



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

# **Synthese von membranpermeablen, chemisch stabilisierten NAADP-Derivaten**

Synthesis of membranpermeable, chemical stabilized NAADP-derivatives

## **Dissertation**

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

von

**Patrick Dekiert**

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

Hamburg 2021

---

---

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 April 2017 bis Mai 2021 angefertigt.

**Erstgutachter:** Prof. Dr. C. Meier

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Dr. A. Guse

Datum der Disputation: 09.07.2021

---

„Sei nicht sauer kleiner Meisenmann, dass du  
den Wurm nicht mit nach Hause nehmen kannst.  
Und mit einer Stimme ganz aus Samt: Ich komm‘  
nämlich vom Finanzamt!“

- Helge Schneider

“You can’t find the right roads  
when the streets are paved.“

- Bob Marley

---

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AB	4-Acyloxybenzyl
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AcOH	Essigsäure
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetyloxymethylester
Äquiv.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
Ar	aromatisch
Bn	Benzyl
BnBr	Benzylbromid
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Kationen
CDCl <sub>3</sub>	Deuteriochloroform
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CSO	(1S)-(+)-(10-Camphorsulfonyl)oxaziridin
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR)
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DBU	Diazabicycloundecen
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCI	Dicyanoimidazol

---

DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMNPE	1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTrCl	4,4-Dimethoxytritylchlorid
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid
EE	Ethylacetat
ESI-HR	<i>electrospray ionization – high resolution</i> (Massenspektrometrie)
Et	Ethyl
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
Fm	Fluorenylmethyl
ges.	gesättigt
h	Stunde
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IR	Infrarot
<i>J</i>	skalare Kern-Kopplungskonstante
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kaliumcarbonat
logP	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
Lsg.	Lösung
m	Multipllett (NMR)
M	Molarität [mol/L]
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minute
MS	Massenspektrometrie

---

MW	Mikrowelle
$\lambda$	Wellenlänge
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborhydrid
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NaH	Natriumhydrid
<i>o</i> -NB	<i>ortho</i> -Nitrobenzylalkohol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NP	Normalphase
<i>o</i> -NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethanol
<i>o</i> -NPP	2-(2-Nitrophenyl)ethyl
p.	<i>page</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCl <sub>3</sub>	Phosphor(III)-chlorid
PE	Petrolether
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph	Phenyl
POCl <sub>3</sub>	Phosphorylchlorid
ppm	parts per million
pK <sub>s</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
q	Quartett (NMR)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
Sdp.	Siedepunkt
SnCl <sub>4</sub>	Zinn(IV)-chlorid
s.S.	siehe Seite
t	Triplett (NMR)
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid

---

TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TES	Triethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPDSi <sub>2</sub> Cl	1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
TMSCl	Trimethylchlorid
TMSI	Trimethylsilyliodid
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat
TREAT-HF	Triethylamintrihydrofluorid
PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphin
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen, Volumenverhältnis
z.B.	zum Beispiel

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Abstract .....	4
3	Einleitung.....	7
4	Kenntnisstand.....	10
4.1	Zellkommunikation .....	10
4.1.1	Sekundäre Botenstoffe.....	12
4.1.2	Ca <sup>2+</sup> -Einstrom durch Ionenkanäle .....	13
4.1.3	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -freisetzende sekundäre Botenstoffe .....	15
4.1.4	Funktion von NAADP .....	20
4.1.5	Mögliche NAADP-spezifische Rezeptoren.....	21
4.1.6	Synthese und Metabolismus von NAADP .....	22
4.1.7	Strukturelevante Merkmale von NAADP .....	25
4.2	Maskierungs-Konzepte an NAADP .....	28
4.2.1	AB-Prodrug-Konzept als bioreversible Maskierung .....	31
4.2.2	Photolabiles Prodrug-Konzept .....	33
5	Aufgabenstellung .....	37
6	Resultate und Diskussion .....	39
6.1	Totalsynthetische Strategie zur Synthese von maskiertem NAADP.....	39
6.2	Synthesestrategie des Adenosin-2',5'-diphosphats .....	43
6.3	Synthese von Adenosin-2',5'-diphosphat.....	46
6.3.1	Bioreversibles Schutzgruppenkonzept am Adenosin-2',5'-diphosphat.....	46
6.3.2	Photolabiles Schutzgruppen-Konzept am Adenosin-2',5'-diphosphat .....	58
6.3.3	Kombiniertes Schutzgruppen-Konzept („Lock-In“-Effekt) .....	78
6.3.4	Synthese des 3'-Desoxy, 3'-fluoro-2',5'-Diphosphatadenosin.....	86

---

6.4	Fazit zur Synthese des Adenosinbausteins.....	97
6.5	Optimierung von der photoaktivierbaren Schutzgruppe .....	98
6.6	Synthesestrategie von maskiertem Nicotinsäurenucleotiden .....	101
6.7	Synthese von maskiertem 2',3'-Acetyl-Nicotinsäurenucleosid.....	105
6.8	Synthese von maskiertem Nicotinsäurenucleosid .....	116
6.9	Fazit zur Synthese des Nicotinsäurebausteins .....	126
6.10	Kupplung zum NAADP .....	127
6.11	Synthese von chemisch stabilisierten Nicotinsäurenucleosiden.....	142
6.11.1	Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäureanalogons .....	144
6.11.2	Synthese des C-nucleosidischen Nicotinamidanalogs .....	155
6.11.3	Synthese des carbocyclischen Nicotinsäureanalogons.....	159
6.12	Synthese des C-nucleosidischen NAADP-Analogons .....	168
6.13	Stabilitätsstudien und Bioassay zur Ca <sup>2+</sup> -freisetzenden Aktivität von dem NAADP-Analogon .....	179
6.14	Fazit und Ausblick zur Synthese des NAADP-Analogons und der Hydrolysestudien. .....	187
7	Experimentalteil .....	192
7.1	Allgemeines .....	192
7.1.1	Lösungsmittel für die Chromatographie .....	192
7.1.2	Absolute Lösungsmittel.....	192
7.1.3	Deuterierte Lösungsmittel .....	193
7.1.4	Verwendete Chemikalien .....	193
7.1.5	Chromatographie .....	194
7.1.6	Spektroskopie.....	195
7.1.7	Geräte.....	196
7.2	Herstellung der Pufferlösungen.....	197

---

7.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	198
7.4	Zusätzliche Synthese von Reagenzien .....	204
7.5	Synthese der Schutzgruppen .....	210
7.6	Synthese des 2',3'-Acetyl Nicotinsäurederivats .....	238
7.7	Synthese des 2',3'-ungeschützten Nicotinsäurederivats .....	248
7.8	Synthese des carbocyclischen Derivats der Nicotinsäure .....	256
7.9	Synthese des C-Nucleosidderivats der Nicotinsäure .....	263
7.10	Synthese des Adenosin-2',5'-diphosphats .....	273
7.11	Synthese des 2',5'-Diphosphat-3'-deoxy-3'-fluoro-adenosins .....	300
7.12	Synthese der NAADP-Derivate .....	309
7.13	Hydrolysestudien .....	315
7.14	Ca <sup>2+</sup> -Imaging .....	316
8	Gefahrstoffverzeichnis .....	318
9	Literaturverzeichnis .....	337
10	Danksagung .....	364
11	Eidesstattliche Erklärung .....	366

### 1 Zusammenfassung

Die Zellkommunikation wird von einer Vielzahl an inter- und intrazellulären Prozessen gesteuert, wobei insbesondere die Verarbeitung von simultan verlaufenden Informationen ubiquitär ermöglicht sein muss. Die Kommunikationsprozesse können auf einer neurotransmitter-vermittelten, ionen-vermittelten elektrischen oder auf einer chemischen Signalgebung beruhen. Ein extrazelluläres chemisches Signal wird infolge von einem spezifischen Rezeptor erkannt und löst anschließend eine Signalkaskade aus. Für die intrazelluläre Signalmodulierung werden in der Folge sekundäre Botenstoffe mobilisiert. Hierbei nehmen intrazelluläre, freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Informationsverarbeitung ein, wobei die Assimilierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch eine Reihe von sekundären Botenstoffen aus der Klasse der Adeninnucleotide, wie cAMP, (c)ADPR oder NAADP, reguliert werden. Als vermeintlich potentester  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender Botenstoff zählt NAADP, wobei dieser seit mittlerweile knapp dreißig Jahren bekannte Botenstoff hinsichtlich seiner physiologischen und pathologischen Involvierung in dem Prozess der  $\text{Ca}^{2+}$ -kontrollierten Signaltransduktion noch unzureichend untersucht ist.

Derweil kommen invasive, technisch sehr anspruchsvolle und zeitintensive Einzelzell-basierte Untersuchungen zur Rolle des NAADPs zum Einsatz, welche durch ein angehobenes Stresslevel der Zellen oftmals zu falsch-positiven Ergebnissen oder Artefakten führen können. Um diese Problematik der Inkohärenz an Ergebnissen und der ineffizienten Einzelzellpräparation umgehen zu können, bietet sich die lipophile Modifikation von NAADP-Derivaten zu membranpermeablen Verbindungen an, welche in der Lage sind, passiv in die Zelle diffundieren zu können. Die Synthese eines membranpermeablen NAADP-Derivats stellt nicht nur eine herausfordernde Aufgabe dar, sondern war bislang zudem nicht erfolgreich (s. Kapitel 4.2).

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Synthese von membranpermeablen NAADP-Derivaten auf einer konvergenten Totalsynthese unter Berücksichtigung der etablierten bioreversiblen und photolabilen Schutzgruppenklassen. Experimentell konnte eine Diffusion von hochpolaren Verbindungen, wie Triphosphaten, mit entsprechender Maskierung und nachfolgender enzymatischer Freisetzung des jeweiligen Nucleotids bereits in der Arbeitsgruppe von MEIER bestätigt werden.

Im Fall des NAADPs schien die bioreversible Maskierung der Carboxylfunktion an der Nicotinsäure und die doppelte bioreversible oder photolabile Maskierung an dem 2'-Phosphat des Adenosins zielführend zu sein. Der synthetische Zugang zur Darstellung vom maskierten Adenosinbaustein konnte im ersten Teil dieser Arbeit realisiert werden. Hierbei wurde ausgehend von Adenosin zunächst selektiv die 2'-Position mit einer maskierten Phosphatgruppe versehen, um anschließend über eine vorangegangene Entschützung der 5'-Position eine Phosphitylierung mit abschließender Oxidation zum maskierten Adenosin-2',5'-diphosphat zu ermöglichen (s. Kapitel 6.3.1). Die hohe Reproduzierbarkeit dieser 5-stufigen Syntheseroute konnte anhand der Variation von verschiedenen Schutzgruppen bewiesen werden. Dabei gelang nicht nur die Optimierung der photolabilen Schutzgruppe mit der Erhöhung der Lipophilie und photolytischen Spaltungsrate unter Verwendung der relativ neuartigen NPP-Schutzgruppe (s. Kapitel 6.3.2), sondern auch die Kombination von bioreversiblen und photolabilen Schutzgruppen für eine gesteigerte Stabilität der photolabilen Schutzgruppe (s. Kapitel 6.3.3). In Bezug auf die photolytischen Eigenschaften konnte mit Hilfe von jeweiligen Photolysen und anschließenden HPLC-Analysen eine sehr schnelle und nebenproduktarme Freisetzung des Adenosinbausteins bestätigt werden. Als besonders interessanter Adenosinbaustein für die NAADP-Synthese ist das 3'-Fluor-Derivat anzusehen, welches in der Lage ist, eine Phosphatmigration verhindern zu können. Die Synthese gelang über 9 Stufen zum bioreversibel und photolabil kombinierten maskierten Derivat (s. Kapitel 6.3.4). Eine weiterführende Optimierung der Eigenschaften von der photolabilen NPP-Schutzgruppe konnte mit der Darstellung von einer Sulfid-verbrückten Schutzgruppe mit „Lock-in“-Eigenschaften realisiert werden (s. Kapitel 6.5).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Syntheseroute für die maskierten Nicotinsäurebausteine sowohl für die  $\beta$ -anomerenrein leichter zugänglichen Acetyl-geschützten Derivate, als auch für Nicotinsäurederivate ohne Acetylschutzgruppe entwickelt. Bei den beiden konvergenten Syntheserouten konnte die Synthese zum jeweiligen Monophosphat in einer jeweils 6-stufigen Synthese realisiert werden, wobei schon an dieser Stelle eine hohe Labilität der *N*-glycosidischen Bindung beobachtet werden konnte (s. Kapitel 6.7/6.8). Der Versuch der darauffolgend durchgeführten Kupplung von einem Adenosinbaustein und einem Nicotinsäurebaustein zum NAADP-Derivat konnte aufgrund der hohen Labilität der maskierten Nicotinsäure nicht erfolgreich durchgeführt werden (s. Kapitel 6.10).

Angesichts der Labilität der Nicotinsäurederivate sind diese als Tool für die NAADP-Synthese nicht qualifiziert; daher wurde alternativ im dritten Teil der Arbeit chemisch stabilisierte Nicotinsäurederivate entwickelt werden. Erfolgreich konnte ein C-nucleosidisches Nicotinsäurederivat mit bioreversibler Maskierung synthetisiert werden; hierfür war eine 8-stufige Synthese ausgehend von der D-Ribose zielführend (s. Kapitel 6.11.1). In Hinblick auf die Synthese des NAADP-Derivats gelang zunächst die Kupplung unter Verwendung der etablierten Methode nach BOGACHEV *et al.* Dabei wurde ausgehend von einem Adenosinbaustein und des C-nucleosidischen Nicotinsäurebausteins ein bioreversibel maskiertes, chemisch stabilisiertes NAADP-Derivat nach abschließender fluorid-vermittelter Entschützung der 3'-TIPDSi<sub>2</sub>-Schutzgruppe erhalten (s. Kapitel 6.12). Zur Validierung der passiven Diffusion und der Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden Aktivität des NAADP-Derivats wurde zudem ein identisch maskiertes, stabilisiertes NADP-Derivat und ein ungeschütztes NAADP-Derivat, als Negativkontrollen, synthetisiert (s. Kapitel 6.11.2). Die enzymatisch induzierte Freisetzung des maskierten NAADP-Derivats wurde in Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase bestätigt, worauf anschließend in biologischen Assays, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von A. GUSE (UKE) durchgeführt wurden, sowohl eine ausgezeichnete Membranpermeabilität, als auch eine unvermittelte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung nachgewiesen werden konnte. Die korrelierenden Ergebnisse zu natürlichem NAADP deuten daraufhin hin, dass die positive Ladung der Nicotinsäure im natürlichem NAADP kein aktivitätrelevantes Merkmal für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung darstellt und vermutlich eine wichtige Rolle im Metabolismus einnimmt (s. Kapitel 6.13). Diese Annahme bleibt aber z.B. mit der Weiterentwicklung der versuchten Synthese des carbocyclischen Nicotinsäurederivats zu bestätigen (s. Kapitel 6.11.3).

Zusammenfassend gelang die Synthese eines reliablen, membranpermeablen NAADP-Derivats, welches ein interessantes Tool für weitergehende Studien zur Rolle des NAADP in der Signaltransduktion darstellt. Als Erweiterung können zukünftig zudem die Zellassay-basierte Verwendung des entwickelten, kombiniert geschützten Adenosinbausteins oder auch das 3'-Fluorderivat, nach Kupplung zum NAADP nach der entwickelten Syntheseroute, angewandt werden.

## 2 Abstract

Cell communication is controlled by a multitude of inter- and intracellular processes. In particular, the processing of simultaneous information must be ubiquitously enabled. The communication processes can be based on neurotransmitter-mediated, ion-mediated electrical or chemical signaling. An extracellular chemical signal is identified as a result of a specific receptor and subsequently triggers a signaling cascade. Secondary messenger substances are subsequently mobilized for intracellular signal modulation. In this context, intracellular, free  $\text{Ca}^{2+}$ -ions play a central role in intracellular information processing. The assimilation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is regulated by a number of secondary messengers from the class of adenine nucleotides, such as cAMP, (c)ADPR or NAADP. NAADP is the supposed most potent  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messenger. Although this messenger is well known for almost thirty years, it has not yet been sufficiently investigated with regard to its physiological and pathological involvement in the process of  $\text{Ca}^{2+}$ -controlled signal transduction.

Meanwhile, invasive, technically very demanding and time-consuming single-cell-based investigations are used to study the role of NAADP, which can often lead to false-positive results or artifacts due to an increased stress level of the cells. To circumvent the problem of incoherence of results and inefficient single cell preparation, the lipophilic modification of NAADP derivatives to membrane-permeable compounds, which are able to passively diffuse into the cell, is a possible option. The synthesis of a membrane-permeable NAADP derivative is not only a challenging task, but has also not been performed successful so far (see chapter 4.2). The aim of this work was to synthesize membrane-permeable NAADP derivatives on a convergent total synthesis considering the established bioreversible and photolabile protecting group classes. Experimentally, a diffusion of highly polar compounds, such as triphosphates, with corresponding masking and subsequent enzymatic release of the respective nucleotide were already be confirmed in the group of MEIER.

In the case of NAADP, bioreversible masking of the carboxyl function on nicotinic acid and double bioreversible or photolabile masking on the 2'-phosphate of adenosine seemed to be productive. The synthetic approach for the preparation of the masked adenosine building block was realized in the first part of this work. Therefore, a masked phosphate group was selectively added to the 2'-position of adenosine in the first place, followed by deprotection of the 5'-position to allow phosphitylation with final oxidation to the masked adenosine 2',5'-

diphosphate (see chapter 6.3.1). The high reproducibility of this 5-step synthesis route was demonstrated by using different protecting groups. Thereby not only the optimization of the photolabile protecting group with the increase of lipophilicity and photolytic cleavage rate using the relatively novel NPP protecting group (see chapter 6.3.2) was successful, but also the combination of bioreversible and photolabile protecting groups for increased stability of the photolabile protecting group (see chapter 6.3.3). With respect to the photolytic properties, a very fast and low by-product formation of the adenosine building block could be confirmed by means of respective photolysis and subsequent HPLC analyses. A particularly interesting adenosine building block for NAADP synthesis is the 3'-fluorine derivative, which is able to prevent phosphate migration. The synthesis succeeded via 9 steps to the bioreversible and photolabile combinant masked derivative (see chapter 6.3.4). A further optimization of the properties of the photolabile NPP protecting group could be realized by the preparation of a sulfide-bridged protecting group with *lock-in* properties (see chapter 6.5).

In the second part of the work, a synthetic route for the masked nicotinic acid building blocks should be developed both for the  $\beta$ -anomerically pure acetyl-protected derivatives, which are more easily accessible, and for nicotinic acid derivatives without an acetyl-protecting group. In the two convergent synthesis routes, the synthesis to the respective monophosphate could be realized in a 6-step synthesis in each case, whereby a high chemical lability of the *N*-glycosidic bond could already be observed at this point (see chapters 6.7/6.8). The subsequent coupling of an adenosine building block and a nicotinic acid building block to the NAADP derivative could not be carried out successfully due to the high lability of the masked nicotinic acid (see chapter 6.10).

Considering the lability of the nicotinic acid derivatives, they are not qualified as a tool for NAADP synthesis. Therefore, chemically stabilized nicotinic acid derivatives should be developed alternatively in the third part of the work. A *C*-nucleoside nicotinic acid derivative with bioreversible masking was successfully synthesized, for which an 8-step synthesis starting from D-ribose was effective (see chapter 6.11.1). With regard to the synthesis of the NAADP derivative, coupling was first achieved using the established method of BOGACHEV *et al.* Starting from an adenosine building block and the *C*-nucleoside nicotinic acid building block, a bioreversibly masked, chemically stabilized NAADP derivative was obtained after final fluoride-mediated deprotection of the 3'-TIPDSi<sub>2</sub> protecting group (see chapter 6.12). In order to

validate the passive diffusion and  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing activity of the NAADP derivative, a identically masked, stabilized NADP derivative and an unprotected NAADP derivative, as negative controls, were synthesized as well (see chapter 6.11.2). The enzymatically induced release of the masked NAADP derivative was confirmed in hydrolysis studies with porcine liver esterase, whereupon in biological assays, which were performed in collaboration with the group of A. GUSE (UKE), both excellent membrane diffusion and fast  $\text{Ca}^{2+}$  release could be confirmed. The correlating results to natural NAADP suggest that the positive charge of nicotinic acid within natural NAADP is not an activity-relevant feature for  $\text{Ca}^{2+}$  release and presumably plays an important role in metabolism, respectively (see chapter 6.13). However, this assumption remains to be confirmed, for example, with the further development of the attempted synthesis of the carbocyclic nicotinic acid derivative (see chapter 6.11.3).

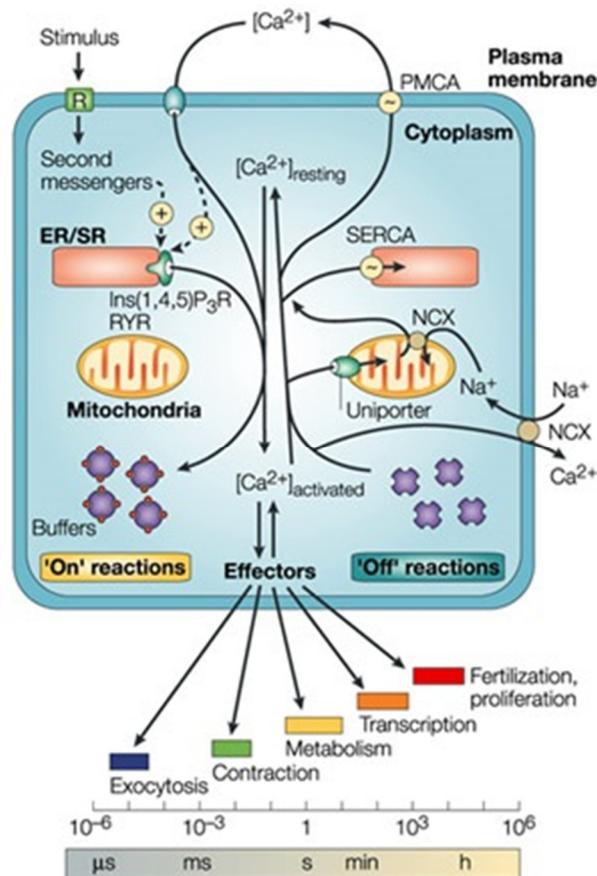
In summary, the synthesis of a reliable, membrane-permeable NAADP derivative was achieved, which represents an interesting tool for further studies on the role of NAADP in signal transduction. As an extension, the cell assay-based use of the developed combined-protected adenosine building block or even the 3'-fluoro derivative, after coupling to NAADP according to the developed synthetic route, can be applied in the future.

### 3 Einleitung

Alle lebenden Organismen besitzen die Eigenschaft, Umweltreize sensorisch zu erfassen, zu verarbeiten und entsprechend darauf zu reagieren. Auf molekularer Ebene stehen den kleinsten lebenden Einheiten eines Organismus, den Zellen, dabei verschiedene Mechanismen zur intrazellulären Kommunikation mit einzigartigen Sensor- und Effektoreigenschaften zur Verfügung.<sup>1</sup> Wirkt beispielweise durch die Bindung eines primären Botenstoffes (z.B. Hormone und Neurotransmitter) an eine membranständige Rezeptordomäne ein extrazellulärer Stimulus auf die Zelle, wird hierdurch ein Signal am Rezeptor ausgelöst. Dieses Signal löst intrazellulär eine Signalkaskade aus, in der das Signal moduliert, bzw. verstärkt und schließlich zum zellulären Effekt als Antwort auf den einwirkenden Stimulus führt.<sup>1,2</sup> Bei dieser sogenannten Signaltransduktion bilden sekundäre Botenstoffe die entscheidende biochemische Komponente zur intrazellulären Weiterleitung des Signals.<sup>1</sup> Viele Signalkaskaden konvergieren bei der Nutzung des divalenten Calcium-Kations ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als zentraler sekundärer Botenstoff, welcher als einer der vielfältigsten Signalgeber den räumlichen und zeitlichen Verlauf vieler wichtiger physiologischer Funktionen reguliert.<sup>3-5</sup>

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]$  ist maßgebend zur Entstehung von spezifischen Prozessen und unterliegt einer exakten Kontrolle. Es herrscht eine hohe Diskrepanz in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen dem extrazellulären Raum und dem Cytosol. Dabei liegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im extrazellulären Raum in einer konstanten, homöostatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ungefähr 1 mM vor, während im Cytosol eine Konzentration im niedrigen nanomolaren Bereich (30 – 200 nM) üblich ist.<sup>6,7</sup> Durch diesen Gradienten und mit Hilfe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher ist beispielsweise durch Aktivierung von entsprechenden Ionenkanälen eine relativ schnelle Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration möglich. Die Konzentration wird in Zellen niedrig gehalten, um so geringe Konzentrationsschwankungen detektieren und durch entsprechende Antworten die Funktionsfähigkeit von Zellen aufrecht erhalten zu können.<sup>2,8</sup> Hierdurch ist die, unter dem Begriff *calcium signaling* (Calcium-Signalübertragung) zusammengefasste, Regulation von verschiedensten zellulären Prozessen möglich, welche von der Geschwindigkeit, Amplitude und der räumlich-zeitlichen Signalgebung durch  $\text{Ca}^{2+}$  abhängen. Das *calcium signaling* kann zu vier elementaren Faktoren zusammengefasst werden: dem  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Stimulus, der Mechanismen zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration,  $\text{Ca}^{2+}$  als sekundärer

Botenstoff zur Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen und der Beendigung des Signals durch Verminderung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels in der Zelle mit Hilfe der Zusammenarbeit von hochspezialisierten Transporterproteinen oder Puffersystemen welche  $\text{Ca}^{2+}$  binden können. Die außerordentlich wichtigen Regulationsmöglichkeiten der Zelle zur dynamischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationszunahme und -abnahme sind schematisch in **Abb.1** dargestellt.<sup>9</sup>



**Abb.1:** Um eine Zell-Zell-Kommunikation zu gewährleisten, stehen den eukaryontischen Zellen verschiedene Regulierungsmöglichkeiten für die dynamische intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Verfügung. Durch einen extrazellulären physiologischen Stimulus wird die Signalkaskade ausgelöst, bei der z.B. die Bildung von sekundären Botenstoffen induziert wird und durch diese eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ausgelöst wird. Das freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  kann nun eine Reihe von Effektoreigenschaften auslösen. Nach erfolgtem Signal wird zum Erreichen des *Status quo ante* die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch verschiedene Ionenpumpen aus der Zelle transportiert, in intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher rückgeführt oder in temporäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Zwischenspeicher, wie den Mitochondrien, gelagert. Verwendet nach freundlicher Genehmigung von Springer Nature.<sup>9</sup>

Sobald die Signalgebung durch das  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt ist, muss die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol wieder auf die Ausgangskonzentration vermindert werden. Zum einen kann dies passiv durch

Ca<sup>2+</sup>-puffernde Proteine, welche Ca<sup>2+</sup> binden, oder zum anderen durch den aktiven Einsatz von Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschern (NCX) und durch die Plasmamembran gebundene Ca<sup>2+</sup>ATPase-Pumpe (PMCA) erfolgen.<sup>2,9</sup> Diese Plasmamembran-gebundenen Kanäle werden durch das elektrochemische Membranpotenzial oder durch Liganden, wie z.B. bei den P2X oder TRPM gesteuert. Eine andere wichtige Möglichkeit liegt in der Rückführung von freiem Ca<sup>2+</sup> in den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher (300 µM - 1 mM Ca<sup>2+</sup>-Konzentration), dem endo-/sarkoplasmatischen Retikulum (SR/ER), welches durch die SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Pumpen (SERCA) bewerkstelligt wird.<sup>2,8,10</sup>

Die hochkomplexe Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern wird wiederum durch die Interaktion mit intrazellulären, sekundären Botenstoffen ausgelöst, welche zuvor durch einen Stimulus gebildet werden können. Zu den bisher beschriebenen Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden sekundären Botenstoffen zählen D-*myo*-Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>), cyclisches Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR), sowie Nicotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP), welche jeweils an spezifische Rezeptoren binden und eine zeitliche Abhängigkeit besitzen. Bei definiertem, glockenförmigem Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsverlauf kann es auch zu einer selbstinduzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch Ca<sup>2+</sup> bei bestimmten Rezeptoren kommen.<sup>11,12</sup>

Infolge des Zusammenwirkens dieser Mechanismen ist eine schnelle Regulierung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gewährleistet, wodurch verschiedenste zelluläre Prozesse mittels dynamischer, binärer Kodierung auch gleichzeitig übermittelt werden können. Die Dynamik dieser Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt über schnelle Konzentrationsoszillationen im Mikrosekundenbereich bis zu einem langsamen, globalen, kontinuierlichen Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Stundenbereich.<sup>8,13,14</sup>

## 4 Kenntnisstand

### 4.1 Zellkommunikation

Eine essenzielle Eigenschaft von Organismen ist die Kommunikation untereinander, also die Übertragung oder der Austausch von Informationen. Als Werkzeuge zur Informationsübertragung stehen der Zelle primäre Botenstoffe, wie Hormone, diffusionsfähige Substanzen im interzellulären Raum, wie Neurotransmitter, zellgebundene Oberflächenmoleküle oder direkter Informationsaustausch über elektrisch-gekoppelte Zellen, zur Verfügung. Die primären Botenstoffe werden als Reaktion auf einen äußeren Reiz synthetisiert.<sup>2,15</sup> Hierbei gibt es unterschiedliche Freisetzungswege, zum einen der endokrine Weg, bei dem die primären Botenstoffe in spezifischen Organen oder Gewebe gebildet werden. Des Weiteren wird der parakrine Weg, bei dem durch Zellen synthetisierte Botenstoffe interzellulär diffundieren oder der autokrine Weg verwendet, bei dem die Zelle Botenstoffe für die intrazelluläre Kommunikation synthetisiert.<sup>2,8</sup>

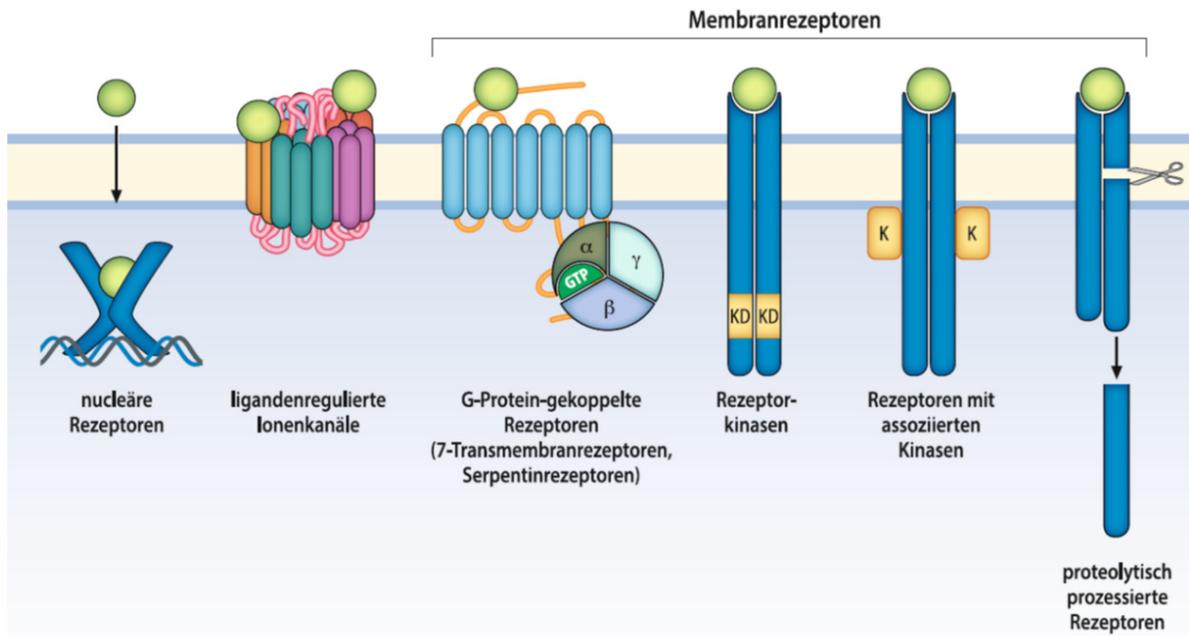
Bis auf einige hydrophobe Signalmoleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Steroide, welche in der Lage sind, passiv direkt in die Zelle zu diffundieren, ist die Vielzahl der komplexen Signalmoleküle durch ihre hydrophilen Eigenschaften begrenzt und können nicht eigenständig durch die Doppellipidschicht diffundieren, weshalb weitere Transduktionsmechanismen nötig sind. Die Signalkaskade beginnt im Allgemeinen mit der Interaktion der Signalmoleküle mit Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche, welche dann das Signal ins Zellinnere weiterleiten und dort intrazellulär den gewünschten Effekt auslöst.<sup>2,8</sup>

Zur Transduktion des externen Signals in das Zellinnere gibt es mehrere Arten von Zelloberflächenrezeptoren. Zu einer dieser Rezeptorgruppen gehören die **Cytokin-Rezeptoren**, welche spezifisch Cytokin binden. Cytokine sind kleine lösliche Polypeptide, welche das Wachstum von Zellen und deren Differenzierung regulieren. Sobald ein Cytokin an einen Rezeptor der vielfältigen Gruppe der Cytokin-Rezeptoren bindet, wird die Januskinase (JAK) Tyrosin-Kinase aktiviert, welche wiederum eine Phosphorylierung der cytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren STATs (*signal transducers and activators of transcription*) induziert, wodurch eine Dimerisierung ausgelöst wird. Dies initiiert nun die Gen-Transkription.<sup>2,16</sup>

Eine weitere wichtige Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren sind die **Tyrosinkinase-Rezeptoren** (RYKs). Bei dieser Rezeptorfamilie dienen in der Regel Wachstumsfaktoren als externe Signalgeber. Sobald diese an den Rezeptor binden, wird eine Dimerisierung ausgelöst, welche die intrazelluläre Domäne, die Tyrosinkinase, aktiviert. Die Tyrosinkinase autophosphoryliert zunächst die Tyrosinreste des Rezeptors, welche daraufhin Bindungsstellen für Signalproteine bilden und diese somit aktivieren. Diese sind dann in der Lage, intrazellulär eine Signalübertragung durch Enzyme und Transkriptionsfaktoren zu bewirken.<sup>2,16</sup>

**G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren** (GPCRs) bilden die dritte und größte Gruppe membranständiger Rezeptoren. Diese Rezeptorklasse, bestehend aus sieben transmembranständigen Helices, ist für die Übermittlung von einer Vielzahl von Signalgebern (z.B. Neurotransmitter, Duftstoffe, Geschmacksstoffe oder Photonen) verantwortlich. Bindet ein Ligand an der extrazellulären Seite des Rezeptors kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch in der cytoplasmatischen Rezeptordomäne ein G-Protein (Guanylnucleotide-Protein) aktiviert wird.<sup>16,17</sup> Bei der Aktivierung handelt es sich um einen katalysierten Austausch von gebundenem GDP zu GTP. Zeitgleich löst sich die  $\alpha$ -Untereinheit von dem  $\beta\gamma$ -Dimer und löst so das zu übermittelnde Signal intrazellulär aus. Durch die relativ träge Hydrolyse von GTP zurück zu GDP und  $P_i$  wird der Rezeptor und seine Konformation wieder in den Ausgangszustand versetzt.<sup>18</sup>

Die vierte wichtige Rezeptorklasse bilden die **ligandengesteuerten Ionenkanäle** (LGICs), welche eine wichtige Rolle bei schnellen synaptischen Übertragungen, sowie bei der Modulation von zellulären Prozessen, einnehmen. Sobald der Agonist, meist ein Neurotransmitter, an den Rezeptor bindet, bewirkt dies eine Konformationsänderung und es wird das Membranpotential innerhalb von Mikrosekunden de- oder hyperpolarisiert.<sup>16</sup> Dies geschieht in Abhängigkeit der Richtung des anschließenden Ionenflusses von z.B.  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  oder  $Cl^-$ . Die LGICs werden in drei Klassen eingeteilt. Zum einen in die P2X-Rezeptorklasse, welche durch ATP aktiviert werden und des weiteren in die Cys-Loop-Rezeptorklasse, sowie die ionotropischen Glutamat-aktivierten-Rezeptorklasse.<sup>2,19</sup> Zusätzlich ist die Klasse der LGICs auch im intrazellulären Raum von großer Bedeutung, worauf im späteren Verlauf näher eingegangen wird.<sup>20</sup> In **Abb.2** sind die verschiedenen Rezeptorklassen zur interzellulären Kommunikation abgebildet.



**Abb.2:** Schematische Darstellung der verschiedenen Rezeptorklassen zur Zellkommunikation auf der Zelloberfläche. Verwendet nach freundlicher Genehmigung von Springer. <sup>2</sup>

Die letzte Variante der Signaltransduktion in den intrazellulären Raum besteht, wie schon zuvor beschrieben, in der passiven Diffusion aufgrund von lipophilen Eigenschaften einiger Moleküle. Im intrazellulären Raum binden diese an nucleäre Rezeptoren und unterdrücken, bzw. fördern so die Gentranskription.<sup>2,16</sup>

Durch die Bindung von Agonisten an einen Rezeptor der beschriebenen Rezeptorklassen wird die intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, bei der das Signal oft amplifiziert wird. Wichtige Zwischenstufen der Signalkaskade bilden die sekundären Botenstoffe.

#### 4.1.1 Sekundäre Botenstoffe

Sekundäre Botenstoffe sind im Allgemeinen kleine Moleküle, welche der Zelle ermöglichen, das primäre extrazelluläre Signal intrazellulär zu verarbeiten. Hierfür kann die Zelle die Konzentration von sogenannten sekundären Botenstoffen verändern, ausgelöst durch die Bildung von Rezeptor-Ligand-Komplexen.<sup>3</sup> Dieses zusätzliche Instrument ermöglicht der Zelle sehr schwache Signale mit geringer Konzentration zu verstärken, da jeder aktivierte Rezeptor eine Freisetzung von vielen sekundären Botenstoffen zur Folge haben kann. Diese sekundären Botenstoffe, zu denen z.B. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat), IP<sub>3</sub>, cADPR oder auch Ca<sup>2+</sup> gehören, besitzen die Eigenschaft, in andere

Zellkompartimente diffundieren zu können und so ein globales intrazelluläres Signal zu erzeugen. Hierbei kann es zum sogenannten *cross talk* kommen, also zu Überkreuzungen von Signalen bei der Verwendung der Zelle von gleichen sekundären Botenstoffen für unterschiedliche Signaltransduktionswege. Durch diese Besonderheit ist eine genauere Steuerung der Signale möglich, kann aber auch zu Fehlinterpretationen der zum Teil sehr geringen Konzentrationsänderungen führen.<sup>2,8</sup>

Als einer der zentralen universellen sekundären Botenstoffe zur Zellkommunikation fungieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen. Dabei bildet es unter den sekundären Botenstoffen eine Ausnahme, da es als metallisches Ion nicht enzymatisch gebildet oder abgebaut wird. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ist dabei in der Lage, sechs bis acht Sauerstoffatome koordinativ zu binden und so erkennbare Konformationsänderungen bei Proteinen, wie z.B. dem regulatorischen Protein Calmodulin (CaM), hervorrufen zu können.<sup>9</sup> Bei dem als *calcium signaling* bezeichneten System dient  $\text{Ca}^{2+}$  als Wandler von extrazellulären Signalen in intrazelluläre Signale und reguliert einige zu wertend wichtige physiologische Prozesse, wie z.B. Signalübertragung bei Nerven, Herzkontraktilität, Blutgerinnung, Knochenbildung, Zelladhäsion, Enzymaktivität, Muskelkontraktion, Apoptose, Proliferation und Zellkommunikation.<sup>21</sup> Dabei hängen einige Prozesse direkt mit der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie z.B. bei der Blutgerinnung, zusammen, wobei andere Prozesse wiederum mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zusammenhängen.<sup>22</sup>

Zur exakten Steuerung der periodisch verlaufenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsschwankung verschiedener simultan ablaufender Prozesse und der damit einhergehenden Steuerung von Frequenz, Amplitude und räumlicher Ausdehnung der Konzentrationsoszillationen, bedient sich die Zelle unterschiedlicher Mechanismen.<sup>3</sup> Zur Einstellung der durch den jeweiligen Signaltransduktionsweg induzierten Amplitude und der räumlich-zeitlich abhängigen Konzentration kann aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern oder durch den Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Cytosol, entsprechend reguliert werden.<sup>22</sup>

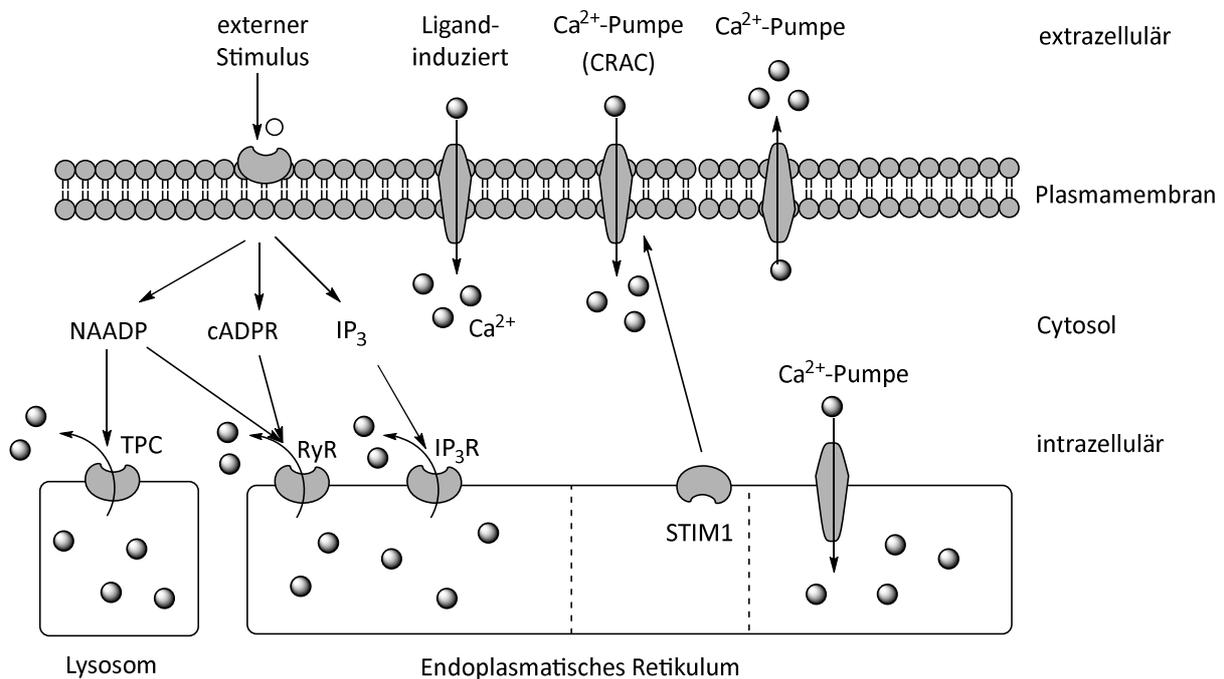
### 4.1.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Ionenkanäle

Die Permeabilität des geladenen  $\text{Ca}^{2+}$  vom extrazellulären Raum ins Cytosol wird durch zwei Klassen an Ionenkanäle reguliert, den **spannungsabhängigen Calciumkanälen** (VGCC) oder den **ligandgesteuerten Calciumkanälen**. Die sehr gut untersuchten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden durch eine transiente Depolarisierung des Membranpotentials aktiviert

und geöffnet, so dass durch den großen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten zwischen extrazellulären und intrazellulären Raum dieses leicht in das Cytosol strömen kann.<sup>23</sup>

Die ligandgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle reagieren auf spezifische Agonisten, wie z.B. die P2X-Kanäle, welche durch extrazelluläres ATP einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bewirken oder der ADPR-aktivierbare TRPM2-Kanal.<sup>19,24</sup>

Der Einstrom aus dem extrazellulären Raum ist für eine langanhaltende Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verantwortlich, wobei der extrazelluläre Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  oft die Folge von der schnellen Depletion aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern ist, um die zellulären Speicher wiederzubefüllen.<sup>25</sup> Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Wiederherstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird als speicher vermittelt  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (SOCE, *store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) bezeichnet.<sup>26,27</sup> In **Abb.3** sind die molekularen Mechanismen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion dargestellt, wobei durch die Beeinflussung der verschiedenen Mechanismen eine Oszillation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgelöst wird. Der speicher vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Cytosol wird hierbei durch Depletion von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum, ER), welches durch sekundäre Botenstoffe induziert wird, ausgelöst.<sup>9</sup>



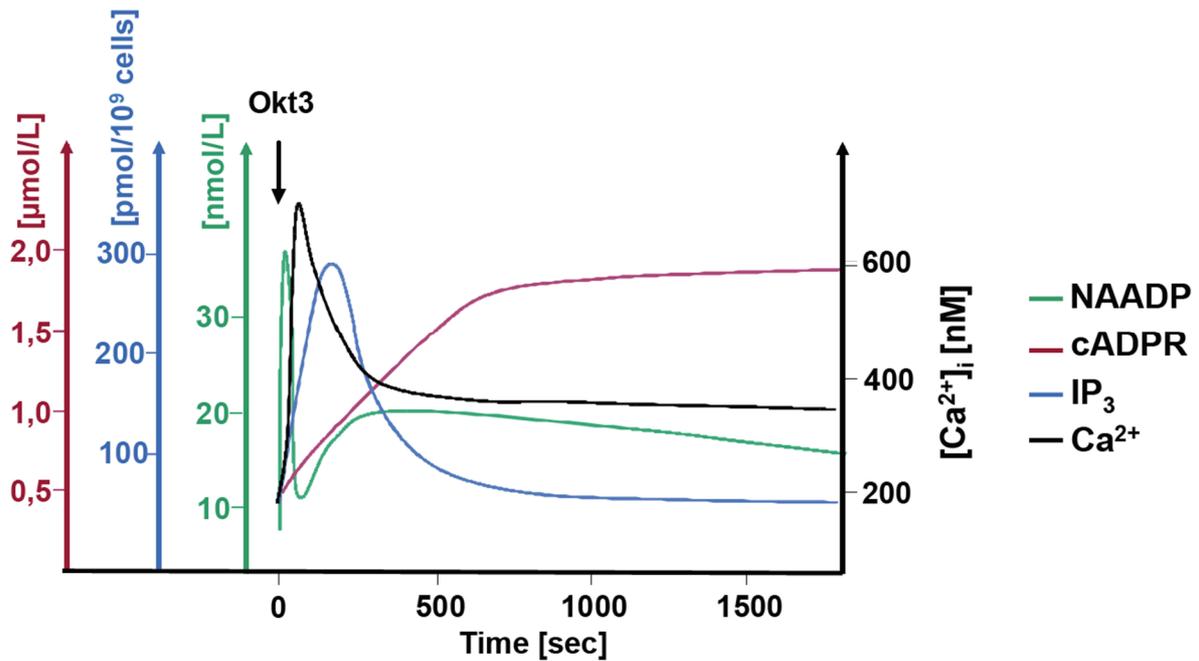
**Abb.3:** Mechanistische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$ , cADPR und NAADP. Über einen extrazellulären Stimulus werden die sekundären Botenstoffe gebildet. Die Botenstoffe sorgen anschließend für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER, bzw. den Lysosomen. Sobald es zu einer Reservoirentleerung gekommen ist, wird durch das *stomal interaction molecule 1* (STIM1), eine spezielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (*Ca<sup>2+</sup> release activated Ca<sup>2+</sup> channel*, CRAC), aktiviert. Zusätzlich können ligandgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -

Kanäle in den Membranen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflussen. Zum Entfernen des freien  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol dienen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen, wie SERCA oder PMCA.<sup>28,29</sup>

Der speichervermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird genauer durch die Aktivierung des ER-ständigen Proteins STIM1 hervorgerufen, welches vermutlich an das membranständige Tetramer aus ORAI1 bindet und so den  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanal bildet und den Einstrom aus dem extrazellulären Raum ermöglicht.<sup>28,29</sup>

### 4.1.3 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende sekundäre Botenstoffe

Im *calcium signaling* nehmen die sekundären Botenstoffe  $\text{IP}_3$ , cADPR, sowie NAADP eine essentielle Rolle ein, da diese wie zuvor beschrieben die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum oder dem sarkoplasmatischen Retikulum über spezifische Rezeptoren vermitteln.<sup>12,30</sup> Eine weitere Möglichkeit besteht allerdings auch darin, dass  $\text{Ca}^{2+}$  selbst eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR, *calcium induced calcium release*) vermittelt.<sup>31</sup> Der CICR-Mechanismus kann hierbei auch für eine wellenartige Signalweitergabe der Kanalöffnung verantwortlich sein, was von einem lokalen Signal zu einem globalen Signal führt.<sup>32</sup> Es wird zum einen vermutet, dass der CICR-Mechanismus durch Ryanodin-Rezeptoren (RyRs), mittels Phosphorylierung des Rezeptors durch cAMP-abhängige Proteinkinase, ausgelöst wird.<sup>33</sup> Zum anderen sind  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren für das CICR verantwortlich, für dessen Aktivierung aber sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ , als auch  $\text{IP}_3$  vorhanden sein müssen.<sup>34</sup> Die unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden sekundären Botenstoffe haben eine in **Abb.4** dargestellte zeitlich abhängige Konzentration und Verweildauer. Diese wurden mittels Stimulation von T-Lymphozyten durch  $\alpha$ -CD3-Antikörper OKT3 ermittelt.



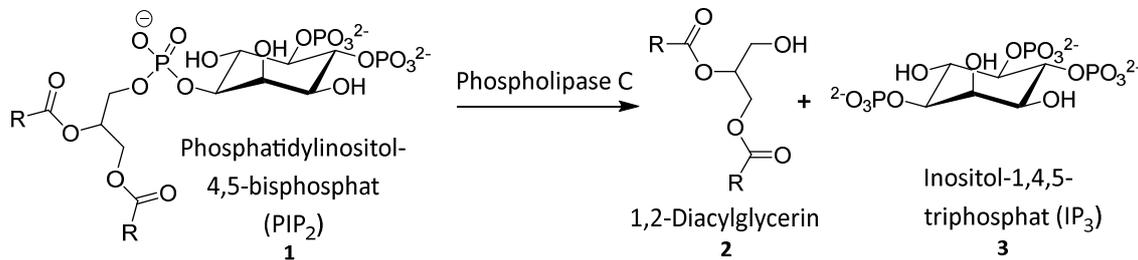
**Abb.4:** *in vitro* simulierter Konzentrationsverlauf der verschiedenen sekundären Botenstoffe nach Stimulation. Es ist die zeitliche Abhängigkeit der Botenstoffkonzentration dargestellt. Verwendet nach freundlicher Genehmigung durch Björn-Philipp Diercks.<sup>13,14,35</sup>

Der Konzentrationsverlauf kann so gedeutet werden, dass das NAADP zunächst eine Sensibilisierungsfunktion für die RyR- und IP<sub>3</sub>-Rezeptoren besitzt, indem es sehr schnell lokale Ca<sup>2+</sup>-Signale auslöst.<sup>14,36</sup> Daraufhin wird im weiteren Verlauf die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung durch IP<sub>3</sub> und cADPR aktiviert, woraufhin die Ca<sup>2+</sup>-Speicher wieder durch extrazellulär einströmendes Ca<sup>2+</sup> aufgefüllt werden.<sup>37,38</sup> Außerdem konnte beobachtet werden, dass die cADPR-Konzentration langsam ansteigt und so wahrscheinlich für ein langanhaltendes globales Ca<sup>2+</sup>-Signal verantwortlich ist.<sup>13</sup>

#### 4.1.3.1 D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>)

Ein wichtiger Vertreter und der zugleich am besten untersuchte Ca<sup>2+</sup>-freisetzende sekundäre Botenstoff ist das IP<sub>3</sub>. Die erste Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung konnte im Jahr 1983 durch STREB *et al.* in permeabilisierten Azinuszellen des Pankreas gezeigt werden.<sup>39</sup> Um eine Ca<sup>2+</sup>-Freigabe zu ermöglichen, wird das IP<sub>3</sub> zunächst durch eine Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, bzw. durch eine Aktivierung der Tyrosinkinase, generiert.<sup>40</sup> Über beide Wege wird ATP gebunden. Hierdurch wird Phospholipase C aktiviert und das Membranphospholipid

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat **1** wird enzymatisch zu den beiden Verbindungen Diacylglycerol **2** und IP<sub>3</sub> **3** hydrolysiert, wie in **Abb.5** dargestellt.<sup>40,41</sup>



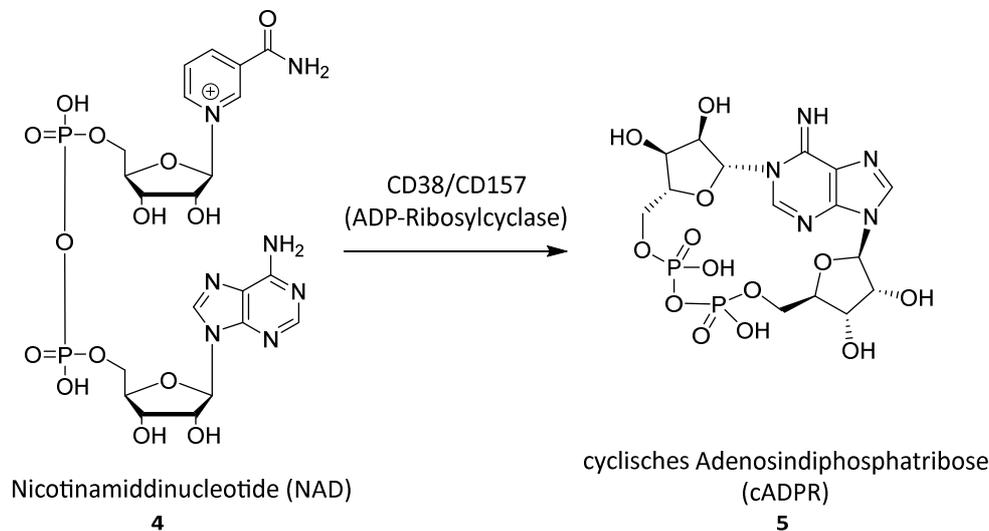
**Abb.5:** Enzymatische Abspaltung des IP<sub>3</sub> **3** von dem membrangebundenen Lipid **1**.

Das Diacylglycerol **2** bleibt in der Membran verankert, wobei das IP<sub>3</sub> durch das Cytosol zum IP<sub>3</sub>-Rezeptor auf dem ER/SR diffundieren kann.<sup>40,42</sup> Insbesondere bei der Aktivierung von Lymphozyten spielt IP<sub>3</sub> eine bedeutende Rolle.<sup>43</sup> Das IP<sub>3</sub> besitzt die Eigenschaft Ca<sup>2+</sup> sehr schnell aus dem intrazellulären Speicher freizusetzen, hat aber lediglich eine kurze Verweildauer in der Zelle, bevor es enzymatisch phosphoryliert bzw. dephosphoryliert wird. Eine Phosphorylierung durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Phosphoinositid-3-Kinase zum Inositol(1,3,4,5)P<sub>4</sub> führt zu einer Bindung der phosphorylierten Verbindung an ein spezifisches GTPase-aktiviertes Protein, welches für eine weitere Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung verantwortlich ist.<sup>44–46</sup> Eine Dephosphorylierung durch die IP<sub>3</sub>-5-Phosphatase führt hingegen zum Inositol-1,4-bisphosphat und zu einer Deaktivierung.

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

Wenige Jahre später wurde ein weiterer universeller Ca<sup>2+</sup>-freisetzender Botenstoff entdeckt. Die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung der cyclischen Adenosindiphosphat-ribose wurde im Jahr 1987 von LEE *et al.* zunächst in Seeigeleiern, durch die Verwendung von Pyridinium-basierter Nucleotidmetaboliten aus denen cADPR gebildet werden kann, beobachtet.<sup>47</sup> Bei gleichzeitiger Unterdrückung von IP<sub>3</sub> und Injektion von NAD und NADP konnte nach kurzer Verzögerung ein Ca<sup>2+</sup>-Signal beobachtet werden. Vorgeschlagen wurde, dass NAD zunächst in eine aktive Form überführt wird.<sup>47</sup> Der cADPR-Signalweg wird dabei durch den membranständigen Rezeptor TRMP2 induziert mit Hilfe der Bindung von ADPR, dadurch wird eine enzymatische Umwandlung von NAD **4** zu cADPR **5** durch eine ADP-Ribosylcyclase vermittelt.<sup>48</sup> Postuliert wurde eine

cADPR-Synthese mit Hilfe des membrangebundenen Enzyms CD38 und/oder der Isoform CD157.<sup>49,50</sup> Die intrazelluläre Synthese des cADPR ist in **Abb.6** dargestellt.



**Abb.6:** Postulierte enzymatische Synthese des cADPR **5** aus NAD **4**.

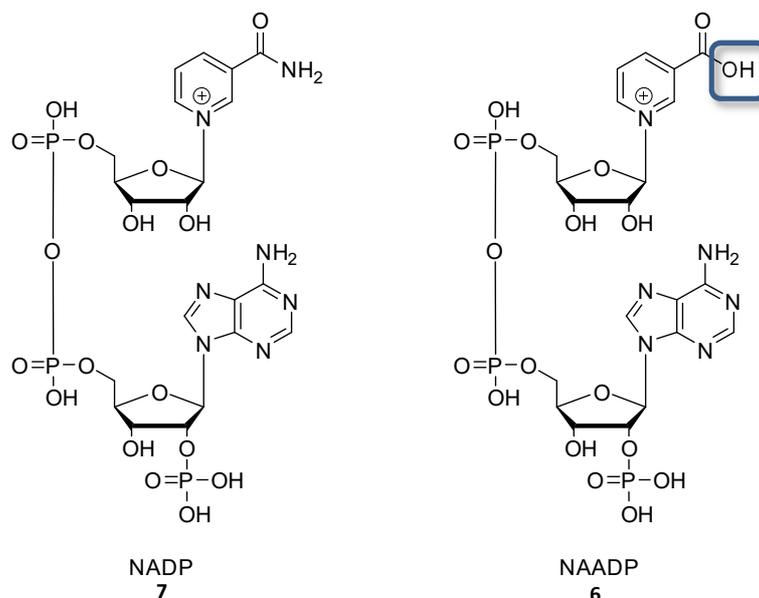
In Frage kommen aber auch weitere ADP-Ribosylcyclasen, da CD38-negative Mäuse weiterhin in der Lage waren, cADPR zu bilden.<sup>51</sup> Es wird aber davon ausgegangen, dass den ADP-Ribosylcyclasen eine bedeutende Rolle im *calcium signaling* zukommt, da es auch die Bildung von weiteren Ca<sup>2+</sup>-freisetzender Botenstoffe katalysieren kann, wie dem 2-Phospho-cADPR, dem acyclischem ADPR und NAADP. Problematisch hierbei ist die extrazelluläre Lage, bzw. die intrazelluläre Lage des CD38 in Organellen, wodurch eine passive Diffusion des NAD zum Wirkort hinderlich erscheint und vermutlich ein aktives Transportsystem verwendet oder das katalytisch aktive Zentrum des Ektoenzym CD38 internalisiert wird.<sup>52,53</sup>

Die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung des cADPR wird, anders als bei dem IP<sub>3</sub>, vermutlich durch die direkte Bindung an den RyR oder einer vorangegangenen Bildung eines Ligand-Proteinkomplexes und anschließender Bindung an den Rezeptor auf dem ER/SR vermittelt.<sup>54–57</sup> Für eine indirekte Vermittlung des cADPR spricht der langsam ansteigende, langanhaltende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel.<sup>13</sup> Eine Inhibition des IP<sub>3</sub>-Rezeptors, durch den Antagonisten Heparin, führte nicht zu einer Hinderung der cADPR-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung. Wohingegen der Einsatz eines cADPR-Antagonisten (Rutheniumrot, 8-Br-cADPR/8-NH<sub>2</sub>-cADPR), die IP<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung nicht beeinflusst.<sup>58–62</sup> Somit müssen zwei unterschiedliche

Freisetzungsmechanismen genutzt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass cADPR nicht nur eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung besitzt, sondern durch Beteiligung an dem CICR-Mechanismus auch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal modulieren und verlängern kann.<sup>13,63</sup> In diesem Zusammenhang sorgt cADPR für eine Sensitivierung des RyR für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in den unteren mikromolaren Bereich.<sup>64</sup> Dem cADPR kommt vermutlich eine untergeordnete, regulatorische Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu.<sup>58</sup>

#### 4.1.3.3 Nicotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP)

Der im Jahr 1987 von CLAPPER *et al.* entdeckte Botenstoff Nicotinsäureadeninucleotidphosphat ist der bislang potenteste  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Botenstoff, wobei die genaue Struktur erst von CHINI *et al.* im Jahr 1995 publiziert wurde.<sup>11,65,66</sup> Zunächst wurde fälschlicherweise angenommen, dass die Injektion von NADP zu dem signifikanten Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führte. Später stellte sich heraus, dass eine Kontamination des NADP mit dem Botenstoff NAADP zu dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg geführt hat. Diese falsche Annahme beruht auf dem marginalen, aber ausschlaggebenden, Unterschied einer Nicotinsäure mit Hydroxylgruppe bei dem in **Abb.7** dargestellten NAADP **6**, im Gegensatz zum Nicotinamid mit Carboxamidgruppe an der 3'-Position des Pyridiniumrings von NADP **7**. Dieser Unterschied konnte erst massenspektrometrisch festgestellt werden.<sup>11,66</sup>



**Abb.7:** Strukturformel von NAADP **6** und NADP **7** mit dem strukturelevanten Unterschied der Hydroxyfunktion (blau).

Anders als die zuvor beschriebenen Botenstoffe setzt NAADP schon in Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich ( $IC_{50} \approx 10 - 100 \text{ nM}$ ) über andere als die für cADPR und  $IP_3$  beschriebenen Mechanismen  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern frei.<sup>65,67,68</sup>

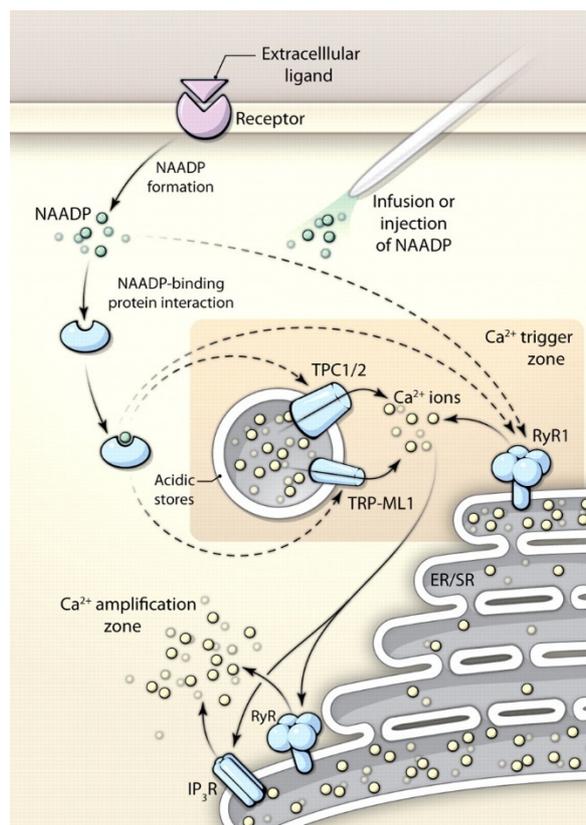
### 4.1.4 Funktion von NAADP

Der glockenförmige Konzentrationsverlauf von  $Ca^{2+}$ , induziert durch NAADP, konnte in Seeigeleiern und T-Lymphozyten dargelegt werden.<sup>11,36,68</sup> Eine Injektion von 30 nM NAADP führt zu einem lokalen, subzellulären  $Ca^{2+}$ -Signal, wohingegen eine Injektion von 50 – 100 nM ein globales, über die gesamte Zelle ausgedehntes Signal erzeugt.<sup>67</sup> Vermutlich nimmt NAADP eine synergistische Rolle unter den Botenstoffen ein, da z.B. eine sehr hohe injizierte NAADP-Menge zu einer Deaktivierung der cADPR und  $IP_3$ -Signalwege führt und konträr eine Inhibition der RyR und  $IP_3$ -Rezeptoren keine globale  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP zur Folge hat.<sup>68,69</sup> Zur Begründung dieser Abhängigkeit wird die Hypothese aufgeführt, dass das NAADP als *Trigger* fungiert und durch ein kleines, lokalbegrenztes Signal die RyR und  $IP_3$ -Rezeptoren sensibilisiert und hierdurch ein globales  $Ca^{2+}$ -Signal initialisiert wird (CICR-System).<sup>12,70,71</sup> Diese Annahme wird durch den bereits in **Abb.4** gezeigten Konzentrationsverlauf untermauert, da zunächst die NAADP-Konzentration sehr schnell ansteigt und anschließend die Konzentrationen von cADPR und  $IP_3$  verzögert steigen.<sup>72</sup> Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass NAADP in der Lage ist, in geringen Mengen  $Ca^{2+}$  freizusetzen, nachdem das endoplasmatische Retikulum als  $Ca^{2+}$ -Speicher entleert wurde. Dabei erfolgte die Inhibition von  $Ca^{2+}$ -ATPase-Pumpen (SERCA) mit Hilfe von Thapsigargin.<sup>73,74</sup> Als alternativen  $Ca^{2+}$ -Speicher werden die subzellulären sauren Lysosom-ähnlichen Organellen vermutet.<sup>75–78</sup>

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die extrazelluläre Zugabe von dem hochpolaren NAADP ebenfalls ein  $Ca^{2+}$ -Signal induzieren kann. Da eine passive Diffusion als ausgeschlossen gilt, wurde der membrangebundene Purinrezeptor  $P2Y_{11}$  vorgeschlagen, welcher mit Hilfe einer Signalkaskade  $Ca^{2+}$  aus dem ER freisetzen kann.<sup>79,80</sup> NAADP ist in der Lage auch weitere Purinrezeptoren zu aktivieren und nimmt somit eventuell auch eine Rolle als, auf das Immunsystem regulatorisch wirkender, parakriner Botenstoff ein.<sup>81</sup> Dass NAADP an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt ist, gilt als bewiesen, wobei aber nicht der direkte Einfluss aufgeklärt ist.

#### 4.1.5 Mögliche NAADP-spezifische Rezeptoren

Die NAADP-spezifischen Rezeptoren sind bislang noch nicht endgültig aufgeklärt. Das NAADP nimmt grundsätzlich eine essentielle Rolle im Signaltransduktionssystem ein, da z.B. eine Inaktivierung von NAADP in T-Lymphozyten gleichwohl eine Inaktivierung der cADPR- und IP<sub>3</sub>-Signalwege bedeutet und konträr eine Blockierung der IP<sub>3</sub> und cADPR-Signalwege durch entsprechende Antagonisten die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung nicht beeinflusst.<sup>11,66</sup> Aufgrund von etlichen Untersuchungen wird inzwischen davon ausgegangen, dass zum einen die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, vermittelt durch NAADP, über einen differenzierbaren Weg aus einer Interaktion mit dem RyR und zum anderen durch eine Interaktion mit den *two pore channel*-Rezeptoren (TPC) auf den lysomalen Kompartimenten ausgelöst wird.<sup>11,75,78</sup> Wobei in humanen T-Lymphozyten nach der Inhibition des RyR keine globale Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung beobachtet werden konnte und die RyRs auf dem ER somit unerlässlich für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung sind.<sup>82-84</sup> In **Abb.8** sind die hypothetischen Signalwege des NAADP dargestellt.



**Abb.8:** Schematische Darstellung der möglichen NAADP-Signalwege. Als möglich gilt die direkte, sowie die indirekte Bindung an den RyR oder den TPC, wodurch eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung initiiert wird und die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus weiteren Ca<sup>2+</sup>-Speichern oder durch weitere Rezeptoren ermöglicht wird. Abgebildet unter Verwendung des Copyright<sup>©</sup> durch AAAS.<sup>85</sup>

Inzwischen haben sich zwei Erklärungsansätze herausgebildet: zum einen das Zwei-Speicher-Modell, bei dem das NAADP als Initiator  $\text{Ca}^{2+}$  durch TPCs aus den lysosomalen Kompartimenten freisetzt und daraufhin das Signal durch weiterführende Mechanismen amplifiziert wird.<sup>11,60,66</sup> Gestützt wird dieses Modell durch das Experiment von LEE *et al.*<sup>86</sup> Hier wurden, mit Hilfe von Lichteinwirkung, photospaltbar-geschützte sekundäre Botenstoffe aktiviert und anschließend beobachtet, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung des NAADP, anders als bei  $\text{IP}_3$  oder cADPR, distanziert zum Nucleus induziert wird.<sup>69</sup> Für dieses Modell spricht außerdem, dass bei Verwendung von Glycylphenylalanin-2-naphthylamid (GPN), einem Substrat für die lysosomale Exopeptidase zur hypotonen Lyse, eine signifikante Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch NAADP beobachtet werden konnte, im Gegensatz zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  mittels photoaktivierbarem NAADP.<sup>87,88</sup>

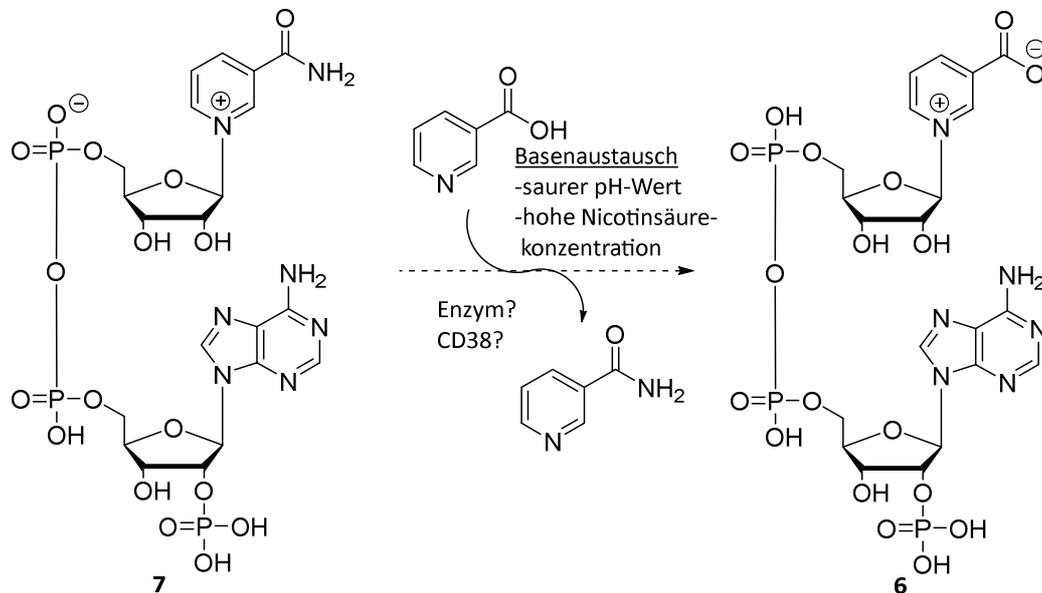
Zum anderen wird das Ein-Speicher-Modell zur Erklärung herangezogen, bei dem als Initiator  $\text{Ca}^{2+}$  durch NAADP über einen RyR freigesetzt wird und das Signal anschließend über nahegelegene  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren oder RyRs amplifiziert wird.<sup>67,83,89</sup> Ungeklärt ist dabei, ob NAADP direkt oder erst nach Interaktion mit einem Bindeprotein an die Rezeptoren bindet. Je nachdem um welches Zellsystem es sich handelt, werden die RyRs oder TPC-Rezeptoren unterschiedlich exprimiert und eine eindeutige Erklärung über diese beiden Systeme wird problematischer. Vermutlich können die NAADP-Freisetzungsmechanismen eher mittels *Cross-Talks*, unter Berücksichtigung und Kombination von verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern, erklärt werden.<sup>70</sup>

Durch die von NAADP lokal initiierte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ , unabhängig von  $\text{IP}_3$  und cADPR und der danach folgenden Freisetzungskaskade, wird NAADP als Schrittmacher der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalinformationswege bezeichnet.<sup>90</sup>

### 4.1.6 Synthese und Metabolismus von NAADP

Eine weitere ungeklärte Komponente ist der enzymatisch regulierte Syntheseweg von NAADP und dessen Abbau. Der sehr schnelle Anstieg und das darauffolgende, innerhalb von wenigen Sekunden, Zurückfallen auf das Ruhenniveau der intrazellulären NAADP-Konzentration, setzt eine effiziente, präzise Enzymkaskade voraus.<sup>14,37,72</sup> Hypothetisch kommen unterschiedliche Mechanismen in Frage, wie die Oxidation von NAADPH, die Phosphorylierung von NAAD, die Deamidierung von NADP oder eine Basenaustauschreaktion.<sup>66,91,92</sup> Relevant für die Synthese scheint die ADP-Ribosylcyclase zu sein, welche auch für die Cyclisierung von NAD zu cADPR

verantwortlich ist. Das Enzym ist in der Lage, eine Basenaustauschreaktion an NADP **7** von Nicotinamid zu NAADP **6** mit Nicotinsäure zu katalysieren, wie in **Abb.9** dargestellt.<sup>93</sup>

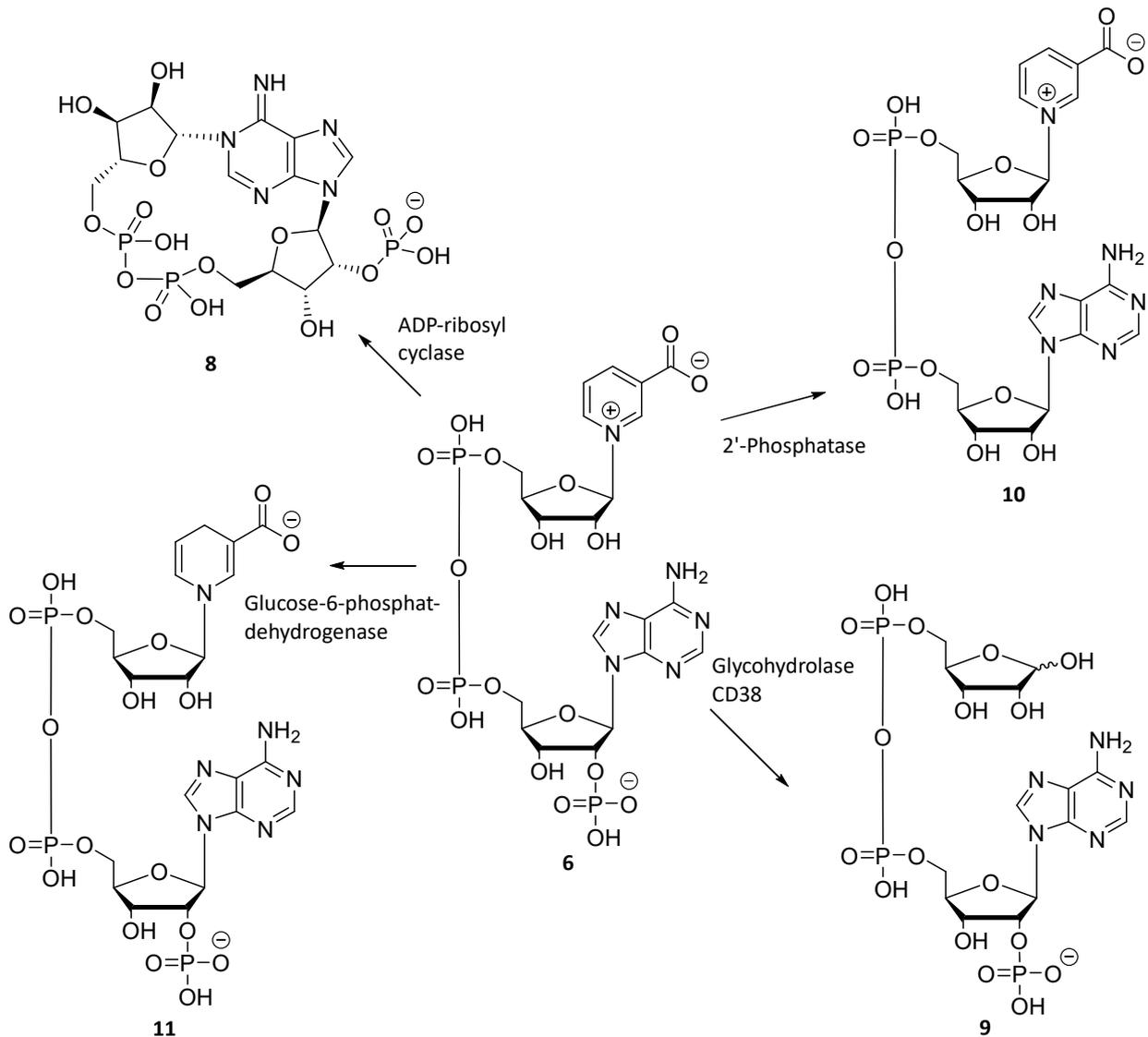


**Abb.9:** Hypothetischer Syntheseverlauf von NAADP durch eine Basenaustauschreaktion.<sup>93</sup>

An dem Enzym CD38 konnte *in vitro* eine entsprechende Basenaustauschreaktion beobachtet werden.<sup>93</sup> Das multifunktionelle CD38 zeigt, abhängig vom pH-Wert, sowohl eine Aktivität als ADP-Ribosylcyclase, als auch von NAD-Glycohydrolase.<sup>94</sup> Im neutralen, bzw. basischem pH-Bereich, wird z.B. die Bildung von ADPR und cADPR aus NAD katalysiert, wohingegen im sauren pH-Bereich die Bildung von NAADP aus NADP katalysiert wird.<sup>93,94</sup> Der verminderte pH-Wert ist ausschließlich in sauren lysosomalen Kompartimenten festgestellt worden, wobei darüber hinaus zusätzlich ein Überschuss von Nicotinsäure für den Basenaustausch notwendig ist.<sup>95</sup> Zur Beschreibung der pH-Problematik wurde ein weiterer Syntheseweg postuliert, bei dem NAADP durch CD38 über zwei Stufen aus NADP über 2'-Phosphat-cADPR bei neutralem pH-Wert gebildet wird.<sup>80,96</sup> Problematisch bei dieser Hypothese der NAADP-Synthese ist zum einen, dass das CD38 ein Ektoenzym ist und somit zumindest sein aktives Zentrum im Extrazellulärraum liegt. Dieses topologische Paradoxon setzt einen aktiven Transport der Edukte und Produkte voraus, bzw. eine Internalisierung des Enzyms.<sup>53,97,98</sup> Zum anderen liegt das pH-Optimum der Basenaustauschreaktion im nicht-physiologischen pH-Bereich von etwa 4-5, es kommt also nur ein ungeladenes Pyridinsubstrat in Frage.<sup>96,99</sup>

*In vivo* ist das CD38/NAADP/Ca<sup>2+</sup>-System wenig aufgeklärt, da NAADP in CD38 negativen *knock-out* Mäusen nachgewiesen werden konnte, daher kommen vermutlich auch weitere ADP-Ribosylcyclasen für die NAADP-Synthese in Betracht und/oder der Syntheseweg verläuft über weitere Enzymkaskaden.<sup>51,100</sup>

Desweiteren ist der enzymatische Abbau weiterhin nicht genau definiert. Auch hierbei werden unterschiedliche Beobachtungen getroffen, welche in **Abb.10** dargestellt sind.



**Abb.10:** Einige mögliche Inaktivierungsreaktionen von NAADP, wie die Cyclisierung, Dephosphorylierung, Reduktion und die Hydrolyse von Nicotinsäure.

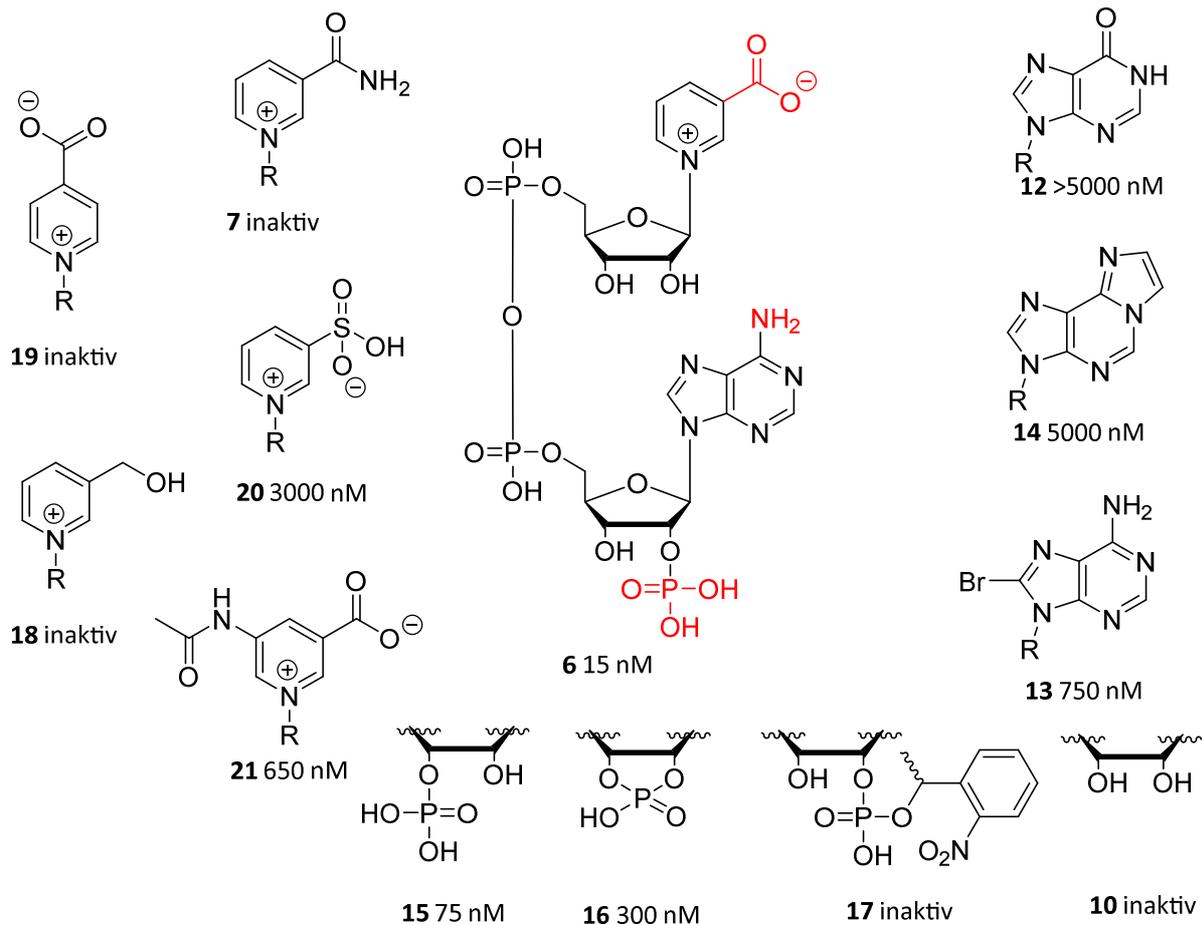
Möglicherweise wird die Schlüsselposition des CD38 nicht in der Synthese, sondern eher in der Inaktivierung von NAADP belegt.<sup>101</sup> Ein entsprechender Abbau des NAADP zu ADPR-2'-Phosphat **8** wurde vorgeschlagen nachdem dieser Abbau bei dem NADP beobachtet werden

konnte. Außerdem ist eine enzymatische Hydrolyse der Nicotinsäure zu ADPR **9** mittels CD38 potenziell denkbar.<sup>101</sup>

Widersprüchlicherweise wurde im Gehirngewebe von Mäusen eine dominante Dephosphorylierung von NAADP zu NAAD **10** beobachtet, welche aber auch zugleich NADP und AMP betraf.<sup>102</sup> Unterstützend zu dieser Beobachtung konnte durch eine Chelatisierung von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  mit Hilfe von EDTA eine Abnahme der Synthese von NAAD detektiert werden.<sup>102</sup> Entsprechende Enzyme konnten aber bislang nicht identifiziert werden, wobei aber eine Degradation durch alkalische Phosphatase *in vitro* beobachtet wurde.<sup>103</sup> Als weitere Inaktivierungsreaktion wurde die Reduktion von NAADP zu NAADPH **11** mittels Glucose-6-phosphatdehydrogenase vorgeschlagen.<sup>104</sup> Das NAADPH besitzt keine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Eigenschaften und es zeigte sich, dass NAADPH vermutlich in der Lage ist, eine nachfolgende NAADP-Aktivierung zu hemmen. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass das NAADPH als schnell zur Verfügung stehende Vorläuferverbindung durch Oxidation in NAADP umgewandelt wird und gleichzeitig als Metabolit das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal blockieren kann. Die exakten Abbaureaktionen und deren physiologische Relevanz ist bislang aber weiterhin ungeklärt.

#### 4.1.7 Strukturelevante Merkmale von NAADP

Trotz der Anonymität des NAADP-Rezeptors wurde die essentielle Bedeutung einiger Strukturmerkmale für die enzymatischen Bindungsstellen identifiziert. Erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*structure activity relationships*, **SAR**) wurden von LEE *et al.* in Seeigeleiern untersucht.<sup>105</sup> Hierbei wurde die Inhibition durch radioaktiv markiertes NAADP im nanomolaren Bereich gegen NAD, NAAD, cADPR und cADPR-2'-phosphat im mikromolaren Bereich beobachtet. Als wesentliche Merkmale, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induzieren, wurden die Carbonsäurefunktion an der 3-Position des Pyridinrings der Nicotinsäure, die 6-Amin-Funktion der Adeninbase, sowie die 2'-Phosphatgruppe des Adenosins identifiziert.<sup>105</sup> Die bedeutenden Strukturmerkmale sind in **Abb.11** am NAADP **6** markiert. Desweiteren ist die Einflussnahme von verschiedenen Modifikationen auf den jeweiligen  $\text{EC}_{50}$ -Wert der NAADP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gezeigt.



**Abb.11:** Aktivitätsrelevante Merkmale des NAADP **6** (rot markiert) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität einiger Derivate.<sup>105,106</sup>

Zunächst wurde für die 6-Amino-Funktion keine Toleranz gegenüber Veränderung ermittelt, da eine Substitution der Amino-Funktion durch eine Hydroxyl-Funktion zu einer über 1000-fach geringeren Aktivität des Hypoxanthinderivats **12** bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung führte.<sup>105</sup> Eine Veränderung an der 8-Position des Adenins **13** hatte nur einen relativ geringen negativen Effekt auf die Aktivität. Auch die Synthese eines stark fluoreszierenden Etheno-NAADP **14** führte zwar zu einer Abnahme der Aktivität, aber die trotzdem vorhandene geringfügige  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität, lässt den Schluss zu, dass ein Stickstoffatom in der 6-Position von Relevanz ist.<sup>107</sup>

Eine Wanderung der 2'-Phosphats zum 3'-Phosphat **15** oder die Bildung eines 2',3'-cyclophosphats **16** hat nur geringe Auswirkungen auf die Aktivität. Dies lässt sich damit erklären, dass diese Phosphatwanderung vermutlich auch unter physiologischen Bedingungen intrazellulär möglich ist und zudem für eine Rezeptoren-/Bindeproteinwechselwirkung vielmehr eine Phosphatgruppe an der Ribose des Adenosins relevant ist.<sup>105</sup> Die dephosphorylierte NAADP-

Variante NAAD **10** ist inaktiv, was ebenfalls für das 2'-Phosphat *photo-caged* NAADP-Derivat **17** der Fall war.<sup>86</sup> Somit kann postuliert werden, dass eine ungeschützte 2'- oder 3'-Phosphatfunktion unentbehrlich für die Aktivität ist, die Position des Phosphats trotz Aktivitätsverlust aber nicht zwangsläufig fixiert sein muss.

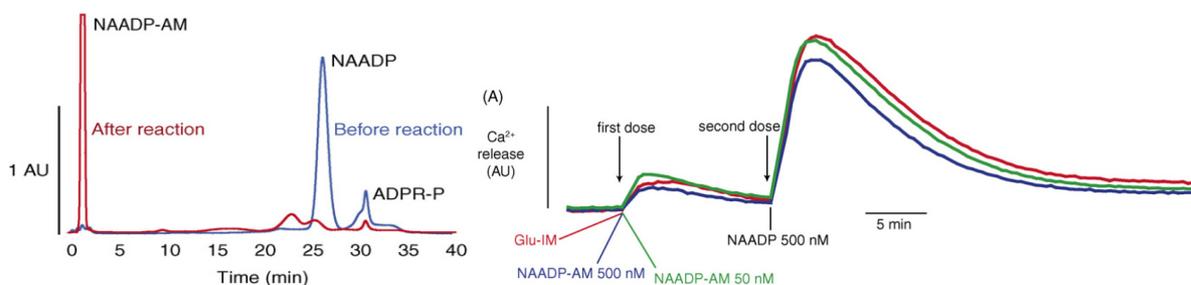
Bei der strukturelevanten Carboxylfunktion der Nicotinsäure müssen gleich mehrere Variablen beachtet werden. Zum einen muss eine geladene Funktion vorhanden sein, da das ungeladene NADP-Derivat **7** und auch das Derivat mit Alkoholfunktion **18** statt Carboxylfunktion, keinerlei Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Aktivität besitzen. Zusätzlich ist die Position in *meta*-Position unerlässlich für die Aktivität, da ein Wechsel zur *para*-Position **19** der Carboxylfunktion ein Verlust der Aktivität zur Folge hat.<sup>108</sup> Auch die Substitution der Carboxylfunktion gegen eine Sulfonsäurefunktion **20**, also einer negativ geladenen Funktion, führt zu einem starken Verlust der Aktivität. Die Einführung von funktionellen Gruppen in der 5-Position **21** hat zwar einen Aktivitätsverlust zur Folge, kann aber größtenteils variiert werden, um unterschiedliche Substituenten einzuführen.<sup>109</sup>

Bislang nicht untersucht wurde der Einfluss der 2'-Position, sowie die Relevanz der positiven Ladung des Pyridinrings auf die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung. Auch konnte nicht aufgeklärt werden, ob eine Modifikation des Phosphatrückgrats Auswirkungen zeigt.

Aufgrund des rudimentären Wissens über die NAADP-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, des genutzten Ca<sup>2+</sup>-Speichers und dessen Rezeptors, bzw. des entsprechenden Bindeproteins, sowie der metabolischen Vorgänge, ist es von großer Bedeutung neben den heute oft verwendeten anspruchsvollen, invasiven Methoden eine Alternative zur NAADP-Applikation für weiterführende Untersuchungen, zu finden, welche die jeweiligen Zellen unter normalem Stressniveau tolerieren. Ein aktiver Transport des NAADP in die Zelle ist nicht bekannt, weshalb eine Modifikation des hochpolaren NAADP unter Berücksichtigung der strukturelevanten Merkmale zur passiven Diffusion ein vielversprechender Ansatz darstellt, da so eine nicht-invasive Applikation ermöglicht werden könnte. Die passive Diffusion durch die Zellmembran kann mit Hilfe der gezielten Schützung von den hydrophilen Positionen des NAADP mit lipophilen Schutzgruppen gewährleistet werden, wobei sichergestellt sein muss, dass diese Schutzgruppen intrazellulär vollständig abgespalten werden können, ohne zellulären Stress zu fördern.



der nicht nucleophilen Base DIPEA in Acetonitril als Lösungsmittel behandelt und anschließend 24 h mit Acetyloxymethylbromid bei Raumtemperatur umgesetzt. Das entstandene Produkt wurde ohne weitere Reinigung zu weiterführenden Untersuchungen eingesetzt. Das Chromatogramm des Reaktionsfortschritts, welcher mittels Anionenaustausch-HPLC verfolgt wurde, ist in **Abb.13** links dargestellt. Die Autoren postulieren bei der Reaktionsverfolgung, dass durch die Blockierung der negativen Ladungen des NAADP durch AM-Schutzgruppen das neugebildete Produkt eine sehr geringe Retentionszeit besitzt.<sup>110</sup> Aufgrund diverser auftretender Nebenprodukte bei dieser Art von Reaktionen, ist eigentlich von mehreren Signalen auszugehen. Ungeachtet dessen wurde das isolierte Produkt, NMR-spektroskopisch untersucht, wobei die publizierten <sup>1</sup>H-Signale eine Deutung der genauen Anzahl, sowie der Position der AM-Schutzgruppen, nicht zulässt. Darauf aufbauend kann nur eine vage Aussage zu dem <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum vorgenommen werden, da dieses teilweise durch das Grundrauschen des Spektrums nicht eindeutig deutbar und die zu erwartenden Signale und Kupplungen nicht eindeutig zu erkennen sind. Darüber hinaus fehlt auf Grund von Stabilitätsproblemen eine massenspektrometrische Untersuchung. Schlussfolgernd wird aus der Publikation die Synthese des NAADP-AM nicht gänzlich bewiesen, sondern angenommen.

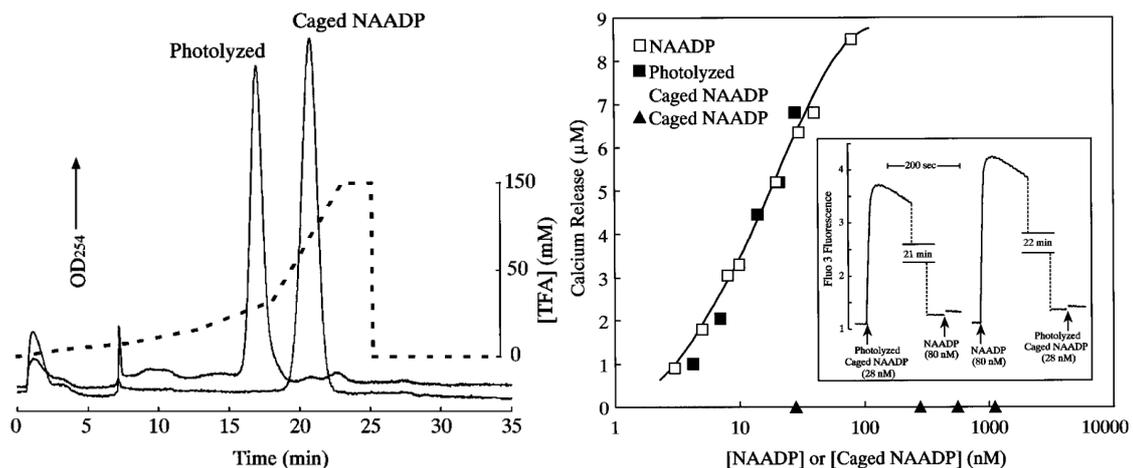


**Abb.13:** HPL-Chromatogramm der Reaktionsverfolgung bei der Synthese des NAADP-AM (rot) aus NAADP (blau). Die Trennung erfolgte mittels Anionenaustausch-HPLC und einem konkav nach oben gerichteten Gradienten aus Trifluoressigsäure (links). Eine Zugabe von 500 nM NAADP-AM (blau), bzw. 50 nM (grün) zu Seeigeleier-Zellen führte zu keiner Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, aber zu einer geringfügigen Inhibition der NAADP-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, welches darauffolgend in maximaler Dosis von 500 nM zugegeben wurde (rechts). Verwendet nach freundlicher Genehmigung von Elsevier.<sup>110</sup>

Die Zellaufnahmestudien zeigen zwar eine Permeation des Produkts in die Zellen, gezeigt in **Abb.13** rechts, aber es konnte hierbei keine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch „NAADP-AM“ beobachtet werden. Es wurden, bei den Studien, verschiedene „NAADP-AM“-Konzentrationen zugegeben und die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration anschließend gemessen, wobei kein signifikanter Anstieg

beobachtet werden konnte. Nach Zugabe von unmaskiertem NAADP zeigte sich lediglich eine leichte inhibitorische Wirkung von „NAADP-AM“, hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Wirkung des NAADP. Dadurch kann eine Interaktion des „NAADP-AM“ mit dem Bindeort von NAADP vermutet werden.<sup>110</sup> Die separat durchgeführten Stabilitätsstudien sind in Bezug auf ihre enzymatische Freisetzung von NAADP aus dem „NAADP-AM“ wenig aussagekräftig und uneindeutig. Infolge der Inkonsistenz der publizierten analytischen Ergebnisse und der nicht vorhandenen Reproduzierbarkeit der Synthese, welche in Vorarbeiten von ALEXANDRA RUTHENBECK erprobt wurden, ist eine Diskussion über die Synthese und die Handhabbarkeit der Substanz für Bioassays zulässig, bzw. die Verwendung von „NAADP-AM“ fragwürdig.

Eine weitere publizierte Variante von maskiertem NAADP stellt das *photo-caged* NAADP dar. Hierfür wurde ein 1-(2-Nitrophenyl)diazoethan unter Freisetzung von molekularem Stickstoff bei saurem pH-Wert mit dem 2'-Phosphats des NAADP gebunden. Eine Bindung der photolabilen Schutzgruppe an das 2'-Phosphats wurde durch Verschiebung des Signals des  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums angenommen. Die erfolgreiche Schützung und die entsprechende Abspaltung der Schutzgruppe unter Einwirkung von Licht wurde mit Hilfe von HPL-Chromatogrammen validiert. Das Einführen der photolabilen Gruppe resultierte in keiner für die passiven Diffusion ausreichenden Lipophiliesteigerung, gezeigt im HPLC in **Abb.14** links, weshalb es der invasiven Mikroinjektion zur intrazellulären Einbringung des geschützten NAADP erforderte.<sup>86</sup>



**Abb.14:** HPL-Chromatogramm des unmaskiertem NAADP und des lipophileren *caged* NAADP (links). *Caged* NAADP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach Bestrahlung mit Licht und der darauffolgenden Injektion von unmaskiertem NAADP, bzw. in konträrer Reihenfolge. Es zeigt sich eine kongruentes  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzendes Vermögen (rechts). Abgebildet unter Verwendung des Copyright<sup>©</sup> durch Elsevier<sup>86</sup>

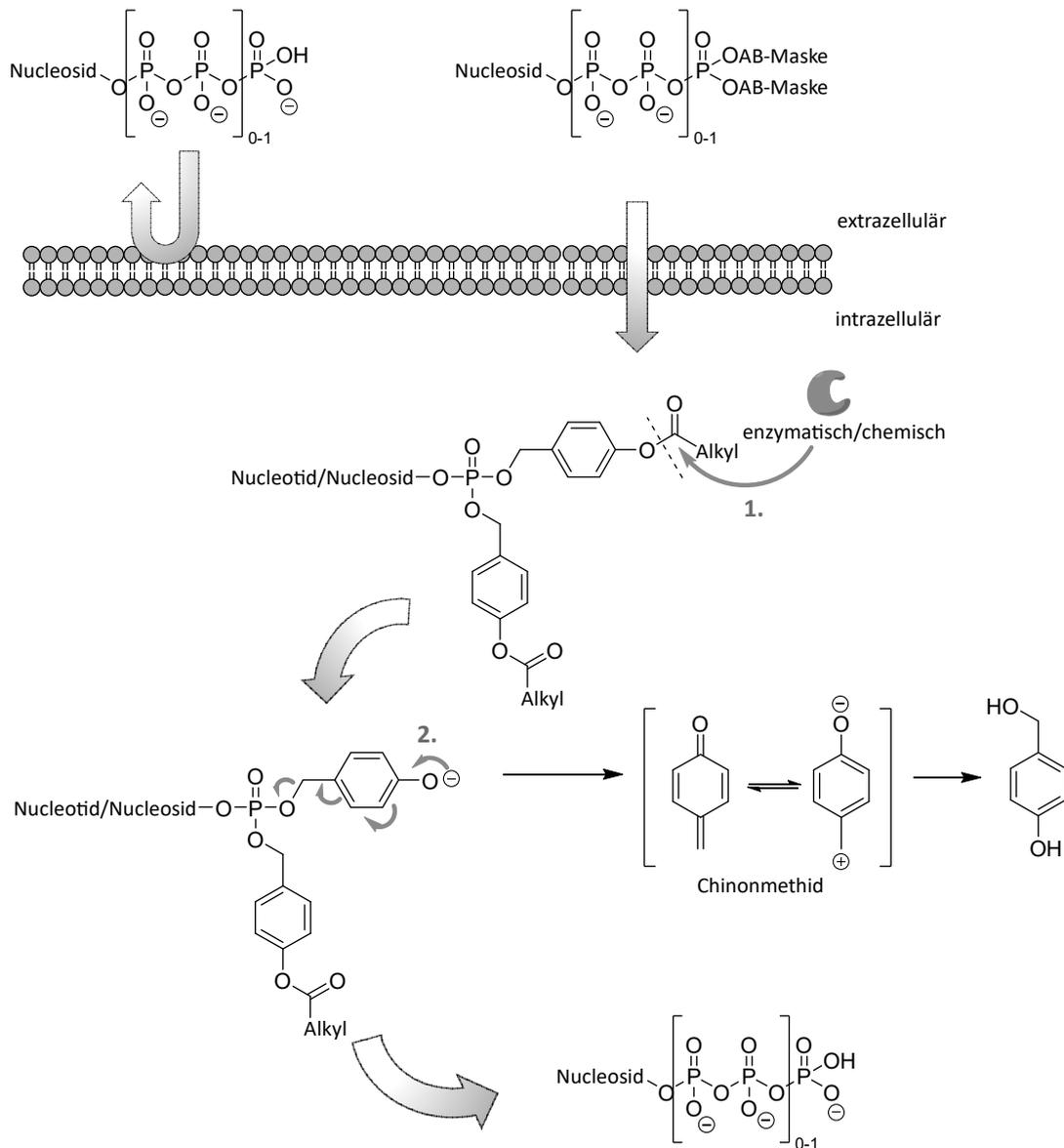
Eine anschließende Bestrahlung der Zellen bei 0-4 °C in einem UV-Reaktor führte zu einem Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, detektiert durch den Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-3. Dies ist in **Abb.14** rechts dargestellt. Eine anschließende Injektion von nicht maskiertem NAADP induzierte keine weitere Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, da vermutlich die NAADP Ca<sup>2+</sup>-Speicher bereits entleert waren. Diese Ergebnisse konnten durch die konträre Injektionsreihenfolge der Substanzen bestätigt werden.<sup>86</sup>

Der große Vorteil einer räumlich und zeitlich exakten Freisetzung von NAADP bei dem *photo-caged* NAADP zeigt die Realisierbarkeit und den großen Nutzen einer Maskierung von NAADP mit photolabilen Schutzgruppen.<sup>111</sup> Andererseits ist weiterhin der Einsatz einer invasiven Methode unvermeidlich, wie die Mikroinjektion, da keine passive Diffusion durch die lediglich gering gesteigerte Lipophilie ermöglicht ist. Als richtiger Ansatz hierfür ist die Synthese des NAADP-AM zu benennen, welches zumindest gezeigt hat, dass eine ausreichende lipophile Schützung des NAADP zu einer Membranpermeabilität führt. Die in einigen Punkten strittige Synthese des NAADP-AM könnte vermutlich auf totalsynthetischem Weg gelöst werden. Desweiteren ist die Wahl von AM-Schutzgruppen aufgrund ihrer nicht variablen lipophilen Eigenschaften, sowie der Kontrollierbarkeit der enzymatischen Spaltungsgeschwindigkeit nicht optimal, weshalb alternative bioreversible Schutzgruppen betrachtet werden müssen.

### 4.2.1 AB-Prodrug-Konzept als bioreversible Maskierung

Unter Auswahl der entsprechenden Schutzgruppen, welche sich zur Modifikation für eine passive Diffusion von polaren Verbindungen wie Nucleosiden erfolgreich bewährt haben, steht ein großes Spektrum an biolabilen Prodrug-Konzepten zur Verfügung. Ein besonders variables, sowie einfach an die Anforderungen anzupassendes Konzept, ist die Verwendung von 4-Acyloxybenzyl-Estern (AB-Ester), welches erstmals von FREEMAN *et al.* und von THOMSEN *et al.* für die Maskierung von Aminen beschrieben wurde.<sup>112,113</sup> Dabei wird der enzymatische Degradationsmechanismus intrazellulär durch Carboxyesterasen induziert. Außerdem konnte eine erhöhte Substrataffinität durch die Einführung einer aromatischen Spacereinheit erzielt werden.<sup>113,114</sup> Die Spacereinheit schien insbesondere bei der enzymatischen Spaltung von Schutzgruppen, welche eine nahegelegene repulsiv wirkende negative Ladung am Wirkort besaßen, von Vorteil zu sein. Diese Schutzgruppenvariante konnte mit großem Erfolg bereits bei der

Synthese von Diphosphat- (DiPPro) und Triphosphaten-(TriPPPPro)Prodrugs angewandt werden, wobei darüber hinaus eine Zellaufnahme unter Verwendung von entsprechend intrinsisch fluoreszierenden Nucleotiden beobachtet wurde.<sup>115–121</sup> Die in **Abb.15** beschriebene Spaltungskaskade an einem nucleotidischen Baustein wird entweder durch eine enzymatische oder chemische Aktivierung initiiert.



**Abb.15:** Beispielhaftes Prodrug-Konzept an einem Nucleotid mit anschließender Hydrolysekaskade des Acyloxybenzyl-Esters und Freisetzung des ungeschützten Nucleotids.<sup>117,122</sup>

Mit Hilfe der lipophilen Maskierung resultiert die Fähigkeit zur passiven Diffusion in den intrazellulären Raum. Hierbei ist zu beachten, dass die Polarität verursacht durch die verbliebenen

Ladungen am  $\alpha$ - und/oder  $\beta$ -Phosphat mit ausreichender Alkylkettenlänge mit den Maskierungsgruppen kompensiert werden können und somit trotzdem eine Membranpermeabilität gewährleistet ist.<sup>120,123</sup> Dort wird der Phenylester enzymatisch durch Esterasen, oder chemisch durch den vorhandenen physiologischen pH-Wert nucleophil, aktiviert. Es folgt eine 1,6-Eliminierung mittels Umpolung der *para*-ständigen Funktion von einem Elektronenakzeptor zu einem Elektronendonator. Das gebildete Spaltungsprodukt der Schutzgruppe ist das mesomeriestabilisierte Chinonmethid, welches durch eine Additionsreaktion zu dem nicht toxischen 4-Hydroxybenzylalkohol weiterreagieren kann.<sup>114,124</sup> Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mit Variation der Substituenten, bzw. der Alkylkettenlänge nicht nur die Lipophilie gezielt variiert werden kann, sondern auch die Halbwertszeit der enzymatischen Freisetzung.<sup>125</sup> Der Vergleich von Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) oder CEM/O-Zellextrakt mit Hydrolysen in Phosphatpuffer (pH 7.3) zeigte eine signifikant höhere chemische Stabilität analog zu der enzymatischen Degradation.<sup>113,114</sup> Unter Berücksichtigung der Stabilität ist also eine Kettenlänge zu wählen, welche die Membranpermeabilität bei gleichzeitig hoher chemischer Stabilität ermöglicht, aber eine geeignete enzymatische Labilität aufweist. Eine Erweiterung der Anwendung der AB-Schutzgruppen auf die lipophile Maskierung von NAADP ist, im Gegensatz zu den zuvor erwähnten AM-Schutzgruppen, für weiterführende Untersuchungen durch ihre Variierbarkeit und ihre schnelle intrazelluläre Spaltung von großem Interesse.

### 4.2.2 Photolabiles Prodrug-Konzept

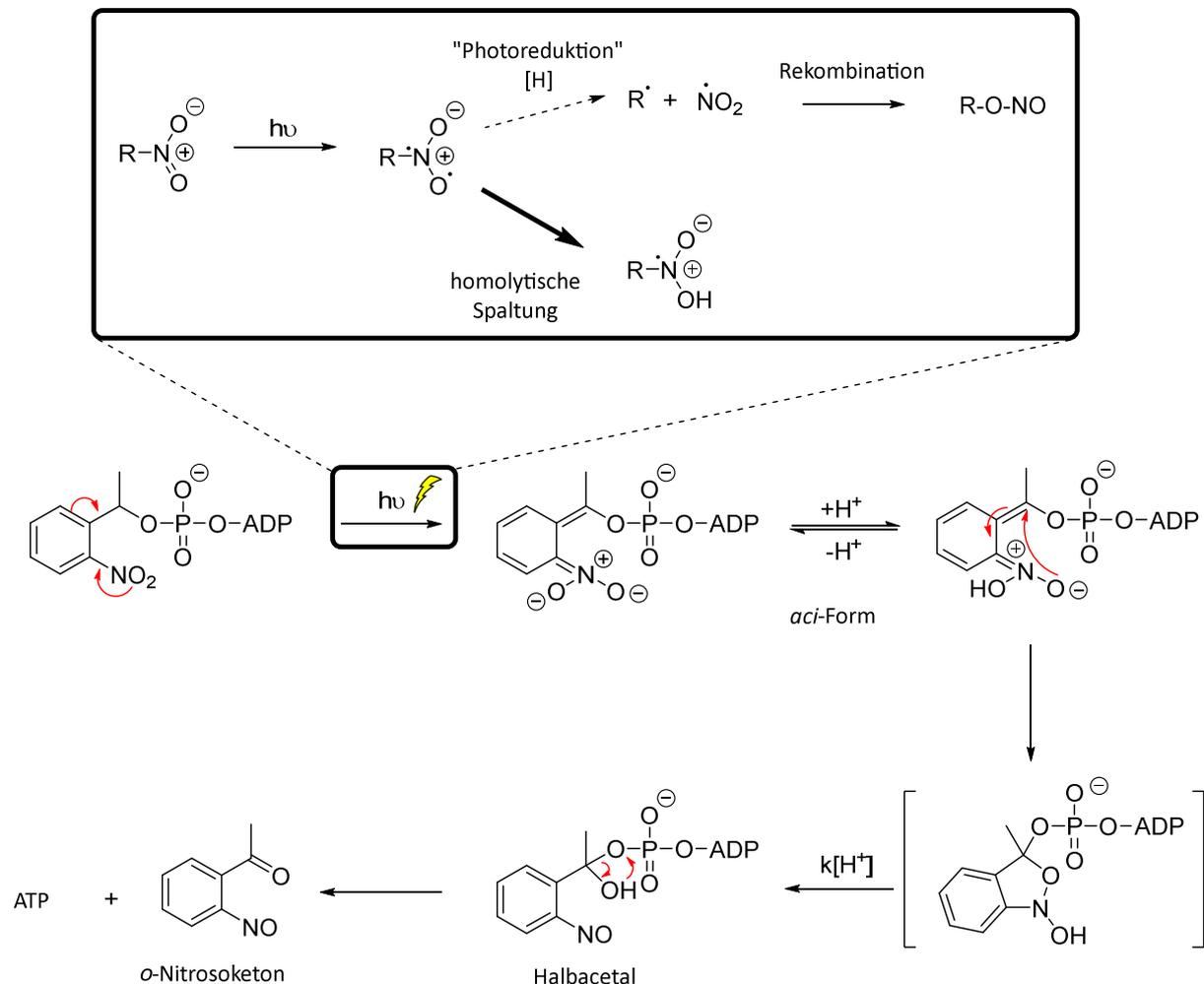
Mit Hilfe des Einsatzes von bioreversiblen Schutzgruppen wird zwar eine passive Diffusion in die Zelle ermöglicht, dabei ist die Regulation der zeitlich und räumlich exakten Freisetzung nur bedingt möglich und abhängig von der Enzymkinetik.<sup>126</sup> Als Schutzgruppenklasse, die diese Anforderungen erfüllen kann, haben sich die photolabilen Schutzgruppen etabliert.<sup>127–129</sup> Die *photoremoveable protecting groups*, (PPGs), können orthogonal zu anderen Schutzgruppen mittels Lichteinstrahlung abgespalten werden, ohne dabei idealerweise auf die chemische Umgebung Einfluss nehmen zu müssen. Insbesondere bei der kinetischen Untersuchung von sehr schnell verlaufenden biologischen Prozessen ist der Einsatz von PPGs bedeutend, da die freisetzende Komponente, das Licht, nicht der Limitierung Diffusion unterliegt und der Wirkstoff homogen und simultan in der gesamten Zelle freigesetzt werden kann.<sup>127,130–133</sup> Unter

Verwendung von z.B. konfokaler Lasermikroskopie ist ein sehr schneller Konzentrationsanstieg der gewünschten Substanz bei gleichzeitig exakter räumlicher und zeitlicher Auflösung möglich.<sup>134,135</sup>

Im Idealfall ist die gewählte PPG, insbesondere bei der Verwendung in biologischen Systemen, hydrolysestabil. Zugleich sollte eine möglichst quantitative Ausbeute des Wirkstoffs bei Lichteinwirkung bei zugleich geringer Quantität von photolytischen Nebenprodukten erzielt werden. Zusätzlich sollten die Abspaltungsprodukte inert gegenüber dem Substrat und dem untersuchenden System sein, sowie eine Wasserlöslichkeit aufweisen. Hinderlich wäre zudem eine kompetitive Absorption der eingestrahlten Wellenlänge durch das Spaltprodukt. Wesentlich für eine effiziente Freisetzung ist die Lichtempfindlichkeit, welche die Summe aus der Quantenausbeute und des Extinktionskoeffizienten bei bestimmter Wellenlänge ist. Die Quantenausbeute beschreibt die Menge von Photofreisetzungsreaktionen pro absorbierte Photonen einer definierten Wellenlänge. Der Extinktionskoeffizient gibt an, wie effizient eine Lichtabsorption bei einer Wellenlänge ist. Dabei sollte die Wellenlänge möglichst >300 nm sein, da ansonsten unerwünschte Zellschäden durch erhöhte Lichtabsorption erwartet werden können.<sup>127,134</sup>

Der erste praktische Einsatz von PPGs gelang 1966 durch BARLTROP *et al.* mit der Einführung einer Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe an Glycin und der Spaltung bei 254 nm, darauffolgend wurden 1977 von ENGELS *et al.* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und 1978 von KAPLAN *et al.* Adenosintriphosphat (ATP) mit der photolabilen *ortho*-Nitrobenzylschutzgruppe modifiziert.<sup>126,131,136–138</sup> Die photoaktivierbar-geschützten biologischen Verbindungen werden als *caged-Compounds* bezeichnet.<sup>135,139</sup> In den folgenden Jahren entwickelte sich die Klasse der *o*-Nitrobenzylschutzgruppen zu den meistverwendeten photoaktivierbaren Schutzgruppen bei z.B. Alkoholen oder Phosphaten.<sup>111,136,140–142</sup> Der Abspaltungsmechanismus der *o*-nitrobasierten Schutzgruppen verläuft nach dem NORRISH-Typ-II-Mechanismus und beginnt mit der photolytischen Anregung des Singulett-Grundzustands der Nitrogruppe.<sup>111,143</sup> Durch das sogenannte *Intersystem-Crossing* erfolgt ein Multiplizitätenwechsel in einen angeregten Triplett-Zustand. Das darauffolgend gebildete Diradikal kann zum einen homolytisch gespalten werden und anschließend zu einem Nitrit rekombinieren. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass ein 1,5-Proton-*shift* von der Benzylposition zum Sauerstoff, also eine intramolekulare Wasserstoffatomabstraktion stattfindet und somit die Verbindung teilweise reduziert

wird, was wiederum für die Einleitung der Spaltung unerlässlich ist und in **Abb.17** dargestellt ist.<sup>144,145</sup>



**Abb.17:** Postulierter Spaltungsmechanismus einer NPE-Schutzgruppe an ATP nach Anregung durch Licht.<sup>111,146,147</sup>

Nach der photochemisch vermittelten Wasserstoffübertragung kommt es zur Relaxation in den diastereomeren *aci*-Zustand. Anschließend kann das *Ac*nitro-Intermediat intramolekular electrocyclisch zu einem Benzisoxazolidin-Derivat reagieren. Die Bildung des Halbacetals erfolgt unter Ringöffnung aus dem Sekundärintermediat. Der vermutete geschwindigkeitsbestimmende Zerfall des Nitroso-Halbacetalanions führt zur Bildung des Substrats, in diesem Fall ATP und dem photolytischen Spaltprodukt der Schutzgruppe, einem  $o$ -Nitrosoketon.<sup>111,146</sup> Trotz ihres breiten Anwendungsspektrums und der relativ einfachen synthetischen Handhabung, liegt der Nachteil bei dieser Klasse der photolabilen Schutzgruppen darin, dass die gebildete Nitrosoverbindung zum einen zelltoxisch ist und zum anderen als Photofilter wirkt, da

diese im Anregungswellenbereich ebenfalls absorbiert.<sup>111,134</sup> Problematisch ist zudem die hohe Affinität zur Bildung eines stabilen Imins mit intrazellulär vorhandenen Aminen. In Hinblick auf die mögliche Schützung von NAADP ist dies durch die freie Aminogruppe des Adenosins kritisch zu sehen.<sup>111,134</sup>

Die relativ niedrige Anregungswellenlänge von ungefähr 300 nm bei NB-Schutzgruppen lässt sich durch die positionsabhängige Einführung von Substituenten bathochrom verschieben.<sup>134</sup> Bei Verwendung des 4,5-Dimethoxy-Derivats wird z.B. die Anregungswellenlänge durch elektronenschiebende Effekte zu 365 nm verschoben.<sup>148</sup> Eine herausgehobene Stellung hat dabei die Einführung eines elektronendonierenden Substituenten in *para*-Stellung zur elektronenakzeptierenden Nitrogruppe, da es hierbei zu einer zusätzlichen *charge-transfer* (CT)-Wechselwirkung kommt.<sup>134</sup> Eine einhergehende Verbesserung der Absorptionseigenschaften durch Nutzung der CT-Wechselwirkung, hat aber durch die Erhöhung der Elektronendichte an der Nitrofunktion eine Verringerung der Quantenausbeute, durch einen langsameren intramolekularen Wasserstofftransfer, zur Folge. Die Erhöhung der Quantenausbeute konnte signifikant mit der Einführung von Methyl-Substituenten an der Benzyl-Position erzielt werden, wodurch hierbei aber ein Stereozentrum eingeführt wird.<sup>111,126,147,149–151</sup>

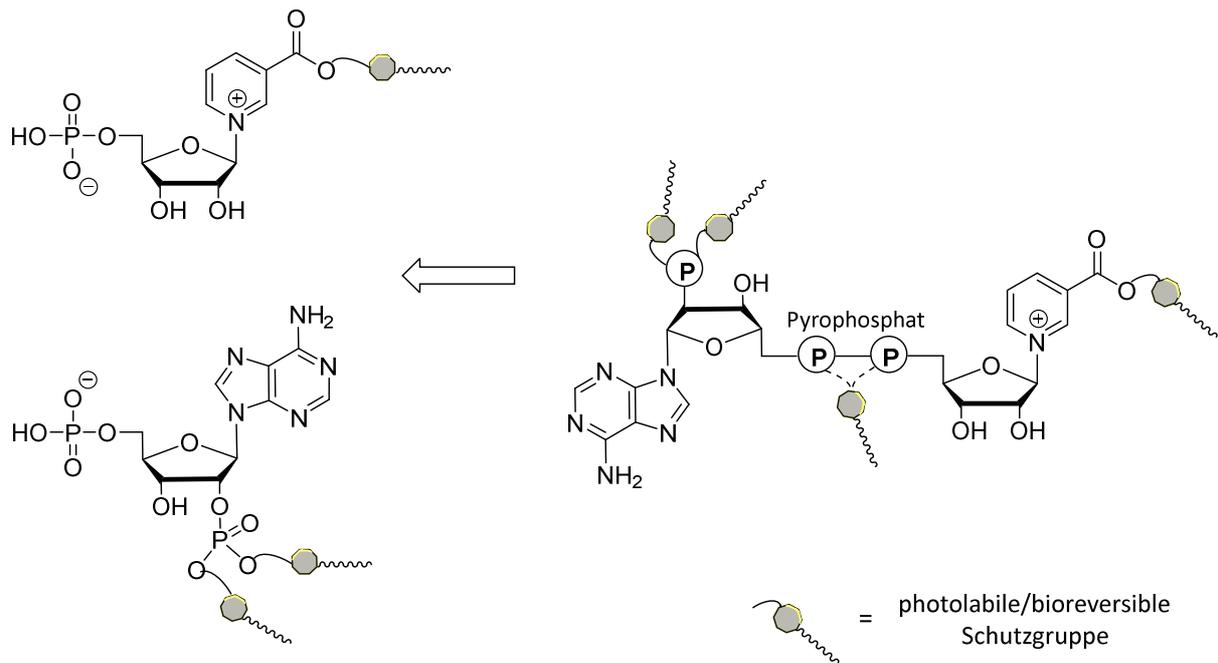
Neben den beschriebenen *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen gibt es zusätzlich etliche Variationen der Substituenten und deren Positionen. Darüber hinaus sind zahlreiche unterschiedliche photolabile Schutzgruppenklassen bekannt, wie die Desoxybenzoinyl-, die *p*-Hydroxyphenacyl- oder der Coumarin-Klasse, wobei diese einige bekannte Probleme der *o*-NB-Schutzgruppe vermeiden, aber zu verschiedenartigen Nachteilen, wie geringer Wasserlöslichkeit und höherem synthetischem Aufwand, führen.<sup>152–154</sup>

## 5 Aufgabenstellung

Eine essentielle Bedeutung für die zelluläre Signaltransduktion ist dem  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden sekundären Botenstoff NAADP zuzuordnen, wobei dessen physiologische Rolle in der zellulären Signaltransduktionskaskade noch nicht vollständig geklärt ist.

Als derzeitige geeignete Möglichkeiten den hochpolaren, geladenen sekundären Botenstoff NAADP für  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsstudien in das Zellinnere zu schleusen, haben sich lediglich die technisch anspruchsvollen, zeitintensiven Methoden, welche unter anderem die Mikroinjektion, *patch clamp* oder die Elektroporation darstellen, als einigermaßen zuverlässig erwiesen. Die Nachteile der genannten Methoden liegen darin, dass die Einzelzellpräparationen für ein gehobenes Stresslevel der Zellen sorgen kann, so dass es zu falsch-positiven Ergebnissen durch eine frühzeitige Initiierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung kommen kann. Wünschenswert wäre daher die Entwicklung einer simplen und effizienten Methode zur Applikation des NAADP in die Zelle, wobei eine entsprechende Möglichkeit in der Modifikation des NAADP besteht, die eine passive Diffusion ins Zellinnere ermöglicht.

Ziel im Rahmen dieser Arbeit war die Entwicklung einer Totalsynthese von lipophil maskierten, membranpermeablen NAADP, welches optimalerweise durch eine Kombination aus photolabilen und bioreversiblen Schutzgruppen maskiert wurde. Diese Kombination der beiden Prodrug-Konzepte hat den Vorteil eines „Lock-in“-Effekts mit kontrollierbarer Freisetzung des sekundären Botenstoffes NAADP. Es bietet sich eine konvergente Totalsynthese unter Anwendung von verschiedenen Schutzgruppenstrategien an, um als letzten Schritt eine Verknüpfung des jeweils maskierten Nicotinsäuremonophosphats und des maskierten Adenosin-2',5'-diphosphats über eine Pyrophosphatbrücke vorzunehmen, siehe **Abb.19**.



**Abb.19:** Überblick zur Retrosynthese zum maskiertem NAADP.

Es galt herauszufinden, welche Lipophilie ausreichend ist, um eine erfolgreiche passive Diffusion durch die Zellmembran zu gewährleisten. Außerdem sollte aufgeklärt werden, an welcher polaren Funktion die Derivatisierung mit welcher Schutzgruppe die besten Ergebnisse in Hinsicht der kontrollierten Freisetzung verspricht. Dabei war nicht bekannt, ob die chemische Stabilität, insbesondere der glycosidischen Bindung des Nicotinsäurenucleotids oder die der Pyrophosphatbindung, für Zelltests ausreichend ist, weshalb die Synthese von chemisch stabilisierten NAADP-Derivaten ebenfalls einen vielversprechenden Ansatz darstellte.

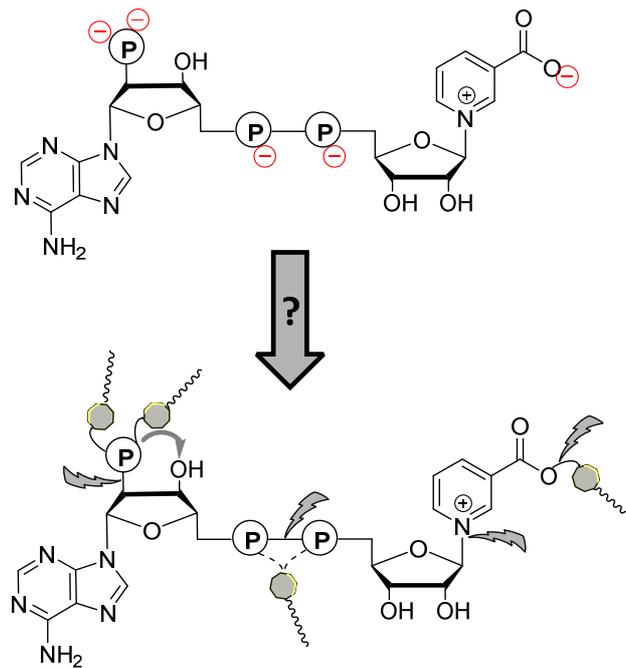
Die Untersuchung der chemischen, sowie die der enzymatischen Stabilität von den maskierten, membranpermeablen und die chemisch stabilisierten NAADP-Derivate stellte einen weiteren relevanten Teil dieser Arbeit dar. Zellstudien, die das Potenzial der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung betrachten, sollten in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) im Rahmen des SFB 1328 durchgeführt werden.

## 6 Resultate und Diskussion

### 6.1 Totalsynthetische Strategie zur Synthese von maskiertem NAADP

Aufgrund des umfangreichen totalsynthetischen Aufwands und der hohen Labilität des NAADP konnten bislang auf diesem Weg keine membranpermeablen NAADP-Derivate synthetisiert werden. Das zuvor in Kapitel 4.2 erwähnte linear synthetisierte NAADP-AM hat sich nicht als zuverlässiges Tool für bioanalytische Untersuchungen erwiesen, bzw. konnte auch in Vorarbeiten von ALEXANDRA RUTHENBECK nicht reproduziert werden.<sup>110,155</sup> Die direkte Modifikation von NAADP mit Acetyloxymethylbromid (AMBr) und Triethylamin (TEA) führte lediglich zu einer Zersetzung und einer Bildung von einem Triethylammoniumacetyloxymethylester-Nebenprodukt. Auch bei der Verwendung von alternativen Gegenionen oder einer direkten Schützung von NAADP mit Diazo-Schutzgruppen, wie in Kapitel 4.2 für die *photo-caged* NAADP angewandt wurde, konnte kein Zielprodukt synthetisiert werden.<sup>155</sup>

Unerlässlich war daher auch zur gezielten Steuerung der Anzahl und deren exakten Position der definierten Schutzgruppen eine Totalsynthese des NAADP. Hierbei stellte sich zunächst die Frage an welcher Position die in Kapitel 4.2.1/4.2.2 vorgestellten Schutzgruppen eingeführt werden sollen und welche Erhöhung der Lipophilie für eine Membranpermeabilität genügend ist. Das hochpolare NAADP besitzt vier negative Ladungen und eine zwitterionische Funktion. Um eine passive Diffusion zu ermöglichen, ist eine Neutralisation dieser Positionen zielführend (**Abb.20**).



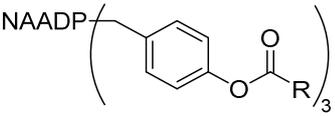
**Abb.20:** Schematische Darstellung der möglichen Positionen zur Einführung von Maskierungen und die zu berücksichtigen labilen Positionen im Molekül.

Eine direkte Schützung an dem Pyrophosphat galt es zunächst zu vermeiden, da es zu einer Labilisierung durch die Neutralisierung der negativen Ladungen kommt und ein Bruch der energiereichen Phosphoranhydridbindung in erhöhtem Maße stattfindet, durch einen möglichen nucleophilen Angriff. Die essentielle Bedeutung des stabilisierenden repulsiven Effekts durch die negativen Ladungen konnte schon in früheren Arbeiten aus dem Arbeitskreis MEIER, insbesondere bei der Synthese von geschützten Di- und Tri-Phosphaten beobachtet werden.<sup>120,122</sup> Andererseits konnte bereits gezeigt werden, dass die Schützung des Pyrophosphats mit einer 4-Acyloxybenzyl (AB)-Schutzgruppe, favorisiert zu einer sehr schnellen Abspaltung der Schutzgruppe und nicht zu einem Bruch der Phosphoranhydridbindung führt.<sup>123,156</sup> Da aber auch mit ausreichender lipophiler Alkylkettenlänge der AB-Schutzgruppe eine Membranpermeabilität trotz des Vorhandensein von zwei oder sogar drei negativen Ladungen z.B. an Triphosphaten kompensiert werden konnte, wurde auf die Schützung des Pyrophosphats verzichtet.<sup>120,157</sup>

Um möglichst viele geladene Positionen zu neutralisieren und nicht das Pyrophosphat zu labilisieren, bietet sich daher die Schützung der Carboxylfunktion der Nicotinsäure und die zweifache Schützung des 2'-Phosphats an.

Zur ersten Abwägung der nötigen Lipophilie für eine Membranpermeabilität wurde der  $\log P$ -Wert berücksichtigt, welcher als Modellmaß des pharmakokinetischen Verhaltens des Wirkstoffs im Wirkort gilt. Der optimale  $\log P$ -Wert für eine gute Permeabilität sollte  $>0$  und maximal 5.6 betragen. Ab einem Wert von  $>0$  wird von einer Diffusionsfähigkeit einer Substanz ausgegangen. Ein  $\log P$ -Wert  $>5.6$  unterliegt einer parabolischen Abhängigkeit von Lipophilie und Permeabilität und führt daher nicht zu einer gesteigerten Diffusionsfähigkeit. Trotz der Tatsache, dass der  $\log P$ -Wert bei geladenen Molekülen, wie NAADP unter physiologischen Bedingungen, nicht uneingeschränkt zuverlässig ist, wurde eine erste Kalkulation mit ChemDraw 19.0 vorgenommen.<sup>158</sup> Angewandt wurde die Kalkulation zunächst ausschließlich auf das NAADP mit dreifacher Schützung mittels AB-Schutzgruppen und variablen Alkylkettenlängen. Die kalkulierten  $\log P$ -Werte sind in **Tab.1** abgebildet.

**Tab.1:** Kalkulierte  $\log P$ -Wert von verschiedenen Alkylketten am NAADP.

Alkylrest der AB-Schutzgruppe = R	Kalkulierter $\log P$ -Wert
	
$CH_3$	-4.86
$C_3H_7$	-1.68
$C_7H_{15}$	4.66
$C_{11}H_{23}$	11.01
<b>NAADP-AM (siehe Kapitel 4.2)</b>	-6.10

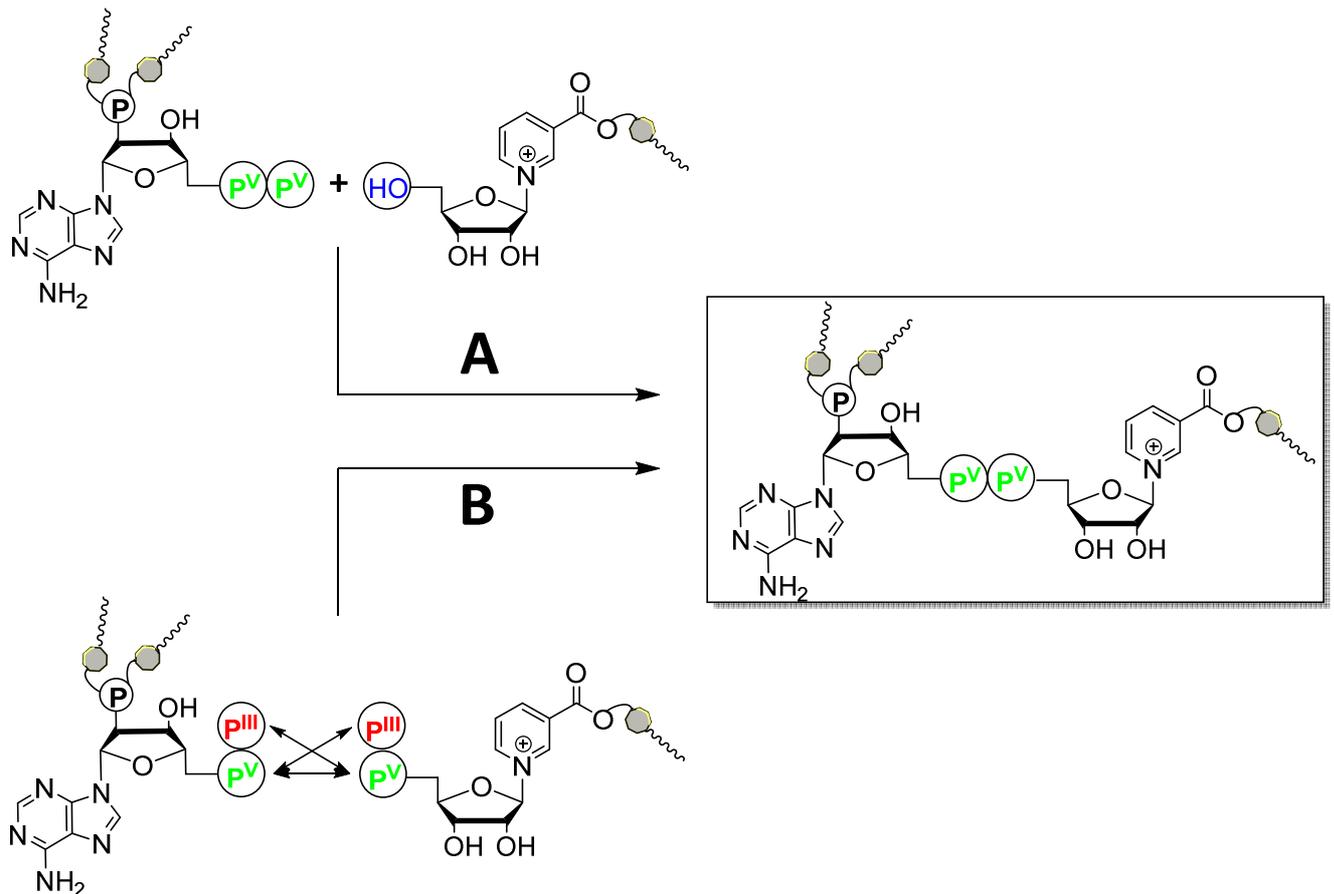
Der kalkulierte  $\log P$ -Wert lässt die Vermutung zu, dass eine dreifache Maskierung bio reversiblen AB-Schutzgruppen mit Alkylkettenlänge zwischen  $C_5H_{11}$  und  $C_9H_{19}$  eine passive Diffusion ermöglicht. Diese Werte dienen als erster Ansatzpunkt und sind weder exakt, noch unumstößlich, sondern ausschließlich als Richtwert zu verstehen, da z.B. das NAADP-AM einen  $\log P$ -Wert besitzt, bei dem eine passive Diffusion nicht möglich sein sollte.

Außerdem sollte möglichst eine AB-Schutzgruppe gewählt werden, welche noch eine Wasserlöslichkeit des geschützten NAADP zulässt und eine ausreichende chemische Stabilität bei einer simultan enzymatischen Labilität besitzt. Untergeordnet sollte die AB-Schutzgruppe eine

gerade Anzahl an Kohlenstoffen des Acylsubstituenten aufweisen, da diese hauptsächlich natürlich vorkommen und ein bevorzugtes Substrat der Carboxyesterasen darstellen.<sup>120</sup> Diese Auswahlkriterien sollen zu einer schnellen enzymatischen intrazellulären Spaltung der AB-Schutzgruppe führen und damit zu einer intrazellulären Anreicherung des NAADP.

Neben der bioreversiblen Maskierung des NAADPs war die Einführung von photolabilen Schutzgruppen, für die zeitlich und räumlich exakte Freisetzung wünschenswert. An welcher Position die Maskierung mit einer photolabilen Schutzgruppe idealerweise erfolgt, war nicht bekannt. Überdies war eine nähere Kenntnis nicht vorhanden, welche Modifikationen an der photolabilen Schutzgruppe für eine ausreichende Qualität hinsichtlich der Lipophilie, Spaltgeschwindigkeit und Lichtempfindlichkeit gewählt werden sollten. Daher wurde zunächst die einfachste der *o*-Nitrobenzylschutzgruppen mit zwei Methoxysubstituenten für eine bathochrom verschobene Lichtabsorption gewählt.

Ein wichtiger Punkt bei der retrosynthetischen Überlegung ist die Wahl der Kupplungsvariante. Dabei sollte die Kupplung einer der letzten durchzuführenden Syntheseschritte sein, um eine hohe Flexibilität im Laufe der Totalsynthese zu haben und eine konvergente Synthese aus zwei Ausgangsverbindungen, dem Adenosin-2'-phosphatbaustein und dem Nicotinsäurebaustein, zu ermöglichen. Hierdurch sind die Änderungen und Modifikationen der Synthesebausteine grundsätzlich erleichtert durchführbar. Die chemische Darstellung der Pyrophosphatbindung zwischen zwei Nucleosiden kann zum einen über die Kupplung eines Nucleosids mit einem Diphosphatnucleotid realisiert werden mittels Glycosylierungsreaktion (**Abb.21**, Weg A) oder zum anderen über zwei Monophosphate, wobei eines der beiden Monophosphate üblicherweise aktiviert ist (**Abb.21**, Weg B). Die Pyrophosphatsynthese über den Weg B ist gegenüber dem Syntheseweg A favorisiert bezüglich der Stereoselektivität, Ausbeute und flexibleren Anwendungsmöglichkeiten.<sup>159–162</sup>



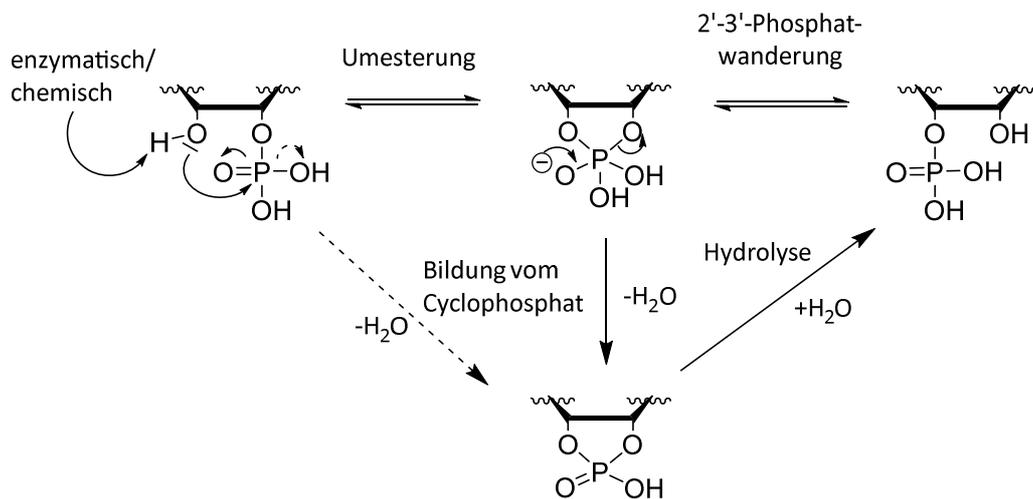
**Abb.21:** Varianten der Pyrophosphatbildung.

Aufgrund der wie oben genannten Vorteile des Synthesewegs B gegenüber A und eines breiteren Anwendungsspektrums wurde entschieden, die Pyrophosphatbindung über den Syntheseweg B zu realisieren. In diesem Fall gibt es die Variationsmöglichkeiten die Kupplung mit Hilfe von P<sup>III</sup> (Phosphit) und P<sup>V</sup> oder über ein P<sup>V</sup> und einem aktiviertem P<sup>V</sup> (Phosphat) zu ermöglichen, dabei greift jeweils das P<sup>V</sup> nucleophil auf aktivierte P<sup>V</sup> oder das P<sup>III</sup> an. An dieser Stelle bleibt zu erwähnen, dass Phosphite generell zwar eine höhere Reaktivität als aktivierte Phosphor(V)-Reagenzien aufweisen, aber nach erfolgter Kupplung abschließend oxidiert werden müssen.

## 6.2 Synthesestrategie des Adenosin-2',5'-diphosphats

Zunächst erfolgte die Synthese des Adenosin-2',5'-diphosphatbausteins. Diesbezüglich ist darauf zu achten, dass die 2'-Position selektiv phosphoryliert wird, da ein 3'-Phosphat oder auch ein 2',3'-cylcophosphat in biologischen Studien eine geringere Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Aktivität

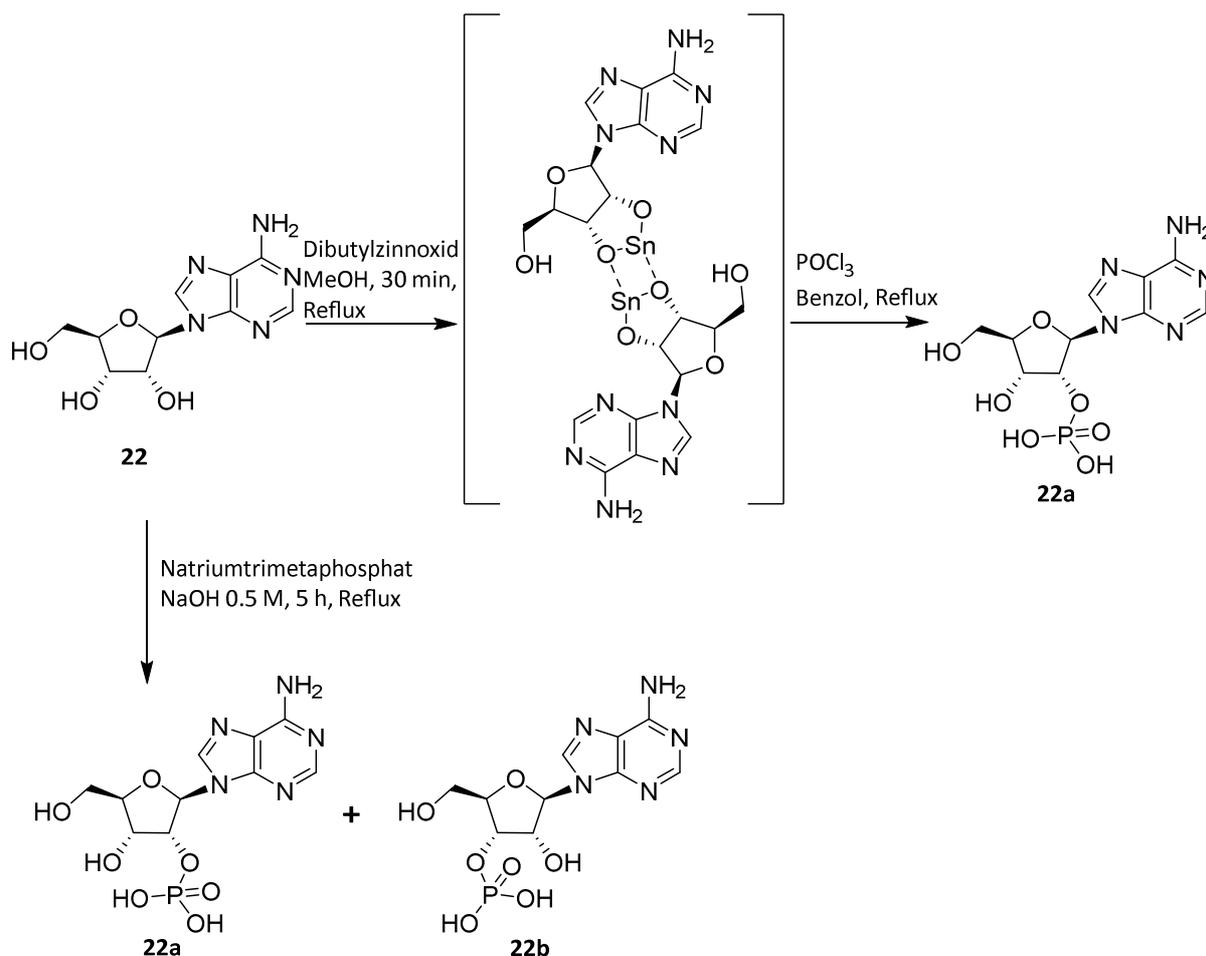
besitzen.<sup>105</sup> Problematisch ist hierbei, dass es auch nach selektiver Phosphorylierung zu einer 2',3'-Phosphatmigration kommen kann. Diese Umesterung wird charakteristisch unter physiologischen Bedingungen, also leicht basischen Milieu, chemisch induziert oder auch enzymatisch katalysiert (**Abb.22**).



**Abb.22:** Mögliche Migrationen des Phosphats.<sup>163</sup>

Bei der chemisch initiierten Migration greift die deprotonierte benachbarte Hydroxylgruppe bevorzugt nucleophil am positiv polarisierten Phosphor an. Hierdurch kann es unter Eliminierung von Wasser zur Bildung eines Cyclophosphats kommen oder unter Hydrolyse zu einer 2',3'-Phosphatmigration. Ferner ist auch eine säurekatalysierte Umphosphorylierung möglich.<sup>163</sup>

Aus diesem Grund ist zwar eine regioselektive Einführung einer Phosphatgruppe an der 2'-Position möglich, wie in **Abb.23** gezeigt, aber wenig zielführend, da diese leicht migrieren kann und dabei mögliche Maskierungen intramolekular eliminiert werden, was wiederum eine Erniedrigung der Lipophilie zur Folge hätte.

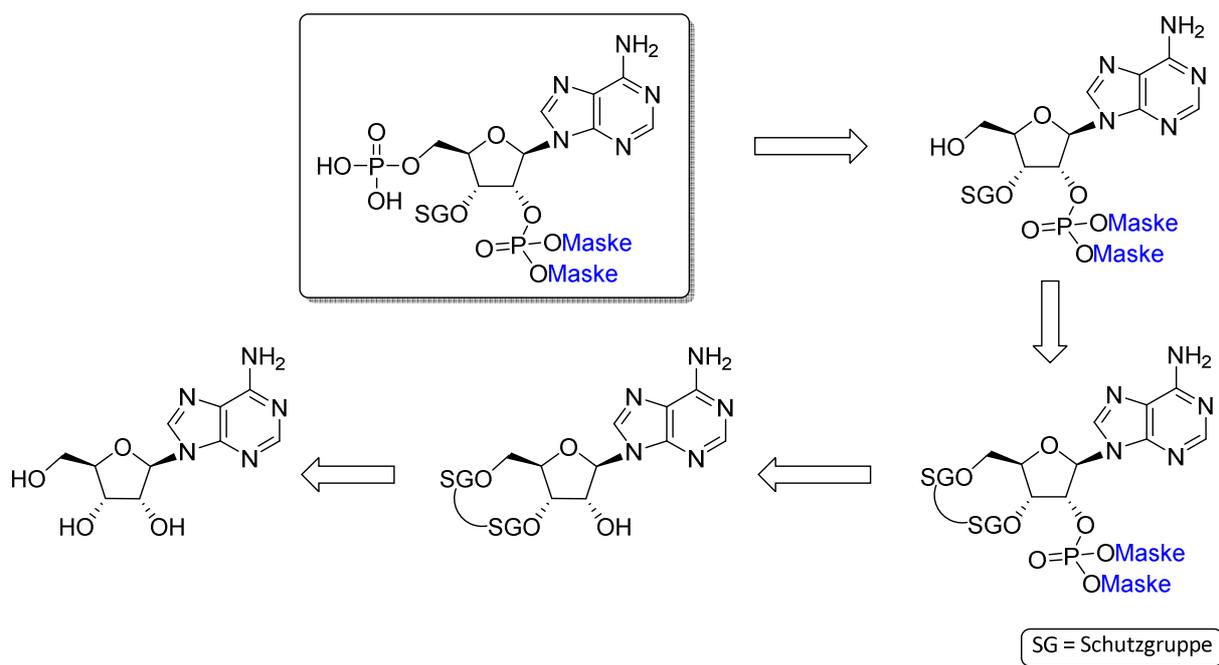


**Abb.23:** Regioselective Phosphorylierung von Adenosin **22** unter Einsatz von Dibutylzinnoxid. Zum einen wird die Reaktivität der 2'-Position durch einen Zinnbutyl-Komplex erhöht, was zum 2'-Phosphatadenosin **22a** führt und zum anderen kann ein Regioisomeregemisch aus 2'- **22a** und 3'- **22b** Phosphat durch Reaktion von Adenosin mit einem Natriumtrimeaphosphat synthetisiert werden.<sup>164,165</sup>

Zielorientiert war es daher, zunächst eine Schutzgruppe an die Positionen 5',3'-Position einzuführen, um auf diese Weise eine erleichterte regioselective Phosphorylierung zu ermöglichen und zugleich eine Phosphatmigration zu verhindern. Die Schutzgruppe war so zu wählen, dass diese selbst keiner Migration unterlag. Dies schloss die Verwendung von Schutzgruppen mit Acylsubstituenten von vorneherein aus, da diese einer identisch ablaufenden Wanderung wie die Phosphatgruppen unterliegen.<sup>166</sup> Außerdem mussten die Schutzgruppen orthogonal zu den verschwendeten bioreversiblen und photolabilen Masken spaltbar sein. Als orthogonal spaltbar bei der Nucleosidsynthese hat sich der Einsatz von Silylschutzgruppen erwiesen, da sich diese mittels Fluorid-haltigen Reagenzien, wie TREAT-HF, abspalten lassen.

Angelehnt an die erste und einzige derzeit publizierte chemoenzymatische NAADP-Totalsynthese von POTTER *et al.* wurde die Retrosynthese des maskierten Adenosin-2',5'-

diphosphatbausteins entwickelt.<sup>167</sup> Ausgehend von Adenosin sollte eine 3',5'-verbundene Silylschutzgruppe eingeführt werden. Die daraufhin folgende Phosphorylierung sollte mit einem zuvor maskierten Phosphorylierungsreagenz durchgeführt werden. Eine anschließende selektive Entschützung der 5'-Position ermöglicht die Einführung einer P<sup>V</sup>- oder P<sup>III</sup>-Gruppe. Im weiteren Syntheseverlauf würde die Bildung der Pyrophosphateinheit mit dem später beschriebenen Nicotinsäurebaustein (Kapitel 6.6) möglich sein, wobei als abschließende Reaktion die Entschützung der 3'-Position beabsichtigt ist (**Abb.24**).

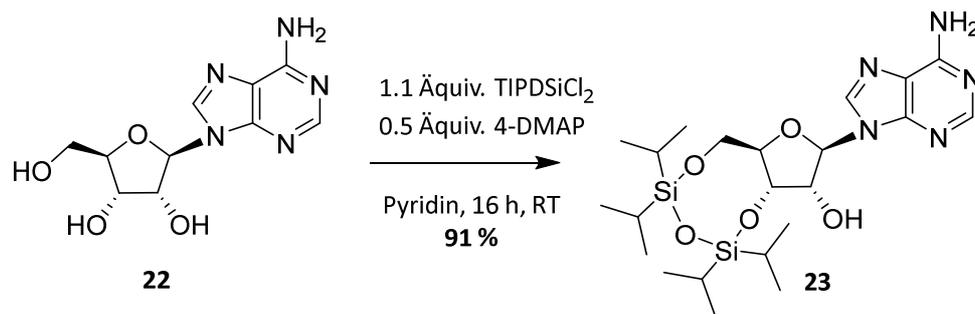


**Abb.24:** Retrosynthetische Darstellung der Synthesestrategie für den Adenosinbaustein.

### 6.3 Synthese von Adenosin-2',5'-diphosphat

#### 6.3.1 Bioreversibles Schutzgruppenkonzept am Adenosin-2',5'-diphosphat

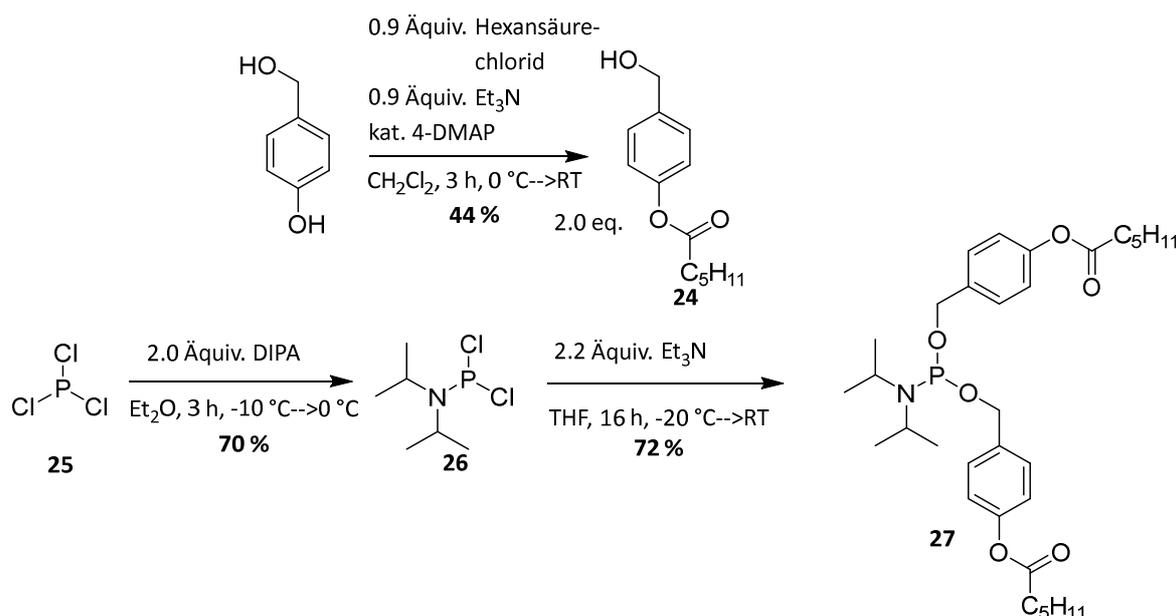
Für die Synthese des 3',5'-geschützten Adenosins wurde auf die Methode von MARKIEWICZ zurückgegriffen. Hierbei wird das kommerziell erhältliche Adenosin **22** mit dem MARKIEWICZ-Reagenz (TIPDSiCl<sub>2</sub>) in Pyridin geschützt, bei der Reaktion in **Abb.25**, diente 4-DMAP als nucleophiler Promoter.<sup>168</sup>



**Abb.25:** Darstellung von 3',5'-Silyl-geschütztes Adenosin **23**.

Es konnte eine sehr gute Ausbeuten von 91 % des gewünschten 3',5'-silylgeschützten Produkts **23** erzielt werden, wobei die 3',5'-Selektivität durch die um ein vielfaches höhere Reaktionsrate der primären Hydroxygruppe in 5'-Position des Adenosins **22** und anschließendem intramolekularem Ringschluss gewährleistet war.<sup>168</sup>

Mit Hilfe der sehr effizienten Amiditmethode sollte die folgende Phosphorylierung realisiert werden. Daneben wurde zunächst die Maskierung des Amidits nur mit bioreversiblen Schutzgruppen durchgeführt, um auf mögliche Probleme bei den anschließenden Synthesen flexibel und ohne erweiternden Aufwand, reagieren zu können. Die Synthese der bioreversiblen AB-Schutzgruppen ist in dem Arbeitskreis MEIER extensiv untersucht und verläuft in der Regel ohne Probleme.<sup>118,120,157,169</sup> Ausgehend von 4-Hydroxybenzylalkohol und dem Säurechlorid mit der gewählten C<sub>5</sub>-Alkylkettenlänge wurde unter leicht abgewandelten Standardbedingungen die AB-Schutzgruppe synthetisiert. Dabei konnte das 4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat **24** mit einer Ausbeute von 44 % isoliert werden, wobei diese Ausbeute im Bereich der üblichen Ausbeuten der AB-Schutzgruppen liegt. Wie schon in früheren Arbeiten konnte die Bildung eines zweifachveresterten Nebenprodukts dünnschichtchromatografisch beobachtet werden. Die chromatografische Trennung des Produkts vom Nebenprodukt konnte durch den deutlichen Unterschied der R<sub>F</sub>-Werte leicht realisiert werden (**Abb.26**).

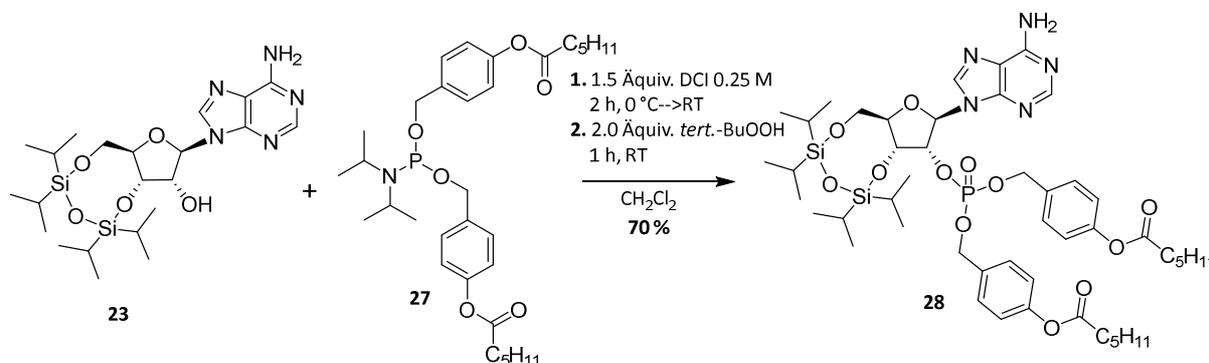


**Abb.26:** Synthese des symmetrisch bioreversibel geschützten Amidits **27**.

Um eine Phosphorylierung über die Amiditroute zu gewährleisten, musste im nächsten Syntheseschritt das Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26** dargestellt werden. Als Edukt diente frisch destilliertes Phosphor(III)-chlorid **25**, welches mit destilliertem Diisopropylamin (DIPA) umgesetzt wurde. Hierbei reagiert das Amin als Nucleophil mit dem Phosphor und kompensiert zugleich das entstehende Chlorwasserstoff, daher wurde das DIPA im Überschuss zugegeben und das entstandene Diisopropylammoniumchlorid konnte nach vollständiger Reaktion durch Filtration unter Schutzgas abgetrennt werden.<sup>170</sup> Es konnte eine mit der Literatur vergleichbare gute Ausbeute von 70 % erzielt werden.<sup>120</sup> Die anschließende Umsetzung zum symmetrisch geschützten Phosphoramidit **27**, von dem Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26** und dem 4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat **24** wurde mit Hilfe eines Zusatzes von Triethylamin durchgeführt, wobei der hierdurch erzielte basische pH-Wert eine Hydrolyse vom säurelabilen Produkts zum H-Phosphonat verhindern sollte. Die bei der Reaktion entstandenen Triethylammoniumchlorid-Salze konnten durch Filtration entfernt werden und das Produkt **27** nach säulenchromatographischer Reinigung mit Zusatz von Triethylamin zum Eluenten in einer guten Ausbeute von 72 % isoliert werden.

Die regioselektive 2'-Phosphorylierung konnte unter Säure-vermittelter Reaktion des 3',5'-silylgeschützten Adenosins **23** mit dem zuvor synthetisierten Phosphoramidit **27** nach optimierter Reaktionsvorschrift nach WEINSCHENK realisiert werden.<sup>171</sup> In diesem Fall diente 4,5-

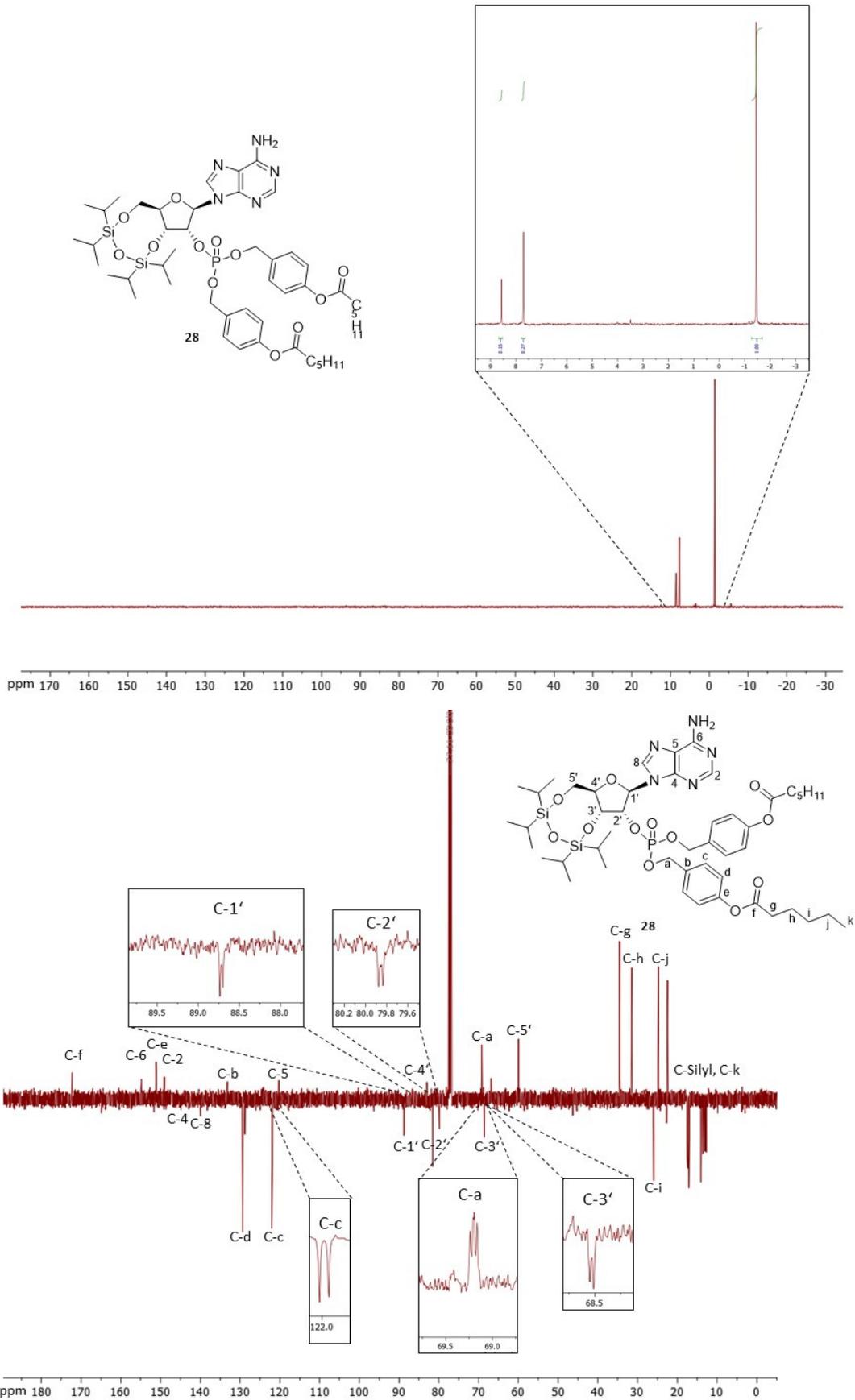
Dicyanoimidazol (DCI) als Aktivator, indem dieses das Phosphoramidit **27** protoniert und als Nucleophil die Diisopropylaminogruppe substituiert. Nach anschließender Oxidation von Phosphor(III) zu Phosphor(V) mit *tert*-Butylhydroperoxid wurde das Produkt **28** in einer Ausbeute von 70 % erhalten (**Abb.27**).



**Abb.27:** Synthese des 2'-symmetrisch geschützten Phosphats **28**.

Nach vollständigem Umsatz wurde das Rohprodukt mittels Normalphasenchromatografie mit einem DCM/MeOH-Gradienten gereinigt. Trotz viermaliger Normalphasen-Chromatografie konnte eine geringfügige Verunreinigung einer *H*-Phosphonatspezies nicht vollständig entfernt werden (**Abb.28, oben**). Das gewünschte Produkt **28** konnte mit einer chemischen Verschiebung von -1.45 ppm im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum detektiert werden. Im  $^{31}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind trotz der erwähnten Verunreinigungen die zugeordneten  $J_{\text{CP}}$ -Kopplungen hervorgehoben und verdeutlichen die erfolgreiche Synthese des 2'-Phosphats **28**, da die spezifischen  $^2J_{\text{CP}}$ - und  $^4J_{\text{CP}}$ -Kopplungen einer Phosphorylierung an der 2'-Position zu beobachten sind (**Abb.28, unten**).

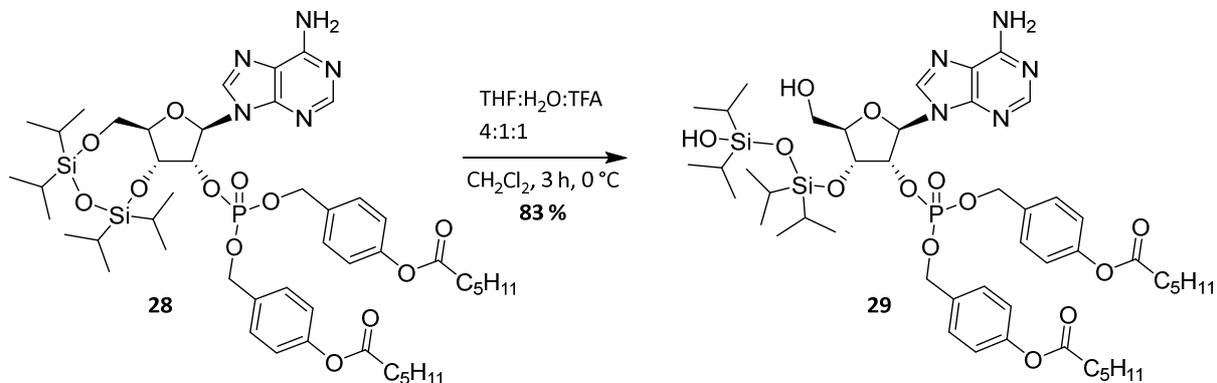
## 6 Resultate und Diskussion



**Abb.28:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (oben) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (unten) des symmetrisch geschützten 2'-Phosphatadenosins **28**.

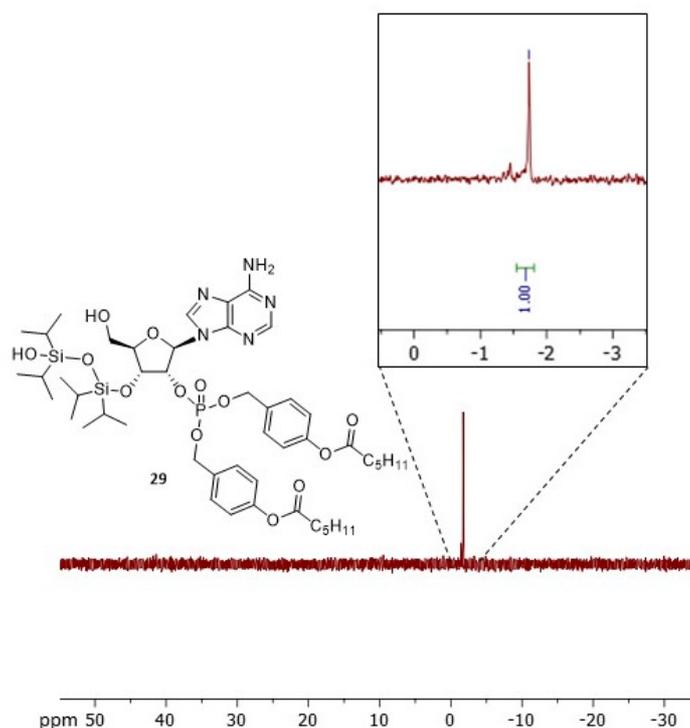
Es wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet und das verunreinigte Produkt in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt, da hierdurch von einer erleichterten Reinigung durch einen höheren Polaritätsunterschied ausgegangen wurde. Zusätzlich störten die Verunreinigungen die nachfolgende Reaktion nicht.

Um eine 2',3'-Phosphatmigration zu verhindern und zugleich die später folgende Kupplung zur Nicotinsäureeinheit zu ermöglichen, wurde die 5'-Position selektiv entschützt. Die Darstellung des 5'-selektiv entschützten Produkts **29** wurde mit kontrolliert sauren Konditionen durchgeführt. Nach SCOTT *et al.* konnte mit THF:H<sub>2</sub>O:TFA im Verhältnis von 4:1:1 die 5'-Position selektiv desilyliert werden, da die primäre 5'-Position weniger sterisch gehindert ist.<sup>172</sup> Die Bildung der möglichen 3'-entschützten oder das komplett desilylierte Nebenprodukt konnten nicht dünn-schichtchromatografisch beobachtet werden. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. bei 0 °C zugegeben, wodurch eine Kondensationsrückreaktion verhindert werden sollte. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte eine gute Ausbeute von 83 % isoliert werden (**Abb.29**).



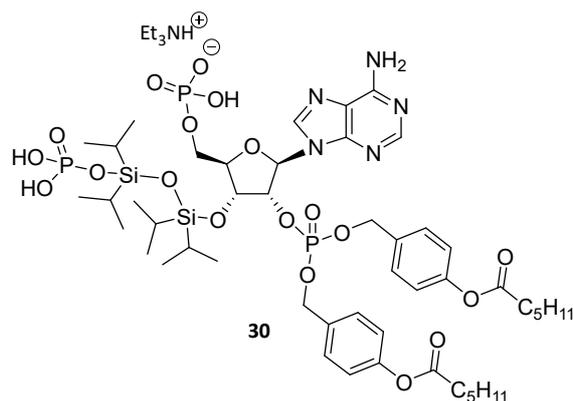
**Abb.29:** Synthese des 5'-Hydroxy-2'-symmetrisch geschützten Adenosinmonophosphats **29**.

Zusätzlich konnte keine Verunreinigung mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der vorangegangenen Reaktion detektiert werden (**Abb.30**). Das Phosphoratom des gewünschten Produkts **29** wies eine chemische Verschiebung von -1.74 ppm auf und konnte mit hoher Reinheit erhalten werden.



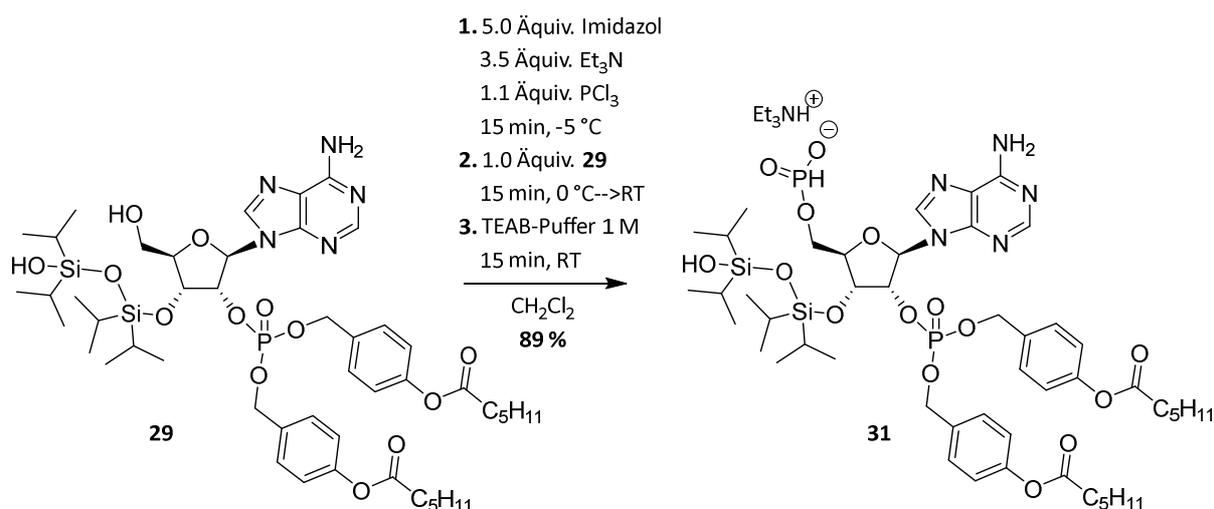
**Abb.30:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des selektiv desilylierten Produkts **29**.

Der nächste Syntheseschritt umfasste die Einführung einer Phosphatgruppe an der 5'-Position, um die Kupplung mit der Nicotinsäureeinheit zu ermöglichen. Bereits in Vorarbeiten durch ALEXANDRA RUTHENBECK und JAMES DOWDEN konnte eine Konkurrenzreaktion zum Silanolphosphat **30** beobachtet werden, weshalb eine direkte Phosphorylierung P(V) nicht angestrebt wurde (**Abb.31**).<sup>155,167</sup> Zu dem Silanolphosphat-Nebenprodukt **30** kann es vermutlich trotz der sterischen Abschirmung durch die Isopropylgruppen der TIPS-Schutzgruppe kommen, aufgrund der größerer Polarisierung des Silanolsauerstoffs. Die effektive Kernladung des Silanolsauerstoffs ist erhöht durch den höheren Elektronegativitätsunterschied von Silicium und Sauerstoff, im Vergleich zu Kohlenstoff und Sauerstoff.



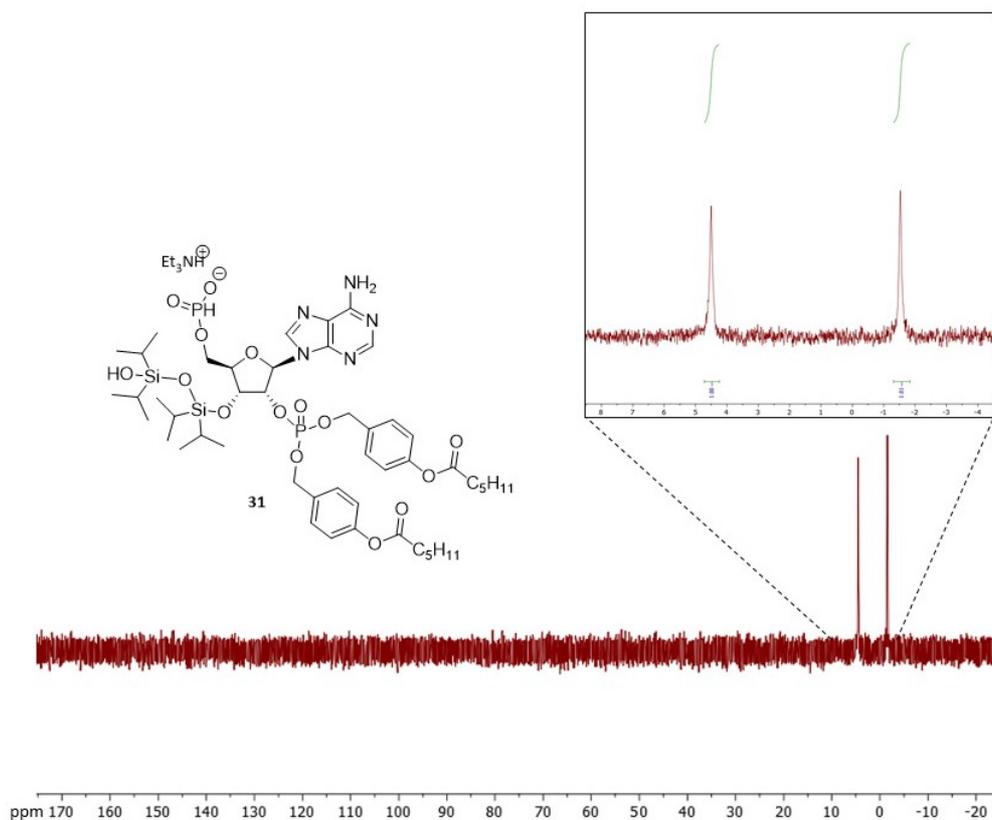
**Abb.31:** Mögliches Nebenprodukt **30** bei der direkten Phosphorylierung.

Aus diesem Grund wurde zunächst die 5'-Position selektiv phosphityliert, was durch die gesteigerte Reaktivität der P(III)-Spezies zu einer hohen Selektivität führt. Als eine effektive und milde Methode hat sich die Synthese eines *H*-Phosponats bewährt. Das benötigte Phosphitylierungsreagenz, Trisimidazolylphosphan, wurde hierfür zunächst *in situ* mit  $\text{PCl}_3$ , Imidazol und  $\text{Et}_3\text{N}$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nach MURPHY *et al.* synthetisiert.<sup>173</sup> Zum Phosphitylierungsreagenz wurde anschließend das 5'-entschützte Adenosin **29** gelöst in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zügig zugegeben. Als besonders effektiv hat sich der Einsatz von 1.1 Äquiv.  $\text{PCl}_3$  erwiesen, bei einer sehr kurzen Reaktionszeit von 15 Minuten, wodurch mögliche Nebenreaktionen verhindert werden konnten. Nach abschließender Hydrolyse mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer, pH 8.0) konnte das gewünschte Produkt **31** mit einer Ausbeute von 89 % isoliert werden (**Abb.32**).



**Abb.32:** Selektive Phosphitylierung der 5'-Position des symmetrisch geschütztem Adenosinmonophosphats **29**.

Das Zielprodukt konnte in sehr hoher Reinheit nach einmaliger RP-18-Säulenchromatographie mit einem Acetonitril/TEAB-Puffer-Gradienten erhalten werden. Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigt die zwei zu erwartenden Signale bei 4.50 ppm für das *H*-Phosphonat und bei -1.53 ppm für das 2'-Phosphat (**Abb.33**). Das Verhältnis der Phosphoratome lag bei 1:1 und auch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte nur ein *H*-Phosphonatsignal einer P-H-Bindung mit entsprechender Kopplungskonstante von über 600 ppm. Zwar wurde kein gekoppeltes  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum aufgenommen, aber da die 5'-Position eine entsprechende chemische Verschiebung im  $^1\text{H}$ -NMR zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich das 5'-*H*-Phosphonat-adenosin **31** gebildet wurde und kein phosphityliertes Silanolnebenprodukt **30** entstanden ist.

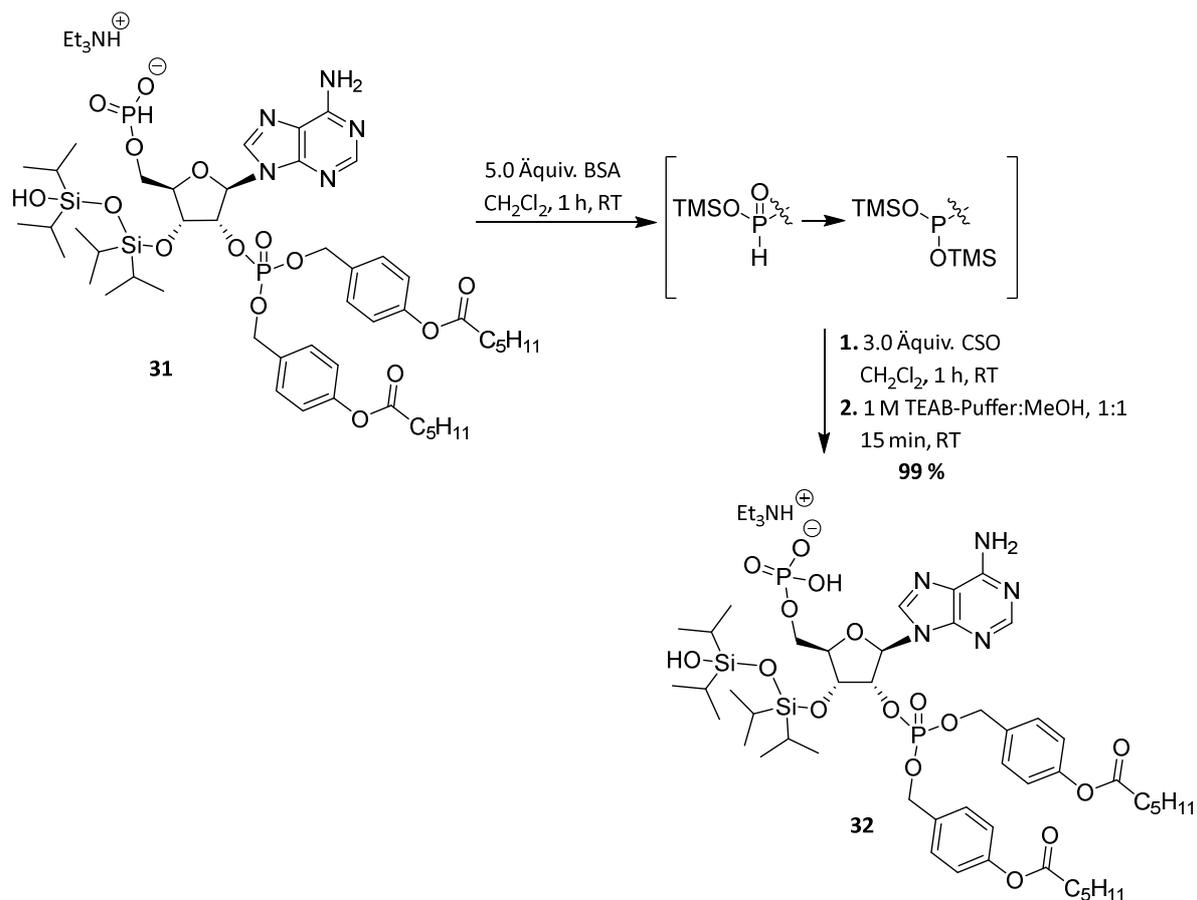


**Abb.33:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des 5'-phosphityliertem Adenosinmonophosphat **31**.

Das synthetisierte 5'-*H*-Phosphonat **31** kann mit vorangegangener Aktivierung zur Kupplung mit der Nicotinsäureeinheit genutzt werden, allerdings waren aus der Literatur keine bestimmten Synthesevorschriften bekannt. Somit wurde das *H*-Phosphonat folgend zum Phosphat oxidiert, um ein größeres Spektrum von Kupplungsmethoden nutzen zu können und auch

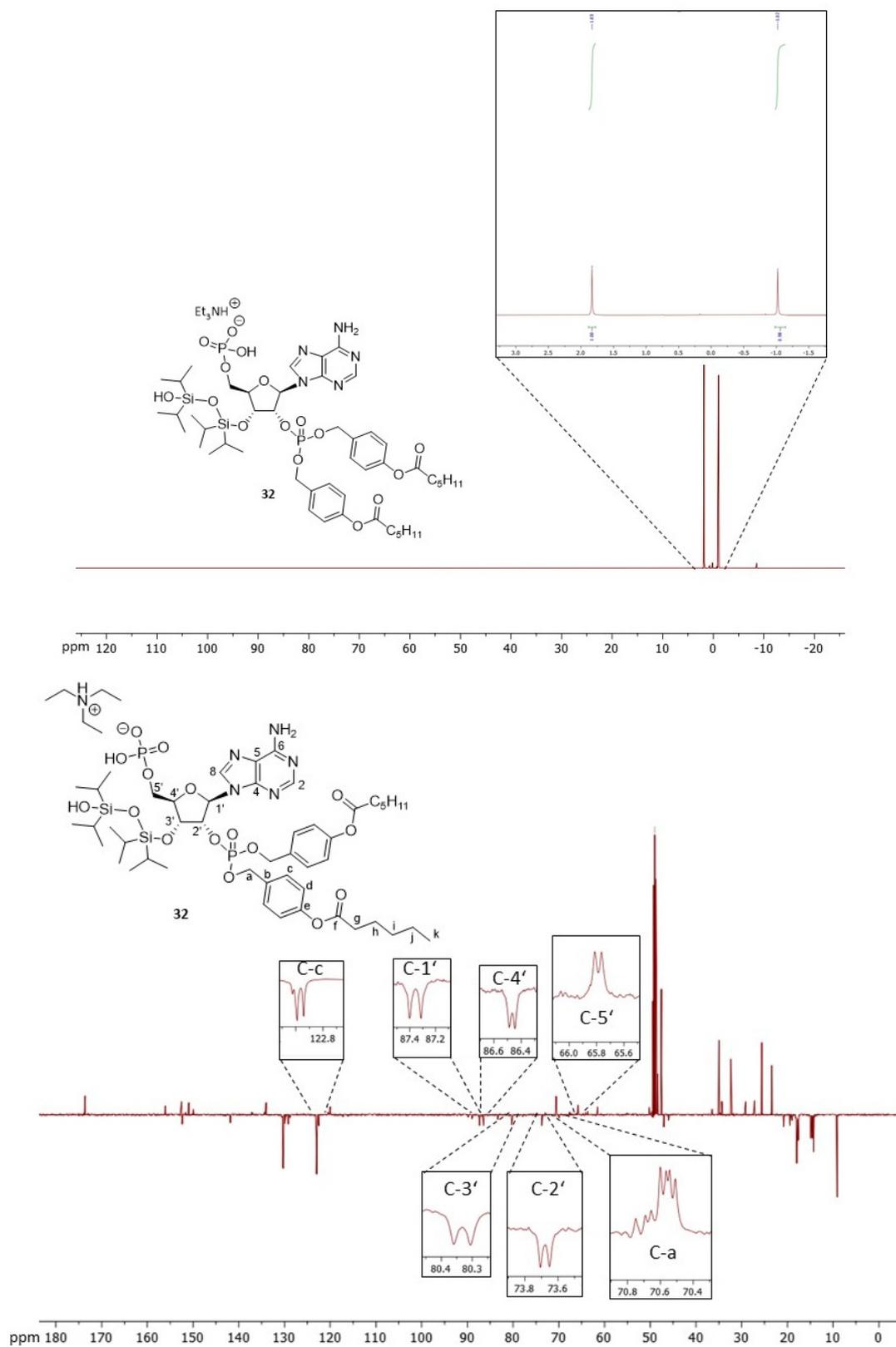
eventuell ein Nicotinsäuremonophosphat zu aktivieren, damit das negativ geladene Sauerstoffatom des Phosphats vom Adenosinmonophosphat nucleophil angreifen kann.

Da die *H*-Phosphonate relativ inert gegenüber Oxidationsmitteln sind, wurde hier zunächst ein hochreaktives trivalentes Silylphosphit gebildet, umso die Oxidation zum Phosphat zu erleichtern. Hierfür wurde das *H*-Phosphonat **31** mit dem milden Silylierungsreagenz *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> behandelt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel und das im Überschuss vorhandene BSA, sowie das bei der Reaktion entstandene *N*-(Trimethylsilyl)acetamid entfernt. Anschließend konnte mit Hilfe von (1*S*)-(+)-(10-Camphorsulfonyl)oxaziridin (CSO) zum Phosphat oxidiert werden.<sup>174</sup> Diese Vorgehensweise folgt der Vorschrift von SEKINE *et al.*, wobei sich das CSO als effektives Oxidationsmittel bewährt hat, da dieses nicht wie z.B. *tert*-BuOOH silyliert wird und somit nicht deaktiviert wird.<sup>174</sup> Die verbliebenen TMS-Gruppen am Phosphat konnten mit einer Lösung aus Methanol und TEAB-Puffer (pH = 8) im Verhältnis von 1:1 abgespalten werden und das gewünschte Adenosindiphosphat **32** in einer annähernd quantitativen Ausbeute nach abschließender RP-18-Säulenchromatografie erhalten werden (**Abb.34**).



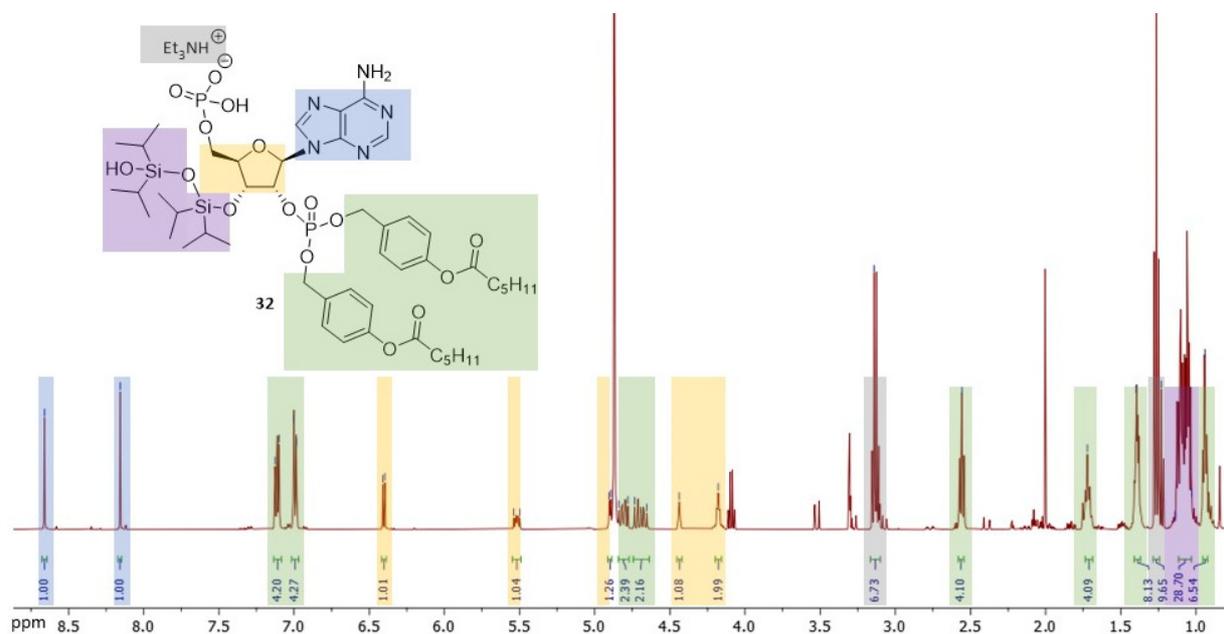
**Abb.34:** Oxidation des *H*-Phosphonats **31** zum Phosphat **32**.

Das zugehörige  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Produkts **32** zeigt eine chemische Verschiebung des 5'-Phosphorsignals von 4.50 ppm des *H*-Phosphonats zu 1.83 ppm für das Phosphat, welches in den üblichen Bereich für Phosphate verschoben ist (**Abb.35, oben**). Zudem weist das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum keinerlei Nebenprodukte oder Edukt auf. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum sind neben den 2'-Phosphat  $J_{\text{CP}}$ -Kopplungen auch die zugehörigen 5'-Phosphat  $J_{\text{CP}}$ -Kopplungen zu erkennen (**Abb.35, unten**).



**Abb.35:** <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum (**oben**) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (**unten**) des Adenosin-2',5'-diphosphats 32.

Auch das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Adenosin-2',5'-diphosphats **32** bestätigt die Oxidation zum Phosphat, da das Signal des *H*-Phosphonats **31** nicht mehr vorhanden ist (**Abb.36**). Außerdem kann die Anzahl der Triethylammonium-Gegenionen auf 1 definiert werden. Somit konnte über eine 5 Stufen Synthese erfolgreich das gewünschte symmetrisch bioreversibel geschützte Adenosin-2',5'-diphosphat **32** mit guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden. Als neuralgischer Punkt kann die selektive Einführung einer Phosphorspezies an der 5'-Position betrachtet werden, da es leicht zur Bildung eines Silanolphosphatnebenprodukts kommen kann.



**Abb.36:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Adenosin-2',5'-diphosphats **32**.

### 6.3.2 Photolabiles Schutzgruppen-Konzept am Adenosin-2',5'-diphosphat

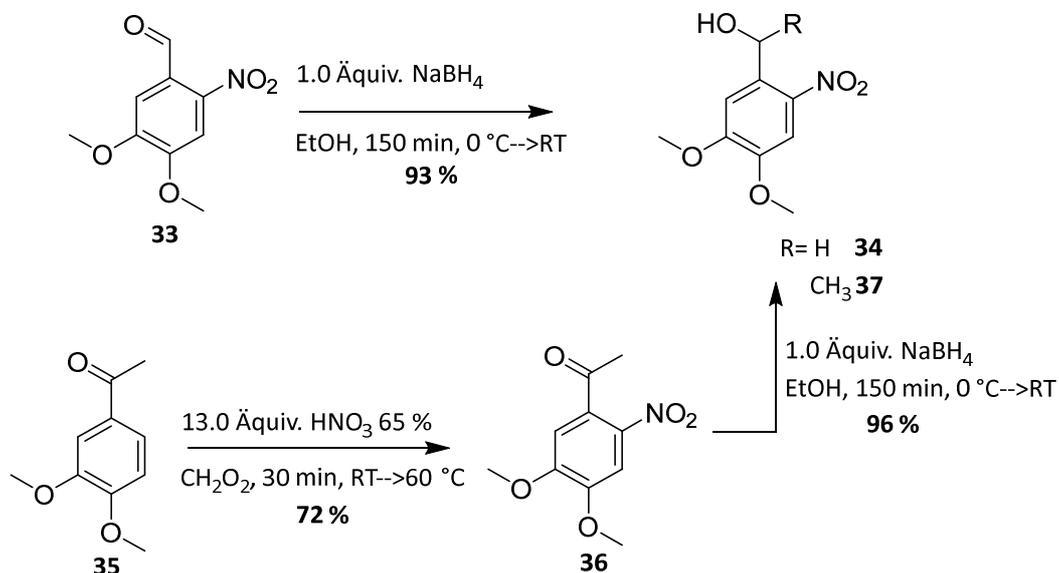
Als weiteres Schutzgruppenkonzept sollte eine geeignete Variante von photolabilen Schutzgruppen gefunden werden. Die zuvor beschriebenen (Kapitel **4.2.2**) *o*-NB Schutzgruppen finden eine breite Anwendung und sind relativ leicht synthetisch zugänglich, daher wurden die *o*-NB Schutzgruppen zunächst als photolabile Schutzgruppe verwendet. Es wurde im Folgenden untersucht, ob die *o*-NB-Schutzgruppen ohne oder mit Methyl-Substituenten an der Benzyl-Position als Amidit zum geschützten 2'-Phosphat verwendet werden können. Außerdem wurde die photolytische Abspaltungseigenschaften untersucht. In beiden Fällen wurde zunächst nicht primär auf die Steigerung der Lipophilie der Schutzgruppe wertgelegt, daher

sollten für die beiden *o*-NB-Varianten lediglich zwei Methoxy-Substituenten verwendet werden, um das Absorptionsmaximum bathochrom zu verschieben. Die übliche Spaltungswellenlänge der *o*-NB-Schutzgruppen liegt bei 300 nm, mit den zwei Methoxy-Substituenten ist eine Spaltung mit einer weniger zellschädigenden Wellenlänge von 365 nm möglich.

Die Synthese der *o*-NB-Schutzgruppe ohne benzyllischer Methylfunktion wurde ausgehend vom kommerziell erhältlichen nitriertem Edukt **33** begonnen. Das Produkt **34** konnte nach Beendigung der Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in wasserfreiem Ethanol von der Aldehydfunktion zum Alkohol **34** in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden (**Abb.37**). Die Reduktion konnte neben der dünnschichtchromatografischen Verfolgung auch im Löslichkeitsverhalten der Substanzen beobachtet werden, da der Aldehyd nur geringfügig in Ethanol löslich war, das Produkt aber gut löslich war.

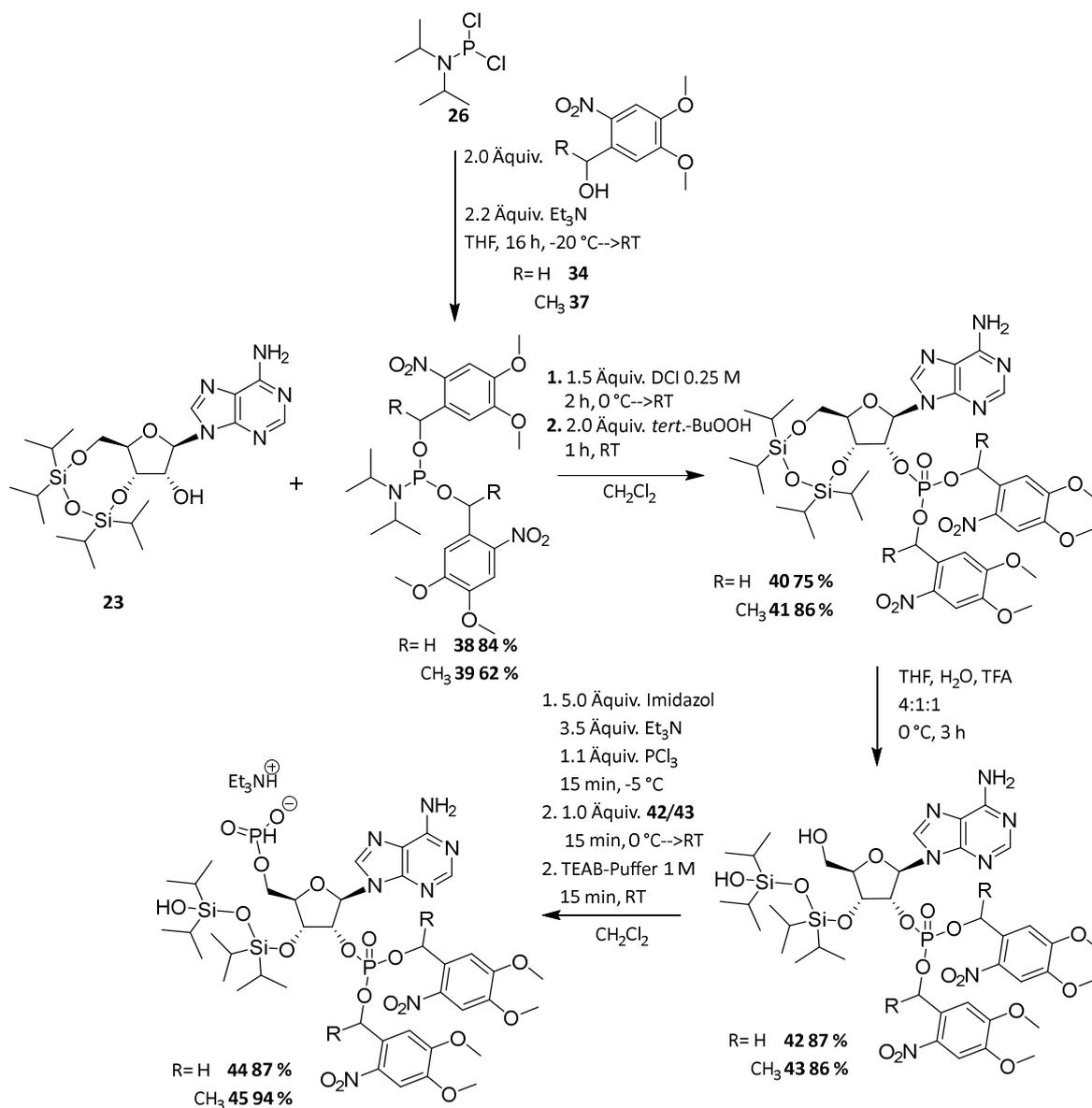
Die Synthese des Derivats mit benzyllischer Methylfunktion wurde ausgehend von 3',4'-Dimethoxyacetophenon **35** begonnen. Der erste Schritt bestand hier in der Nitrierung in *ortho*-Position. Zur Gewährleistung der einfachen Nitrierung in *ortho*-Position musste ein geeignetes Nitrierungsreagenz gefunden werden. Neben zahlreichen Nitrierungsvarianten hat sich die Kombination von Ameisensäure und 65 % Salpetersäure zur Erzeugung des Nitroniumions (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) als effizient erwiesen, da die Reaktion sehr schnell verläuft, ohne die Entstehung von Nebenprodukten. Hierbei muss stattdessen auf die Temperaturkontrolle geachtet werden, da bei Überschreitung von 60 °C eine sehr rasche und starke Entwicklung von nitrosen Gasen beobachtet werden konnte. Die elektrophile aromatische Substitution des *in situ* erzeugten NO<sub>2</sub><sup>+</sup> wird durch die drei Substituenten dirigiert. Die zwei Methoxygruppen weisen einen +M-Effekt auf, also einen aktivierenden Effekt und dirigieren das NO<sub>2</sub><sup>+</sup> in die *ortho/para*-Position. Die Nitrierung in Position 6 und Position 2 wird jeweils von zwei Substituenten dirigiert, dabei findet die Nitrierung aber fast ausschließlich in Position 6 statt, da diese Position durch die sterische Hinderung der Position 2 bevorzugt ist. Eine Zweitnitrierung findet mit diesem Nitrierungsreagenz nicht statt, da das aromatische System auf Grund des Nitro-Substituenten deaktiviert ist. Die Ausbeute der Nitrierung lag nach säulenchromatographischer Reinigung bei 72 %. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestätigte dabei die Synthese des gewünschten Produkts **36**, da zwei aromatische Singulettssignale entstanden sind und damit die Nitrierung in Position 2 ausgeschlossen werden konnte. Wie bei der vorangegangenen Reaktion wurde das Keton **37**

mit  $\text{NaBH}_4$  in Ethanol reduziert. Auch hier konnte eine annähernd quantitative Ausbeute erzielt werden (**Abb.37**).



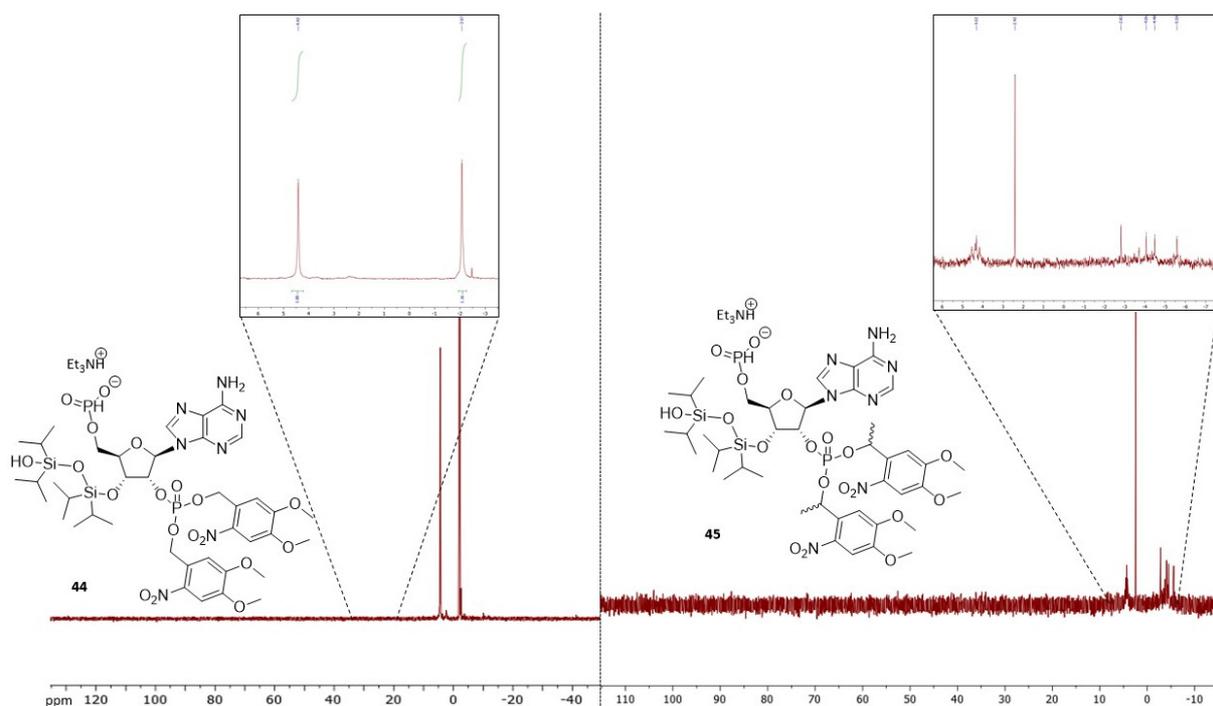
**Abb.37:** Synthese der beiden Dimethoxynitrobenzylschutzgruppen **34** und **37**.

Im Folgendem wurden die synthetisierten *o*-NB-Schutzgruppen nach demselben Reaktionsprinzip wie bei dem bioreversibel geschütztem Adenosin-2',5'-diphosphat **32** eingesetzt (**Abb.38**). Zunächst erfolgten die Synthesen zu den Amiditen **38** und **39** durch die Umsetzung mit Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit. Hierbei wurden Ausbeuten von 84 % für das Amidit **38** und 62 % für das Amidit **39** erzielt. Die relativ niedrige Ausbeute von 62 % für das Amidit **39** mit der photolabilen Schutzgruppe **37** mit benzylicher Methylfunktion kann mit dem erhöhten sterischen Anspruch der Alkoholfunktion erklärt werden, hierdurch war auch eine erhöhte Instabilität des Amidits zu beobachten. Im Zuge dessen war das Amidit **39** nicht lagerfähig und musste umgehend mit dem Adenosin **23** gekuppelt werden. Bei beiden photolabil geschützten Derivaten wurden in den nachfolgenden Synthesestufen vergleichbare Ausbeuten mit einem vergleichbaren Reinigungsaufwand zu dem der Syntheseroute mit der symmetrisch bioreversibel geschützten Derivats **28**, siehe Kapitel **6.3.1**, erzielt (**Abb.38**). Die Syntheseroute wurde bis zur Darstellung des *H*-Phosphonats verfolgt, da diese jeweils wasserlöslich sind und für photolytische Untersuchungen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit pH 7.3 (zur Simulation der physiologischen Bedingungen) geeignet sind.



**Abb.38:** Synthese der symmetrisch photolabil geschützten 2'-Phosphat-5'-Phosphit-adenosin **44** und **45**.

Durch die Einführung der *o*-NPE-Schutzgruppe **37** mit einer benzylichen Methylgruppe weist das Molekül **45** zwei stereogene Zentren auf. Dies erschwert die NMR-spektroskopische Auswertung, da eine exakte Zuweisung der Signale zu den jeweiligen vier Diastereomeren nicht möglich ist. Die Entstehung der Diastereomere ist im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum an der Vielzahl der jeweiligen Signale zu erkennen (**Abb.39, rechts**), daneben ist zudem eine Verunreinigung bei 2.41 ppm zu beobachten, hierbei könnte es sich um ein Silanolphosphit-Nebenprodukt handeln.

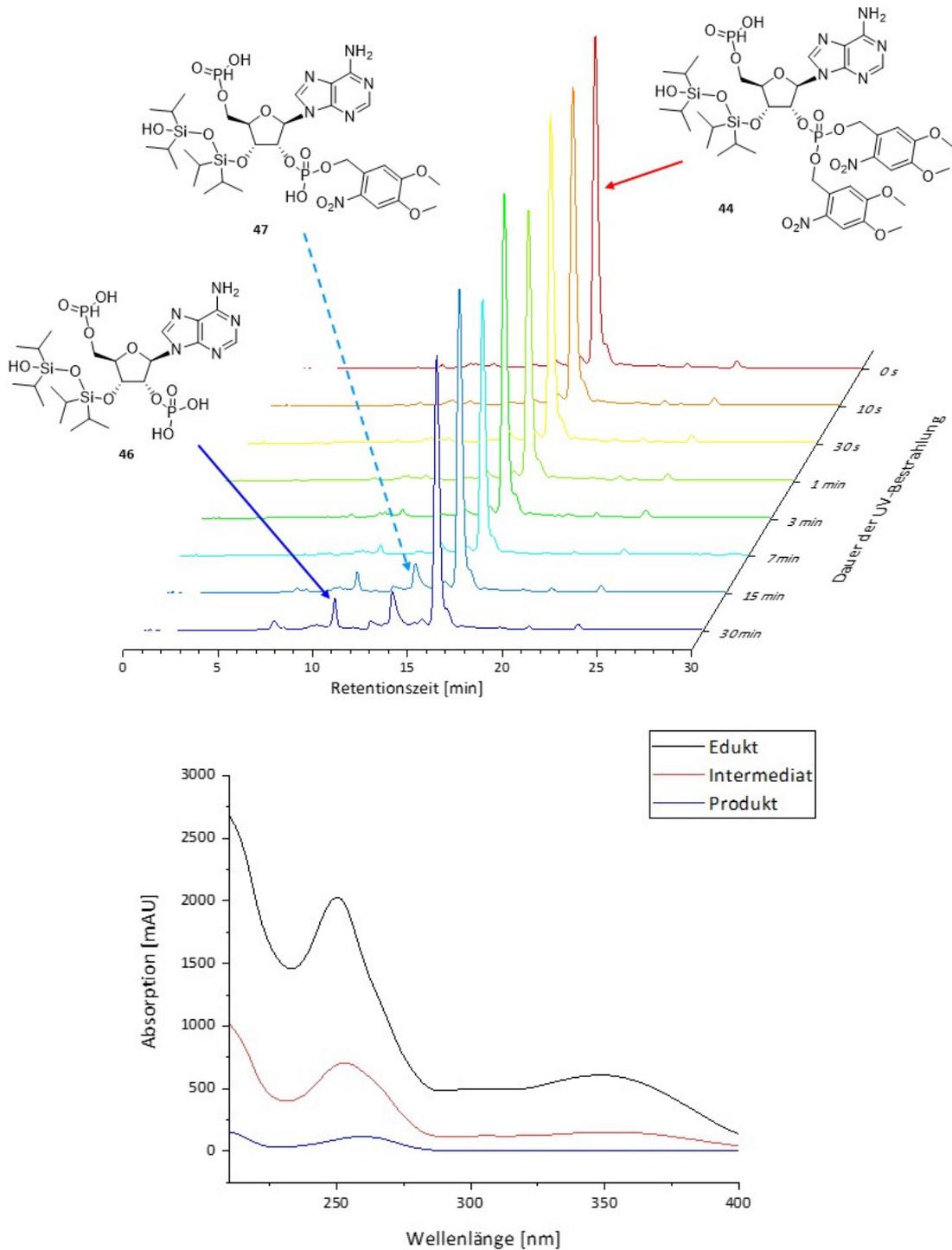


**Abb.39:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der zwei symmetrisch photolabil geschützten 2'-Phosphat-5'-Phosphit-Adenosin **44** (links) und **45** (rechts).

Folglich wurden die Derivate photolytisch untersucht und die Spaltungsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Photogruppen verglichen, da hierzu nur sehr wenige belastbare Literaturdaten existieren, welche vergleichbare Photolysebedingungen und freizusetzende Moleküle verwenden. Damit die Spaltungsgeschwindigkeiten langsam verläuft und somit verglichen werden können, wurden relativ leistungsschwache UV-Quellen verwendet. Für die Photolysen wurden zwei 30 W UV-Röhren mit einer Strahlungswellenlänge von 365 nm verwendet. Um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, wurden die Substanzen in PBS-Puffer ( $\text{pH} = 7.3$ ) gelöst, mit einer Konzentration von 1 mg/mL. Die Lösungen wurden bei der Bestrahlung gerührt, so dass die Lösung möglichst durchgehend homogen bleibt. Die Probenentnahme folgte nach definierten Zeitpunkten, wobei die Photolyse analytisch mit Hilfe einer HPLC verfolgt wurde. Zur Analyse wurde die HPLC-Methode-A verwendet. Die Höchstbestrahlungsdauer lag bei 30 Minuten, da eine weitere Bestrahlung zu einer starken Erhitzung der Probenlösung führte, wodurch mögliche ergebnisverfälschende Thermolyse-Nebenreaktionen möglich sind.

Die Photolyse des Derivats **44** ohne benzyliche Methylgruppe ist in **Abb.40** (oben) dargestellt. Bei 0 s ist das Derivat **44** ohne vorangegangene Photolyse injiziert. Die freigesetzten Produkte wurden anhand der zugehörigen Absorptionsspektren zu den jeweiligen Signalen identifiziert.

Diese Zuordnung ist möglich, da bei dem komplett entschützten Adenosinderivat **46** kein Absorptionsmaximum bei 360 nm der Photogruppe beobachtet werden konnte und bei dem teilweise freigesetzten Derivat **47** zwar ein Absorptionsmaximum bei 360 nm zu erkennen ist, aber die Polarität sich signifikant ändert und das Absorptionsvermögen erniedrigt ist (**Abb.40**, unten). Zusätzlich wurde das ungeschützte Derivat **46** separat injiziert und die Retentionszeit konnte, abhängig vom HPLC-System, bei ungefähr 11 Minuten identifiziert werden. Zu erkennen ist bei der Photolyse des Derivats **44**, dass nach 30 Minuten UV-Bestrahlungszeit nur eine geringfügige Menge des einfach entschützten Intermediats **47** bei einer Retentionszeit von 14 Minuten und des komplett entschützten Derivats **46** bei 11 Minuten Retentionszeit, freigesetzt wurden. Zudem ist die Bildung des absorbierenden Spaltungsnebenprodukts *o*-Nitrosoaldehyd **48** bei 13 Minuten Retentionszeit zu beobachten. Für eine Anwendung zur Maskierung von NAADP für die Untersuchung der sehr schnell verlaufenden intrazellulären Prozesse der NAADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, siehe Kapitel **4.1.3**, stellt diese photolabile Schutzgruppe keine anforderungserfüllende Alternative aufgrund der trägen Freisetzungsgeschwindigkeit, dar.

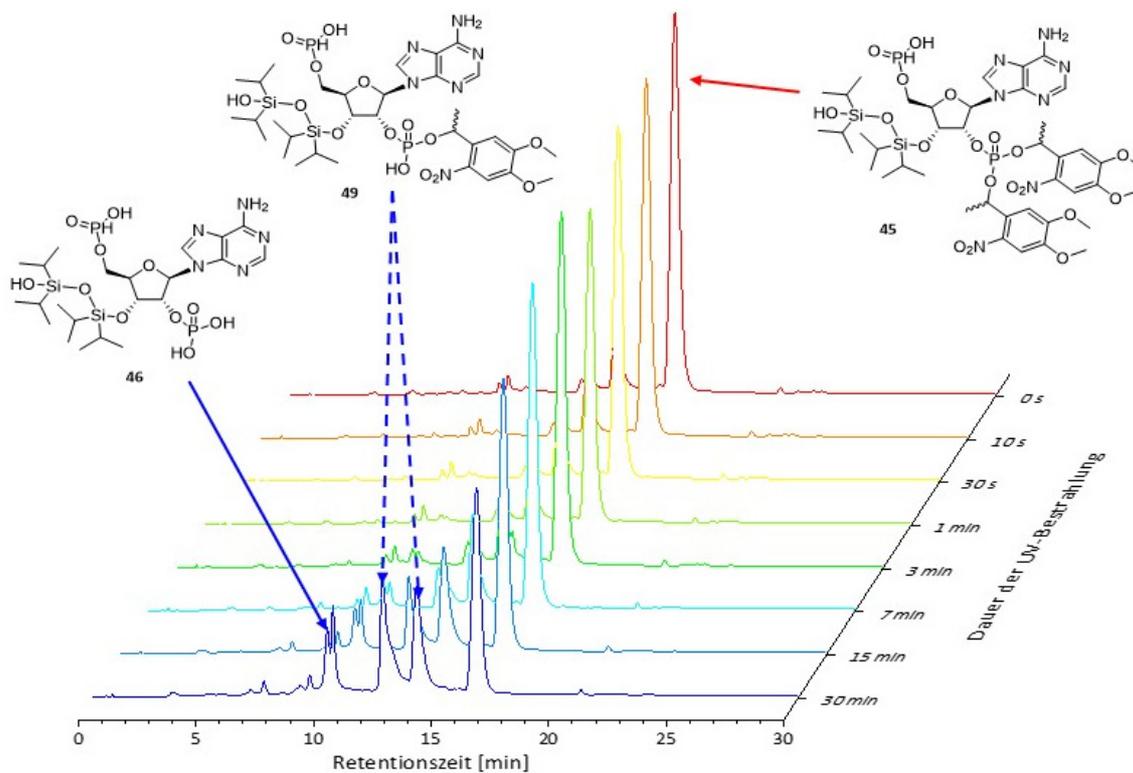


**Abb.40:** Photolyse von dem Derivat **44** ohne benzylicher Methylgruppe (oben), Absorptionsspektren der jeweiligen HPLC-Signale (unten).

Die Photolyse des Derivats **45** mit einer benzylichen Methylgruppe (*o*-NPE-Schutzgruppe) unter gleichen Bedingungen zeigte eine signifikante Steigerung von Geschwindigkeit und Effizienz der photolytischen Spaltung (**Abb.41**). Begründet werden kann dies mit der Erhöhung der Quantenausbeute durch den elektronenschiebenden Effekt der Methylgruppe.<sup>111</sup> Der

elektronenschiebende Effekt der Methylgruppe führt zu einer erhöhten Elektronendichte am benzylichem Kohlenstoff, wodurch der radikalische Übergangszustand stabilisiert wird. Hierdurch wird die C-H-Bindung geschwächt und der intramolekulare Wasserstofftransfer ist erleichtert. Zusätzlich wird die Endothermie des Wasserstofftransfers herabgesetzt, so dass die Rückreaktion erschwert ist und die Bildung des cyclischen Übergangszustand wahrscheinlicher ist.<sup>175</sup>

Das komplett entschützte Derivat **46** konnte bei 11 Minuten Retentionszeit identifiziert werden. Das einfach entschützte Intermediat **49** bei 12 und 13 Minuten, sowie das symmetrisch photolabil geschützte Edukt **45** bei 16 Minuten Retentionszeit. Bei der Konzentrationsabnahme des Edukts **45** ist im Gegensatz zur Photolyse des Edukts **44** eine signifikante Erhöhung der Spaltungsgeschwindigkeit zu erkennen. Nach 30 Minuten Bestrahlungsdauer kann nur noch die Hälfte des geschützten Edukts **45** detektiert werden. Diese Erhöhung folgt auch der in der Literatur beschriebenen Zunahme der Spaltungsgeschwindigkeit der *o*-NPE-Schutzgruppe, im Vergleich zu der *o*-NB-Schutzgruppe, mit einem Faktor von ungefähr 10.<sup>111,130</sup>



**Abb.41:** Photolyse von dem Derivat **45** mit benzylicher Methylgruppe.

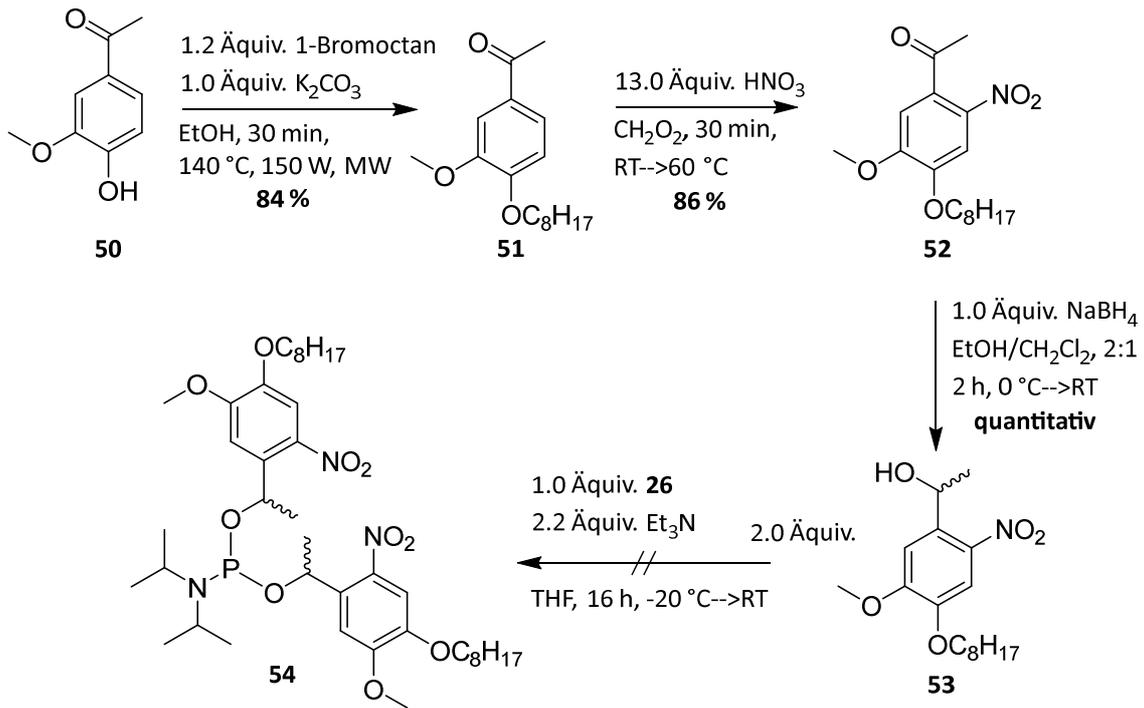
Trotz des bereits erwähnten Nachteils der Einführung von zwei stereogenen Zentren bei den *o*-NPE-Schutzgruppen, überwiegt der Vorteil des um ein Vielfaches erhöhten

Spaltungsgeschwindigkeit. Zur Gewährleistung der passiven Diffusion für die zelluläre Untersuchung sollte die Lipophilie der *o*-NPE anschließend erhöht werden. Hierfür wurde eine Methoxygruppe durch eine Octanoxygruppe substituiert.

Die Synthese der *o*-NPE-C8-Schutzgruppe wurde ausgehend von 4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenon **50** mit einer WILLIAMSON-Ethersynthese begonnen (**Abb.42**). Die Einführung der Octylkette gelang unter basischen Bedingungen und dem dadurch induzierten nucleophilen Angriff des entstandenen Phenolats auf das elektrophile Kohlenstoffatom des 1-Bromoctans. Die Reaktionsdauer konnte unter Verwendung eines Mikrowellenreaktors auf 30 Minuten verkürzt werden im Vergleich zu den langen Reaktionszeiten von 16 Stunden unter Rückfluss ohne Mikrowellenreaktor. Es konnte eine Ausbeute von 84 % von **51** ohne aufwändige Reinigung erzielt werden. Die darauffolgende Nitrierung in *ortho*-Position **52** und die Reduktion der Ketonfunktion zum Alkohol **53** verlief mit vergleichbaren Ausbeuten zu den vorangegangenen Synthesen der *o*-NB- und *o*-NPE-Schutzgruppen.

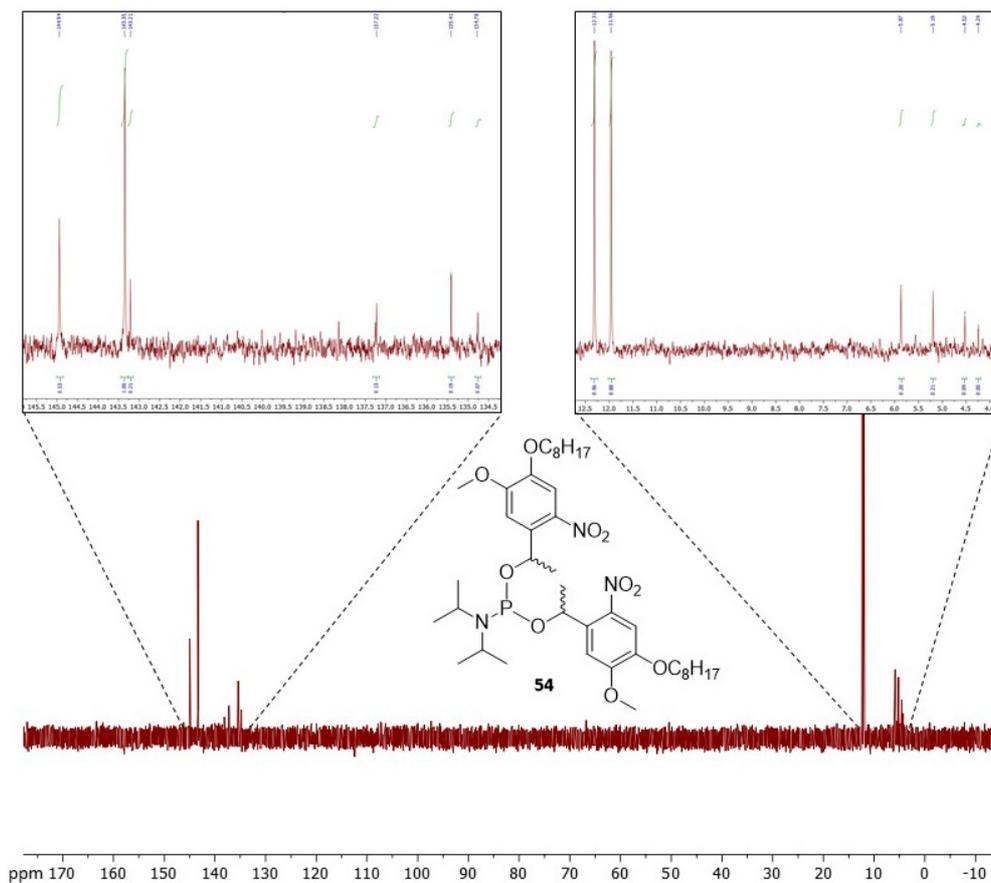
Die Synthese des Amidits **54** unter den üblichen Reaktionsbedingungen gelang nicht. In parallel verlaufenden Synthesen von NILS JESCHIK konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, dort wurde alternativ die Synthese über *H*-Phosphonate zur Kupplung mit Adenosin-5'-diphosphat (ADP) fortgeführt.<sup>176</sup> Die Phosphorylierung über die *H*-Phosphonatroute der 2'-Position des Adenosins **23** bietet sich an dieser Stelle nicht an, da die Phosphorylierung von Alkoholfunktionen mit dieser Methode nur bedingt möglich ist und mit mäßigen Ausbeuten verläuft.

Aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe in der benzylicischen Position konnte bereits bei der Amiditsynthese mit Methoxyresten **39** eine relativ niedrige Ausbeute beobachtet werden. Außerdem war eine hohe Instabilität zu beobachten, wobei diese Instabilität bei dem *o*-NPE-C8-Amidit **54** wahrscheinlich noch erhöht ist und somit die Amiditkupplung nicht realisiert werden konnte.



**Abb.42:** Versuch der Synthese des symmetrisch photolabil geschützten Amidits mit *o*-NPE-Schutzgruppe und einer C8-Alykylkettenmodifikation **54**.

In **Abb.43** ist das unmittelbar nach der Reinigung aufgenommene  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des *o*-NPE-C8-Amidit **54** dargestellt. Es konnten nicht eindeutig die Signale der Diastereomeren des gewünschten Produkts **54** zugewiesen werden, da neben den erwarteten Signalen  $>140$  ppm auch viele Signale zwischen 130 ppm und 140 ppm detektiert wurden, welche nicht zugeordnet werden konnten. Zudem konnte ein sehr hoher Anteil der Zerfallsprodukte im Bereich von 4.0 ppm bis 12.0 ppm beobachtet werden, dabei handelt es sich entweder um eine *H*-Phosphonatspezies oder um eine Amidatspezies. Auch bei dem Versuch der Phosphorylierung mit dem vermeintlichen Amidit **54** und dem Adenosin **23** konnte, auch bei direktem Umsatz des Amidits ohne Isolierung, keine Reaktion beobachtet werden.



**Abb.43:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum der Reaktion zum Amidit **54**.

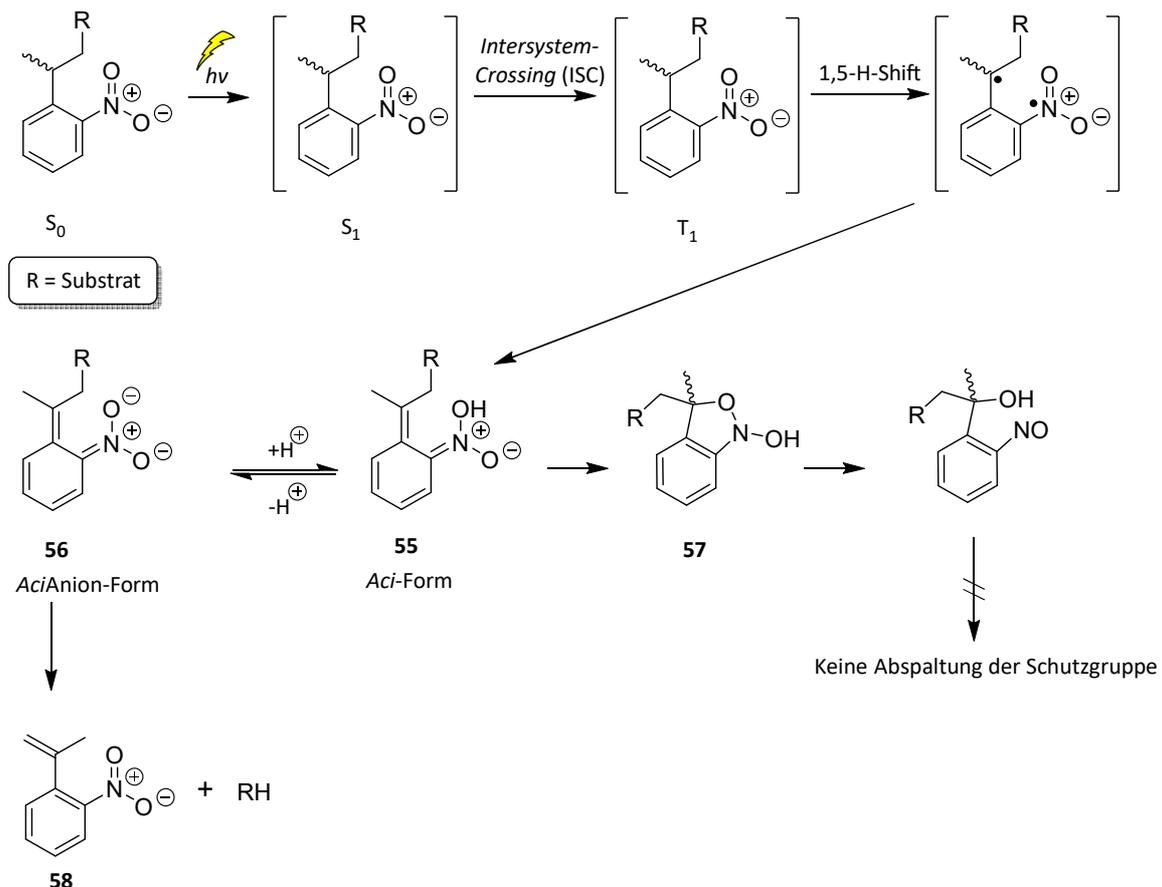
Aufgrund dieser Syntheseschwierigkeiten wurde entschieden, eine alternative Variante zur *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen zu verwenden. Da die Bildung, bei der Photolyse, der sehr reaktiven Nitroso-aldehyd- oder -ketonenebenprodukte und deren starke UV-Absorption problematisch bei der zellulären Anwendung sein kann, sollte diese Problematik bei der Wahl der alternativen Photoschutzgruppe berücksichtigt werden.

### 6.3.2.1 NPP-photolabiles Schutzgruppenkonzept am Adenosin-2',5'-diphosphat

Als Weiterentwicklung der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe kann die von PFLEIDERER *et al.* im Jahr 1997 publizierte photolabile 2-(2-Nitrophenyl)ethyl-Schutzgruppe (NPP) gesehen werden.<sup>177</sup> Bei dieser Variante wurde eine zusätzliche Methylengruppe eingeführt, wobei durch diese geringfügige Veränderung des Moleküls ein anderer Spaltungsmechanismus postuliert wurde (**Abb.44**). Außerdem wurde vermutet, dass die Erhöhung des Abstands des Amidits zu der benzylicen Methylfunktion eine erhöhte Stabilität zur Folge hat, vergleichbar mit der

Stabilität der *o*-NB-Schutzgruppe ohne benzyliche Methylfunktion. Vorteilhaft ist zudem die publizierte nahezu Verdopplung der Photolysegeschwindigkeit zu *o*-NPE-Schutzgruppen zu sehen.

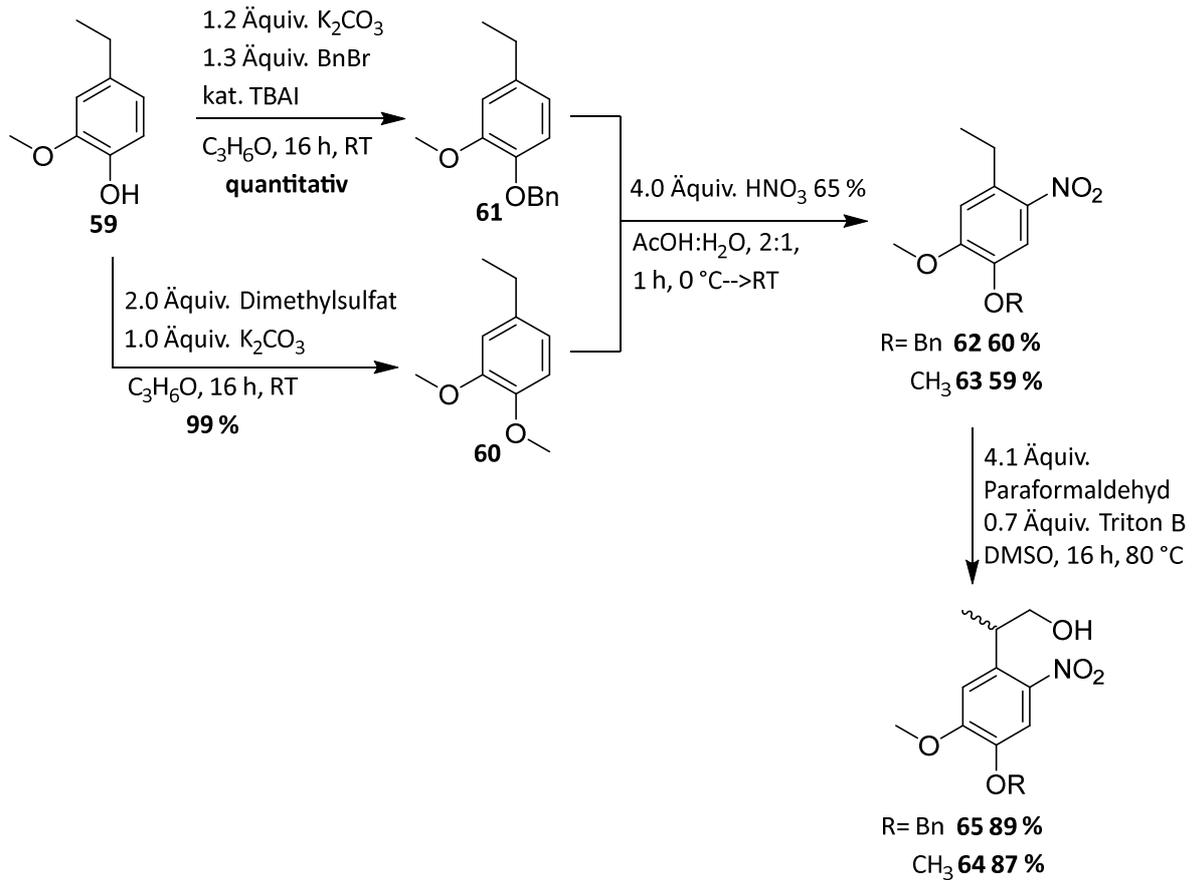
Vergleichbar mit den *o*-NB- oder *o*-NPE-Schutzgruppen beginnt der Spaltungsmechanismus nach der NORRISH-Typ-II-Reaktion bis zur Bildung des *Acinitro*-Intermediats **55**. Allerdings verläuft die Substratfreisetzung durch eine intramolekulare  $\beta$ -Eliminierung aus dem *Acinitro*-Anion **56** (**Abb.44**). Daraus ergibt sich der Nachteil dieser Schutzgruppe, welche nur bei Gegenwart eines Protonenakzeptors und einer guten Abgangsgruppe zu einer Substratfreigabe führt, da sich sonst ein cyclisches *Benzisooxazolidin*-Derivat **57** bildet, welches bei der anschließenden Ringöffnung nicht zur Substratfreisetzung führt. Neben dem Substrat wird als Spaltungsprodukt Nitrostyrol **58** freigesetzt, welches eine deutlich herabgesetzte Reaktivität im Vergleich zu den Nitrosospaltprodukten aufweist.<sup>134,178</sup>



**Abb.44:** Postulierter Photolysemechanismus der NPP-Schutzgruppen.<sup>179</sup>

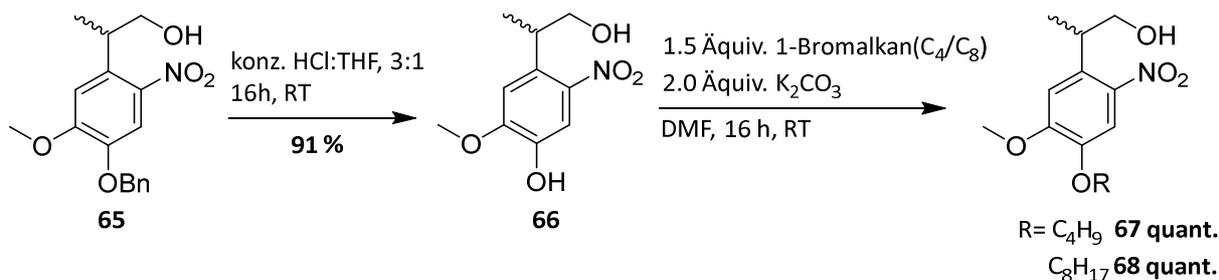
Bei der angestrebten Verwendung als Maskierung eines Phosphats als gute Abgangsgruppe und bei physiologischen pH-Wert sollten diese Nachteile aber nicht ins Gewicht fallen.

Die Synthese der NPP-Schutzgruppe erfolgte ausgehend von 4-Ethylguajacol **59**. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Reaktionsansätze verfolgt. Zum einen wurde die phenolische Hydroxygruppe benzylich geschützt und zum anderen erfolgte die Einführung einer Methoxygruppe. Die Synthese der Methoxygruppe **60** konnte unter basischen Bedingungen mit Dimethylsulfat realisiert werden, wobei das gebildete Phenolat nucleophil am elektrophilen Kohlenstoff des Dimethylsulfat in einer  $S_N2$ -Reaktion angreift. Die Einführung der Benzylschutzgruppe **61** wurde ebenfalls mittels WILLIAMSSON-Ethersynthese mit Benzylbromid umgesetzt. Hier wurde zur Reaktionsbeschleunigung eine katalytische Menge Tetrabutylammoniumiodid zugegeben, welches zunächst das Bromid gegen das reaktivere Iodid am Benzylbromid *in situ* austauscht in einer FINKELSTEIN-Reaktion. Bei beiden Synthesen konnte nach Normalphasen-Säulenchromatographie eine quantitative Ausbeute erreicht werden. Die anschließende Nitrierung sollte zunächst mittels dem neutralen Nitrierungsreagenz Nitroniumtetrafluoroborat und der sterisch gehinderten Base 2-Picolin realisiert werden, wodurch die Benzylschutzgruppe nicht sauer gespalten werden kann. Bei dieser Synthese konnte kein Umsatz beobachtet werden, weshalb unter leicht sauren Bedingungen mit verdünnter Essigsäure die Bildung des reaktiven Nitronium-Ions katalysiert wurde. Die beiden *ortho*-nitrierten Produkte **62** und **63** konnten nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 59 % und 60 % isoliert werden. Die darauffolgende Einführung der Hydroxymethylenfunktion wurde nach der Deprotonierung der, durch Mesomerie stabilisierte, *CH*-aziden Benzylposition mit der starken organischen Base Triton B durch die Erwärmung der Reaktionslösung mit Paraformaldehyd durchgeführt. Die Hydroxymethylierung verläuft nach der thermischen Zersetzung von Paraformaldehyd zu Formaldehyd mittels Aldol-Reaktion zum gewünschten Produkt. Das verwendete DMSO als Lösungsmittel ist im üblichen nur schwer wieder zu entfernen, konnte aber in diesem Fall durch Ausschütteln der Reaktionslösung mit Wasser und Ethylacetat erfolgreich entfernt werden. Nach der darauffolgenden säulenchromatographischen Reinigung konnten sowohl das Methoxyderivat **64**, als auch das Benzyl-geschützte Derivat **65** als racemisches Gemisch in annähernd 90 % Ausbeute isoliert werden (**Abb.45**).<sup>180</sup>



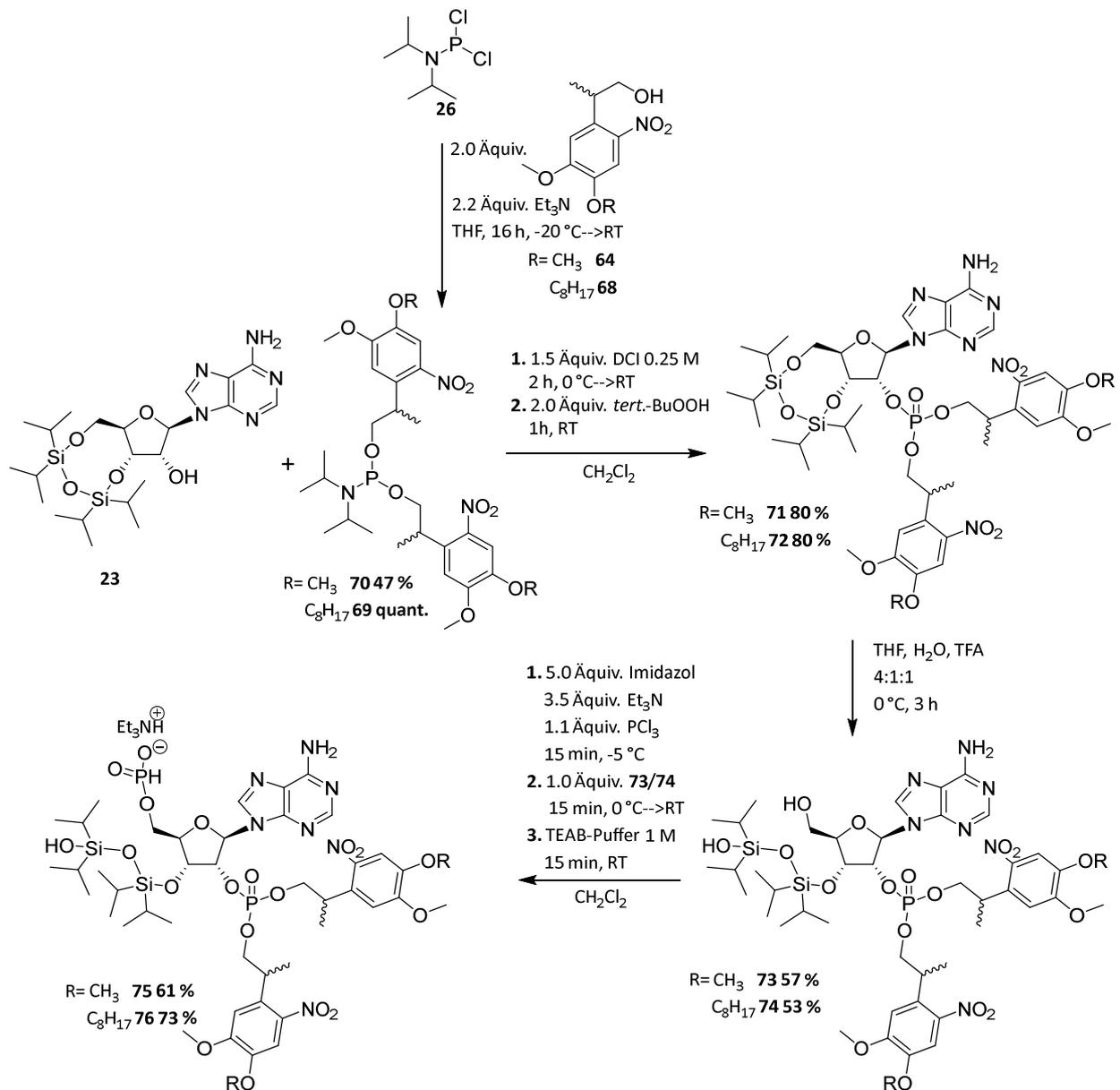
**Abb.45:** Synthese der NPP-Schutzgruppe **64** und des Synthesebaustein für die NPP-C8-Schutzgruppe **65**.

Zur Erhöhung der Lipophilie und da zudem nicht bekannt war, welche Alkylkettenlänge für die Amiditsynthese toleriert wird, wurde an dem Benzyl-geschützten Derivat **65** die Modifikationen mit C4- und C8-Alkylkette angebracht. Hierzu musste zunächst die Benzylschutzgruppe entfernt werden. Da keine reduktiven Bedingungen, aufgrund der Nitrogruppe in Frage kommen, wurde die Entschützung unter stark sauren Bedingungen mit konzentrierter Salzsäure in THF im Verhältnis 3:1 durchgeführt, was zur Eliminierung des mesomeriestabilisierten Benzylkation führt. Das erhaltene Hydroxy-Zwischenprodukt **66** konnte unter bekannten Bedingungen zu den lipophilen NPP-Derivaten **67** und **68** mit jeweils quantitativer Ausbeute umgesetzt werden (**Abb.46**).<sup>134,180</sup>



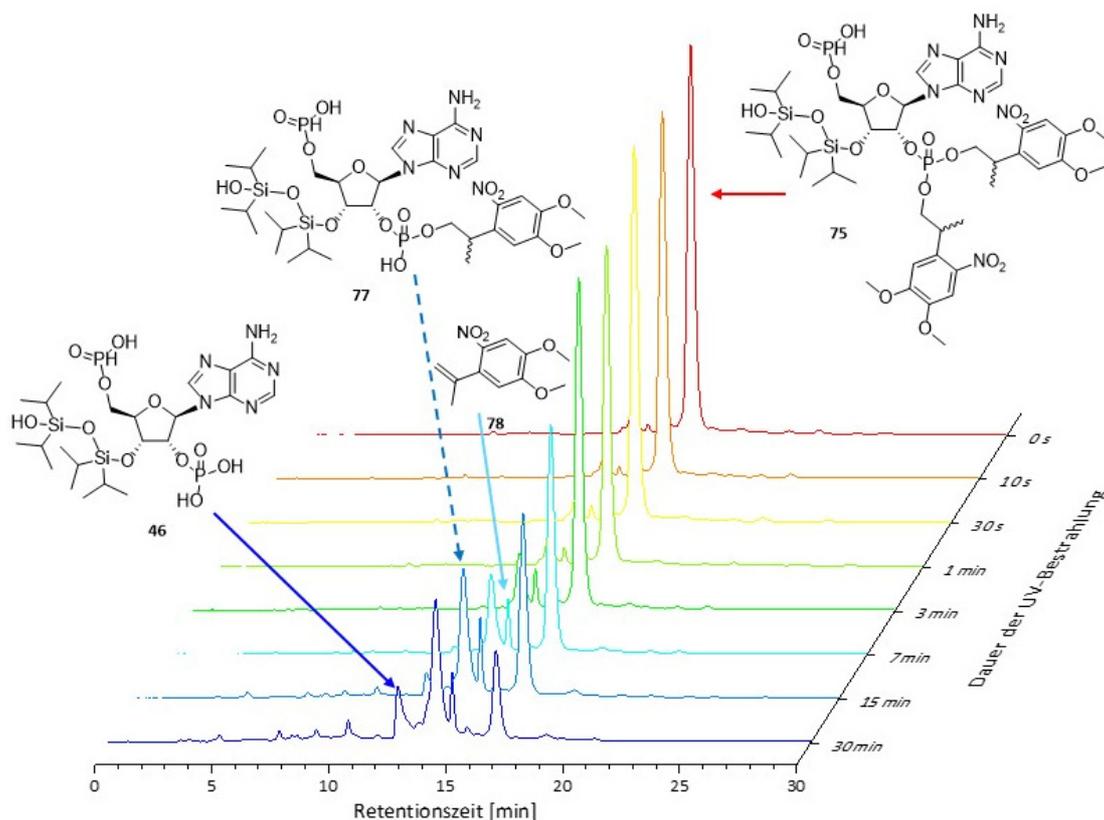
**Abb.46:** Entschützung des nitrierten Derivats **65** und anschließender Synthese der lipophilen NPP-Derivate **67** und **68**.

Zur Überprüfung der photolytischen und der synthetischen Eigenschaften der verwendeten NPP-Schutzgruppe wurden die Derivate mit einer C1- und C8-Alkylkette **64/68** verwendet. Im Gegensatz zu der NPE-C8-Schutzgruppe **54** gelang die Synthese des Amidits mit der NPP-C8-Schutzgruppe **68** in quantitativer Ausbeute, weshalb eine Synthese des NPP-C4-Amidits nicht weiter notwendig erschien. Die Synthese des NPP-C1-Derivats **70** gelang nur in einer moderaten Ausbeute von 47 %, wofür wahrscheinlich eine teilweise Zersetzung bei der säulenchromatographischen Reinigung verantwortlich war, da die zugesetzte Menge an Triethylamin zum Eluenten vermutlich nicht ausreichend war. Die Kupplung der jeweiligen Amidite **69/70** mit dem Adenosinderivat **23** gelang mit einer guten Ausbeute von jeweils 80 %, wobei wie schon bei den Synthesen der geschützten 2'-Phosphate **71** und **72** zuvor leichte Verunreinigungen von nicht abzutrennende *H*-Phosphonate oder Amidate vorhanden waren. Hierdurch ist auch zum Teil die niedrigere Ausbeute der darauffolgenden selektiven Entschützung der 5'-Position zu erklären, da in diesem Schritt diese Verunreinigungen gänzlich entfernt werden konnten. Bei den beiden Phosphitylierungen wurde nach einer RP-18-säulenchromatographischer Reinigung eine Ausbeute von 61 % bei dem C1-Derivat **75** und eine gute Ausbeute von 73 % bei dem C8-Derivat **76** erzielt (**Abb.47**).



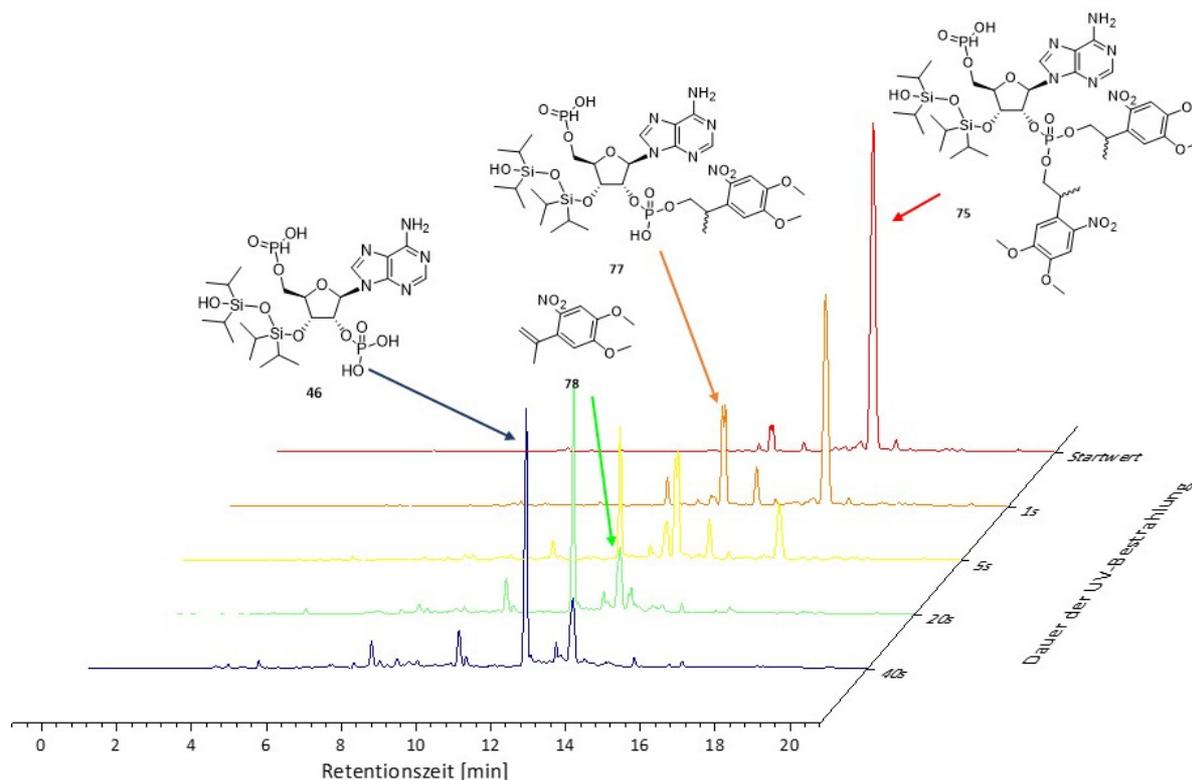
**Abb.47:** Synthese zu den zwei symmetrisch photolabil geschützten 2'-Phosphat-5'-Phosphit-Adenosin **75** und **76**.

Die synthetischen Schwierigkeiten konnten somit behoben werden, indem ein lipophiles, photolabil geschütztes 2'-Phosphatadenosin synthetisiert werden konnte. Im Folgenden sollten die photolytischen Eigenschaften der NPP-Schutzgruppe an der 2'-Phosphatposition und in PBS bei pH 7.3 untersucht werden. Es wurden die gleichen Bedingungen der Photolyse wie bei den *o*-NB- und *o*-NPE-Schutzgruppen zuvor gewählt. Zu erkennen ist in der **Abb.48**, dass das geschützte Edukt **75** bei 16 Minuten Retentionszeit sogar schneller zum einfach geschützten Intermediat **77** zerfällt, als das zuvor untersuchte NPE-Derivat **45**. Die Freisetzung zum komplett entschützten Derivat **46** verläuft im vergleichbaren Maßstab.



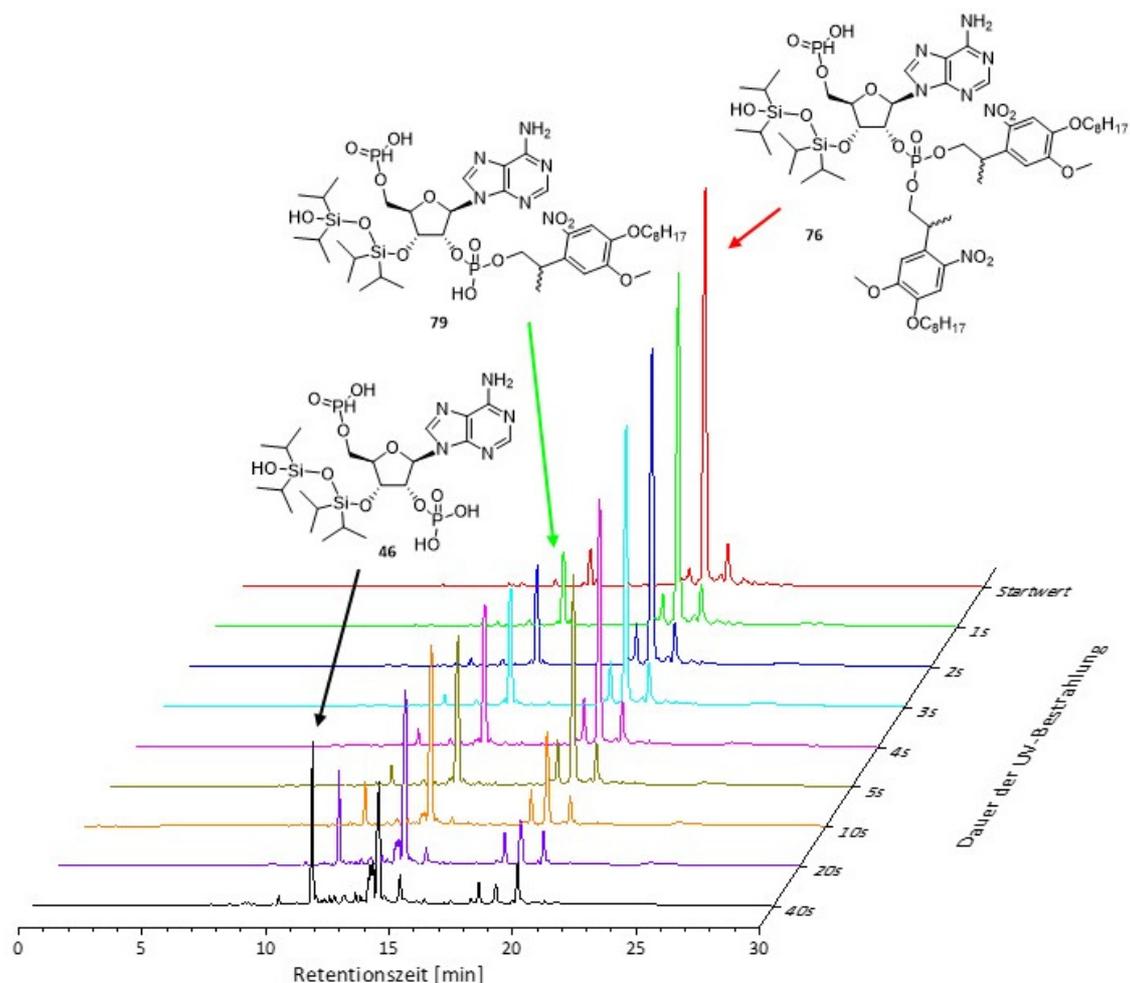
**Abb.48:** Photolyse des NPP-C1-symmetrisch geschützten Adenosinderivats **75**.

Die NPP-Schutzgruppe stellt also nicht nur synthetisch, sondern auch photolytisch eine gute Alternative zu den üblichen *o*-NB-Schutzgruppen dar. Infolgedessen sollten die photolytischen Eigenschaften der C1- und C8-NPP-Derivate genauer untersucht werden und die Halbwertszeit bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde eine leistungsfähigere UV-Quelle verwendet, in Form von drei 1.3 W Hochleistungs-LED, wobei die anderen Messparameter wobei die anderen Messparameter gleichblieben. Als limitierender Faktor war wiederum die hohe Temperatur von Messungen >40 Sekunden zu sehen. Die erste Photolyse des C1-NPP-Derivats **75**, in **Abb.49**, zeigte eine rasche Abnahme des symmetrisch geschützten Edukts **75** zum komplett entschützten Derivat **46** über das einfach entschützte Intermediat **77**. Zusätzlich ist bei einer Retentionszeit von 13 Minuten das photolytische Spaltungsprodukt Nitrostyrol-Derivat **78** zu erkennen. Die berechnete Halbwertszeit des Edukts **75** beträgt  $t_{1/2} = 2.47$  Sekunden und kann für die sehr schnell verlaufenden zellulären Prozesse mit Verwendung eines entsprechenden Lasers noch signifikant beschleunigt werden.



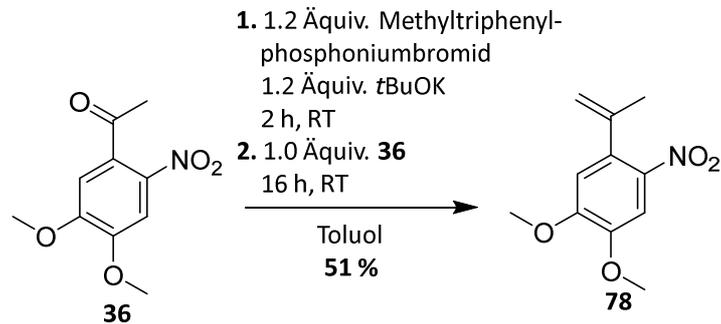
**Abb.49:** Photolyse des NPP-C1-symmetrisch geschützten Adenosinderivats **75** mit Hochleistungs-LED.

Für die Photolyse des NPP-C8-symmetrisch geschützten Adenosinderivats **76**, gezeigt in **Abb.50**, musste eine Lösungsmittelmischung aus PBS und Acetonitril im Verhältnis 9:1 gewählt werden, um eine vollständige Löslichkeit des lipophilen Derivats **76** zu gewährleisten, dadurch könnte es zu einer leichten Verfälschung der folgenden Messergebnisse gekommen sein. Die Retentionszeit des geschützten Derivats **76** liegt bei 19 Minuten. Die Halbwertszeit bei der Photolyse des NPP-C8-symmetrisch geschützten Adenosinderivats **76** konnte auf mit  $t_{1/2} = 5.16$  Sekunden berechnet werden. Die Freisetzung des Substrats **46** ist nach 40 Sekunden aus dem einfach geschützten Intermediats **79** nicht vollständig abgeschlossen. Es ist aber wie bei der NPP-C1-Photolyse eine schnelle Freisetzung des Produkts **46** zu beobachten.



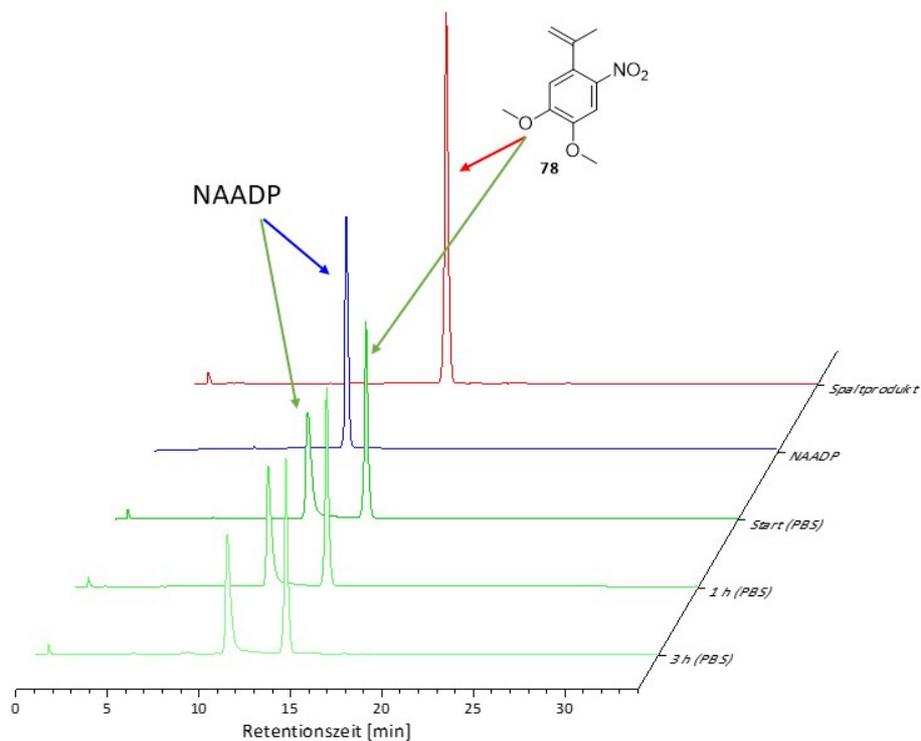
**Abb.50:** Photolyse des NPP-C8-symmetrisch geschützten Adenosinderivats **76** mit Hochleistungs-LED.

Zur Überprüfung, ob das photolytische Nitrostyrol-Spaltungsnebenprodukt **78** keine Folgereaktionen mit dem potenziell freigesetzten NAADP eingeht, wurde das Nitrostyrol-Derivat **78** zunächst synthetisiert und anschließend für einen definierten Zeitraum mit NAADP in PBS mit dem pH-Wert 7.3 inkubiert. Als Edukt der Synthese diente das in den Reaktionen für die NPE-Schutzgruppe zuvor synthetisierte nitrierte Keton **36**. Die Substitution des Carbonylsauerstoffs zu dem entsprechenden Alken wurde mittels einer WITTIG-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Ylid aus Methyltriphenylphosphoniumbromid durch Deprotonierung mit Kalium-*tert*-butanolat hergestellt. Über den bekannten WITTIG-Mechanismus kommt es zur Entstehung von Triphenylphosphanoxid und dem gewünschten Produkt **78**. Nach zweifacher säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt in einer moderaten Ausbeute von 51 % isoliert werden (**Abb.51**).



**Abb.51:** Synthese der Nitrostyrol-Photolyseprodukts **78**.

Die Vinylgruppe des photolytischen Nitrostyrol-Spaltprodukt **78** neigt zu Polymerisationsreaktionen, welche potentiell intrazellul\u00e4r ablaufen k\u00f6nnen. Deshalb sollte \u00fcberpr\u00fcft werden, ob das photolytische Nebenprodukt inert gegen\u00fcber dem NAADP ist. Hierf\u00fcr wurde NAADP und **78** in PBS-Puffer in der Dunkelheit f\u00fcr einen definierten Zeitraum inkubiert und anschlie\u00dfend mit Hilfe der HPLC auf eine m\u00f6gliche Reaktion kontrolliert (**Abb.52**). Hierbei ist keine Reaktion zu beobachten und eine wesentliche Folgereaktion des Spaltprodukts mit dem NAADP kann ausgeschlossen werden.

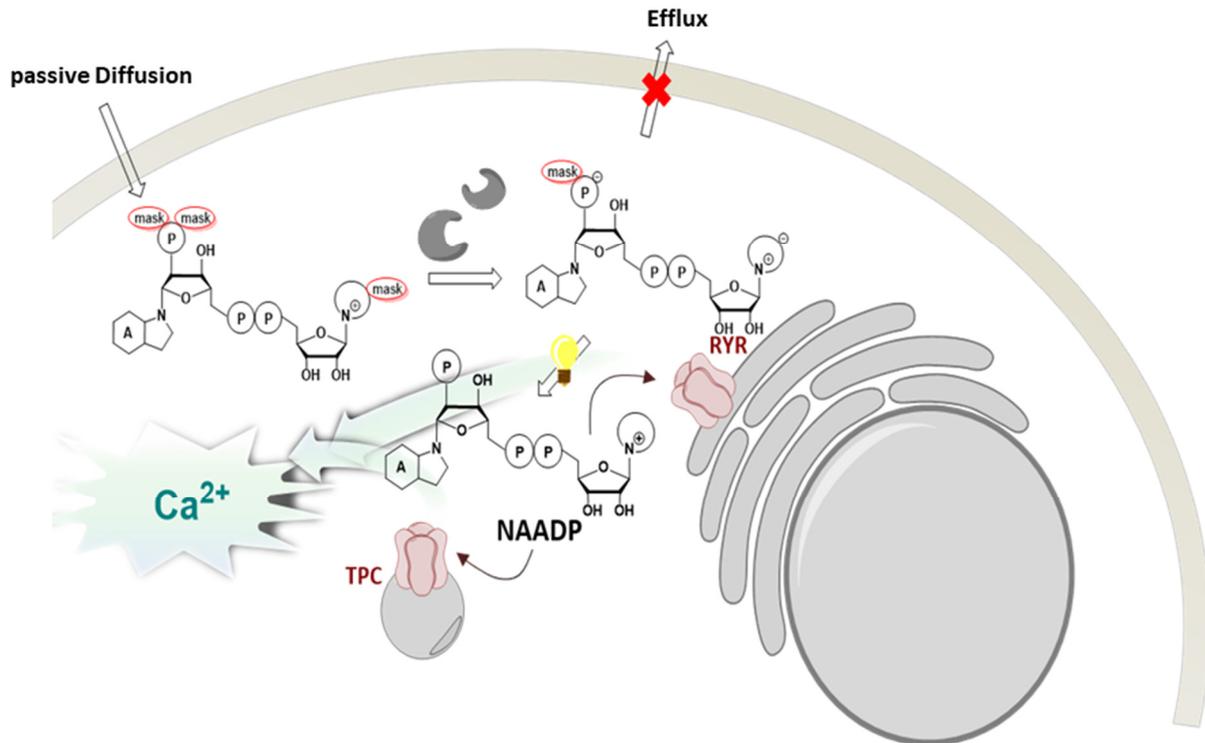


**Abb.52:** \u00dcberpr\u00fcfung der Reaktivit\u00e4t des photolytischen Spaltprodukt **78** gegen\u00fcber NAADP in PBS-Puffer.

Da sowohl die photolytischen Eigenschaften der NPP-Schutzgruppen zufriedenstellend sind und auch die Synthese eines lipophil symmetrisch geschütztes Adenosins **76** mit einer C8-Alkylkette gelang, sollte die weitere Synthese mit dieser Klasse der photolabilen Schutzgruppen weiterverfolgt werden, da hierdurch eine hochlipophile Maskierungskomponente innerhalb kürzester Zeit abgespalten werden kann.

### 6.3.3 Kombiniertes Schutzgruppen-Konzept („Lock-In“-Effekt)

Eine große Bedeutung kann die Kombination der beiden zuvor vorgestellten Schutzgruppensysteme haben. Diese Synergie aus den Schutzgruppen hätte gleich mehrere entscheidende Vorteile. Nach einem passiven Influx in die Zelle würde das Diffusionsgleichgewicht durch die schnelle intrazelluläre enzymatische Spaltung der bioreversiblen Schutzgruppen gestört werden. Hierdurch wäre die Rückdiffusion anhand der Bildung von geladenen Spezies unter physiologischen Bedingungen erschwert.<sup>122,158,181</sup> Mit der nicht enzymatisch spaltbaren photolabilen Schutzgruppe ist eine Inaktivierung des NAADP mit hoher Wahrscheinlichkeit gegeben, so dass eine Akkumulation des inaktiven *caged* NAADP intrazellulär möglich ist. Mit anschließender räumlich und zeitlich exakter Bestrahlung ist eine Überführung des *caged* NAADPs in die aktive Form *in vivo* möglich. Das Prinzip der Kombination der Schutzgruppen und dem damit verbundenem *Lock-In*-Effekt ist am Fall des NAADP in **Abb.53** dargestellt.



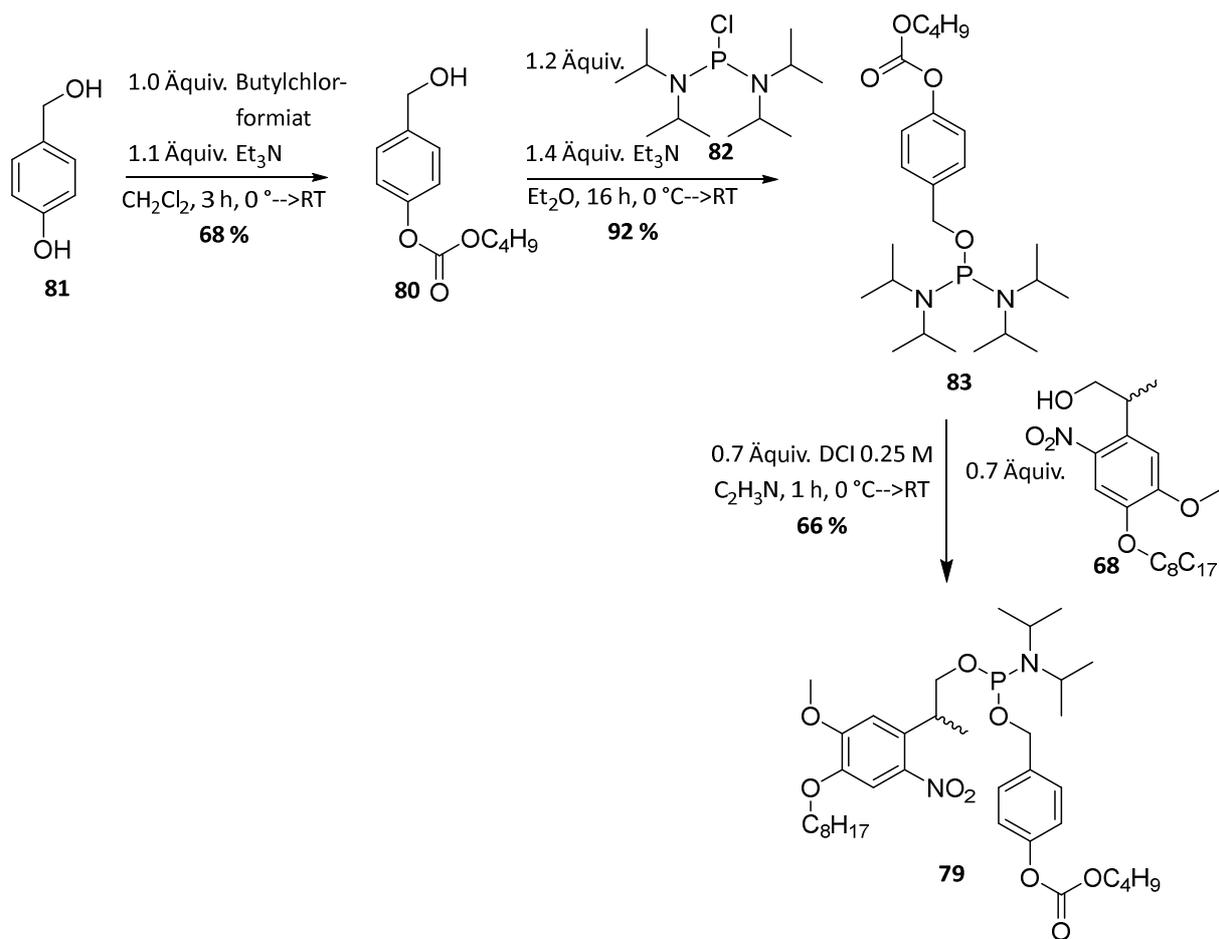
**Abb.53:** Schematische Darstellung der möglichen Anwendung des kombinierten Schutzgruppen-Konzept.<sup>155</sup>

Von Vorteil wäre zudem, dass trotz des Ermöglichens der Membranpermeabilität eine Reduzierung der potenziell zelltoxischen photolytischen Spaltprodukte vorgenommen werden kann. Daneben sollte auch auf eine ausreichende Stabilität der photoaktivierbaren Schutzgruppe geachtet werden, da eine unerwünschte frühzeitige enzymatische Spaltung zu vermeiden ist. Dies könnte mit einer repulsiv wirkenden negativen Ladung bewerkstelligt werden. Zudem würde durch die intrazelluläre Anreicherung des inaktiven NAADP die mögliche extrazelluläre chemische Spaltung von bioreversiblen Schutzgruppen und der damit einhergehenden gehinderten passiven Diffusion nicht ins Gewicht fallen.

Es wurde die 2'-Phosphatposition mit einer bioreversiblen Schutzgruppe mit kurzer Alkylkette und eine photolabile Schutzgruppe mit einer langen Alkylkette zu kombiniert geschützt. Es ist bekannt, dass die bioreversibel spaltbaren AB-Schutzgruppen mit Abnahme der Alkylkettenlänge generell eine verkürzte Halbwertszeit, sowohl enzymatisch als auch chemisch besitzen.<sup>115</sup> Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung von 4-(Hydroxymethyl)phenylalkylcarbonate im Vergleich zu AB-Schutzgruppen eine erhöhte chemische Stabilität besitzen bei gleichbleibender enzymatischer Labilität.<sup>120</sup> Hierdurch wäre eine erfolgreiche

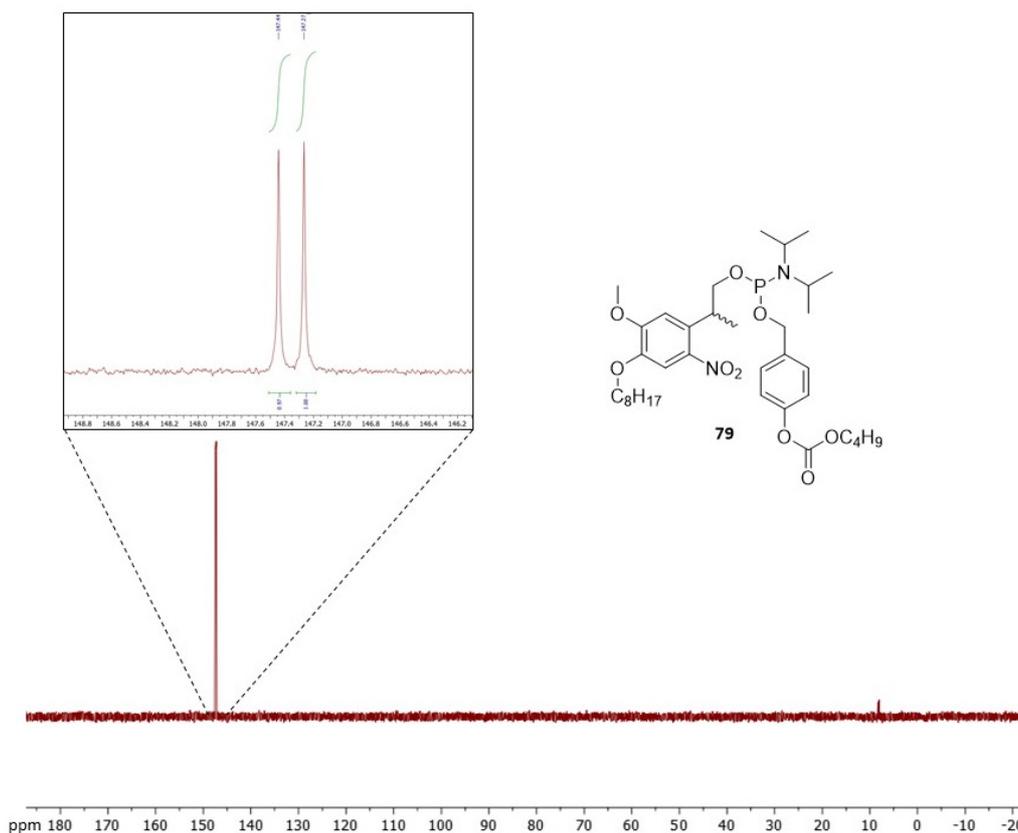
passive Diffusion begünstigt, da eine vorzeitige extrazelluläre, chemische Spaltung der bioreversiblen Schutzgruppe vorgebeugt wird. Durch die kurze Alkylkette der bioreversiblen und der hiermit einhergehenden schnellen intrazellulären, enzymatischen Spaltung wird eine negative Ladung generiert, welche wiederum die mögliche enzymatische Spaltung der photolabilen Schutzgruppe, durch repulsive Abstoßung, verlangsamt.

Für die Synthese des asymmetrisch geschützten Amidits **79** wurde zunächst die 4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat-Schutzgruppe **80** synthetisiert, durch Reaktion von 4-Hydroxybenzylalkohol **81** und dem entsprechenden Chlorformiat. Hierbei konnte im Vergleich zum 4-(Hydroxy)phenylhexanoat **24** in Kapitel **6.3.1** eine erhöhte Ausbeute von 68 % erzielt werden (**Abb.54**). Als Begründung kann die erniedrigte Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffs dienen, aufgrund des positiven Mesomerieeffekts des zusätzlichen Sauerstoffatoms, wodurch ein nucleophiler Angriff des Phenolats begünstigt wird. Die anschließende Synthese des asymmetrisch geschützten Amidits **79** wurde nach einer modifizierten Synthesevorschrift von LINA WEINSCHEK vorgenommen.<sup>171</sup> Begonnen wurde mit der Substitution des 4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat **80** an Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **82**, wobei das Chlorphosphin **82** im Überschuss in Diethylether vorgelegt und eine Lösung des 4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat **80** in Diethylether bei 0 °C langsam zu getropft wurde. Die Lösung wurde daraufhin für 16 h gerührt, zunächst filtriert und anschließend mit Zusatz von Triethylamin zum Eluenten säulenchromatographisch gereinigt. Es konnte eine sehr gute Ausbeute von 92 % isoliert werden (**Abb.54**). Die Einführung der photolabilen Schutzgruppe mit einer C8-Alkylkette wurde sauer-katalysiert mit Hilfe von 4,5-Dicyanoimidazol durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Bis(diisopropylamino)phosphoramidit **83** im Überschuss in Acetonitril gelöst und die in Acetonitril gelöste NPP-C8-Schutzgruppe **68** mit DCI bei 0 °C tropfenweise zugegeben, wobei die sauer-katalysierte Reaktion sehr schnell verlief und nach 1 h bereits beendet war. Die Reinigung erfolgte wie zuvor säulenchromatographisch und es konnte eine gute Ausbeute von 66 % erhalten werden (**Abb.54**).



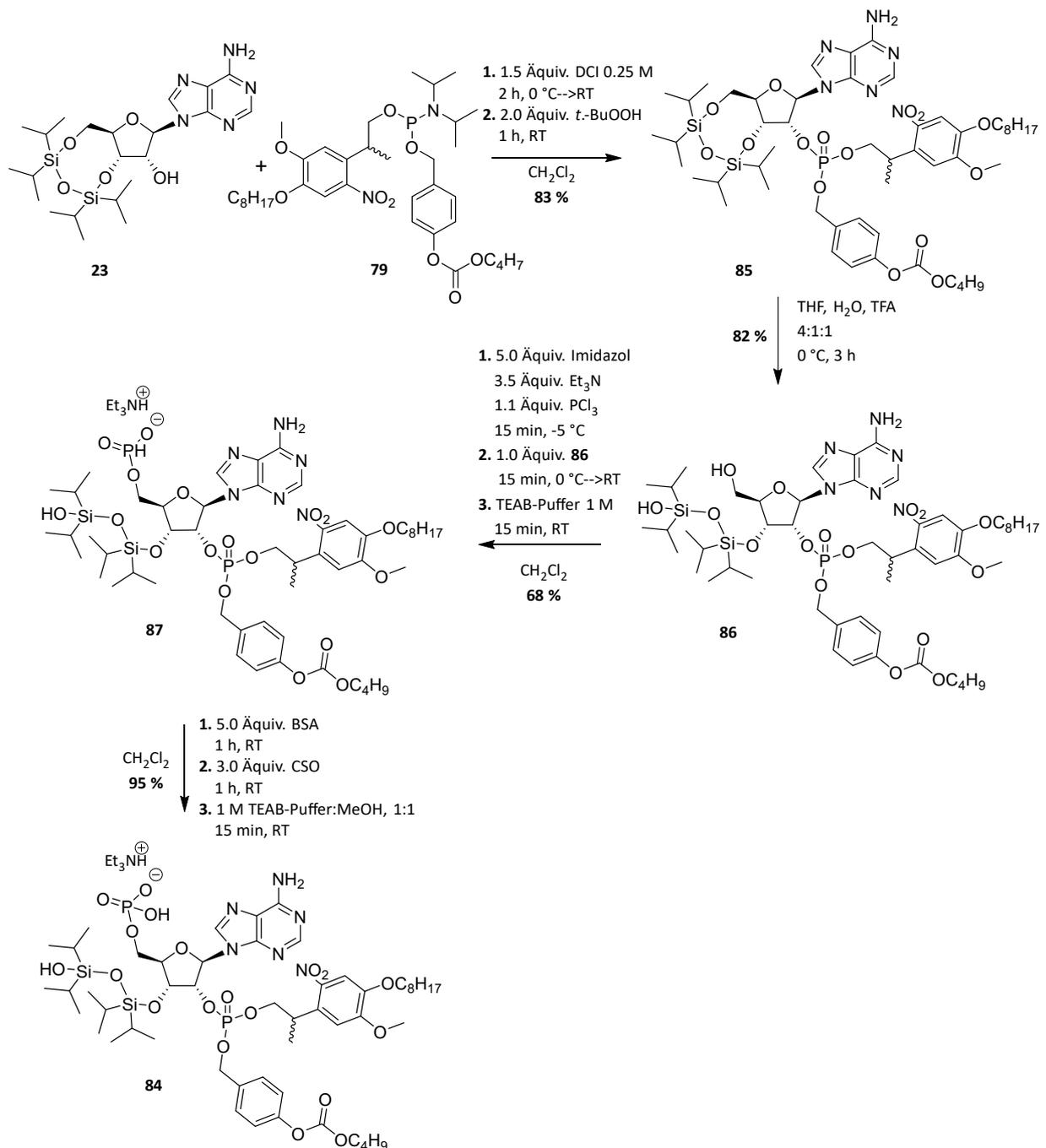
**Abb.54:** Synthese des asymmetrisch geschützten Amidits **79**.

Das entsprechende  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigt die beiden Signale des Amidits bei 147 ppm der zwei Diastereomere als Racemat im Verhältnis 1:1, welche durch die photolabile Schutzgruppe eingeführt wurde (**Abb.55**).



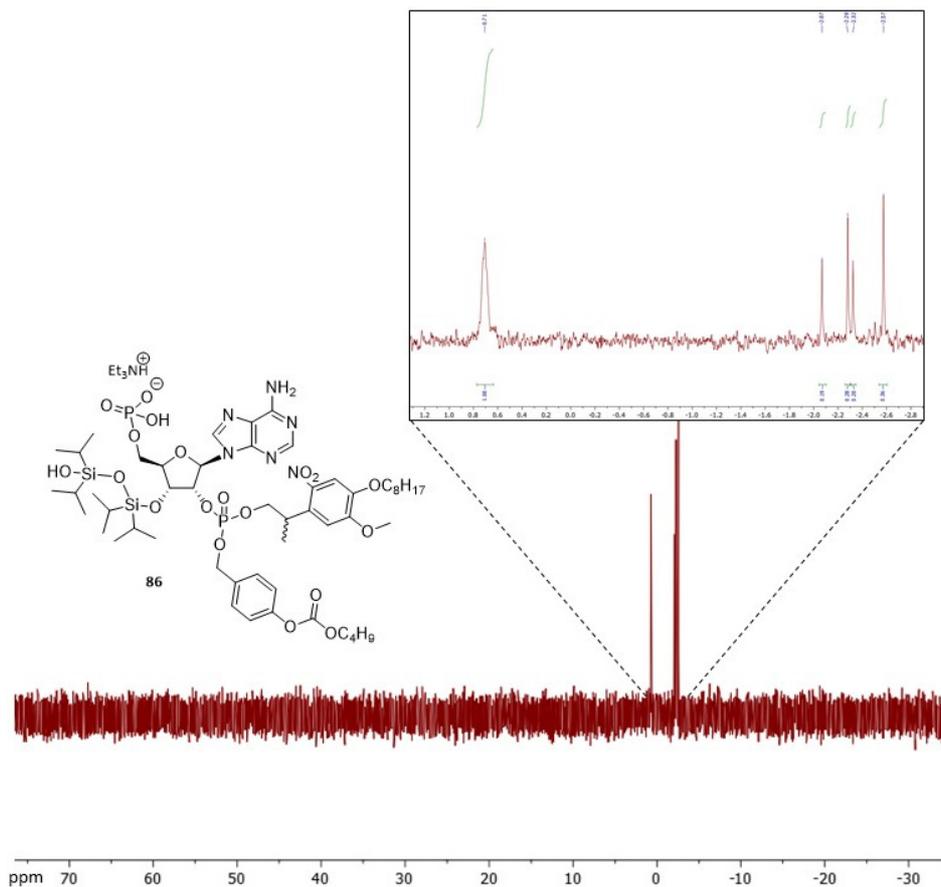
**Abb.55:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des asymmetrisch geschützten Amidits **79**.

Die anschließende Synthese des asymmetrisch geschützten Adenosin-2',5'-diphosphats **84** wurde nach den Synthesevorschriften wie in Kapitel **6.3.1** realisiert. Hierbei konnten vergleichbare Ausbeuten erreicht werden und eine gute Reproduzierbarkeit auch mit Variation der Schutzgruppen bewiesen werden. Auch die jeweilige Reinigung der Synthesestufen stellte keine besondere Schwierigkeit dar. Es wurde bei der Kupplung des silyl-geschützten Adenosins **23** mit dem asymmetrisch geschützten Amidit **79** zum geschützten Adenosin-2'-phosphat **85** eine Ausbeute von 83 % erzielt, bei der darauffolgenden selektiven Entschützung der 5'-Position zum Produkt **86** konnte eine Ausbeute von 82 % erhalten werden. Die Phosphitylierung konnte mit einer Ausbeute von 68 % zum 5'-Phosphit **87** realisiert werden, wobei die anschließende Oxidation mit annähernd quantitativer Ausbeute zum Adenosin-2',5'-diphosphat **84** verlief (**Abb.56**).



**Abb.56:** Synthese zum asymmetrisch geschützten Adenosin-2',5'-diphosphat **84**.

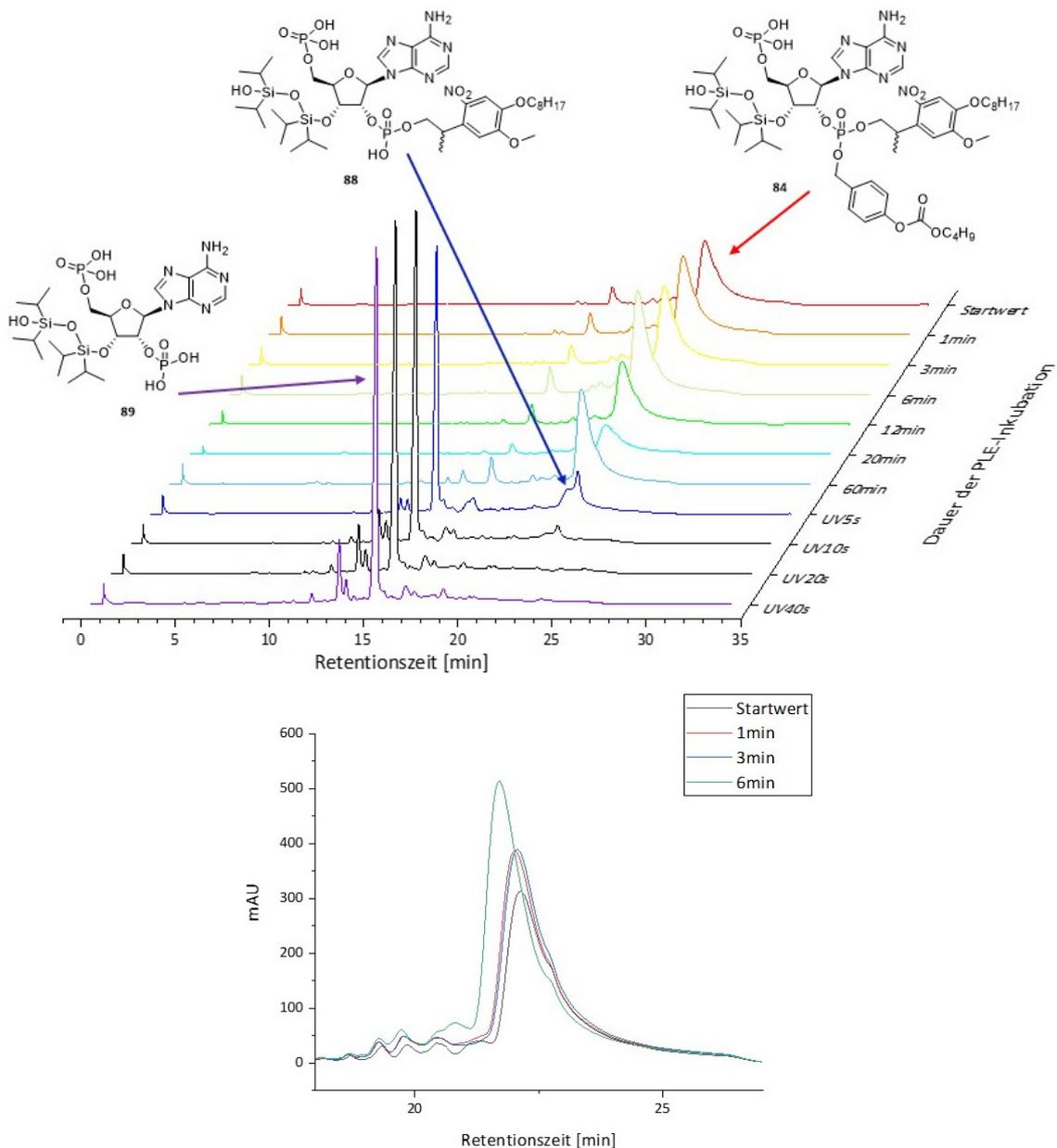
Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum vom gewünschten Produkt **84** zeigt das Signal des 5'-Phosphats bei der chemischen Verschiebung von 0.71 ppm, zudem sind die vier Diastereomerensignale des 2'-Phosphats bei -2.07, -2.28, -2.32 und -2.57 ppm zu erkennen (**Abb.57**). Das Produkt **84** konnte in hoher Reinheit erhalten werden.



**Abb.57:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des asymmetrisch geschützten Adenosin-2',5'-diphosphats **84**.

Die photolytische und enzymatische Labilität sollte in einer kombinierten Hydrolyse-/Photolysestudie visualisiert werden. Dafür wurde eine Hydrolyselösung des asymmetrisch geschützte Adenosin-2',5'-diphosphat **84** in einem DMSO/PBS-Gemisch hergestellt. Die Hydrolysereaktion wurde durch die Zugabe einer definiert konzentrierter Lösung aus isolierter Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) gestartet. Das Edukt hat ein breites Signal bei einer Retentionszeit von 22 Minuten, wobei diese hohe Retentionszeit durch den Gegenionenaustausch des Triethylammoniums gegen Tetrabutylammonium zu erklären ist. Die Spaltung der bioreversiblen Schutzgruppe ist aufgrund der nicht Basislinien getrennter Signale nicht exakt zu beobachten. Vermutlich wird die Schutzgruppe enzymatisch gespalten und an die freiwerdende negative Ladung orientiert sich ein Tetrabutylammonium-Gegenion mit vergleichbarer Polarität. Nichtsdestotrotz kann eine leichte Verschiebung hin zu einer geringeren Retentionszeit des breiten Eduktsignals während der enzymatischen Hydrolyse beobachtet werden, wobei ab der Inkubationszeit von 6 Minuten keine weitere Verschiebung zu beobachten ist. Dies lässt vermuten, dass die enzymatische Spaltung der bioreversiblen Schutzgruppe

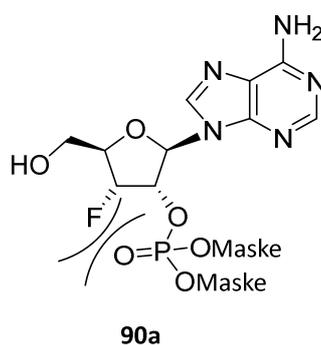
bereits nach 6 Minuten vollständig abgeschlossen ist (**Abb.58, unten**). Zusätzlich kann eine enzymatische Spaltung der photolabilen Schutzgruppe und damit die Freisetzung des entschützten Derivats **89** nicht beobachtet werden. Nach einer Inkubation von 60 Minuten mit PLE-Lösung wurde die Hydrolyselösung photolytisch untersucht und wie zuvor beschrieben mit drei 1.3 W Hochleistungs-LEDs bestrahlt. Es ist eine schnelle Freisetzung des entschützten Derivats **89** bei einer Retentionszeit von 15 Minuten zu erkennen, wobei nach 5 Sekunden bereits die größte Menge photolytisch gespalten wurde und nach 20 Sekunden keine photolabil geschütztes Intermediats **88** zu erkennen ist (**Abb.58, oben**).



**Abb.58:** Kombinierte enzymatische und photolytische Hydrolysestudie zur Freisetzung des Derivats **89** (**oben**) und die genaue Betrachtung der enzymatischen Hydrolyse des geschützten Edukts **84** (**unten**).

### 6.3.4 Synthese des 3'-Deoxy, 3'-Fluoro-2',5'-Diphosphatadenosin

Wie bereits in Kapitel 6.2 erwähnt, stellt die 2',3'-Phosphatmigration ein Problem dar. Es soll die Abspaltung der TIPS-Schutzgruppe zwar erst im letzten Syntheseschritt zum NAADP erfolgen, trotzdem kann es bei der intrazellulären Einbringung und anschließender Spaltung der Schutzgruppen zu der unerwünschten Migration kommen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität gegebenenfalls herabsetzen. Um vergleichbare Studien mit dem chemosynthetischen NAADP durchführen zu können, ist die generelle Verhinderung dieser Migration von großem Interesse. Es bietet sich eine Substitution der 3'-Hydroxyfunktion gegen ein geeignetes Bioisoster an, da eine 3'-Desoxygenierung nach einer BARTON-McCROMBIE-Reaktion zu einer Konformationsänderung der Ribose des Adenosins führen kann und vermutlich die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Aktivität herabsetzt. Als Bioisostere der Hydroxyfunktion, also ein Molekül welches die biologisch vergleichbare Wirkung erzielt, kann z.B. eine Methoxyfunktion, Thiofunktion oder Fluor angesehen werden.<sup>182</sup> Hierbei ist allerdings der sterische Einfluss, sowie mögliche Konformationsänderungen oder ein veränderter elektronischer Einfluss zu beachten. Als besonders geeignet hat sich die Substitution der Hydroxyfunktion mit Fluor herausgestellt. Hierbei wird die Konformation beibehalten, da durch das kleine Fluoratom keine sterische Hinderung zu erwarten ist, es Wasserstoffbrückenbindungen als Protonenakzeptor ausbilden kann und äußerst starke Kohlenstoff- und Fluoratombindungen mit hoher Bindungsenergie bildet, wodurch wiederum die Phosphatmigration nicht möglich ist.<sup>183</sup> Zusätzlich ist der synthetische Aufwand geringer und z.B. die selektive Phosphorylierung in der 5'-Position deutlich vereinfacht. Aus diesem Grund sollte das in **Abb.59** dargestellte Molekül synthetisiert werden.

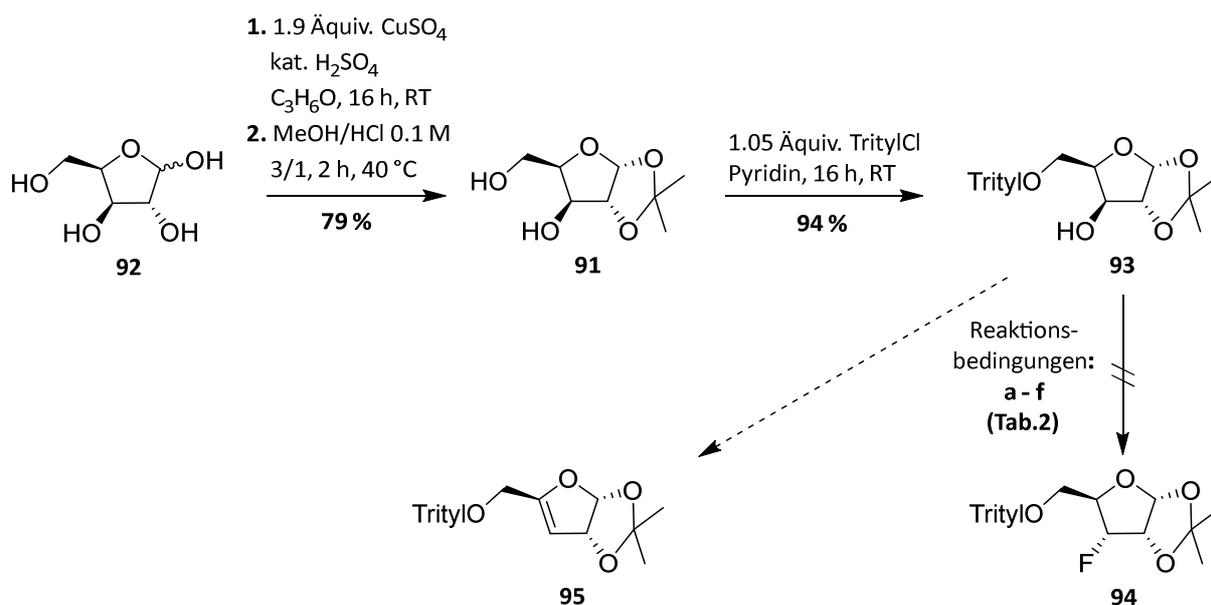


**Abb.59:** Zielmolekül zur Verhinderung der Phosphatmigration.

Zur Synthese von Alkylfluoriden, also der Bildung einer C-F-Bindung, an einem  $\text{sp}^3$ -Kohlenstoffzentrum hat sich die nucleophile Desoxyfluorierung als äußerst vorteilhaft erwiesen. Die

Reaktion verläuft im Allgemeinen über einen  $S_N2$ -Mechanismus und führt so zu einer Inversion eines Stereozentrums bei der Reaktion mit einem Alkohol zum entsprechenden Fluorid. Hierbei sind eine Vielzahl von verschiedenen Desoxyfluorierungsmethoden bekannt.<sup>184,185</sup> Die frühzeitige Einführung der fluorhaltigen Funktionalität in die Grundbausteine hat sich als vielversprechend herausgestellt, da so eine hohe funktionelle Diversität bei der Verwendung von verschiedenen Grundbausteinen erreicht werden kann.

Zunächst sollte die Synthese zum 3'-Desoxo-3'-fluoroadenosin **90b** über das bicyclische Isopropyliden geschützte D-Xylose **91** nach REN realisiert werden.<sup>186</sup> Begonnen wurde die Synthese ausgehend von D-Xylose **92** durch die Einführung einer Isopropylidene-Schutzgruppe in der 1',2'-Position. Es wurde hier zum einen versucht, ausschließlich die 1',2'-Position mit Aceton und  $H_2SO_4$  zu schützen und nach definierter Zeit die Reaktion abubrechen, wobei Ausbeuten von lediglich 50 % erzielt wurden. Durch die vollständige Schützung der D-Xylose **92** an den Positionen 1',2' und 3',5' und anschließender milder saurer Hydrolyse der instabileren 3'-5'-Isopropylidenschutzgruppe konnte die Ausbeute auf 79 % des 1',2'-Isopropylidene- $\alpha$ -D-Xylose **91** gesteigert werden. Die Schützung der 5'-Position **93** mit der sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe Tritylchlorid konnte mit 94 % realisiert werden (**Abb.60**). Es wurde anschließend der Versuch unternommen eine Desoxyfluorinierungsreaktion zur 3'-Desoxo-3'-fluororibose **94** durchzuführen, wobei die verschiedenen Reaktionsbedingungen nachfolgend näher erläutert werden (**Tab.2**).



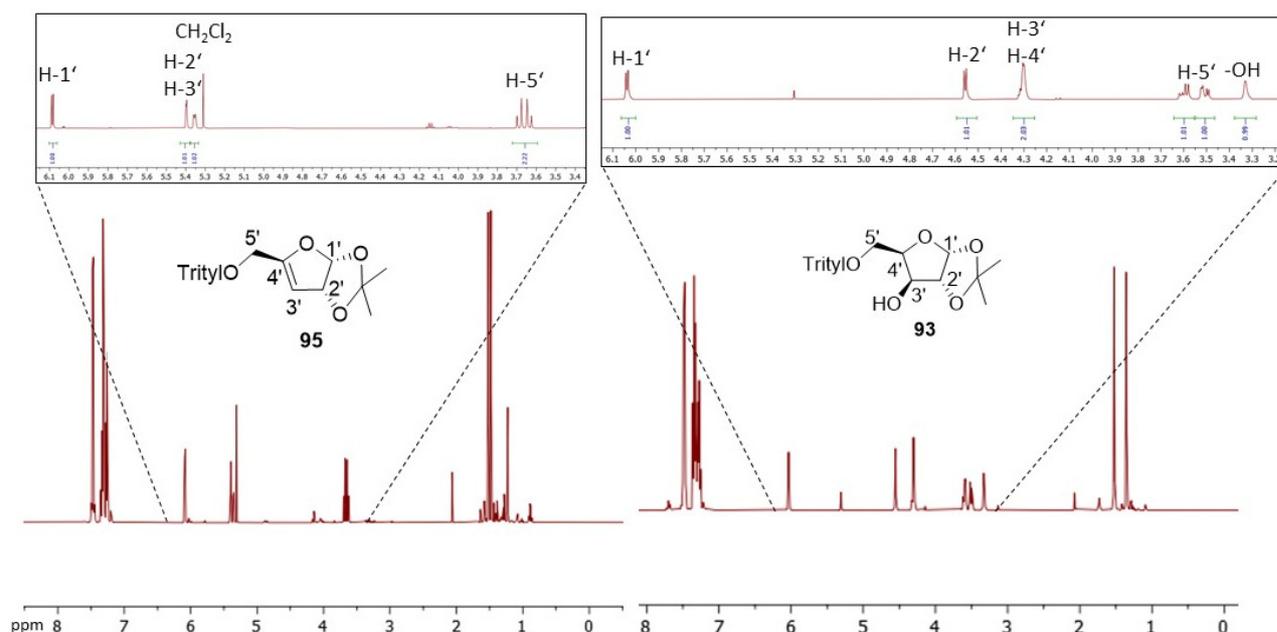
**Abb.60:** Versuch der Synthese des 3'-Desoxo-3'-fluoro-ribose **94**.

In **Tab.2** sind die verwendeten Reaktionsbedingungen für die Desoxyfluorierung aufgelistet. Die Verwendung des konventionell verwendeten nucleophilen Desoxyfluorierungsreagenz Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) zur Einführung des Fluors ist die weitverbreiteteste Methode. Dabei wird die Alkoholfunktion *in situ* in eine gute Abgangsgruppe überführt und anschließend durch ein Fluorid-Anion über einen  $S_N2$ -Mechanismus substituiert. Bei der Desoxyfluorierung mit Hilfe dieses Reagenzes konnte unter Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln oder einem verändertem Temperaturprofil ausschließlich das Eliminierungsprodukt **95** isoliert werden. Üblicherweise können nur geringe Mengen des Eliminierungsnebenprodukts bei der Desoxyfluorierung beobachtet werden, da die Eliminierungsreaktion bei der nucleophilen Fluorierung immer in Konkurrenz steht. Daher sollten im folgenden Fluorierungsmethoden angewandt werden, welche die Bildung des Nebenprodukts unterdrücken und bevorzugt das Alkylfluorid **94** bilden. Als ein mildes Fluorierungsreagenz, welches nur im geringfügigen Maße zum Eliminierungsprodukt führt, hat sich PyFluor<sup>®</sup> etabliert. Bei dieser Methode ist der Zusatz einer starken Base nötig, wobei der Fluorierungsmechanismus vergleichbar ist mit dem des DAST-Reagenzes.<sup>187</sup> Bei der Reaktion mit PyFluor<sup>®</sup> konnte aber bei Raumtemperatur kein Umsatz beobachtet werden und nach dem Erhitzen auf 100 °C wurde ausschließlich wieder das Eliminierungsnebenprodukt isoliert. Deshalb wurde ein weiteres Fluorierungsreagenz eingesetzt, welches den Zusatz einer externen Fluoridquelle benötigt und dadurch die Fluorierung eventuell begünstigt.<sup>188</sup> Der Einsatz von AlkylFluor<sup>®</sup> mit Zusatz von CsF führt aber auch unter Erwärmung zu keinem Umsatz. Aus diesem Grund wurde abschließend versucht, die Fluorierung über eine zweistufige Synthese durchzuführen. Hierfür wurde zunächst die Hydroxyfunktion in die sehr gute Abgangsgruppe Triflat überführt. Für die Fluorierung sollte CsF als Fluoridquellen dienen, wobei *tert*-BuOH als Lösungsmittel die Nucleophilie des Fluorid-Anions erhöht.<sup>189</sup> Es konnte auch hier kein Umsatz beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Konformation der bicyclischen D-Xylose **91** keinen nucleophilen Angriff von der  $\alpha$ -Seite aus sterischen Gründen zulässt.

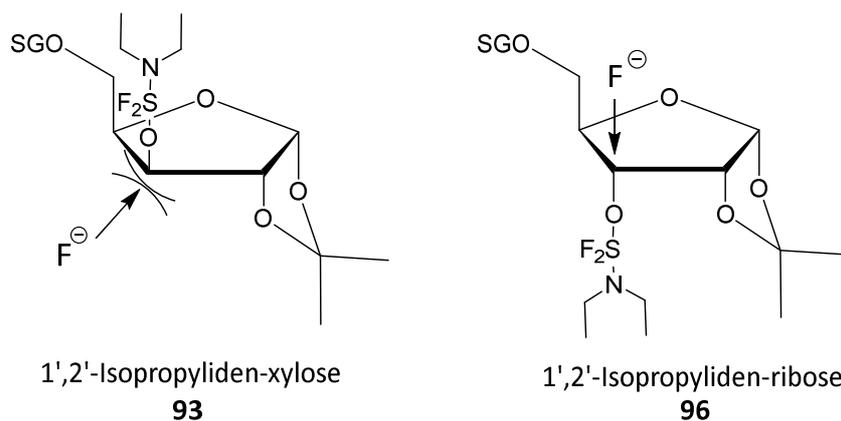
**Tab.2:** Übersicht der verwendeten Reaktionsbedingungen für die 3'-Desoxyfluorinierung.

Variante	Bedingungen	Resultate
<b>a</b>	1.2 Äquiv. DAST, 3.0 Äquiv. Pyridin, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -78 °C → RT, 16 h	ausschließlich Eliminierungsprodukt isoliert, 70 %
<b>b</b>	1.2 Äquiv. DAST, 3.0 Äquiv. Pyridin, CH <sub>3</sub> CN, -78 °C → RT, 16 h	ausschließlich Eliminierungsprodukt
<b>c</b>	1.2 Äquiv. DAST, 3.0 Äquiv. Pyridin, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0 °C → RT, 16 h	ausschließlich Eliminierungsprodukt
<b>d</b>	1.2 Äquiv. PyFluor®, 2.0 Äquiv. DBU, Toluol, RT → 100 °C, 120 h	ausschließlich Eliminierungsprodukt
<b>e</b>	1.2 Äquiv. AlkylFluor®, 5.0 Äquiv. CsF, Dioxan, 40 °C, 48 h	kein Umsatz
<b>f</b>	1. 1.5 Äquiv. Tf <sub>2</sub> O, 3.0 Äquiv. Pyridin, -20 °C, 1 h, 2. 5.0 Äquiv. CsF, <i>tert</i> -BuOH, 75 °C, 16 h	kein Umsatz

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren vom Edukt **93** und Produkt **95** der Desoxyfluorinierung zeigen im Vergleich eindeutig, dass das H-4'-Signal bei dem vermeintlichen Produkt **95** nicht vorhanden ist und es sich um das Eliminierungsprodukt handelt (**Abb.61**). Zusätzlich zeigen die <sup>19</sup>F-NMR-Spektren keine Signale mit passender chemischer Verschiebung.

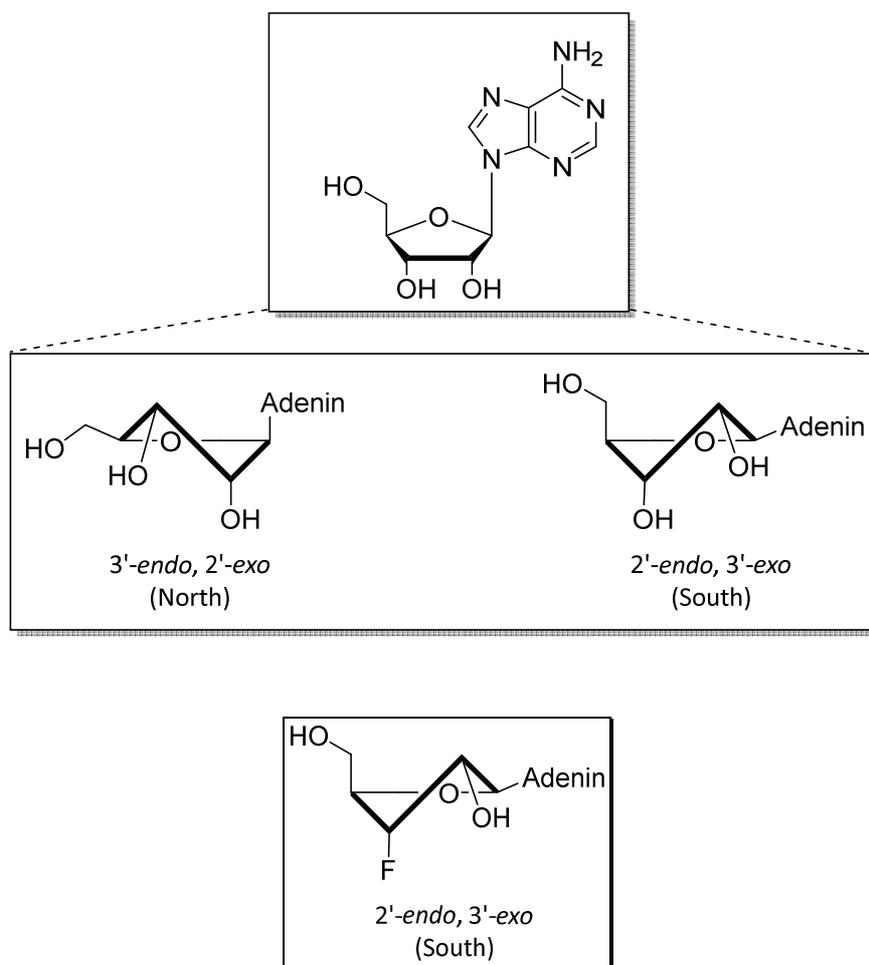
**Abb.61:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des isolierten Eliminierungsnebenprodukts **95** (links) und des eingesetzten Edukts **93** (rechts).

Es wird davon ausgegangen, dass die 1,2-Isopropyliden-D-xylose **91** in einer C3'-*endo*-Konformation vorliegt, da das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für das H-1', H-2' und H-3' eine sehr kleine Kopplungskonstante der Dupletts aufweist und damit die Diederwinkel dieser Wasserstoffatome annähernd  $90^\circ$  aufweisen. Durch die günstige *trans*-diaxiale Stellung zwischen der C3'- $\beta$ -Abgangsgruppe und dem H-4'-Proton kommt es bevorzugt zu einer Eliminierung.<sup>190</sup> Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass 1,2-Isopropylidene-D-ribose **96** laut Literatur erfolgreich fluoriert werden kann und somit in der konträren Konformation vorliegt (**Abb.62**).<sup>191-193</sup>



**Abb.62:** Desoxyfluorierung von 1,2-Isopropyliden-D-xylose **93** und 1,2-Isopropylidene-D-ribose **96** mit dem DAST-Reagenz.

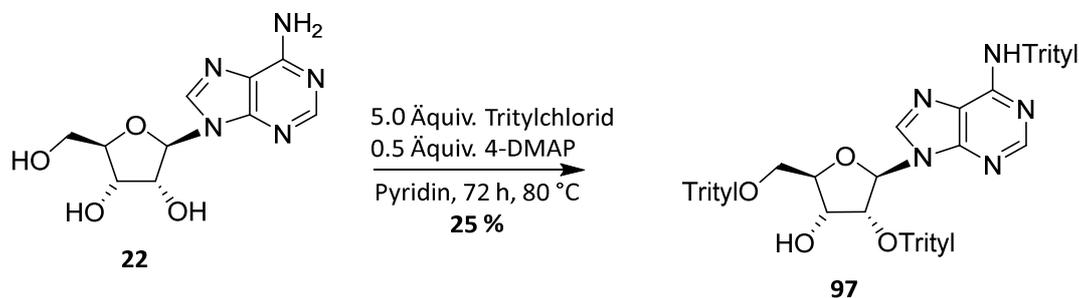
Alternativ bietet sich die Fluorierung von Adenosin **22** an, da dieses in ungeschützter Form sowohl in C3'-*endo*-, als auch in C3'-*exo*-Konfiguration, aufgrund des anomeren Effekts und durch *gauche*-Wechselwirkungen zwischen dem Ringsauerstoff und der 3'-OH-Gruppe, vorliegt. Adenosin **22** weist eine hohe Flexibilität auf, da diese *twist*-Konformationen durch eine Pseudorotation ineinander übergehen können (**Abb.63**, oben). HERDEWIJN *et al.* beschrieb erstmals die Reaktion von geschütztem *xylo*-Adenosin zum 3'-Desoxo-3'-fluoro-adenosin **90b**.<sup>193,194</sup> Die Konformation des fluorierten Produkts hängt möglicherweise hauptsächlich mit der hohen Elektronegativität des Fluors und mit der Stabilisierung durch die elektrostatische Interaktion des Fluoridsubstituenten mit der vicinalen Hydroxyfunktion zusammen. Aus diesem Grund liegt vermutlich auch 3'-Desoxo-3'-fluoro-adenosin **90b** in einer C3'-*exo*-Konfiguration vor (**Abb.63**, unten).<sup>195</sup>



**Abb.63:** Konformationen des Adenosins (oben) und die bevorzugte Konformation von 3'-Desoxy-3'-fluoro-adenosin **90b** (unten).<sup>195</sup>

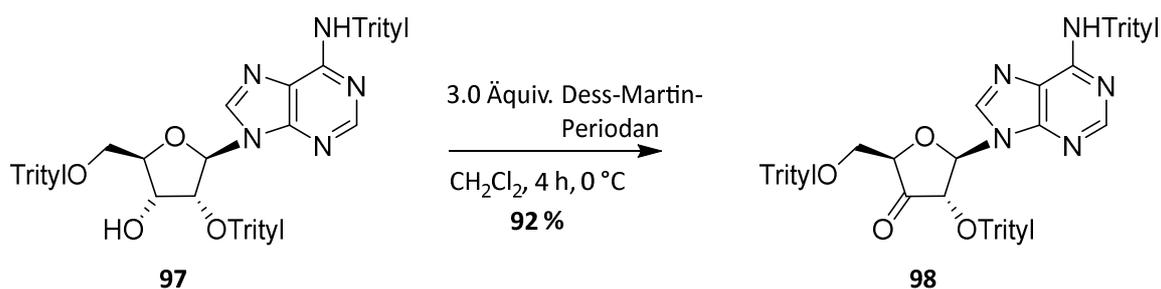
Für die selektive Fluorierung mussten zunächst alle Positionen, bis auf die C-3'-Position, des Adenosins **22** geschützt werden. Als geeignete Schutzgruppe wurde die sterisch anspruchsvolle Trityl-Schutzgruppe verwendet, wobei eine gleichzeitige Schützung der 2'- und 3'-Position durch die gegenseitige sterische Hinderung nicht möglich war. Hierfür wurde Adenosin **22** mit 0.5 Äquiv. 4-DMAP in Pyridin gelöst und anschließend 5.0 Äquiv. Tritylchlorid zugegeben, daraufhin wurde die Reaktionslösung für 72 h bei 80 °C gerührt. Ein großer Anteil des ausgefallenen Pyridiniumchlorids konnte durch Filtration abgetrennt werden. Mit der anschließenden säulenchromatographischen Reinigung wurde mit einem Eluenten aus Petrol-ether/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2:1 der Überschuss der Tritylschutzgruppe abgetrennt. Die jeweils 2'- oder 3'-geschützten Produkte konnten mit dem Eluenten CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Petrolether/Ethylacetat, 7:2:1 säulenchromatographisch getrennt werden. Die niedrige Ausbeute von 24 % des 2',5'-di-O-trityl-N-trityl geschützten Adenosins **97** kann mit der Entstehung im gleichen Maße von dem 3',5'-

di-*O*-trityl-*N*-trityl geschützten Adenosins und dem lediglich 5'-*O*-trityl-*N*-trityl geschützten Adenosin erklärt werden (**Abb.64**).



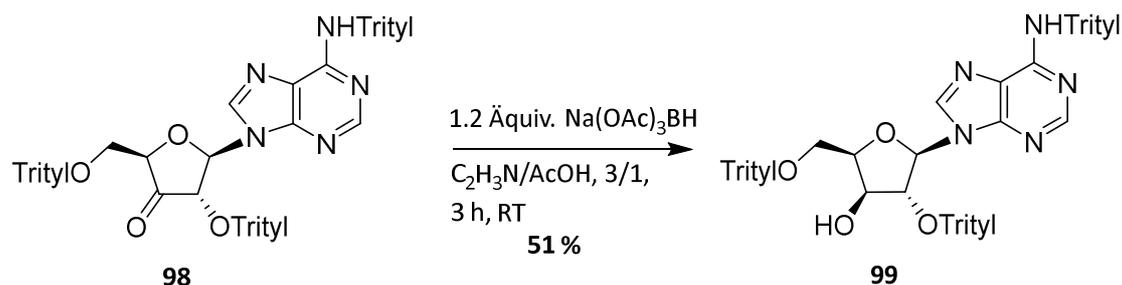
**Abb.64:** Synthese des 2',5'-Di-*O*-trityl-*N*-trityl-adenosin **97**.

Anschließend sollte eine Inversion der Hydroxylfunktion an der 3'-Position zum *xylo*-Adenosin durchgeführt werden. Ein Versuch, die Hydroxyfunktion unter MITSUNOBU-Bedingungen zu invertieren oder die Inversion mittels  $S_N2$ -Reaktion zu realisieren, misslang, vermutlich aufgrund der Abschirmung dieser Position durch eine zuvor erwähnte ungünstige Konformation des Ribosezuckers.<sup>190</sup> Deshalb sollte alternativ die *xylo*-Form über eine Oxidations-Reduktions-Abfolge synthetisiert werden. Die 3'-Position wurde hierfür mit einem Überschuss an DESS-MARTIN-Periodinan oxidiert.<sup>196</sup> Hierbei konnte eine Ausbeute von 92 % des Ketons **98** erhalten werden (**Abb.65**). Das Produkt konnte eindeutig an der chemischen Verschiebung des C-3' von 208.3 ppm im  $^{31}\text{C}$ -NMR-Spektrum identifiziert werden.



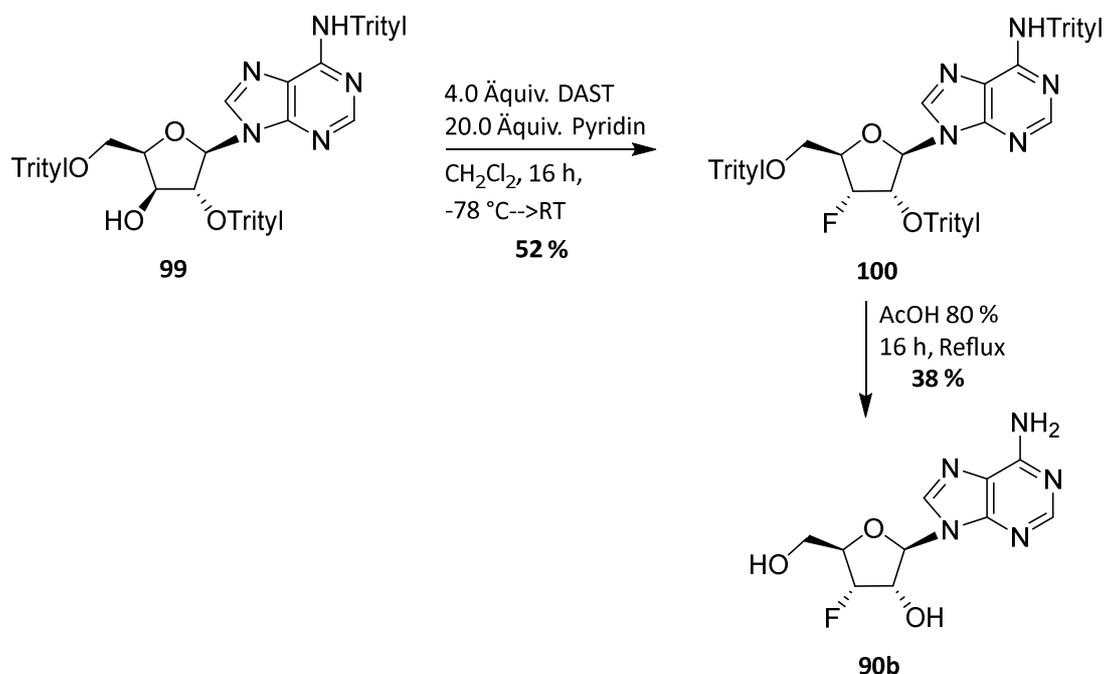
**Abb.65:** Oxidation des geschützten Adenosins **97** zum Keton **98**.

Die darauffolgende Reduktion wurde mit dem mildem Reduktionsmittel  $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$  durchgeführt. Das Hydrid greift hier bevorzugt von der weniger sterisch gehinderten  $\alpha$ -Seite an und führt so selektiv zum *xylo*-Produkt **99** mit einer Ausbeute von 51 %. Hierbei konnte außerdem die Entstehung des *ribo*-Nebenprodukts in geringem Maße beobachtet werden (**Abb.66**).<sup>197</sup>



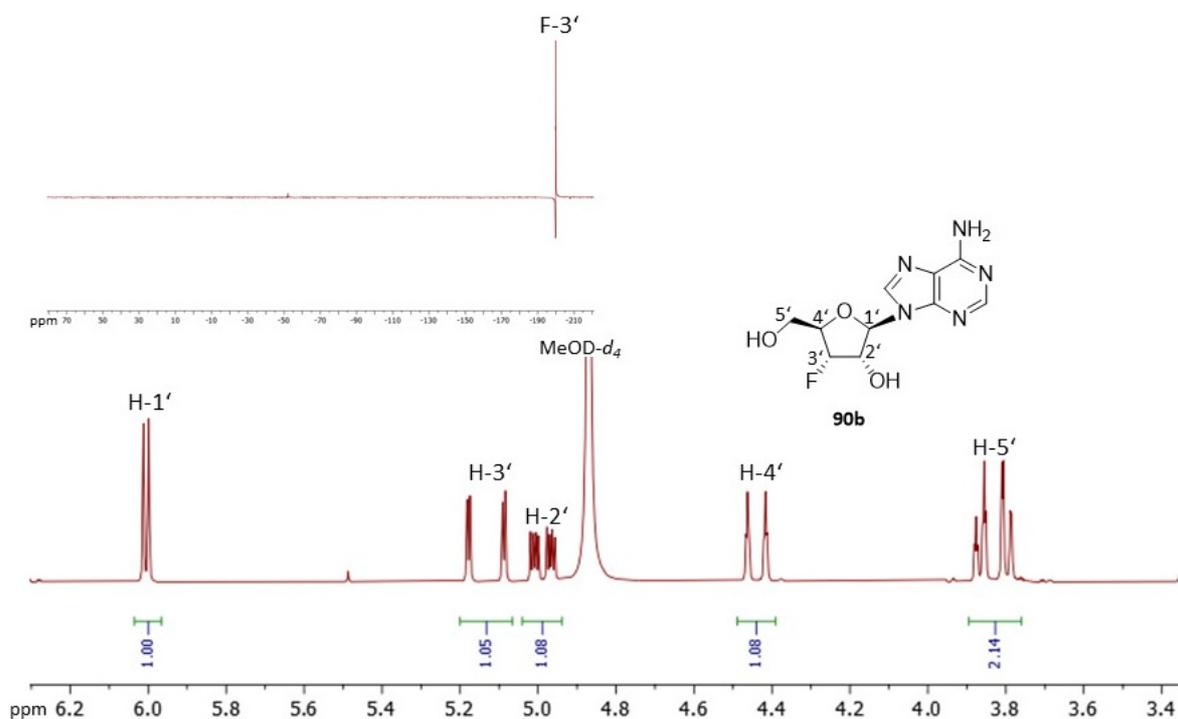
**Abb.66:** Reduktion zum geschützten *xylo*-Adenosin **99**.

Als nächstes sollte die 3'-Hydroxyfunktion unter Desoxyfluorierungsbedingungen zum fluorierten, geschützten *ribo*-Adenosin **100** invertiert werden. Als Fluorierungsreagenz wurde DAST im Überschuss mit einem Zusatz von Pyridin eingesetzt, um so mögliches HF, welches *in situ* entsteht, abzupuffern und eine sauerkatalysierte Abspaltung der Nucleobase zu verhindern. Es konnte eine mit der Literatur vergleichbare Ausbeute von 52 % isoliert werden.<sup>196</sup> Die Entschützung der Tritylschutzgruppe sollte sauerkatalysiert durchgeführt werden. Die Entschützung mit 80 %iger Essigsäure und 16 h refluxieren führte lediglich zu einer mittelmäßigen Ausbeute von 38 %.<sup>193</sup> Mit einer verkürzten Reaktionszeit oder dem kontrollierten Einsatz von wenigen Äquivalenten von Trifluoressigsäure kann eventuell eine erhöhte Ausbeute erzielt werden (**Abb.67**).



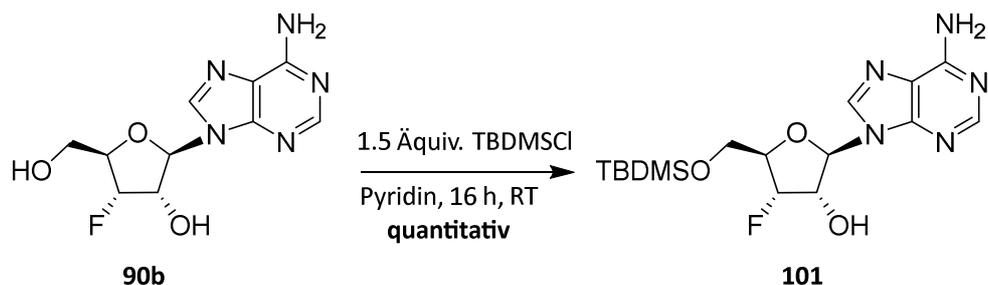
**Abb.67:** Synthese des geschützten 3'-Desoxy-3'-fluoro-adenosins **100** und anschließender Spaltung der Tritylschutzgruppen zum 3'-Desoxy-3'-fluoro-adenosin **90b**.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt das charakteristische Aufspaltungsmuster und die chemischen Verschiebungen und stimmt mit vergleichbaren Literaturdaten überein. Zudem ist im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum das Signal mit passender chemischer Verschiebung von  $-199.78$  ppm zu erkennen (**Abb.68**).<sup>193</sup>



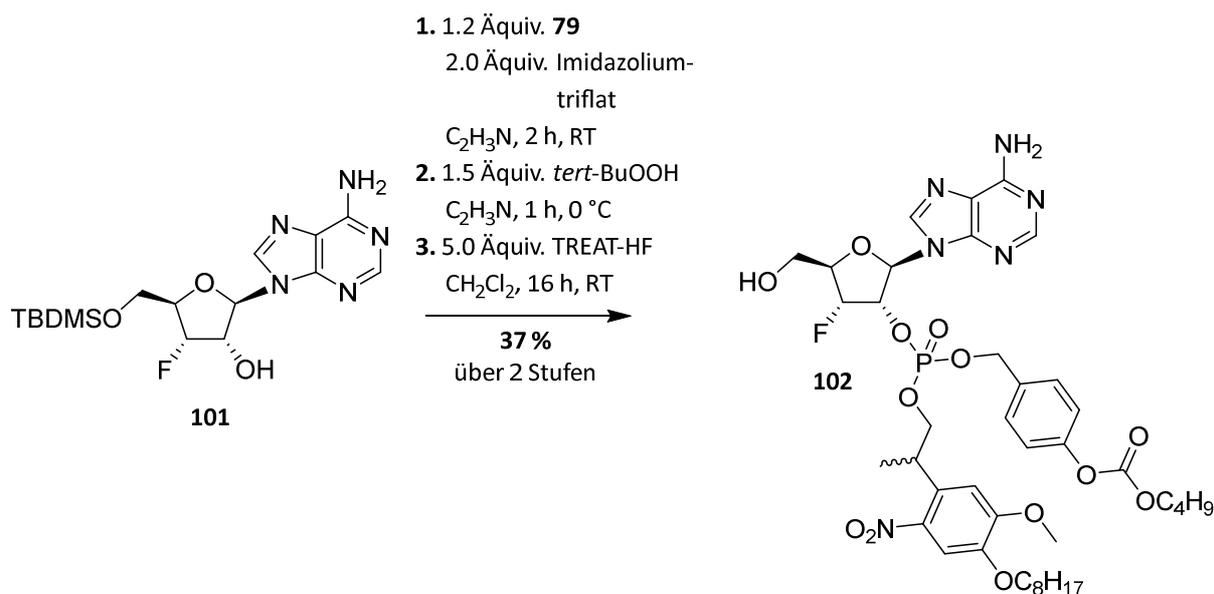
**Abb. 68:**  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum des 3'-Desoxy-3'-fluoro-adenosins **90b**.

Zur regioselektiven Einführung des asymmetrisch geschützten Phosphats an der 2'-Position musste zunächst die 5'-Position geschützt werden. Als später orthogonal spaltbare Schutzgruppe ist die sterisch anspruchsvolle TBDMS-Schutzgruppe geeignet, welche mit TBDMSCl in Pyridin selektiv an der 5'-Position eingeführt werden sollte. Zunächst wurde 1.05 Äquiv. des TBDMSCl-Reagenzes für die Reaktion verwendet, da aber nach 16 h Rühren kein vollständiger Umsatz beobachtet werden konnte, wurden weitere 0.45 Äquiv. zugegeben. Hierdurch konnte eine quantitative Ausbeute des 5'-TBDMS-geschützten Adenosins **101** isoliert werden (**Abb.69**). Dies stellt eine deutliche Steigerung der Ausbeute im Vergleich zur Literatur dar, wo lediglich eine Ausbeute von 22 % erreicht wurden.<sup>196</sup>



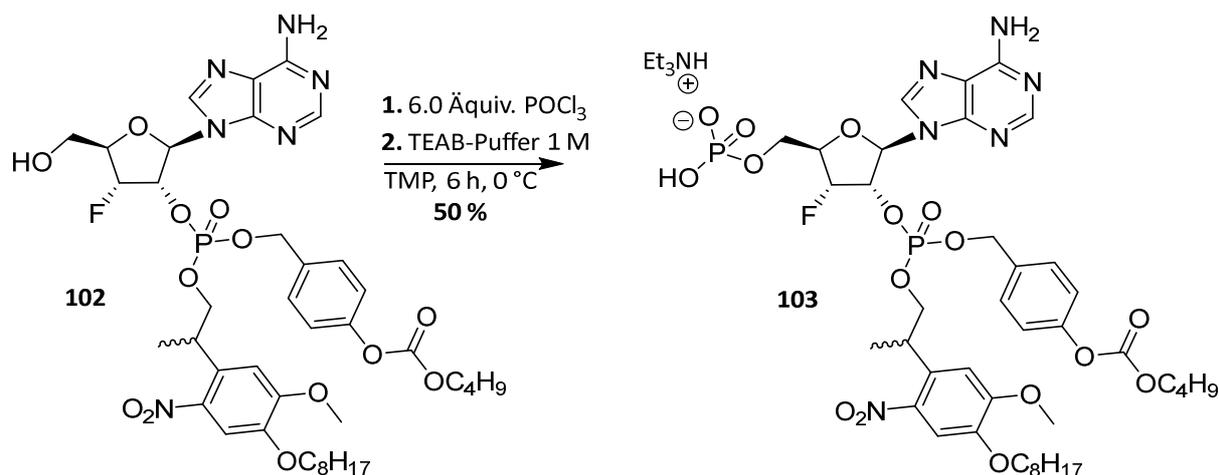
**Abb.69:** Regioselektive Schützung der 5'-Position mit TBDMS-Schutzgruppe zum 3'-Desoxy-3'-fluoro-5'-TBDMS-adenosin **101**.

Als nächstes sollte die 2'-Position mit dem asymmetrisch geschützten Amidit **79** phosphoryliert und die 5'-Position wieder entschützt werden. Die in der 1.Stufe durchgeführte Phosphorylierung wurde wie zuvor beschrieben (Kapitel **6.3.1**) bewerkstelligt, mit dem Unterschied, dass die Amiditreaktion anstatt mit DCI mit Imidazoliumtriflat aktiviert wurde. Vorteilhaft war hierbei die vereinfachte Abtrennung des Säurekatalysators mittels Extraktion. Es konnte nach 2 h kein vollständiger Umsatz beobachtet werden, weshalb weitere 0.5 Äquiv. des Amidits **79** zugegeben wurden, wobei dünnschichtchromatographisch kein weiterer Umsatz beobachtet werden konnte. Aufgrund der erschwerten Abtrennung der entstehenden *H*-Phosphonate und Amidate wurde kein weiteres Amidit **79** zugegeben und die Reaktion abgebrochen. Die 2. Stufe stellte die TBDMS-Entschützung durch Triethylamintrihydrofluorid (TREAT-HF) als Fluorid-Quelle dar, wobei die starke Affinität des Fluorids zum Siliciumatom eine selektive und orthogonale Entschützung unter Bildung einer Si-F-Bindung ermöglicht. Es konnte eine Ausbeute von 37 % über drei Stufen nach säulenchromatographischer Reinigung isoliert werden (**Abb.70**). Eine Erklärung für die relativ träge sauer-vermittelte Amiditreaktion und die damit verbundene geringe Ausbeute ist wiederum über die bevorzugte 2'-endo, 3'-exo-Konformation des Edukts **90b** möglich, da hierdurch eine sauer-vermittelte Reaktion von der  $\alpha$ -Seite erschwert ist. Außerdem kann es zu einer Verringerung der Elektronendichte und damit zu einer Erniedrigung der Reaktivität am 2'-Sauerstoff kommen durch die starke elektronenziehende Wirkung des Fluors in der 3'-Position.



**Abb.70:** Synthese des asymmetrisch geschützten Adenosin-2'-phosphats **102** über drei Stufen.

Abschließend sollte die 5'-Position direkt phosphoryliert werden. Hierbei wurde die Methode nach YOSHIKAWA ET AL. verwendet, welche eine selektive Phosphorylierung unter milden Bedingungen ermöglicht.<sup>198</sup> Das asymmetrisch geschützte Adenosin-2'-phosphat **102** wurde in Trimethylphosphat gelöst und auf 0 °C gekühlt, da beobachtet werden konnte, dass Temperaturen >5 °C bevorzugt eine intramolekulare Umlagerung unter Abspaltung von  $PO_2Cl$  zum 5'-chlorierten Nebenprodukt führen.<sup>199</sup> Der Verlauf der Reaktion wurde mittels HPL-Chromatographie verfolgt. Nach 6 h Reaktionszeit konnte kein weiteres Edukt **102** detektiert werden und die Reaktion wurde mit der Zugabe von TEAB-Puffer 1 M mit pH 8.0 hydrolysiert. Nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung mit Hilfe eines Acetonitril/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradienten konnte das 5'-Monophosphat **103** in einer Ausbeute von 50 % isoliert werden, wobei diese Ausbeute vergleichbar mit literaturbekannten Monophosphorylierungen nach der YOSHIKAWA-Methode ist (**Abb.71**).



**Abb.71:** Monophosphorylierung zum 2',5'-Diphosphat-3'-Deoxy-3'-Fluoro-adenosin **103**.

#### 6.4 Fazit zur Synthese des Adenosinbausteins

Resümierend ist es gelungen, eine geeignete Syntheseroute für die Darstellung des Adenosinbausteins zu finden, welche sich an der Syntheseroute nach DOWDEN ET AL. orientiert.<sup>167</sup> Die Syntheseroute zeigte eine gute Reproduzierbarkeit bei Verwendung von verschiedenen Schutzgruppensystemen. Der Adenosinbaustein mit bioreversiblen Schutzgruppen konnte dabei mit einer Gesamtausbeute von 47 % über 5 Stufen zum Diphosphat **32** synthetisiert werden. Für eine sehr schnelle intrazellulären Freisetzung des synthetisierten NAADP bietet sich der Einsatz von photolabilen Schutzgruppen an. Eine Einführung des photolabil geschützten 2'-Phosphats gelang über die Amidroute mit dem Wechsel der photolabilen Schutzgruppe von *o*-NB, bzw. *o*-NPE zu den *o*-NPP-Schutzgruppen, welche schnellere photolytische Spalteigenschaften zeigten und durch die Anbringung von Alkylketten in ihrer Lipophilie beeinflusst werden konnten. Die kombinatorische Verwendung von photolabilen und bioreversiblen Schutzgruppen für eine korrelative Nutzung der unterschiedlichen Eigenschaften konnte mit der Synthese des bioreversibel-/photolabil-geschützten Adenosinbaustein **84** realisiert werden. Die Gesamtausbeute bei der 5 stufigen Synthese betrug 40 %. Als problematisch bei den Adenosinbausteinen ist eine möglicherweise auftretende Phosphatmigration bei der späteren Spaltung der Silylschutzgruppe, sowie während biologischer Untersuchungen. Zur Verhinderung der Phosphatmigration wurde das 3'-Fluor-Derivat **103** mit einer kombinatorischen Schutzgruppenstrategie synthetisiert. Die Synthese gelang ausgehend von Adenosin **22** über eine 9-stufige Synthese mit einer Gesamtausbeute von 0.4 %, wobei insbesondere die regio-selektive Schützung des Adenosins mit Trityl-Schutzgruppen und die später erfolgte

Entschützung sich noch optimieren lassen. Als alternative Syntheseroute kann das 3'-Fluor-Derivat **90b** zukünftig ausgehend von D-Xylose **92** synthetisiert werden, welches die benötigte Stereochemie liefert.

### 6.5 Optimierung von der photoaktivierbaren Schutzgruppe

Aufgrund der erfolgreichen Synthese des optimierten photolabilen Schutzgruppenkonzepts mit der NPP-Schutzgruppe bestand das Interesse darin, diese Schutzgruppe hinsichtlich ihrer photolytischen Eigenschaften zu verbessern. Zum einen besitzt die NPP-Schutzgruppe zwar bei der Wellenlänge von 365 nm eine gute Quantenausbeute, dabei kann aber nur ein geringes Vermögen zur Absorption, sprich einer geringen Lichtempfindlichkeit, beobachtet werden.<sup>134</sup> Wodurch für die sehr schnelle Abspaltung der Schutzgruppe sehr intensive, möglicherweise zellschädigende, Lichtquellen nötig sind. Durch die Einführung von Donor-Substituenten am aromatischen Ring kann der Absorptionskoeffizient erhöht werden. Insbesondere die Substitution in *para*-Stellung zu der Nitrofunktion führt zu einer stark erhöhten Absorption mittels CT-Wechselwirkungen. Nachteilig ist hierbei der verlangsamte Wasserstofftransfer durch eine Erhöhung der Elektronendichte an der Nitrofunktion.

Zum anderen sind die photolytischen Spaltungsprodukte, die Nitrostyrole, nicht oder nur sehr schwer wasserlöslich. Dies trifft insbesondere auf die verwendete lipophile NPP-C8-Schutzgruppe zu. Generell gilt es, das Ausfallen von Produkten oder Nebenprodukten in biologischen Untersuchungen zu vermeiden.

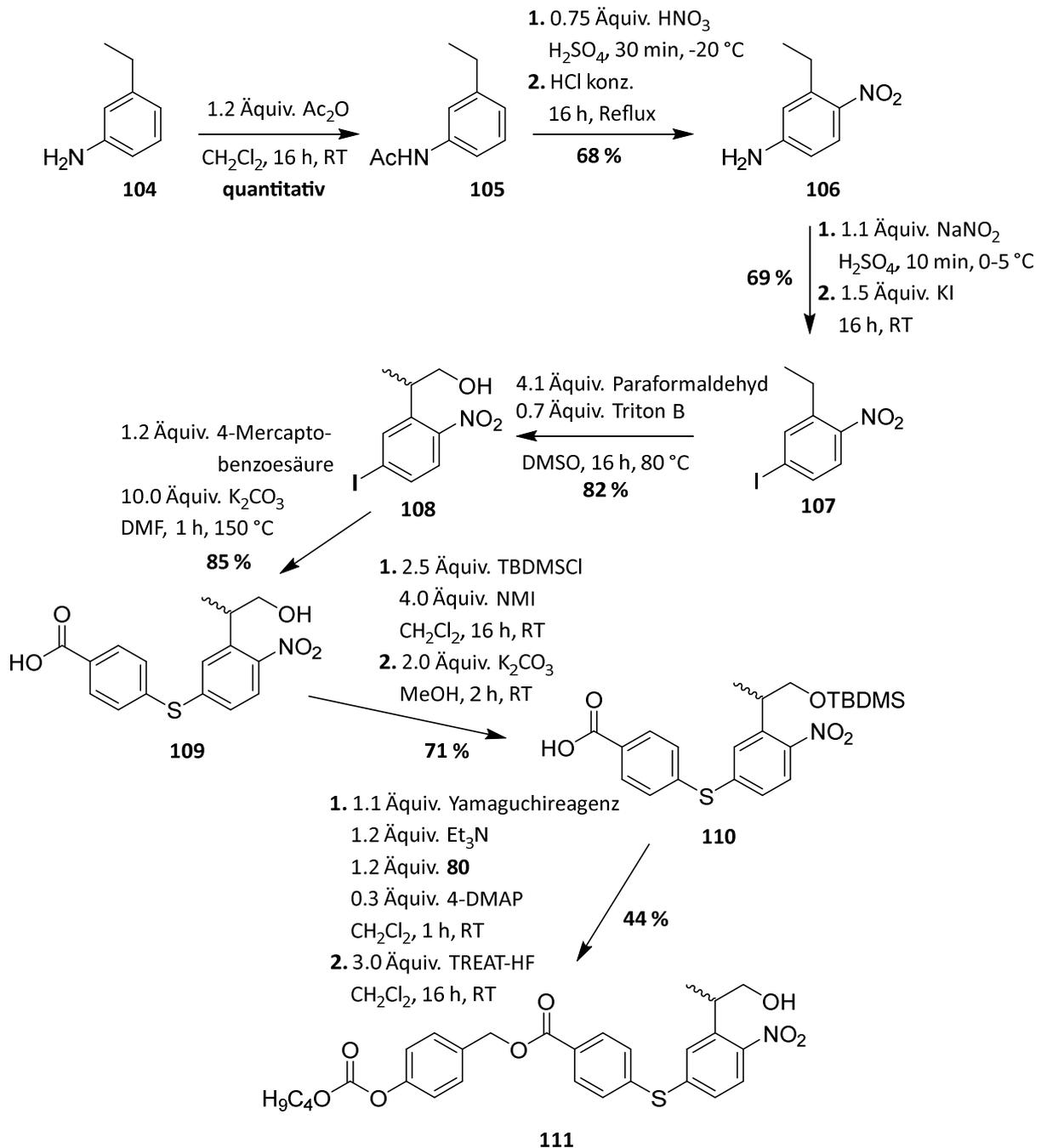
Es hat sich in Untersuchungen von einer Vielzahl an NPP-Schutzgruppen mit diversen Substituenten gezeigt, dass der Thiophenyl-Substituent in *para*-Stellung in der Lage ist, besonders effizient die Lichtempfindlichkeit zu steigern. Die molare Lichtempfindlichkeit konnte von  $\epsilon_{365 \text{ nm}} = 260$  für die NPP-Schutzgruppe zu  $\epsilon_{365 \text{ nm}} = 1560$  mit Thiophenyl-Substituenten gesteigert werden und die photolytische Effizienz von  $\epsilon\phi_{365 \text{ nm}} = 104$  zu  $\epsilon\phi_{365 \text{ nm}} = 1064$  gesteigert werden.<sup>200</sup> Die damit einhergehende photolytische Spaltung konnte so um das 12-fache erhöht werden.

Zur Problembewältigung der geringen Wasserlöslichkeit sollte der Thiophenyl-Substituent mit einer Carboxylfunktion ausgestattet werden. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Carboxylfunktion als geladenes Carboxylat vor, welches zu einer gesteigerten Wasserlöslichkeit führt. Die Carboxylfunktion sollte mit einer kurzkettigen bioreversiblen Schutzgruppe

blockiert werden, um die Lipophilie beizubehalten und eine passive Diffusion durch die Zellmembran garantieren zu können. Es wird davon ausgegangen, dass die bioreversible Schutzgruppe intrazellulär enzymatisch gespalten werden kann, wodurch es zusätzlich zu einem „Lock-in-Effekt“ kommen kann, durch die erschwerte Rückdiffusion der geladenen, photolabilen Gruppe.

Gemäß der Vorschrift von BÜHLER *et al.* wurde die Synthese ausgehend von 3-Ethylanilin **104** begonnen.<sup>178</sup> Zunächst wurde die Aminofunktion mit Hilfe von Essigsäureanhydrid acetyliert. Es konnte eine quantitative Ausbeute des monoacetylierten Produkt **105** isoliert werden. Die Nitrierung in *ortho*-Position konnte mit Nitriersäure realisiert werden. Durch den dirigierenden +M-Effekt der *N*-Amid-Funktion und des +I-Effekts der Ethyl-Funktion in *ortho*- und *para*-Position, erfolgt die Nitrierung in *para*-Stellung zur *N*-Amid-Funktion. Nach der Reinigung durch Extraktion erfolgte ohne weitere Reinigung die sauerkatalysierte Spaltung der Acetyl-schutzgruppe mit konz. Salzsäure. Das gewünschte 3-Ethyl-4-nitroanilin **106** konnte in einer Ausbeute von 68 % isoliert werden. Mit Hilfe einer Diazotierung der aromatischen Aminofunktion konnte diese gegen die gute Iodid-Abgangsgruppe substituiert werden. Hierfür wurde *in situ* zunächst das Diazoniumsalz gebildet, welches anschließend mit Hilfe einer SANDMEYER-Reaktion unter radikalischem Mechanismus zum iodierten Aromaten führt. Das 2-Ethyl-4-iod-1-nitrobenzol **107** konnte in einer Ausbeute von 69 % isoliert werden. Als nächstes erfolgte die Hydroxymethylierung des Benzylkohlenstoffs. Es wurden die gleichen Reaktionsbedingungen, wie zuvor in Kapitel **6.3.2** beschrieben, verwendet. Bei der Hydroxymethylierung konnte eine Ausbeute von 82 % des NPP-Derivats **108** erhalten werden. Alle isolierten Ausbeuten stimmen mit den Literaturausbeuten gut überein.<sup>201</sup> Der Thiophenylsubstituent wurde darauffolgend unter basischen Bedingungen und mit der Verwendung von 4-Mercaptobenzoessäure eingeführt. Nachdem die Reaktionslösung angesäuert und säulenchromatographisch gereinigt wurde, konnte eine sehr gute Ausbeute von 85 % des Thiophenyl-NPP-Derivats **109** erhalten werden. Die anschließende selektive Schützung der Alkoholfunktion wurde über zwei Stufen realisiert. Es konnte zunächst die Schützung der Alkohol- und der Carboxylfunktion unter Verwendung von TBDMSCl mit *N*-Methylimidazol (NMI) als Base innerhalb von 16 h durchgeführt werden. Darauffolgend wurde die TBDMS-Schutzgruppe an der Carboxylfunktion mit Hilfe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hydrolysiert. Die isolierte Ausbeute des TBDMS-geschützten Produkts **110** lag bei 71 %.

Abschließend sollte die bioreversible Schutzgruppe an der Carboxylfunktion eingeführt und die TBDMS-Schutzgruppe an der Alkoholfunktion abgespalten werden. Die Blockierung der Carboxylfunktion mit der bioreversiblen Schutzgruppe konnte mit Hilfe des YAMAGUCHI-Reagenzes, welches mechanistisch der STEGLICH-Reaktion folgt, realisiert werden. Die Spaltung der TBDMS-Schutzgruppe erfolgte wiederum mit TREAT-HF als Fluorid-Quelle. Hierbei konnte eine Ausbeute von 44 % über zwei Stufen zu der bioreversibel geschützten Photoschutzgruppe **111** erhalten werden (**Abb.72**).



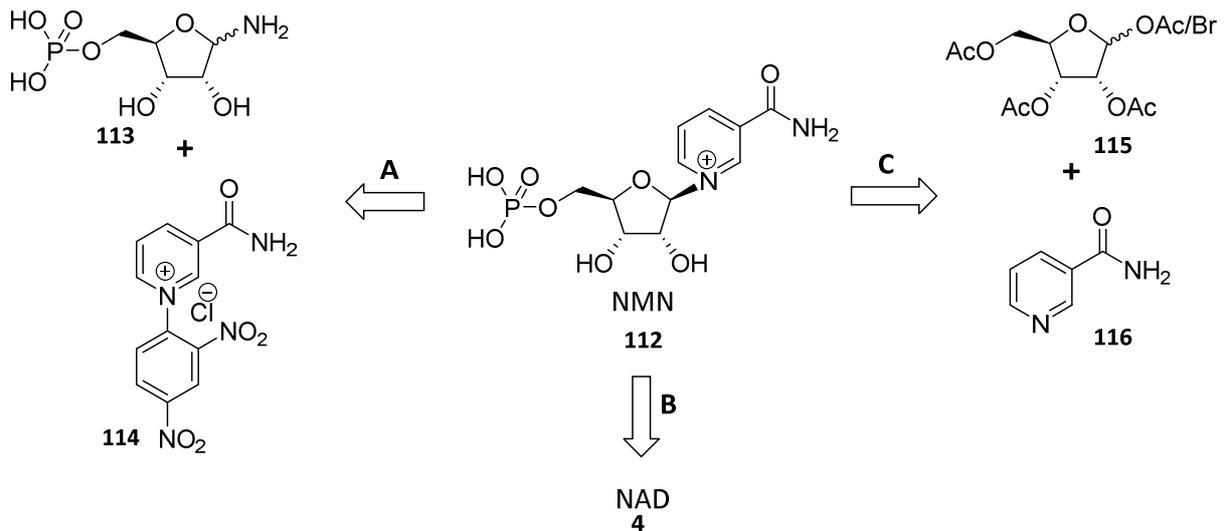
**Abb.72:** Synthese zur optimierten NPP-Schutzgruppe **111** mit möglichen „Lock-in-Effekt“.

Somit konnte die bioreversibel geschützte Photogruppe **111** in einer Gesamtausbeute von 10 % über 11 Stufen synthetisiert werden.

Angesichts dieser Ergebnisse ist die Verwendung von dieser neuartigen Photoschutzgruppe eine gute Alternative zu den etablierten *o*-Nitrophotoschutzgruppen, da die Schutzgruppe sowohl eine hohe Lipophile mit sich bringt, aber zugleich wasserlöslich ist und zusätzlich eine effiziente sehr schnelle photolytische Spaltung ermöglicht. Ein möglicher Einsatz zur Maskierung des 2'-Phosphats des Adenosins ist für zukünftige Synthesen von großem Interesse.

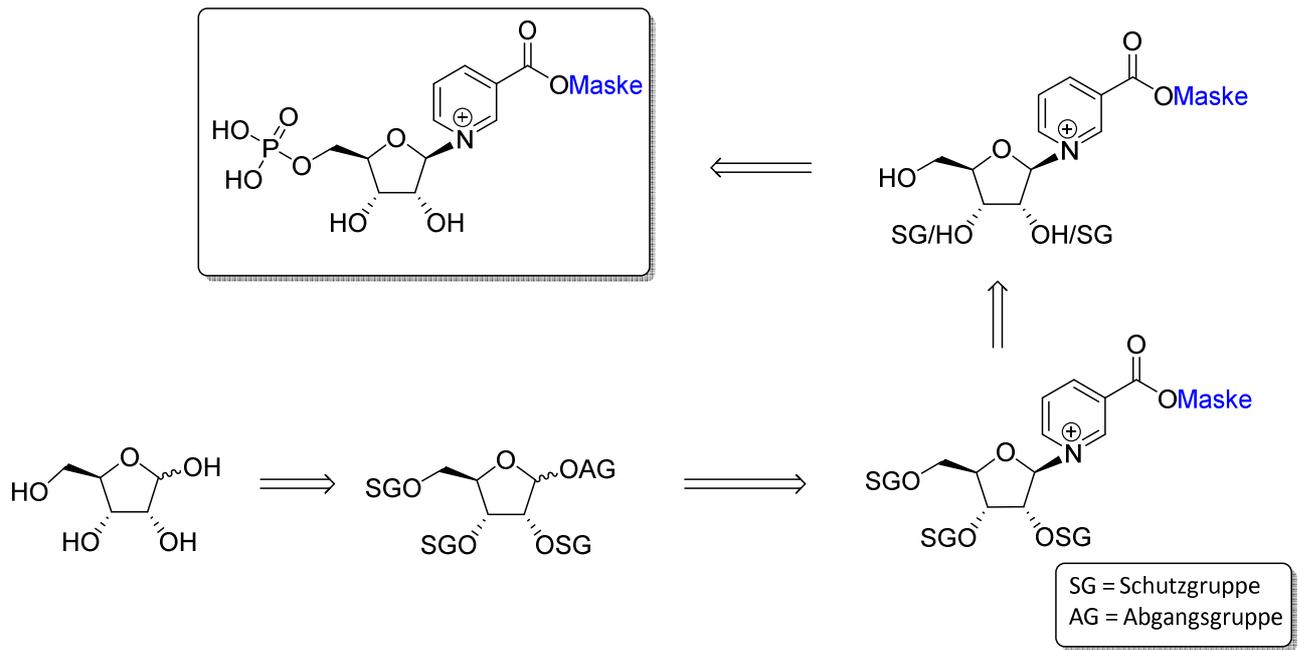
### 6.6 Synthesestrategie von maskiertem Nicotinsäurenucleotiden

Für die Synthese von unmaskiertem Nicotinamidmononucleotid (NMN) sind zahlreiche Synthesemöglichkeiten publiziert. Diese können generell auf die Synthese von Nicotinsäuremonophosphat übertragen werden. Wie in **Abb.73** dargestellt haben sich drei grundsätzliche Methoden durchgesetzt. Zum einen kann das NMN **112** durch die Kondensation von D-Ribofuranosyl-1-aminen **113** mit *N*-(2,4-dinitrophenyl)-3-carbamoylpyridinium Salzen **114** hergestellt werden (Route A). Von Nachteil sind bei dieser Variante die begrenzte Anwendbarkeit aufgrund der geringen synthetischen Effizienz und der nicht kontrollierbaren Stereoselektivität.<sup>202</sup> Eine Alternative bietet der enzymatische Abbau von NAD **4** zum NMN **112**, wobei diese enzymatische Methode eine Synthese von Derivaten und Analoga nicht toleriert und somit für die Synthese ungeeignet ist (Route B).<sup>203</sup> Als weitere Variante gilt die Kondensation von peracetylierten Glycosylhalogeniden, bzw. Ribosetetraacetat **115** mit Nicotinamid **116**, wobei diese Methode eine Verwendung von FRIEDEL-CRAFT-Katalysatoren zur Glycosylierung benötigen (Route C).<sup>204–207</sup> Die letztgenannte Route C bietet dabei die höchste Kontrolle über die Stereoselektivität bei hohen Ausbeuten und flexiblen Anforderungs- und Reaktionsprofil, wobei abschließend die Acetylschutzgruppen entfernt werden müssen.



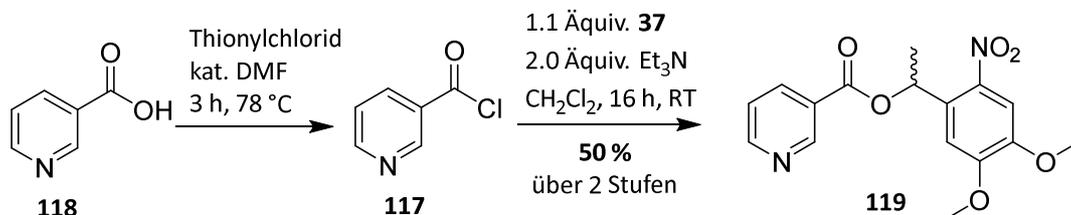
**Abb.73:** Verschiedene Syntheseverfahren zur Darstellung von  $\beta$ -NMN **112**.

Folglich wurde die Synthese des Nicotinsäurebausteins für die NAADP-Totalsynthese dementsprechend abgeleitet, welche in **Abb.74** dargestellt ist. Die Synthese sollte ausgehend von D-Ribose **116** sukzessiv zu einer 2',3',5'-geschützten D-Ribose führen, mit gleichzeitiger Einführung einer geeigneten Abgangsgruppe an der C-1'-Position. Unter Einsatz einer adäquaten Lewisäure sollte die zuvor maskierte Nicotinsäure mittels einer Glycosylierungsreaktion eingeführt werden, wobei eine stereoselektive Synthese des  $\beta$ -Anomers wünschenswert war. Die abschließende regioselektive Phosphorylierung an der 5'-Position sollte über das zuvor entschützte Nucleosid oder ein 5'-ungeschütztes Derivat erfolgen.



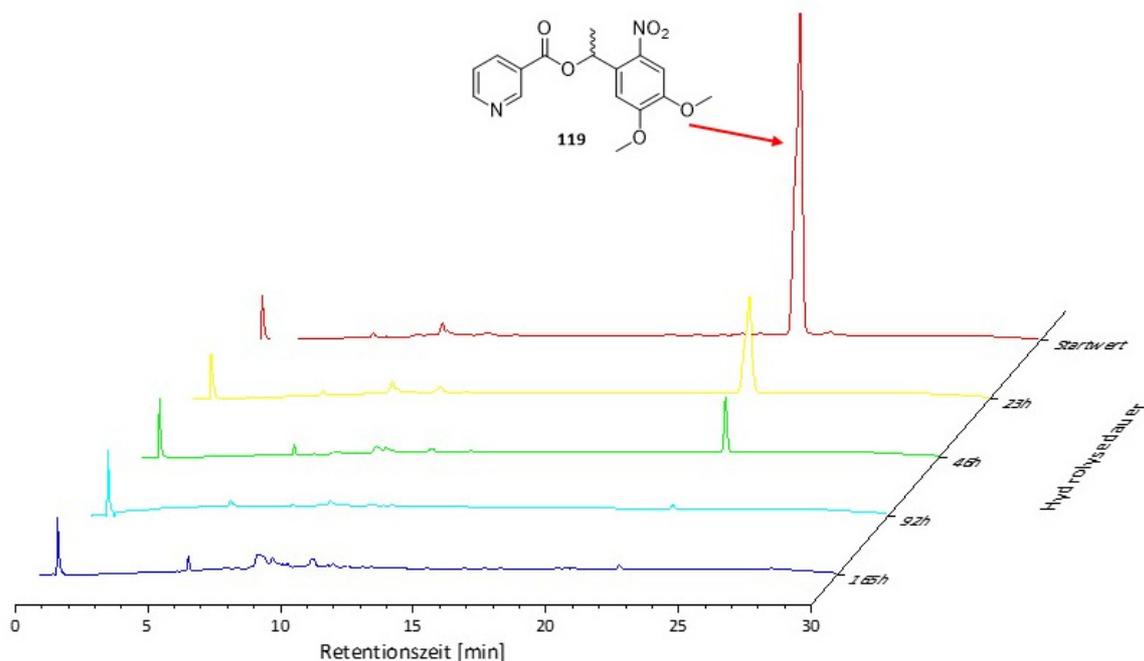
**Abb.74:** Retrosynthese des Nicotinsäurebausteins.

Um eine ungefähre Vorstellung zu erlangen, welche Maskierung an der polaren Carboxylfunktion eingeführt werden kann, wurde in Vorarbeiten zunächst exemplarisch das Hydrolyseverhalten von einer photolabilen Schutzgruppe an der Nicotinsäure untersucht, um festzustellen, ob eine Verwendung dieser Schutzgruppe an dieser Position möglich ist. Es wurde vermutet, dass die bioreversible Schutzgruppe an dieser Position enzymatisch gespalten werden kann, da die Carboxylfunktion ebenfalls, wie die Phosphate, eine gute Abgangsgruppe darstellen. Die Maskierung der Nicotinsäure wurde unter basischen Bedingungen durchgeführt über das zuvor synthetisierte Nicotinychlorid **117**, welches mit Thionylchlorid aus Nicotinsäure **118** dargestellt wurde. Die photolabil geschützte Nicotinsäure **119** konnte über die zwei Stufen in einer Ausbeute von 50 % erhalten werden (**Abb.75**).



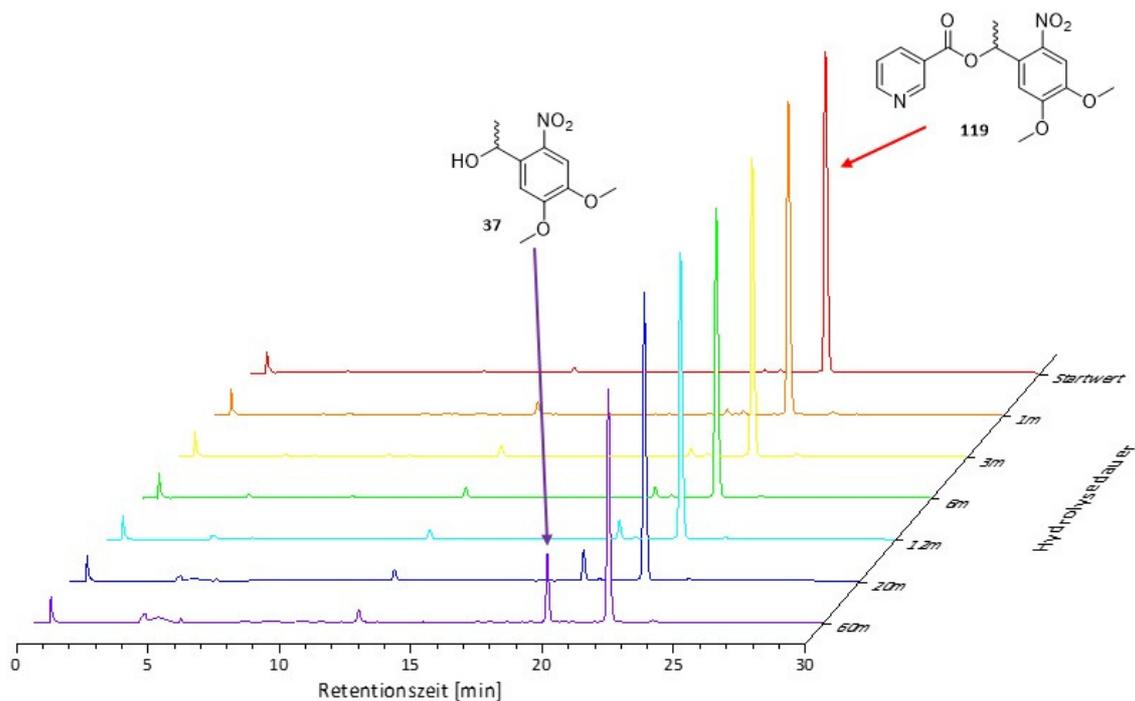
**Abb.75:** Synthese der photolabil geschützten Nicotinsäure **119**.

Die Stabilitätsprüfung der geschützten Nicotinsäure wurde sowohl chemisch in PBS und enzymatisch in PLE-Lösung durchgeführt. Trotz der veränderten sterischen, als auch elektronischen Verhältnisse im NAADP, kann die Hydrolyse einen Hinweis auf die Stabilität der photolabilen Schutzgruppe an dieser Position liefern. Die jeweiligen Hydrolysen wurden im Dunkeln durchgeführt, um photolytische Nebenreaktion auszuschließen. Bei der chemischen Hydrolyse in PBS ist ein langsamer Zerfall des geschützten Edukts **119** zu erkennen, dabei liegt die Halbwertszeit bei  $t_{1/2} = 14.05$  h (**Abb.76**). Dies lässt vermuten, dass die Esterfunktion für eine Verseifungsreaktion durch nucleophil angreifende Hydroxidionen zugänglich ist.



**Abb.76:** Chemischer Hydrolyseverlauf der photolabil geschützten Nicotinsäure **119** in PBS pH-Wert 7.3.

Bei der enzymatischen Hydrolyse ist zu erkennen, dass die photolabile Schutzgruppe eindeutig enzymatisch gespalten wird und nicht über photolytische Nebenreaktionen gespalten wird, da die abgespaltene Schutzgruppe mit alkoholischer Funktion vorliegt. Nach 60 Minuten Inkubationszeit ist eine erheblich freigesetzte Menge der photolabile Schutzgruppe zu erkennen, womit auch unbeabsichtigt die Nicotinsäure freigesetzt wird (**Abb.77**). Diese Nebenreaktion sollte bei der Verwendung von photolabilen Schutzgruppen im besten Fall komplett unterdrückt werden, um eine kontrollierte Freisetzung durch die photolabile Schutzgruppe zu gewährleisten.



**Abb.77:** Enzymatischer Hydrolyseverlauf der photolabil geschützten Nicotinsäure **119** in PLE-Lösung.

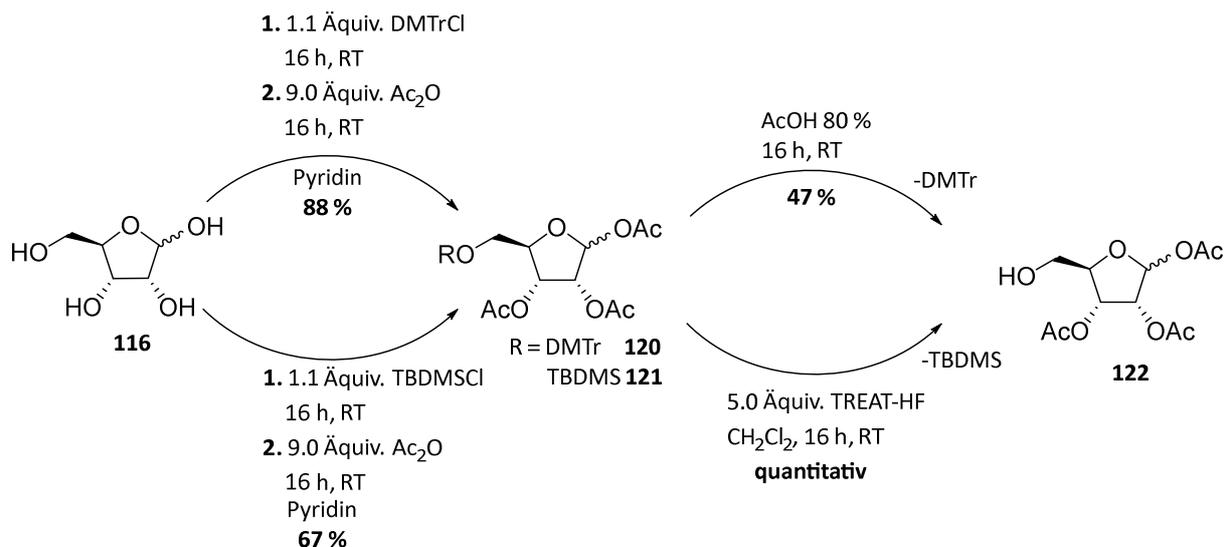
Daraus lässt sich ableiten, dass die Maskierung der Nicotinsäure mit einer photolabilen Schutzgruppe ungeeignet ist und die Maskierung mit einer bioreversiblen Schutzgruppe entsprechend durchgeführt werden sollte. Die zuvor beschriebene photolabile Maskierung des 2'-Phosphats führt zu einer Inaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Wirkung des NAADPs, wie in Kapitel **4.1.7** beschrieben. Zudem konnte bei der Hydrolyse des kombiniert geschützten Adenosinbausteins keine frühzeitige Freisetzung der photolabilen Schutzgruppe beobachtet werden, vermutlich aufgrund der schnellen enzymatischen Freisetzung des gebildeten, geladenen 2'-Phosphats, wodurch die photolabile Maskierung am 2'-Phosphat favorisiert ist. Aus diesen Gründen wurde der Nicotinsäurebaustein im Folgenden ausschließlich mit einer bioreversiblen Schutzgruppe maskiert.

### 6.7 Synthese von maskiertem 2',3'-Acetyl-Nicotinsäurenucleosid

In Anbetracht einer erleichterten Syntheseführung wurde zunächst mit der Darstellung eines acetylierten Nicotinsäurebausteins begonnen. Trotz der Vorkenntnis, dass sich Acetyl-Gruppen nicht als Substrat für die Esterase in PLE-Hydrolysestudien von Adenosin-diphosphat-ribose (ADPr) erwiesen haben, welche von KATHARINA PAHNKE durchgeführt wurden, kann davon

ausgegangen werden, dass die Acetyl-Gruppen intrazellulär chemisch oder durch andere Enzyme gespalten werden können. Dies wurde bereits an einer Vielzahl von eingesetzten Medikamenten bewiesen.<sup>123</sup> Zudem sind die 2'- und 3'-Position an denen die verbleibenden Acetyl-Gruppen gebunden sind bislang nicht als strukturelevante Merkmale für die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Aktivität von NAADP bekannt und könnten vielleicht sogar die passive Diffusion positiv durch die Lipophilieerhöhung beeinflussen.

Als Ausgangssubstanz diente D-Ribose **116**. Um ferner selektiv die Phosphatgruppe in die 5'-Position einführen zu können, sollte zunächst eine orthogonal zu spaltende Schutzgruppe an dieser Position eingeführt werden. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Schutzgruppen verwendet und sowohl die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr), als auch die TBDMS-Schutzgruppe näher untersucht. Anschließend wurden jeweils mit Hilfe von Essigsäureanhydrid in einer „one-pot“-Reaktion ohne vorherige Reinigung die verbleibenden freien Hydroxyfunktionen acetyliert. Bei der Synthese des DMTr-Zuckers **120** konnte eine Ausbeute von 88 % isoliert werden und bei dem TBDMS-Zucker **121** eine Ausbeute von 67 %. Eine Trennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere war in diesem Fall nicht notwendig, da die später durchgeführte Glycosylierung einen entscheidenden dirigierenden Einfluss auf die Entstehung der jeweiligen Anomere hat. Die beiden 5'-Schutzgruppen konnten jeweils orthogonal entschützt werden. Bei der Spaltung der DMTr-Schutzgruppe mit 80 %iger Essigsäure konnte das Produkt in einer Ausbeute von 47 % erhalten werden, wohingegen bei der Spaltung der TBDMS-Schutzgruppe mit TREAT-HF eine quantitative Ausbeute erhalten wurde. Daraus ergibt sich eine höhere Gesamtausbeute der 1',2',3'-Tri-acetyl-D-ribose **122** über die TBDMS-Route mit 67 %. Die erste Stufe dieser Route weist zwar eine geringere Regioselektivität auf, dies wird allerdings durch die quantitative Ausbeute in der 2. Stufe gegenüber der DMTr-Route kompensiert (**Abb.78**). Zudem war die Reinigung nach der TBDMS-Entschützung im Gegensatz zur DMTr-Entschützung vereinfacht, da der abgespaltene Triphenylmethylalkohol nur schwer säulenchromatographisch abgetrennt werden konnte und ein signifikanter Anteil an schwer trennbaren Mischfraktionen erhalten wurden. Eine Entschützung der 5'-Position ist dabei unbedenklich, da eine Acetylmigration zur 5'-Position bislang nicht beobachtet werden konnte.

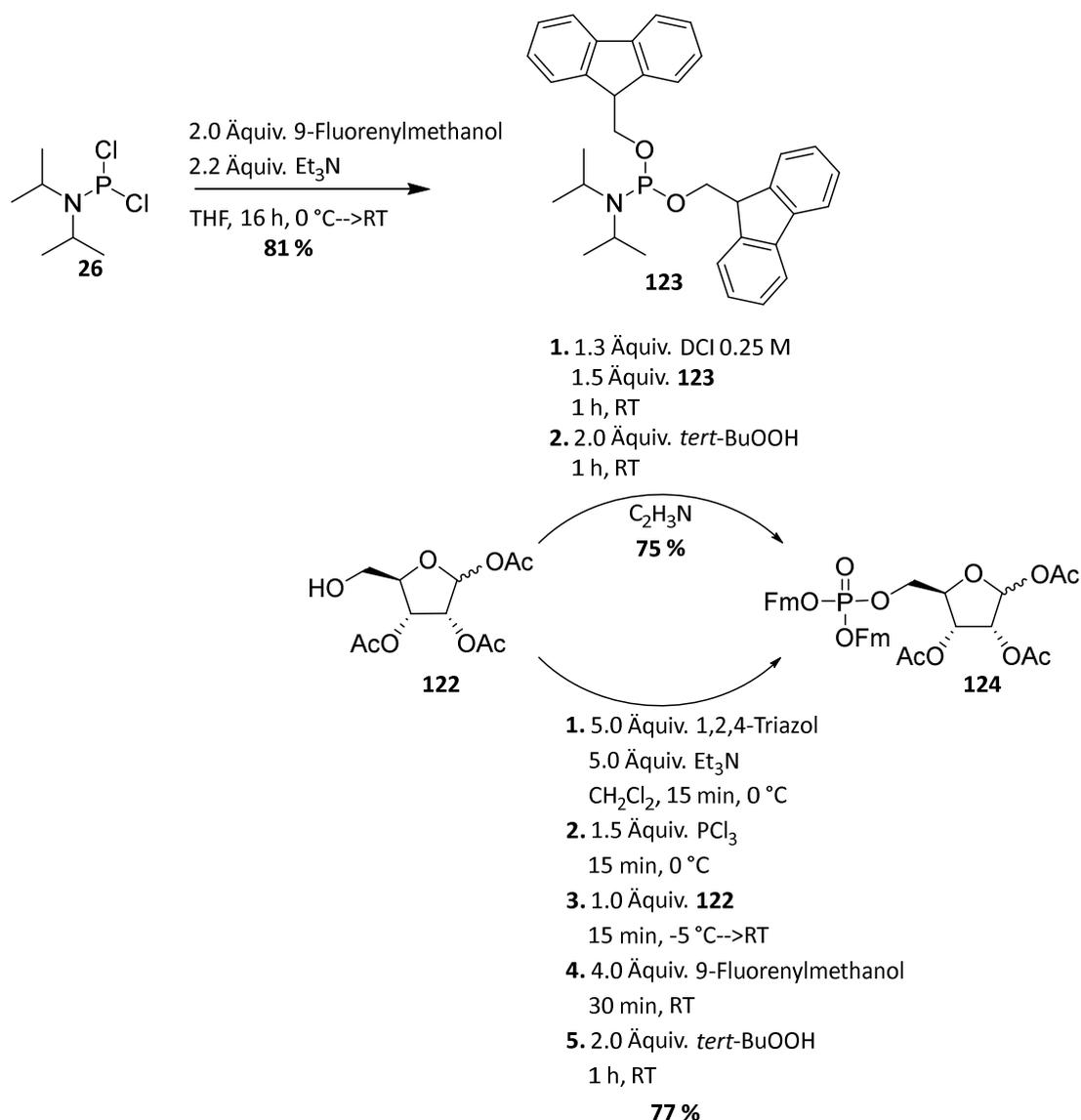


**Abb.78:** Synthese der 1',2',3'-Tri-acetyl-D-ribose **122** über zwei verschiedene Synthesevarianten.

Darauffolgend sollte eine geschützte Phosphatgruppe an der 5'-Position in das Produkt **122** eingeführt werden, um im späteren Verlauf eine Glycosylierungsreaktion zu ermöglichen. Da die bioreversible Maskierung an der Nicotinsäure basenkatalysiert, genauer durch ein Nucleophil, verseift werden kann, sollte eine Schutzgruppe für das Phosphat gewählt werden, welche orthogonal gespalten werden kann. Die in der Peptidsynthese zur breiten Anwendung eingesetzte Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) erfüllt diese Anforderung, da diese mittels nicht-nucleophiler Basen gespalten werden kann. Dabei wird das in 9'-Position befindliche acide Proton durch die Base abstrahiert, worauf es in einem E1<sub>cb</sub>-Mechanismus zu einer Kollabierung des quasi-aromatischen Zustands kommt und das Substrat freigesetzt wird.

Die anschließende selektive Phosphorylierung der ungeschützten 5'-Position konnte auf die klassische Methode mittels Amiditchemie durchgeführt werden. Hierfür wurde zunächst das Fm-Amidit **123** aus dem Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26** synthetisiert. Dabei wurde das übliche Syntheseprotokoll nach WEINSCHENK verwendet und eine Ausbeute von 81 % des Fm-Amidits **123** erhalten.<sup>171</sup> Ausgehend von der acetylierten Ribose **122** erfolgte als nächstes die sauer-vermittelte Phosphorylierung durch Umsetzung mit dem zuvor synthetisierten Fm-Amidit **123** und anschließender Oxidation. Hierbei wurde nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung eine Ausbeute des Bis-(Fm)-1',2',3'-tri-acetyl-ribofuranose-monophosphats **124** von 75 % erhalten. Aufgrund des hohen synthetischen Aufwands für den Zuckergrundbaustein entstand der Wunsch die Synthese zu vereinfachen und zu verkürzen. Als neuartige Synthese zur Einführung von geschützten Phosphaten wurde die zuvor

beschriebene Phosphitylierung mittels  $\text{PCl}_3$  und Imidazol (Kapitel 6.3.1) abgewandelt. Es wurde zunächst das Tristriazolylphosphan *in situ* aus 1,2,4-Triazol und  $\text{PCl}_3$  unter basischen Bedingungen gebildet. Der Zuckerbaustein wurde daraufhin in einer „one-pot“-Reaktion mit dem Phosphitylierungsreagenz für 15 Minuten gerührt, woraufhin im Überschuss 9-Fluorenylmethanol zugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde für 30 Minuten gerührt und daraufhin abschließend mit *tert*-BuOOH oxidiert (**Abb.79**).<sup>208</sup> Durch diese Methode konnte die Reinigung ebenfalls deutlich vereinfacht werden, da keine schwer abzutrennenden Nebenprodukte wie bei der Amidit-Methode anfielen. Überdies ist die Ausbeute von 77 % des Monophosphat **124** vergleichbar mit der Amidit-Methode, wobei die Synthese zusätzlich um zwei Synthesestufen zum benötigten Fm-Amidit **123** reduziert werden konnte.

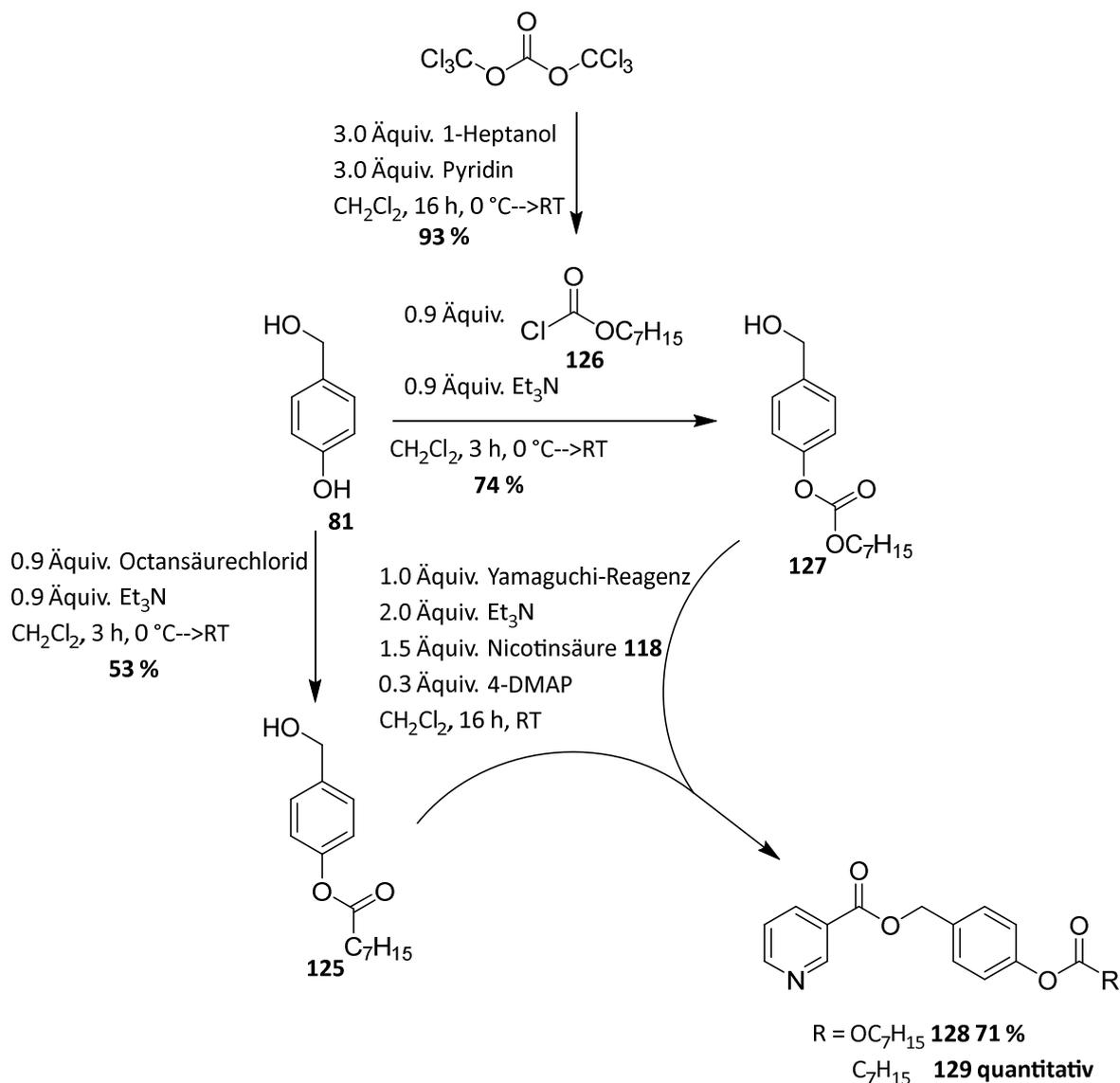


**Abb.79:** Synthese des Bis-(Fm)-1',2',3'-tri-acetyl-ribofuranose-monophosphats **124** über zwei verschiedene Syntheserouten.

Um eine Glycosylierung des Zuckerbausteins mit der Nicotinsäure zu ermöglichen und zugleich die polare Position der Carboxylfunktion zu maskieren, sollte eine bioreversible Schutzgruppe eingeführt werden, da wie zuvor beschrieben (s. Kapitel **6.6**), die Verwendung einer photolabilen Schutzgruppe nicht praktikabel ist. Außerdem sollte die AB-Schutzgruppe mit der konvergente AB-Carbonat-Schutzgruppe verglichen werden hinsichtlich ihrer chemischen, sowie enzymatischen Stabilität, weshalb jeweils die geschützten Nicotinsäuren dargestellt werden sollten. Ausgehend von 4-Hydroxybenzylalkohol **81** konnte zunächst nach der bekannten Synthesevorschrift aus Kapitel **6.3.1** und der Verwendung von Octansäurechlorid eine Ausbeute von 53 % des 4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat **125** isoliert werden.

Für die Synthese der Carbonat-Schutzgruppe musste zuvor das Heptylchlorformiat **126** dargestellt werden. Das Formiat wurde hierfür aus 1-Heptanol und Triphosgen synthetisiert. Dabei ist darauf zu achten, dass 3.0 Äquiv. Pyridin für 1.0 Äquiv. Triphosgen verwendet wird, wodurch *in situ* 3.0 Äquiv. Phosgen erzeugt werden. Das Phosgen bildet mit dem Pyridin ein reaktives Pyridinium-Intermediat, welches mittels nucleophilem Angriff des Alkohols reagiert. Das Heptylchlorformiat **126** konnte in einer Ausbeute von 93 % nach Extraktion erhalten werden. Die darauffolgende Synthese des 4-(Hydroxymethyl)phenyloctylcarbonats **127** erfolgte gemäß der AB-Synthese. Hierbei konnte wiederum eine erhöhte Ausbeute von 74 % erreicht werden, wobei die Begründung der gleichen Argumentation aus Kapitel **6.3.3** folgt.

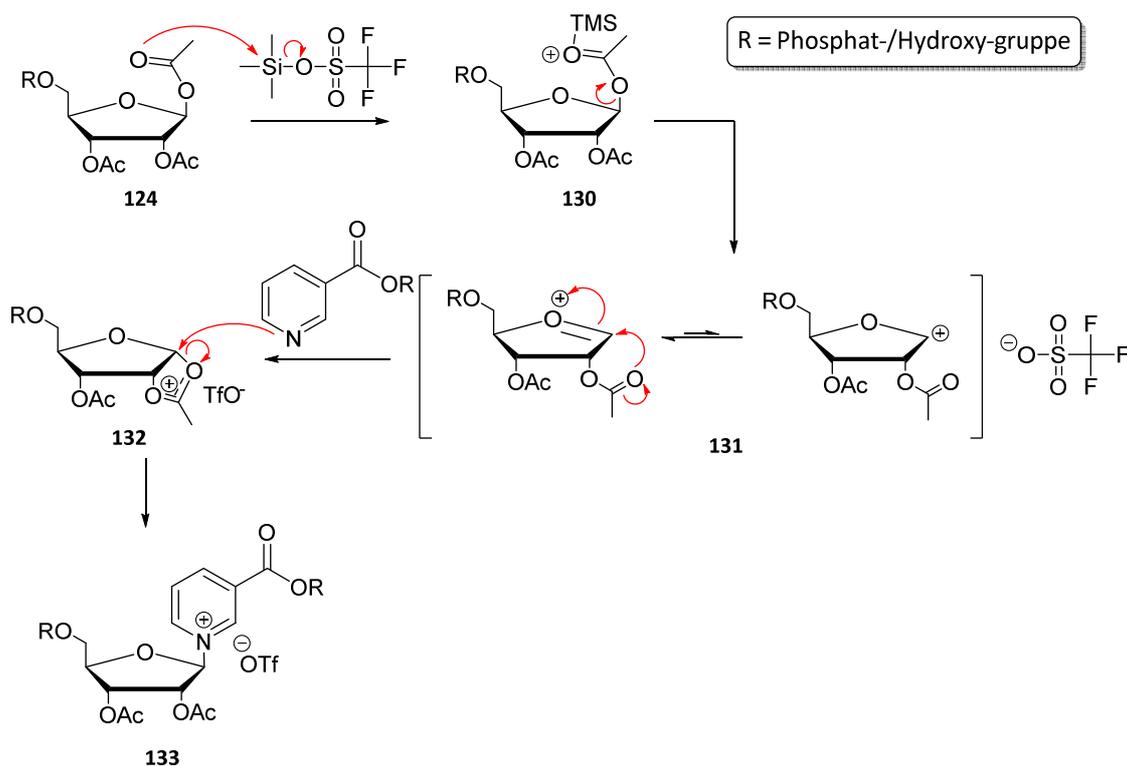
Zur Bildung der Esterfunktion mit der Nicotinsäure **118** stehen mehrere Reaktionsvarianten zur Verfügung. Die in Kapitel **6.6** dargestellte Synthesevariante über ein Säurechlorid resultiert nur in moderaten Ausbeuten von etwa 50 %. Deshalb wurde alternativ die Veresterung nach STEGLICH durchgeführt. Eine anfängliche Veresterung mit dem festem *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurde durch das flüssige YAMAGUCHI-Reagenz (2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid) für die Erzeugung des Aktivesters substituiert. Die Veresterung wurde dabei durch 4-DMAP katalysiert. Im Fall der Veresterung mit der Carbonat-Schutzgruppe zur geschützten Nicotinsäure **128** konnte eine Ausbeute von 71 % erzielt werden und im Fall der AB-Schutzgruppe zur geschützten Nicotinsäure **129** wurde eine quantitative Ausbeute erhalten (**Abb.80**). Die geringere Ausbeute der Carbonat-geschützten Nicotinsäure **128** kann dadurch erklärt werden, dass die bei der säulenchromatographischen Reinigung erhaltenden Mischfraktionen nicht weiter getrennt, sondern verworfen wurden.



**Abb.80:** Synthese der bioreversiblen Schutzgruppen **125** und **127** und anschließender Maskierung der Nicotinsäure zu den Estern **128** und **129**.

Die in der Synthese folgende Glycosylierung der acetylierten Ribose **124** kann durch mehrere Methoden realisiert werden. Insbesondere die Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-(TMSOTf)-vermittelte Glycosylierungsreaktion scheint geeignet, da diese eine hohe Ausbeute mit sehr hoher Stereoselektivität zum  $\beta$ -Anomer ermöglicht.<sup>206,209</sup> Ausschlaggebend für die Verwendung dieser Glycosylierungsvariante sind die hohe Effizienz durch das *in situ* dargestellte elektrophile Zentrum, welches durch einen Nachbargruppeneffekt stabilisiert werden kann und auf diese Weise bevorzugt zum  $\beta$ -Anomer führt. Umfassend beschrieben wird die Acetylabbaugruppen spaltung an der 1'-Position mittels TMSOTf **130**. Das mesomeriestabilisierte kationische 1'-Kohlenstoffatom **131** kann anschließend intramolekular nucleophil von

dem Sauerstoff der 2'-Nachbargruppe angegriffen werden. Der hierdurch gebildete 1,2-*cis*-Oxonium-Fünfring **132** steht in  $\alpha$ -Stellung am Zuckerring, wodurch der nucleophile Angriff der Nicotinsäure bedingt durch die Zuckerkonformation favorisiert von der weniger sterisch gehinderten  $\beta$ -Seite erfolgen kann und so zur kovalenten Bindung führt **133** (**Abb.81**). Da die Acetyl-Gruppe die Reaktion als Trimethylsilylacetester verlässt, muss eine stöchiometrische Menge TMSOTf eingesetzt werden, daher handelt es sich nicht um einen Katalysator, sondern um einen Promoter der die Reaktion nur vermittelt.<sup>210,211</sup>

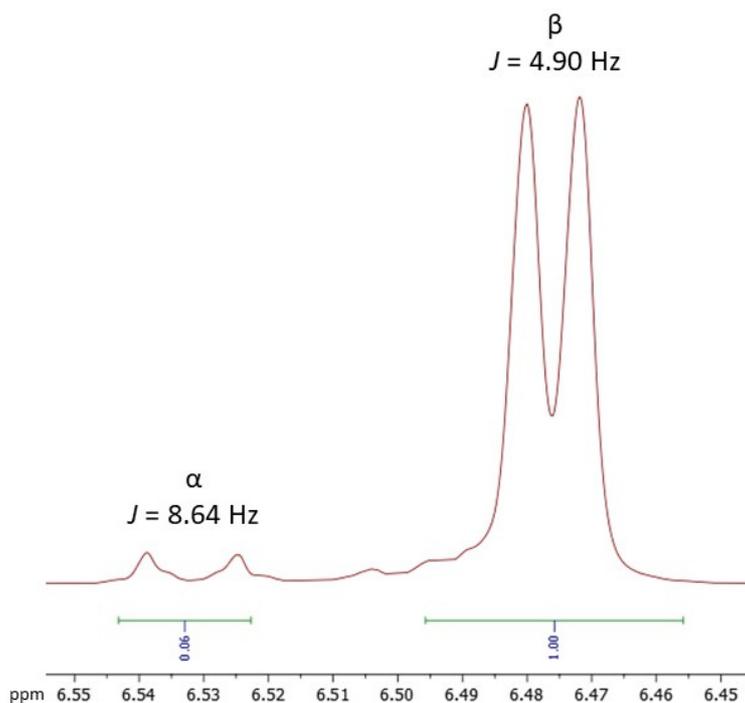


**Abb.81:** Schematischer Mechanismus der TMSOTf-vermittelten Glycosylierung.

Erste Glycosylierungsversuche von WARNECKE mit peracetylierter D-Ribose mit Ethylnicotinat bestätigen die hohe  $\beta$ -Stereoselektivität bei guten Ausbeuten.<sup>161</sup> Aufbauend auf diesem Ergebnis sollte die Glycosylierung unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde das Bis-(Fm)-1',2',3'-tri-acetyl-ribofuranose-monophosphat **124** jeweils mit den unterschiedlich geschützten Nicotinsäuren **128** und **129** unter TMSOTf-vermittelter Reaktion kondensiert. Überwiegend aus Gründen der verbesserten Löslichkeit wurde das Lösungsmittel von dem zuvor von WARNECKE verwendeten  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zu Acetonitril gewechselt, der Einfluss des Lösungsmittels auf die Stereoselektivität kann aufgrund des

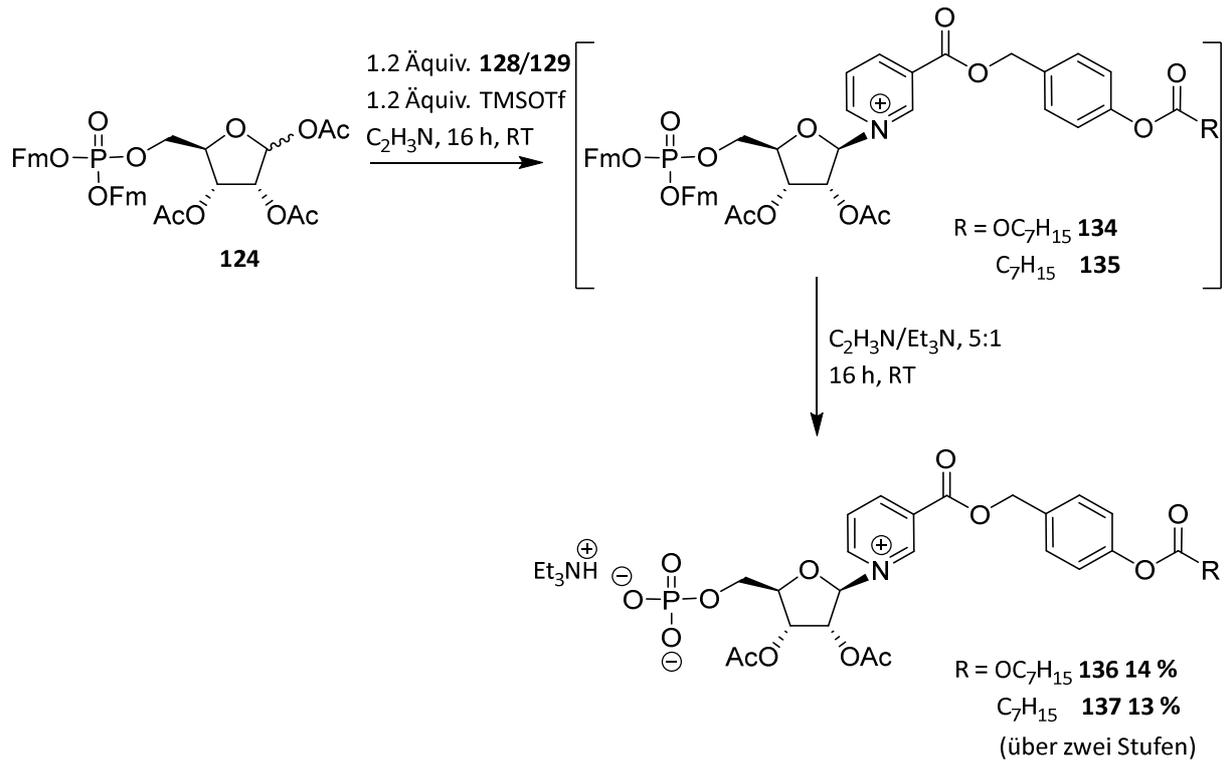
Nachbargruppeneffekts an dieser Stelle vernachlässigt werden, weshalb nicht näher darauf eingegangen wird. Als optimales Verhältnis zwischen dem TMSOTf und der Nicotinsäurederivate **128** und **129** hat sich eine äquivalente Menge für die Reaktion als geeignet erwiesen, da eine Erhöhung der Äquivalente des TMSOTf zu einer Erniedrigung der Ausbeute geführt hat. Der Überschuss von TMSOTf kann zu einer Silylierung des Pyridinstickstoff führen, infolgedessen wird die Nucleophilie vermutlich erniedrigt. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führte zwar zu einer verkürzten Reaktionszeit, wobei aber das Anomerenverhältnis zu Gunsten des unerwünschten  $\alpha$ -Anomers beeinflusst wurde. Auch der Wechsel der Lewisäure von TMSOTf zu  $\text{SnCl}_4$  oder Tetraisopropylorthotitanat führte entweder zu einer erniedrigten Ausbeute oder einer vollständigen Hemmung der Glycosylierung. Als optimale Reaktionsbedingungen haben sich die Zugabe von 1.2 Äquiv. geschützte Nicotinsäure und die Verwendung von 1.2 Äquiv. der Lewisäure TMSOTf bei einer unter Raumtemperatur durchgeführten Reaktion herausgestellt. Aufgrund der erhöhten Labilität der glycosidischen Bindung und der damit einhergehenden komplexen Reinigung wurden die geschützten Monophosphate **134** und **135** nicht vollständig säulenchromatographisch gereinigt, sondern verunreinigt in der folgenden Reaktion eingesetzt (**Abb.83**).

Es konnte aber im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Anomerenverhältnis von  $\beta:\alpha$ , 19:1 bestimmt werden. Die Bildung der glycosidischen Bindung zeigte sich durch eine Tieffeldverschiebung der Pyridinium-Protonen durch eine elektronendefizitären Umgebung infolge des positiv geladenen Stickstoffs. Bei einer Untersuchung des Diederwinkels des anomerischen  $1'$ -Proton und des  $2'$ -Protons konnte die Stereochemie bestimmt werden. Dieser Diederwinkel liegt bei Ribose bei z.B. ca.  $130^\circ$  bis  $140^\circ$ , wenn ein  $\alpha$ -Anomer vorliegt. Durch die Anwendung des Diederwinkels in der Karplus-Gleichung kann für das  $\alpha$ -Anomer eine Kopplungskonstante von ungefähr 8 ppm berechnet werden und für das  $\beta$ -Anomer eine Kopplungskonstante zwischen 4 – 5 ppm berechnet werden. Bei Betrachtung des anomerischen Protons im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergibt sich eine Kopplungskonstante von 4.90 ppm, daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hauptsächlich um das  $\beta$ -Anomer handelt (**Abb.82**).



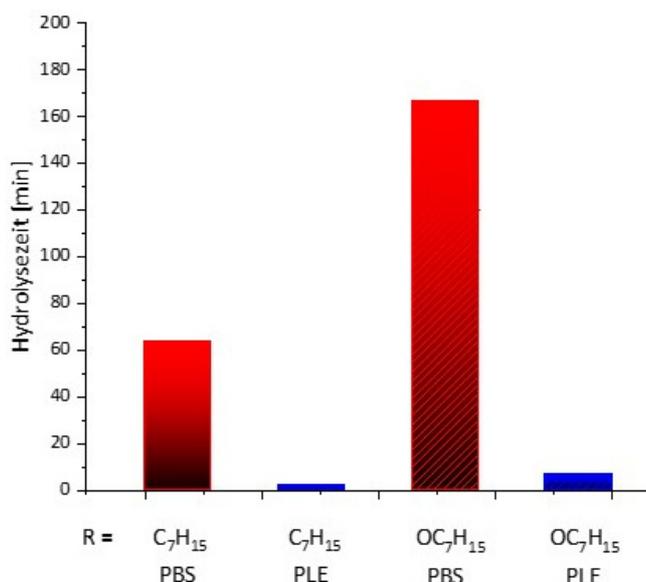
**Abb.82:** Kopplungskonstanten der Anomere  $\alpha/\beta$  im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

Die folgende Spaltung der Fm-Schutzgruppe konnte mit 20 %iger Triethylaminlösung in Acetonitril realisiert werden, wobei das Triethylamin als nicht-nucleophile Base den E1<sub>CB</sub>-Spaltungsmechanismus der Fm-Gruppe initiiert und gleichzeitig als Gegenion des entstandenen Phosphats fungiert. Über die zwei Stufen der Glycosylierung und der Entschützung konnte für das Monophosphat **136** eine Ausbeute von 14 % und für das Monophosphat **137** eine Ausbeute von 13 % erhalten werden (**Abb.83**). Als mögliches Gegenion kommt das Triflat-Anion in Frage, wobei das signifikante Signal bei 120 ppm im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum nicht detektiert werden konnte. Es folgte eine sehr aufwändige mehrmalige RP-18-säulenchromatographische Reinigung, wobei zwar der Anteil des  $\alpha$ -Anomers abgetrennt werden konnte, es aber sogar während der Reinigung zu einer langsamen Zersetzung der Produkte **136** und **137** gekommen ist. Zu der Zersetzung könnte es bei einem nucleophilen intramolekularen Angriff von dem negativ geladenem Sauerstoff des Phosphats auf das elektrophile Kohlenstoff der 1'-Position gekommen sein, wodurch sich ein 1,5-anhydro-Derivat bilden würde.<sup>212</sup> Zudem ist eine Epimerisierung oder Spaltung der glycosidischen Bindung unter basischen Bedingungen denkbar, wodurch sich die niedrige Ausbeute erklären lässt.<sup>205</sup>



**Abb.83:** Synthese der geschützten Nicotinsäuremonophosphate **136** und **137**.

Die hydrolytischen Eigenschaften der zwei verschiedenen bioreversiblen Schutzgruppe zeigen im Vergleich, dass die 4-(Hydroxymethyl)phenylcarbonat-Schutzgruppe **136** eine deutlich erhöhte chemische Stabilität in PBS-Puffer aufweist, als die 4-(Hydroxymethyl)phenylester-Schutzgruppe **137**. Zudem ist bei beiden Schutzgruppen eine hohe enzymatische Labilität in PLE-Lösung von wenigen Minuten Halbwertszeit zu beobachten. Aufgrund der erhöhten chemischen Stabilität der 4-(Hydroxymethyl)phenylcarbonat-Schutzgruppe **136** bei gleichzeitig hoher enzymatischer Labilität sollte diese Carbonat-Maskierung fortan ausschließlich zur Anwendung kommen (**Abb.84**). Die Ergebnisse zu den Carbonat-Schutzgruppen korrelieren mit den Erkenntnissen, welche von GOLLNEST und XIAO erhalten wurden.<sup>120,213</sup>

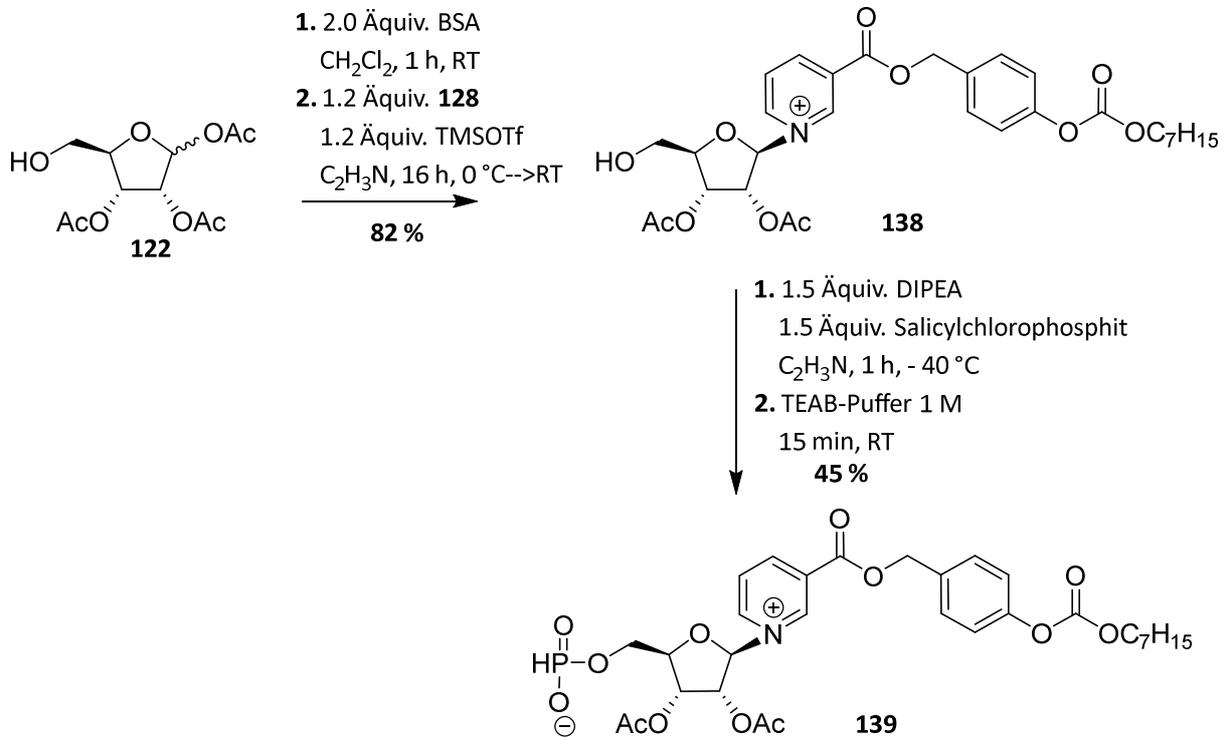


**Abb.84:** PLE- und PBS-Hydrolysehalbwertszeiten  $t_{1/2}$  der C<sub>7</sub>-Ester- **137** und C<sub>07</sub>-Carbonat- **136** Schutzgruppen im Vergleich.

Abschließend wurde die Synthese zu einem Nicotinsäurebausteins mit einem Phosphit in 5'-Position durchgeführt, um weitere Kupplungsmöglichkeiten für die später folgende NAADP-Synthese zur Verfügung zu haben. Hierfür wurde die 5'-ungeschützte Ribose **122** zunächst an der 5'-Position mit dem Reagenz Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) unter neutralen Bedingungen silyliert, um anschließend die Glycosylierung unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchführen zu können. Die TMS-Schutzgruppe der 5'-Position wird während der NP-säulenchromatographischen Reinigung und der vorherrschenden leicht sauren Bedingungen hydrolysiert. Im Vergleich zu der Glycosylierung mit dem Fm geschützten Monophosphats **124** konnte eine deutlich erhöhte Ausbeute von 82 % des 2',3'-di-Acetylnicotinsäurenucleosids **138** isoliert werden. Deshalb wird vermutet, dass das Fm-geschützte Monophosphat einen sterischen, sowie einen elektronischen negativen Einfluss auf die Glycosylierung bewirkt.

Die abschließende Einführung der Phosphor(III)-Funktion konnte mit Salicylchlorophosphit unter basischen Bedingungen und einer darauffolgenden Hydrolyse mit TEAB-Puffer realisiert werden. Dabei wurde eine moderate Ausbeute des Phosphits **139** von 45 % nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden (**Abb.85**). Auch hier konnte eine langsame Zersetzung des Produkts im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum durch eine teilweise Hochfeldverschiebung der Pyridiniumprotonen und des anomeren Protons beobachtet werden. Dies

verdeutlicht die Sensibilität der glycosidischen Bindung der Pyridiniumnucleoside und gibt Hinweise auf die möglichen Reaktionsbedingungen für die Kupplung zum NAADP.



**Abb.85:** Synthese zum Phosphor(III)-Nicotinsäuresynthesebausteins **139**.

### 6.8 Synthese von maskiertem Nicotinsäurenucleosid

Aufgrund von fehlenden biologischen Daten zur Freisetzung der Acetylschutzgruppen von den 2'- und 3'-Positionen und der fehlenden Kenntnis, ob die Acetylschutzgruppen vielleicht nicht doch die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung von NAADP beeinflussen können, entstand der Wunsch ein Nicotinsäurebaustein ohne verbliebene Schutzgruppen zu synthetisieren. Der Versuch, die Acetyl-Schutzgruppen chemoselektiv zu spalten und gleichzeitig die bioreversible Maskierung der Nicotinsäure beizubehalten, misslang. Daher sollte eine Syntheseroute entwickelt werden, bei der eine stereoselektive Synthese des β-Anomer ohne einen dirigierenden Nachbargruppeneffekt möglich ist. Da nur Schutzgruppen mit freiem Elektronenpaar, wie Acylgruppen einen Nachbargruppeneffekt ermöglichen, diese aber nicht orthogonal zur bioreversiblen Maskierung entfernt werden können, sollte eine andere Schutzgruppenklasse verwendet werden. Angesichts des fehlenden Nachbargruppeneffekts in der folgenden Syntheseroute müssen die Faktoren für eine Steuerung der Stereoselektivität bei der Glycosylierung genauer

betrachtet werden. Als entscheidend gelten die Wahl des Lösungsmittels, der Temperatur, des Promoters, die Beschaffenheit des Glycosyldonors (Zucker) und dessen Abgangsgruppe in 1'-Position, sowie des Glycosylakzeptor (Nucleobase).<sup>214</sup> Um eine geeignete Wahl dieser Faktoren treffen zu können, ist es notwendig den Glycosylierungsmechanismus ohne Nachbargruppeneffekt zu verstehen. Die Glycosylierungen können im Allgemeinen zum einen über einen  $S_N1$ - oder einen  $S_N2$ -Mechanismus verlaufen, wobei zunächst die Abgangsgruppe des Glycosyldonors abgespalten wird mittels Bildung eines Promoter-Donorkomplexes.<sup>215,216</sup> Dies resultiert in einem mesomeriestabilisierten Oxocarbeniumkation, welches  $sp^2$ -hybridisiert ist und hierdurch von beiden Seiten nucleophil von einem Glycosylakzeptor angegriffen werden kann.<sup>217</sup> Dabei ist die Stabilisierung des Oxocarbeniumkations entscheidend für die Glycosylierungsgeschwindigkeit und der nucleophile Angriff an dem anomeren Zentrum entscheidend für die Stereoselektivität. Obwohl  $\alpha$ -Anomere bevorzugt thermodynamisch gebildet werden über der kinetisch-kontrollierten Bildung von  $\beta$ -Anomere, ist die Bildung von  $\beta$ -Anomeren aufgrund des Anomereffekts dessen ungeachtet favorisiert.<sup>218</sup> Angesichts dieser Komplexität an Faktoren benötigt jede Glycosylierungsreaktion ihre spezifisch optimalen Bedingungen. Es können aber generelle Trends zur Beeinflussung der Stereoselektivität beobachtet werden.

Da von einer geringeren Reaktivität des Glycosylakzeptors ausgegangen wird, infolge der niedrigen Nucleophilie des Stickstoffs der Nicotinsäure, sollte auf eine ausreichende Reaktivität des Glycosyldonors geachtet werden. Hierfür bietet sich das Modell der „armed“- und „disarmed“-Glycosyldonoren von FRASER-REID an.<sup>219</sup> Hierbei wird beschrieben, dass zum einen elektronenziehende Schutzgruppen wie Ester in 2'-Position zu einer verringerten Reaktivität führen und zum anderen Ether zu einer Erhöhung der Reaktivität führen, aufgrund einer Stabilisierung des kationischen Oxocarbeniumintermediats.<sup>220</sup>

Angesichts dieser Erkenntnisse sollte ein Glycosyldonor gewählt werden, welcher Silylschutzgruppen in 2',3',5'-Position besitzt, da diese nicht nur einen „superarmed“-Effekt bewirken, sondern auch orthogonal nach erfolgter Glycosylierung gespalten werden können.<sup>221</sup> Zudem sollte in 1'-Position eine geeignete Abgangsgruppe installiert werden.<sup>220</sup> Erste Versuche unter Verwendung von 1'-Halo-Zuckern nach der KÖNIGS-KNORR-Methode führten zu keiner gewünschten Stereoselektivität bei gleichzeitig komplizierter Reaktionsführung, infolge der Instabilität der 1'-Halo-Zucker. Als favorisiert wurde die Verwendung der Trichloroacetimidat-

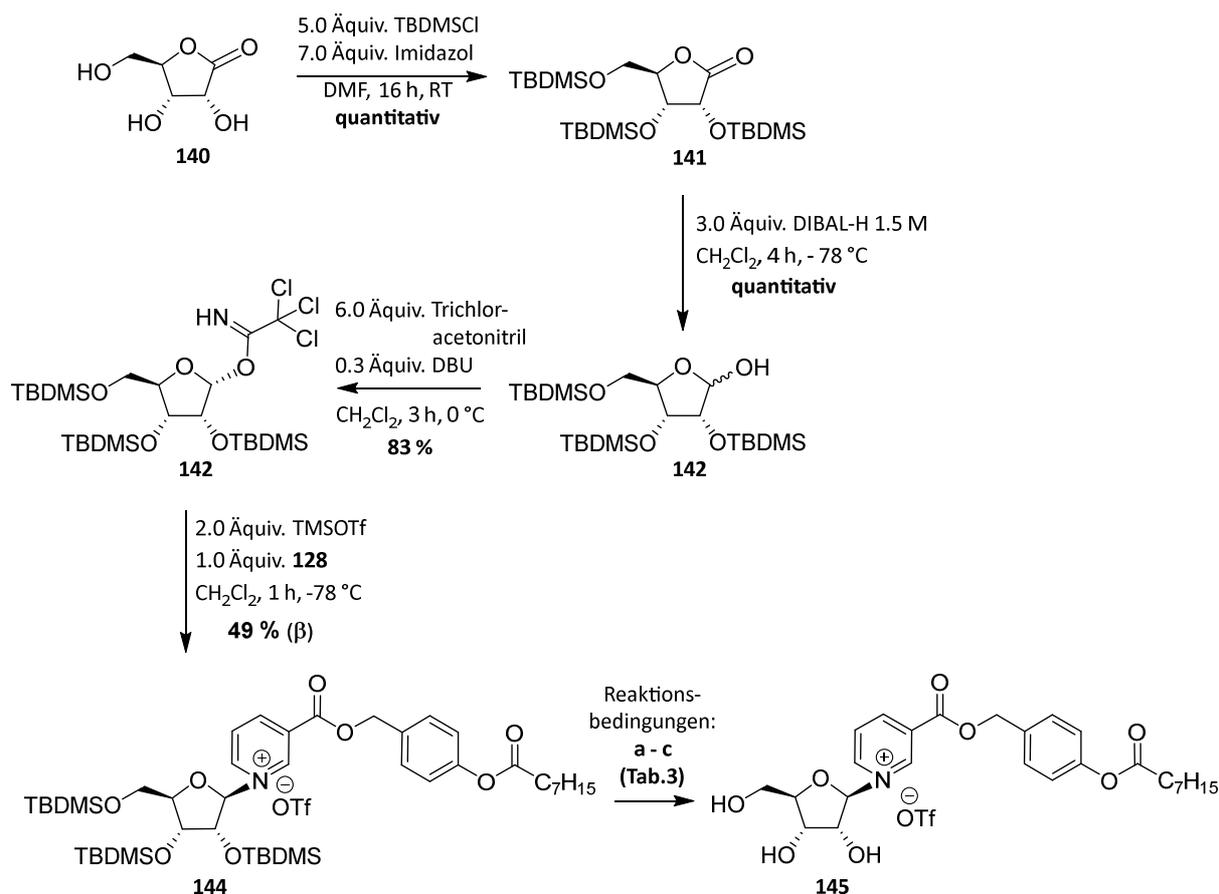
Abgangsgruppe angesehen, welche sich durch eine erleichterte Handhabung mittels erhöhter Stabilität auszeichnen und zugleich durch geeignete LEWISSÄURE unter milden Bedingungen katalytisch aktiviert werden können.<sup>222</sup> Daneben ist die Konfiguration am anomeren Zentrum des Trichloracetimidat-Donors für die Stereokontrolle entscheidend.<sup>223</sup>

Ausgehend vom D-Ribonsäure-1,4-lacton **140** wurde dieses sukzessiv nach LAMBRECHT *et al.* entsprechend geschützt und mit der Abgangsgruppe versehen.<sup>224</sup> Die vollständige Schützung des D-Ribonsäure-1,4-lactons **140** an den Positionen 2',3' und 5' mit der sterisch anspruchsvollen TBDMS-Schutzgruppe konnte unter der Verwendung von Imidazol und TBDMSCl in Pyridin realisiert werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte eine quantitative Ausbeute von dem TBDMS-geschützten Lacton **141** erhalten werden. Um die Trichloracetimidat-Abgangsgruppe in 1'-Position anbringen zu können, war zunächst eine Reduktion des TBDMS-geschützten Lactons **141** notwendig. Hierfür wurde bei -78 °C tropfenweise DIBAL-H-Lösung in Toluol (1.5 M) zum Lacton **141** zugegeben. Das Arbeiten bei tiefen Temperaturen verhindert hierbei eine Überreduktion unter Ringöffnung. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch die Zugabe von Methanol beendet und mit einer Kaliumnatriumtartrat-Lösung aufgearbeitet, wodurch die entstandenen Aluminiumsalze gebunden werden konnten und eine Emulsionsbildung unterdrückt wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte wiederum die TBDMS-geschützte Ribose **142** in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

Die stereoselektive Kontrolle der Synthese von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Trichloracetimidat-Donoren kann über die Wahl der Base gesteuert werden.  $\beta$ -Trichloracetimide können unter Einsatz von Basen wie  $K_2CO_3$  mittels kinetischer Kontrolle synthetisiert werden, wobei  $\alpha$ -Trichloracetimide unter Einsatz von Basen wie NaH, KOH oder DBU mittels thermodynamischer Kontrolle erhalten werden können.<sup>225</sup> Hierbei unterlaufen die elektronendefizienten Nitrile eine basenkatalysierte nucleophile Addition der freien Alkoholfunktion des Zuckers. In diesem Fall sollte der  $\alpha$ -Trichloracetimidat-Donor synthetisiert werden, weshalb die organische starke Base DBU als Katalysator eingesetzt wurde. Als elektronenarmes Nitril diente das Trichloracetonitril, welches zunächst mit dem geschützten Zucker **142** vorgelegt wurde. Nach der tropfenweisen Zugabe von DBU bei 0 °C färbte sich die Reaktionslösung über gelb zu schwarz. Nach dünn-schichtchromatographischer Kontrolle wurde nach 3 h ein vollständiger Umsatz beobachtet

und die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels beendet. Das Rohprodukt wurde für die säulenchromatographische Reinigung mit Chromabond im Vakuum getrocknet und unter Zusatz von Triethylamin zum Eluenten gereinigt. Es konnte eine Ausbeute von 83 % des Trichloracetimidates **143** erhalten werden.

Um eine gute Kontrolle über die Stereoselektivität zu erlangen, ist nicht nur der Einsatz von geeigneten Glycosyldonoren essentiell, sondern gleichermaßen die Wahl des Lösungsmittels und des Katalysators. In diesem Fall wurde zunächst das nicht-polare Lösungsmittel Dichlormethan und der stark-saure Katalysator TMSOTf gewählt. Die Reaktion wurde zudem bei tiefen Temperaturen durchgeführt, um eine kinetische Kontrolle favorisiert zum  $\beta$ -Nucleosid unter  $S_N2$ -Reaktionsmechanismus zu gewährleisten. Der nucleophile Angriff der geschützten Nicotinsäure **128** von der  $\beta$ -Seite wird dabei vermutlich durch die sterische Hinderung der  $\alpha$ -Seite durch die TBDMS-Schutzgruppe noch weiter begünstigt. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem  $CH_2Cl_2/MeOH$ -Gradienten konnte das anomenreine  $\beta$ -Nucleosid **144** in 49 %iger Ausbeute erhalten werden (**Abb.86**). Hierbei erfolgte die Identifizierung der Bildung des  $\beta$ -Anomers über die Kopplungskonstante im  $^1H$ -NMR-Spektrum und über das NOESY-Korrelationsspektrum. Der folgende Syntheseschritt sollte eine fluoridvermittelte Entfernung der Silyl-Schutzgruppen in 2',3',5'-Position darstellen. Die verschiedenen Reaktionsbedingungen für die Entschützung sind in **Tab. 3** aufgeführt.



**Abb.86:** Synthese zum maskierten Nicotinsäurenucleosids **145**.

Die Verwendung der Standardbedingungen mit TREAT-HF als Fluoridquelle führte zu einer sehr langen Reaktionszeit und infolgedessen zu einer schlechten Ausbeute von 35 % des desilylierten Nucleosids **145**. Infolge der leicht sauren Reaktionsbedingungen bei dem Einsatz dieses Reagenzes und der damit erhöhten Labilität der Glycosylbindung sollte deshalb die Fluorid-Quelle gewechselt werden. Der Einsatz zum Pyridin·HF mit einem höheren Fluoridanteil pro Volumen und einer Pufferung mit Pyridin resultierte in einer vollständigen Zersetzung des Edukts, wobei die Identifizierung aufgrund der Vielzahl der entstandenen Nebenprodukte nicht erfolgen konnte. Auch der Einsatz von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) führte zu einer vollständigen Zersetzung, wobei es hier aufgrund der basischen Bedingungen des Reagenzes zu einer Spaltung der Esterfunktion der bioreversiblen Maskierung gekommen ist (**Tab.3**).

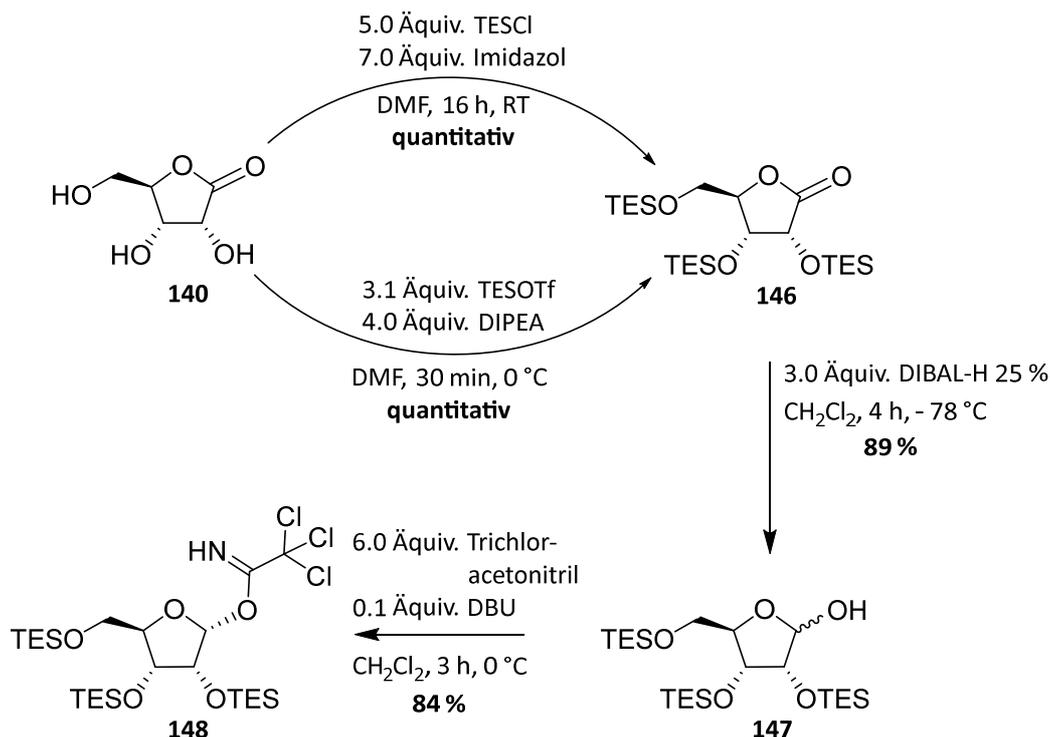
**Tab.3:** Übersicht der Synthesebedingungen für die TBDMS-Spaltung.

<i>Variante</i>	<i>Bedingungen</i>	<i>Resultate</i>
<b>a</b>	12.0 Äquiv. TREAT-HF, THF, 72 h, RT	35 %
<b>b</b>	1 mL pro 100 mg Pyridine·HF, THF:Pyridin 10:1, 16 h, RT	Zersetzung
<b>c</b>	12.0 Äquiv. TBAF, THF, 2 h, 0 °C	Zersetzung

Anlässlich der nicht zufriedenstellenden Ausbeute bei der Entschützung der TBDMS-Schutzgruppe konnte nur ein Wechsel der Schutzgruppen zu einer Verbesserung dieses Reaktionsschritts führen, da die alternative saure Spaltungsmöglichkeit der Silylschutzgruppe an dieser Stelle, infolge der hohen Labilität der Glycosylbindung gegenüber sauren Bedingungen, nicht realisierbar war.

Aus diesem Grund sollten die TBDMS-Schutzgruppen gegen Triethylsilyl-Schutzgruppen gewechselt werden (TES), welche eine um die etwa 200-fache höhere Labilität gegen Fluoridionen aufweisen.<sup>226</sup>

Die Schützung der 2',3',5'-Position mit TES-Schutzgruppen konnte sowohl unter den bekannten Bedingungen mittels Imidazol-vermittelter Silylierung mit TESCl in Pyridin realisiert werden, als auch die Schützung unter Einsatz von TESOTf bei basischen Bedingungen, wobei hier die Reaktionszeit signifikant von 16 h auf 30 Minuten verkürzt werden konnte. Bei beiden Reaktionsbedingungen konnten quantitative Ausbeuten nach säulenchromatographischer Reinigung des TES-geschützten Lactons **146** isoliert werden. Die folgende Reduktion des Lactons und die Einführung des Trichloracetimidates konnte wie schon zuvor bei dem TBDMS-Derivat **141** in sehr guten Ausbeuten realisiert werden. Hierbei konnte eine Ausbeutes des 1'-OH Zuckers **147** in 89 % und das Trichloracetimidat **148** in 84 % erhalten werden (**Abb.87**). In diesem Fall wurde die katalytische Menge an DBU verringert, um eine frühzeitige basische Spaltung der TES-Schutzgruppen zu verhindern.

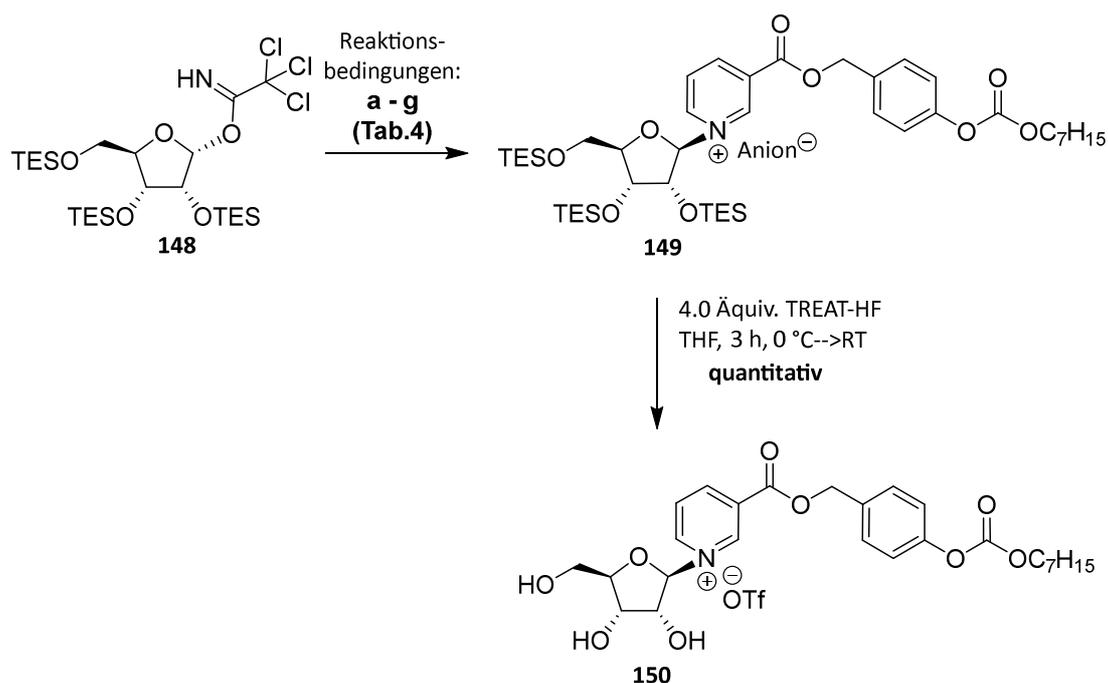


**Abb.87:** Synthese des TES-geschützten Trichloroacetimidat-Donors **148**.

Die Glycosylierung wurde zunächst wie bei dem TBDMS-geschützten-Donor **143** mit TMSOTf in Dichlormethan bei tiefen Temperaturen durchgeführt, da dies nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen verwendet (**Tab.4**). Unter Verwendung des stark sauren TMSOTf konnte nach der Reinigung lediglich eine geringe Ausbeute von 20 % isoliert werden, mit einem Anomerenverhältnis von  $\alpha:\beta/1:19$ . Bei der Glycosylierung konnte eine Spaltung der TES-Schutzgruppe durch das stark-saure TMSOTf beobachtet werden. Zudem wird davon ausgegangen, dass die sterisch weniger anspruchsvollen TES-Schutzgruppen einen Angriff von der  $\alpha$ -Seite ermöglichen. Aus diesen Gründen sollte eine mildere LEWISSäure gewählt werden, welche eine Spaltung der TES-Schutzgruppen nicht initiiert und einen S<sub>N</sub>2-Mechanismus begünstigt. Als milde Alternative zur Aktivierung der Trichloroacetimidatgruppe wurde daraufhin Silbertriflat verwendet.<sup>227</sup> Dies führte, ebenso wie der Einsatz von Kupfertriflat zu keinem oder lediglich zu einem sehr geringem Umsatz von unter <5 % bei beiden LEWISSäuren.<sup>228</sup> Daraufhin sollte gemäß GENG *et al.* die Aktivierung mittels Bis-(*para*-Nitrophenyl)phosphorsäure und einer Protonenübertragung erfolgen. Dieser Promoter weist einen leicht niedrigeren pK<sub>S</sub>-Wert zu dem Silbertriflat und Kupfertriflat auf und sollte damit zu einer Beschleunigung der Reaktion führen.<sup>229</sup> Die Umsatzrate konnte unter Verwendung dieses

Promoters zwar signifikant gesteigert werden, führte aber andererseits zu einem Anomerenverhältnis von  $\alpha:\beta/1:1$ , sowie einer Anlagerung des Bis-(*para*-Nitrophenyl)phosphorsäure-Anions als Gegenion, wodurch eine Reinigung erheblich erschwert wurde. Aufgrund dessen wurde die Glycosylierung mit TMSOTf in katalytischer Menge zur Aktivierung eingesetzt und mit Imidazoliumtriflat kombiniert, um als eine ionische Flüssigkeit zu fungieren, welche meist gute Löslichkeitseigenschaften besitzt bei hohen Umsatzraten, insbesondere bei der Glycosylierung.<sup>230</sup> Als Lösungsmittel wurde Acetonitril eingesetzt, da sich hierdurch eine erhöhte  $\beta$ -Selektivität durch den zusätzlichen Nitrileffekt erwartet wurde.<sup>231</sup> Es konnte lediglich 28 % des  $\beta$ -Anomers isoliert werden, da es auch hier trotz Verringerung der TMSOTf-Menge zu einer teilweisen Spaltung von TES-Schutzgruppen kam. Trotzdem scheint das Triflat eine wichtige Rolle für die Stereoselektivität einzunehmen. Es wird vermutet, dass das Triflat während der Glycosylierung an das kationische 1'-Kohlenstoffatom koordiniert und auf diese Weise ein Angriff von der  $\alpha$ -Seite blockiert. In Folge dessen wurde ausschließlich Imidazoliumtriflat als Promoter in Acetonitril angewandt, wobei die Ausbeute auf 49 % gesteigert werden konnte mit einem Anomerenverhältnis von  $\alpha:\beta/1:19$ . Das Imidazol scheint eine Art Relaisfunktion für die Protonenübertragung der Trifluormethansulfonsäure zu dem Trichloroacetimidat-Donor zu übernehmen, wie sie auch in aktiven Zentrum von vielen Enzymen durch Histidin übernommen wird.<sup>232</sup> Ein Wechsel des Lösungsmittels von Acetonitril zum nicht polaren Dichlormethan zeigte eine deutliche Steigerung der Ausbeute und zusätzlich zu einer erhöhten Umsatzrate bei  $\beta$ -Anomerenreinheit. Insbesondere die Reaktionsrate konnte durch den Einsatz von Ultraschallwellen mittels Intensivierung von Massenübertragungsprozessen und akustischer Kavitation beschleunigt werden.<sup>233</sup> Hierbei konnte eine Ausbeute von 87 % des TES-geschützte Nucleosids **149** als  $\beta$ -Anomer erhalten werden.

Die abschließende Spaltung der TES-Schutzgruppen konnte mit Hilfe von lediglich 4.0 Äquiv. TREAT-HF in THF bei 0 °C innerhalb von 3 h realisiert werden. Hierbei wurde eine quantitative Ausbeute des entschützten Nucleosids **150** erhalten, wobei die RP-18-säulenchromatographische Reinigung, zum Erhalt von einem Produkt mit einheitlichem Gegenion, mit einem Acetonitril/Imidazoliumtriflat-Lsg.(0.01 M)-Gradienten durchgeführt wurde (**Abb.88**).



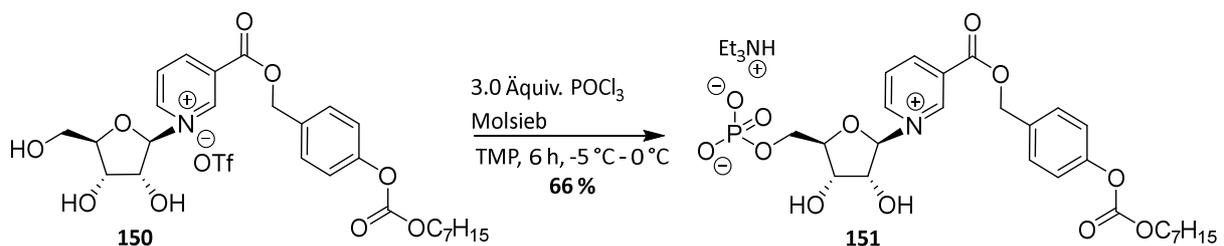
**Abb.88:** Synthese des bioreversibel maskiertem Nicotinsäurenucleosids **150**.

**Tab.4:** Übersicht der Reaktionsbedingungen für die Glycosylierung.

<i>Variante</i>	<i>Bedingungen</i>	<i>Resultate</i>
<b>a</b>	1.0 Äquiv. TMSOTf, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -78 °C, 2 h	20 % α:β/1:19
<b>b</b>	2.0 Äquiv. AgOTf, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , RT, 72 h	<5 %
<b>c</b>	2.0 Äquiv. Cu(OTf) <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , RT, 36 h	<5 %
<b>d</b>	1.0 Äquiv. <i>p</i> -Nitrophenylphosphorsäure, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , RT, 66 h	50 % α:β/1:1
<b>e</b>	0.5 Äquiv. TMSOTf, 2.0 Äquiv. Imidazolium-Tri- flat, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, RT, 2 h	28 %
<b>f</b>	3.0 Äquiv. Imidazolium-Triflat, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, RT, 16 h	49 % α:β/1:19
<b>g</b>	2.0 Äquiv. Imidazolium-Triflat, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , RT, Ultra- schall, 1 h	87 %, β

Die abschließende Phosphorylierung sollte mit der Methode nach YOSHIKAWA *et al.* für eine regioselektive Phosphorylierung durchgeführt werden.<sup>198</sup> Es ist hierbei präzise auf eine

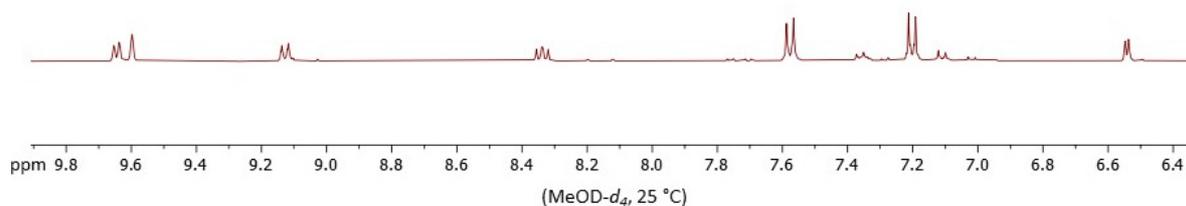
wasserfreie Umgebung zu achten, da schon geringe Mengen an Wasser eine säurekatalysierte partielle Hydrolyse, insbesondere der Nicotinsäurenucleoside, bewirkt. Das Nucleosid **150** wurde zunächst in trockenem Trimethylphosphat (TMP) gelöst und 1.1 Äquiv. POCl<sub>3</sub> tropfenweise zu der Reaktionslösung zugegeben. Hierbei konnte nach 8 h mittels HPLC-Reaktionsverfolgung noch kein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Deshalb wurde zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit die Zugabe von den Basen Proton-Sponge<sup>®</sup>, sowie von Tributylamin überprüft, wobei in beiden Fällen eine Zersetzung des Edukts **150** festgestellt werden konnte. Angesichts des trägen Reaktionsumsatzes und der Labilität wurde die Menge des zugesetzten POCl<sub>3</sub> auf 3.0 Äquiv. erhöht und sowohl zur zusätzlichen Trocknung gemörsertes aktiviertes Molsieb zu dem TMP zugegeben, als auch aufgrund der Funktionalität als Protonenfänger für die Unterdrückung von säureinduzierten Zersetzungsreaktionen. Nach vollständiger Reaktion wurde zur Vermeidung von sauren Bedingungen ein TEAB-Puffer 1 M zugegeben. Mit Hilfe dieser Parameter konnte eine Ausbeute von 66 % des Nicotinsäurenucleotids **151** innerhalb von 6 h Reaktionszeit erhalten werden (**Abb.89**).



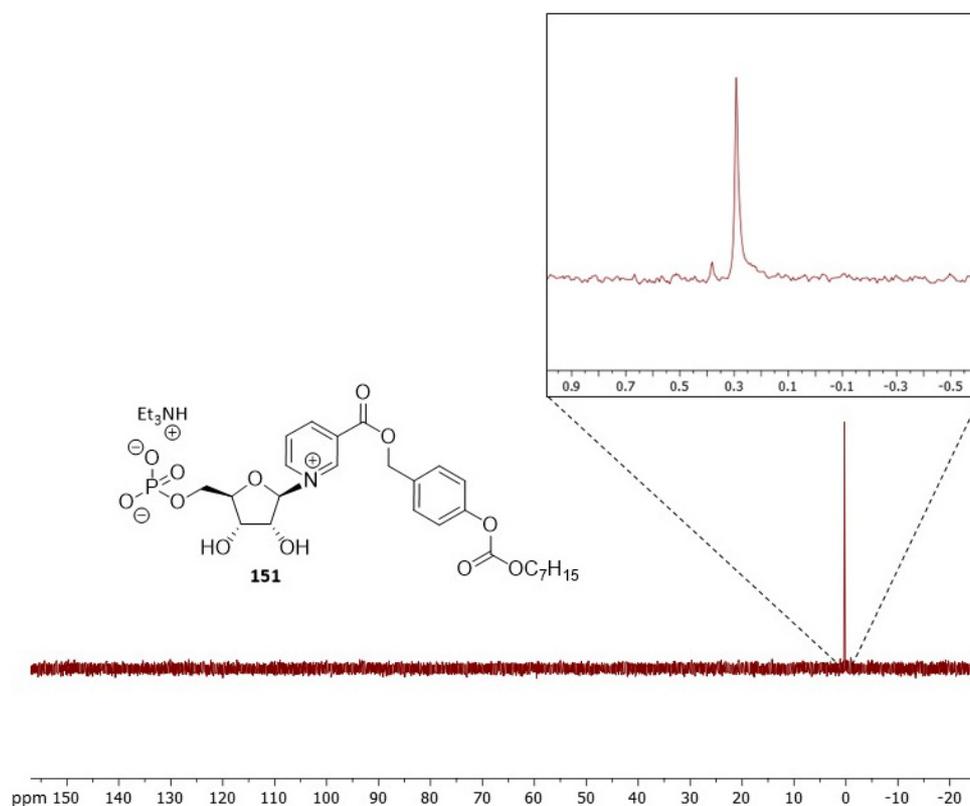
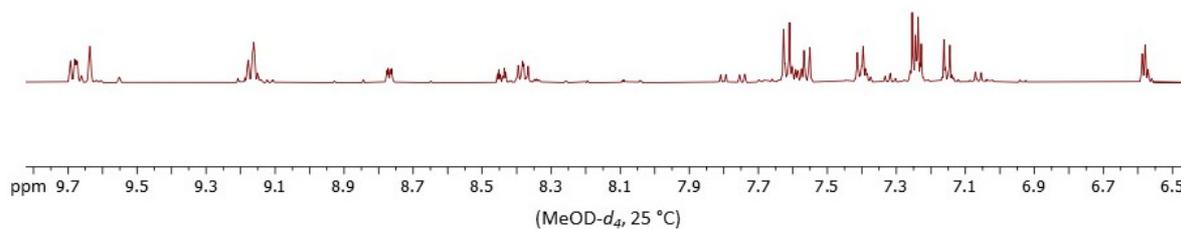
**Abb.89:** Synthese des Nicotinsäurenucleotids **151**.

Auch bei diesem Nicotinsäurenucleotid **151** konnte eine langsame Zersetzung im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum durch die Änderung der chemischen Verschiebung der Pyridinprotonen und des anomeren Protons beobachtet werden. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum wurde in einem Zeitunterschied von 3 h aufgenommen, gezeigt sind die Signale der Nicotinsäureprotonen, sowie die aromatischen Protonen der bioreversiblen Schutzgruppe und das anomere Proton (**Abb.90**, oben). Das äquivalente <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum bei 0 h in Lösung des Nicotinsäurenucleotids **151** zeigt ein sauberes Monophosphat (**Abb.90**, unten).

0 h



3 h



**Abb.90:** Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zum Zerfall des Nicotinsäurenucleotids **151** (oben) und das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des 2',3'-ungeschützten Nicotinsäurenucleotids **151** (unten).

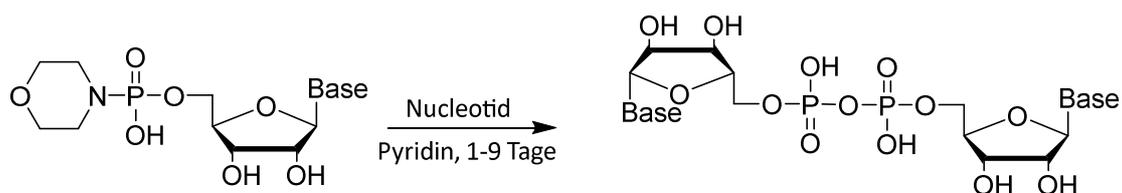
### 6.9 Fazit zur Synthese des Nicotinsäurebausteins

Rückblickend war die Entwicklung von Syntheserouten zum bioreversibel geschützten Nicotinsäurebaustein als Monophosphat oder *H*-Phosponat mit Acetylschutzgruppen **136/137** und **139**, bzw. zum 2',3'-ungeschützten Monophosphat **181** erfolgreich. Vorteilhaft war bei

der Synthese der Acetyl geschützten Nicotinsäurebausteine, die einfache Reaktionsführung, auch in Hinblick auf die hohe Stereoselektivität mittels Nachbargruppeneffekt, wobei über den optimalen Syntheseweg zum Monophosphat über 6 Stufen eine Gesamtausbeute von 7 % erzielt werden konnte und zum *H*-Phosphonat über 5 Stufen eine Gesamtausbeute von 25 % erreicht wurde. Bei der Synthese des Monophosphats **136/137** ist die problematische Glycosylierung, welche vermutlich durch das Fm geschützte Phosphat gestört wird, für die nicht zufriedenstellende Ausbeute maßgebend. Ähnlich war bei der Synthese des 2',3'-ungeschützten Nicotinsäurebausteins **151** die Glycosylierung zum gewünschten  $\beta$ -Anomer besonders herausfordernd, sowie die regioselektive Phosphorylierung zum Monophosphat, wobei trotzdem eine gute Gesamtausbeute von 43 % über 6 Stufen nach Optimierungen erreicht werden konnte. Insbesondere die niedrige Stabilität der *N*-glykosidischen Bindung führte aber zu nicht gänzlich zufriedenstellenden Ausbeuten bei empfindlichen Reaktionsschritten bzw. einer allmählichen Zersetzung in Lösungen und schränkt den Einsatz der Verbindungen für weiterführende Reaktionen und ferner biologische Untersuchungen stark ein.

### 6.10 Kupplung zum NAADP

Erste Arbeiten zu der Bildung von dimerisierten Monophosphaten ( $\text{Np}_2\text{N}$ ) machten TODD *et al.* mit der Synthese von symmetrischen Diphosphaten durch Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid.<sup>234</sup> Als weiterführender Schritt wurde von KHORANA *et al.* DCC als Kupplungsreagenz verwendet, wodurch zunächst deutlich gesteigerte Ausbeuten zur Synthese von symmetrischen  $\text{Np}_2\text{N}$ 's möglich waren.<sup>235,236</sup> Erst die Zugabe von Morpholin als Base zur Bildung von 5'-Phosphormorpholidat unter Verwendung von DCC und anschließender Reaktion mit Alkylammonium-Monophosphaten ermöglichte nach MOFFATT und KHORANA die Synthese von asymmetrischen  $\text{Np}_2\text{N}$ 's in Ausbeuten zwischen 15 % - 90 %.<sup>237,238</sup> Bei dieser Synthesevariante ist der Ausschluss von Feuchtigkeit zwingend erforderlich, damit eine vorzeitige Hydrolyse des Phosphormorpholidats verhindert wird. Zudem sind die sehr langen Reaktionszeiten nachteilig, welche zudem zu hydrolytischer Zersetzung führten (**Abb.91**).

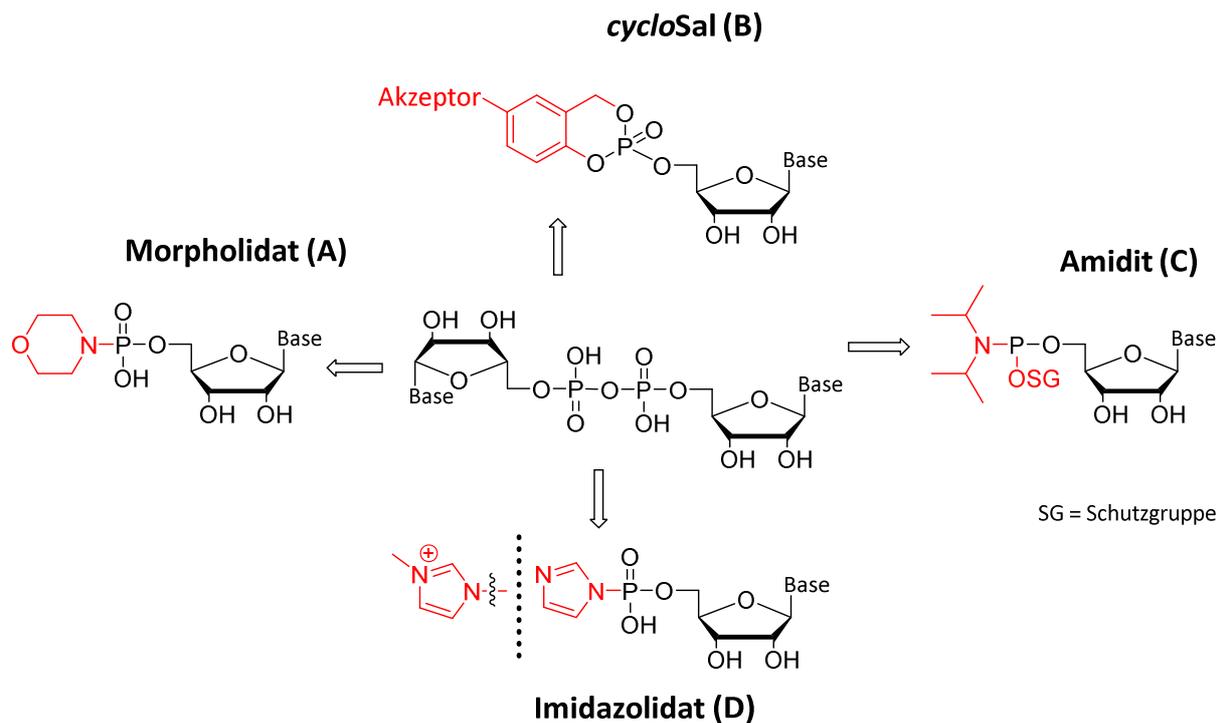


**Abb.91:** Np<sub>2</sub>N-Synthese nach der Methode von MOFFATT und KHORANA mittels Phosphormorpholidat.

Die meisten heutzutage verwendeten Methoden für die Synthese von asymmetrischen und symmetrischen Np<sub>2</sub>N's nutzt die Erstaktivierung eines Nucleotids durch Addition einer aktivierenden Gruppe an das terminale Phosphat. Dieses aktivierte Nucleotid reagiert als Elektrophil oder Donor für die nachfolgende Reaktion mit einem zweiten Nucleotid, welches als Nucleophil oder Akzeptor agiert. Wie schon in Kapitel 6.1 beschrieben ist die Bildung der Pyrophosphatbindung durch die Reaktion von zwei Phosphorspezies, entweder P(III) oder P(V), synthetisch am ehesten zugänglich. Im Fall der Verwendung von P(III)-Reagenzien werden diese meist z.B. durch Tetrazole oder Imidazole in ein hochreaktives Intermediat überführt und abschließend nach erfolgter Bildung der Pyrophosphatbindung oxidiert.

Aufbauend auf der Methode von MOFFATT und KHORANA folgten weitere an verschiedene Anforderungen angepasste Reaktionsvarianten. Als effizient und universell haben sich die in **Abb.92** dargestellten Methoden durchgesetzt. Zum einen wurde bei der Morpholidat-Methode zunächst versucht von WITTMANN und WONG mit dem Einsatz von 1*H*-Tetrazol, als Aktivator, die Reaktionszeiten signifikant zusenken.<sup>239</sup> Später folgte bei der Variante von KAHNE *et al.* der Einsatz von *N*-Methylimidazoliumchlorid als Katalysator, wodurch die Reproduzierbarkeit verbessert werden konnte (Methode **A**).<sup>240</sup>

Als Methode zur Bildung von Pyrophosphaten ohne Zugabe von Additiven und mit relativ kurzer Reaktionszeit hat sich die Verwendung der *cycloSal*-Methode von WARNECKE und MEIER bewiesen (Methode **B**).<sup>160,241</sup> Hierbei kann die Reaktivität über elektronenziehende Substituenten in 5'-Position des aromatischen Rings beeinflusst werden. Die Bildung der Pyrophosphatbindung wird durch einen nucleophilen Angriff eines Nucleotids auf das Phosphoratom des Triesters initiiert, was einen Bruch der phenylischen Phosphatesterbindung zur Folge hat. Der Bindungsbruch der benzylichen C-O-Bindung des mesomeriestabilisierten (2-Hydroxybenzyl)phosphatdiesters erfolgt spontan unter Freisetzung von Chinonmethid, welches durch die Hydrolyse mit Wasser zum Salicylalkohol weiterreagiert.<sup>242</sup>



**Abb.92:** Bedeutende Methoden für die  $Np_2N$ -Synthese.

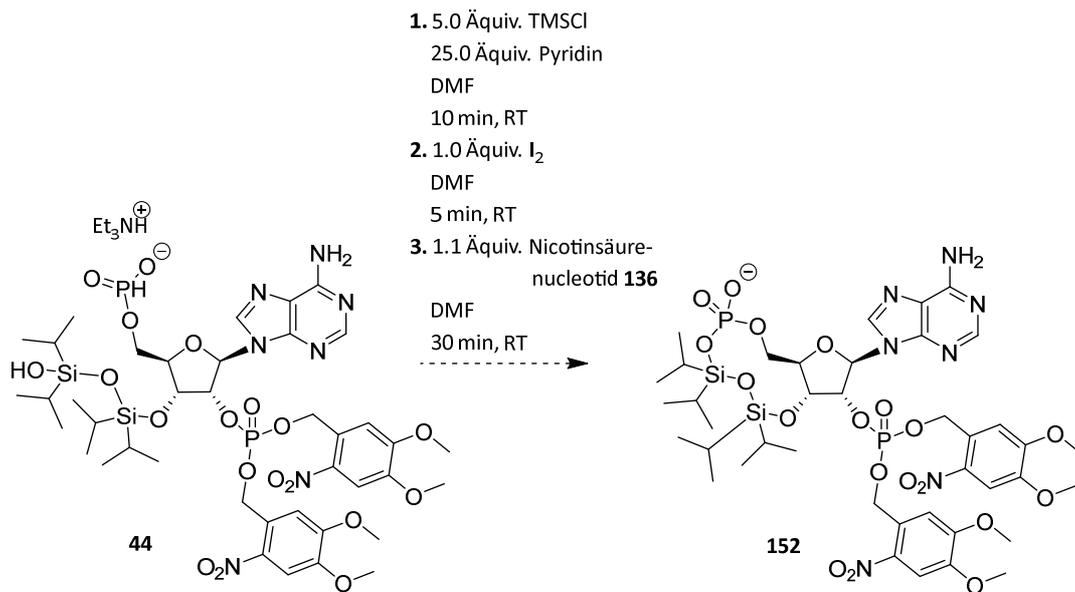
Die Methode von VAN DER MAREL *et al.* nutzt eine P(III)-Spezie zur Synthese der Pyrophosphatbindung (Methode C).<sup>243,244</sup> Bei dieser Synthesevariante werden 5'-Phosphoramidite mittels sauer-vermittelter Aktivierung mit Nucleotiden gekuppelt und abschließend *in situ* zum P(V) oxidiert. Besonders die kurzen Reaktionszeiten zeichnet diese Methode aus, wobei die Anwendung auf oxidationsunempfindliche Nucleotide beschränkt ist. Eine alternative Abwandlung dieser Methode, welche von HERGENROTHER *et al.* entwickelt wurde, bildet der Einsatz von einer abweichenden P(III)-Spezie, den *H*-Phosponaten, welche zur Aktivierung mit *N*-Chlor-succinimid (NCS) oxidativ chloriert werden und anschließend eine Kupplung mit einem Nucleotid ermöglichen.<sup>224</sup>

Zuerst synthetisiert von CRAMER *et al.* und später von MUKAIYAMA und HASHIMOTO bilden 5'-Phosphorimidazolidate die am meist genutzten Donoren für die Bildung von Pyrophosphatbindungen (Methode D).<sup>245</sup> Dabei stehen eine Vielzahl an verschiedenen Imidazolidat-Synthesemöglichkeiten zur Verfügung, z.B. die Synthese mit Hilfe von *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) oder via Reaktion von Imidazol, Triphenylphosphin und 2,2'-Dipyridyldisulfid.<sup>246,247</sup> Insbesondere die einfache Synthese der Imidazolidate unter milden Bedingungen zeichnet diese Methode aus, wobei die mit den Morpholidaten vergleichend schleppend verlaufende Pyrophosphatbildung mit dem Zusatz von Aktivatoren beschleunigt werden können, wie z.B. die Zugabe von

divalenten Metallionen.<sup>224,248,249</sup> Angelehnt an diese Methode gilt die Synthese von BOGACHEV *et al.* als eine Weiterentwicklung der Imidazolidat-Methode mit entscheidenden Vorteilen, wie einer sehr kurzen Reaktionsdauer, hohen, reproduzierbaren Ausbeuten und keine Erfordernis von Schutzgruppen an dem aktivierten Nucleotiddonor für die Kupplung. Zur Aktivierung wird der Donor zunächst mit Trifluoressigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol zum hochreaktiven 5'-Phosphor-*N*-methylimidazolium aktiviert, woraufhin eine Reaktion mit einem Nucleotid folgt.<sup>250,251</sup>

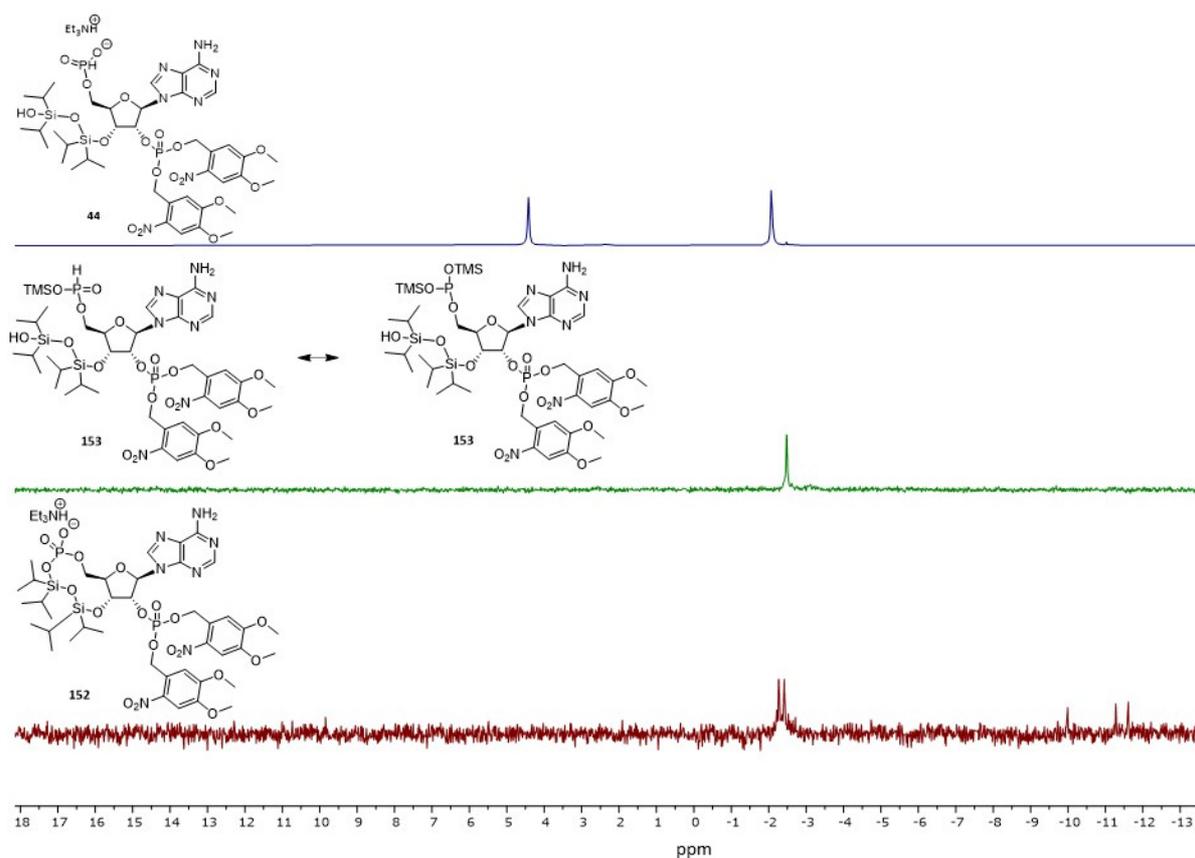
Als Beispiel für die chemoenzymatische NAADP-Totalsynthese ist ausschließlich die Publikation von DOWDEN aufzuführen, wobei auch hier die Pyrophosphatsynthese über das Nicotinamidimidazolidat erfolgt, mit anschließenden enzymatischem Basenaustausch durch Nicotinsäure.<sup>167</sup> Somit ist bislang keine Publikation zur chemischen Kupplung von Nicotinsäuremonophosphat und Adenosinmonophosphat zum NAADP bekannt. Aus diesem Grund wurde sich auf die Syntheseinformationen von NAD orientiert, da hierzu eine Vielzahl von Publikationen für die Synthese zugänglich sind und vergleichbare chemische Eigenschaften vermutet wurden. Als limitierender Faktor für die Pyrophosphatsynthese wurde die Labilität des Nicotinsäurenucleotids gesehen, die sich schon in der Synthese der 5'-Monophosphat in Kapitel **6.7** und **6.8** als problematisch herausgestellt hat.

Deshalb sollte aufgrund der bekannten Sensibilität der *N*-glycosidischen Bindung der Nicotinsäure zunächst versucht werden, den Adenosinbaustein zu aktivieren und anschließend ein Nicotinsäuremonophosphat zuzugeben. Nach der Synthesevorschrift von SUN *et al.* wird mit TMSCl und Pyridin unter oxidativen Bedingungen ein *H*-Phosphonat in ein hochreaktives zwitterionisches Amidatintermediat überführt, wodurch die Synthese von asymmetrischen und symmetrischen Diphosphaten mit kurzen Reaktionszeiten und guten Ausbeuten von bis zu 53 % ermöglicht wurden.<sup>252</sup> Zu Testzwecken wurde das symmetrisch mit *o*-Nitrobenzylgruppen geschützte Adenosin-*H*-phosphonat **44** verwendet. Dieses wurde mit entsprechend aktiviert und mit dem Nicotinsäurenucleotid **136** umgesetzt. In der HPLC-Reaktionsverfolgung konnte die Entstehung eines neuen Signals neben den beiden eingesetzten Edukten beobachtet werden, zudem nahm der Anteil des zugegebenen Nicotinsäurenucleotids **136** sukzessiv ab, wodurch zunächst ein Reaktionsumsatz suggeriert wurde. Nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung konnte ein Hauptprodukt isoliert werden (**Abb.93**).



**Abb.93:** Versuch der Synthese zum NAADP über Aktivierung des Adenosinbausteins **44**.

Im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum war zwar die Bildung eines neuen Signals neben dem Signal für 2'-Phosphatgruppe bei einer chemischen Verschiebung von ungefähr -10 ppm zu beobachten. Hierdurch kann die Annahme der Pyrophosphatbildung getroffen werden, welche üblicherweise in einem ähnlichen Bereich liegt, wobei nach Untersuchung im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum keine Signale dem gewünschten Produkt zugeordnet werden konnten und auch die Kopplungsmuster im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum waren nicht kompatibel. Erst die Auswertung über das Massenspektrum brachte die eindeutige Erkenntnis, dass es sich bei dem Hauptprodukt der Reaktion um das *cyclo*-Produkt **152** handelt, welches durch den intramolekularen Ringschluss durch einen nucleophilen Angriff des Silanolalkohols auf das aktivierte Phosphat entstanden ist. Die zuvor erwähnte Abnahme des Nicotinsäurenucleotids **136** bei der Reaktion ist auf eine langsame Zersetzung zurückzuführen, da nach Beendigung der Reaktion und der anschließenden Reinigung kein Nicotinsäureedukt **136** reisoliert werden konnte. Die Reaktionsverfolgung durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie zeigt eine schnelle und vollständige intramolekulare Ringschlussreaktion (**Abb.94**). Es ist das Spektrum der Ausgangsverbindung **44** in dem oberen Spektrum dargestellt. In dem mittleren Spektrum ist das silylierte Produkt **153** nach Zugabe von TMSCl in Pyridin gezeigt und in dem unteren Spektrum ist das entstandene *cyclo*-Produkt **152** dargestellt, welches über die oxidative Bildung des reaktiven Amidates zum intramolekularen Ringschluss geführt hat.

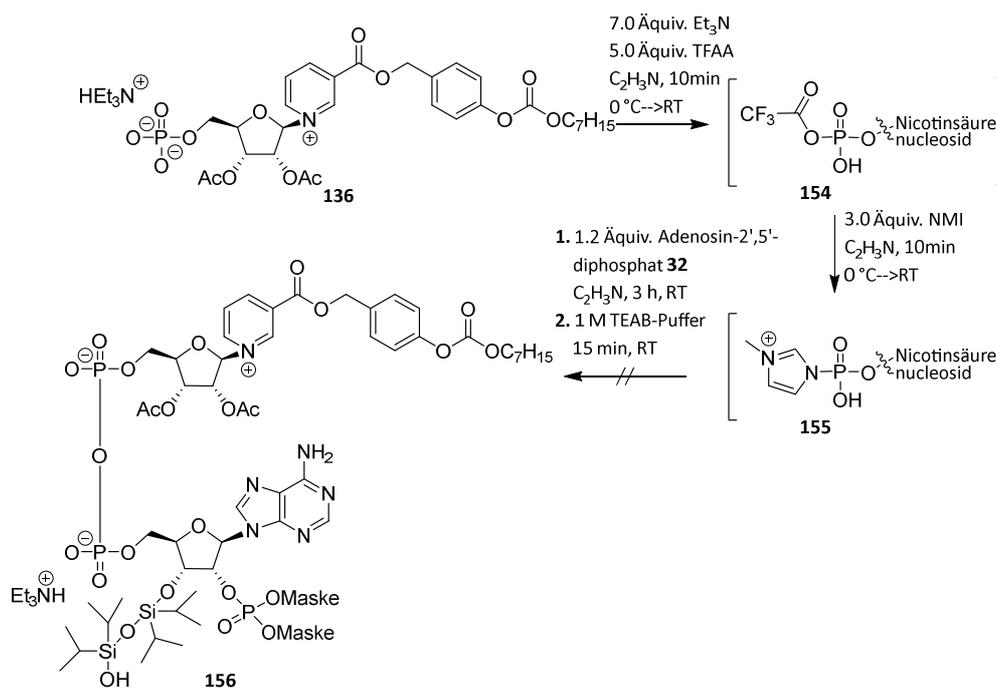


**Abb.94:** Reaktionsverfolgung mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum. Dargestellt ist das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Edukts **44** (oben), des silylierten Intermediats **153** (mitte) und des entstandenen *cyclo*-Produkts **152** (unten).

Demzufolge konnte eine Aktivierung des Adenosinbausteins **44** als nicht zielführend klassifiziert werden, da ein unbeabsichtigter Ringschluss auch bei den Adenosinmonophosphaten zu befürchten war. Eine alternative Schützung der Silanolgruppe scheint nicht zielführend zu sein, da keine chemoselektive Reaktion mit dem Silanolalkohol bekannt ist. Es wurde zudem in vorigen Arbeiten bei der NAD-Synthese von einer herabgesetzten Nucleophilie und damit erniedrigten Reaktivität, des zwitterionischen Nicotinamidnucleotids, aufgrund der positiven Ladung des Pyridiniums, berichtet.<sup>205</sup> Angesichts der strukturellen Ähnlichkeit des Nicotinamids zur Nicotinsäure bleibt eine vergleichbare träge Reaktivität zu vermuten. Infolgedessen sollte im Folgenden die Synthesereihenfolge invers durchgeführt werden und zunächst die Aktivierung am Nicotinsäurebaustein erfolgen und anschließend ein Adenosinmonophosphat als Akzeptor in der Reaktion dienen. Es bleibt dabei abzuwarten, ob die Stabilität der *N*-glycosidischen Bindung des Nicotinsäurebausteins ausreichend ist.

Als aussichtsreichste Reaktionsvariante sollte die Methode nach BOGACHEV *et al.* verwendet werden, welche von MOHAMADY *et al.* auf die Synthese von Triphosphaten adaptiert wurde und bereits sehr gute Erfahrungen in der Arbeitsgruppe von MEIER zur Synthese von TriPPP-Pro-Verbindungen gezeigt hat.<sup>120,157,253</sup>

Für die erfolgreiche Aktivierung des Nicotinsäuredonors **136** wurde die übliche Reihenfolge der Zugabe von den Reagenzien leicht verändert, um die Integrität des Nicotinsäurebausteins nicht zu beeinträchtigen. Hierfür wurde das Trifluoressigsäureanhydrid zusammen mit Triethylamin in Acetonitril bei 0 °C für 10 min gerührt, um durch Hydrolyse freigesetzte stark saure Trifluoressigsäure zu kompensieren. Diese Aktivierlösung wurde anschließend unter Eiskühlung tropfenweise zum Nicotinsäurenucleotid, welches in Acetonitril gelöst war, zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden nach Bildung des gemischten Anhydrids **154** alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und direkt mit 1-Methylimidazol in Acetonitril zum *N*-Methylimidazolidsalz **155** umgesetzt. Das hochreaktive Salz sollte anschließend mit dem nucleophilen Adenosin-2',5'-diphosphat **32** zum maskierten NAADP **156** umgesetzt werden. Die HPLC-Reaktionsverfolgung zeigte einen vollständigen Verbrauch des aktivierten Nicotinsäuredonors **155** bereits nach 1 h. Die Reaktion wurde mit einem 1 M TEAB-Puffer beendet und RP-18-säulenchromatographisch gereinigt unter Verwendung eines Acetonitril/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradienten. Bedauerlicherweise konnte keine Produktfraktion isoliert werden und ausschließlich das Adenosin-2',5'-diphosphat **32** in 70 %iger Ausbeute reisoliert werden (**Abb.95**).

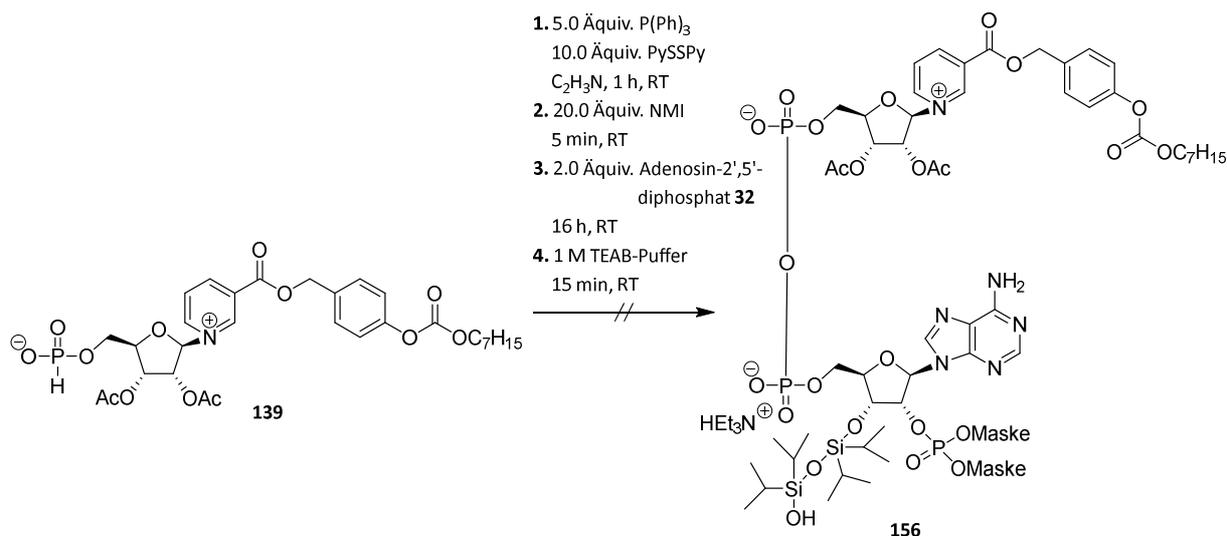


**Abb.95:** Versuch der Synthese des maskierten NAADP **156** mit Hilfe der adaptierten Methode nach BOGACHEV *et al.*

Es wurde davon ausgegangen, dass sich das Nicotinsäurenucleosid **136** in einem der Syntheseschritte zersetzt hat, da bei der Auswertung der Integrale vom Signal des Adenosin-2',5'-diphosphat **32** bei der HPLC-Reaktionsverfolgung kaum Unterschiede des Integrals während der Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden konnten. Vermutlich hat sich das Nicotinsäurenucleosid **136** während der Aktivierung oder der Reaktion zersetzt und zumindest der Reinigungsschritt nicht erheblich an der Zersetzung des Nicotinsäurenucleotids **136** beteiligt ist, da keine Reaktion zwischen Akzeptor **136** und Donor **32** ersichtlich war.

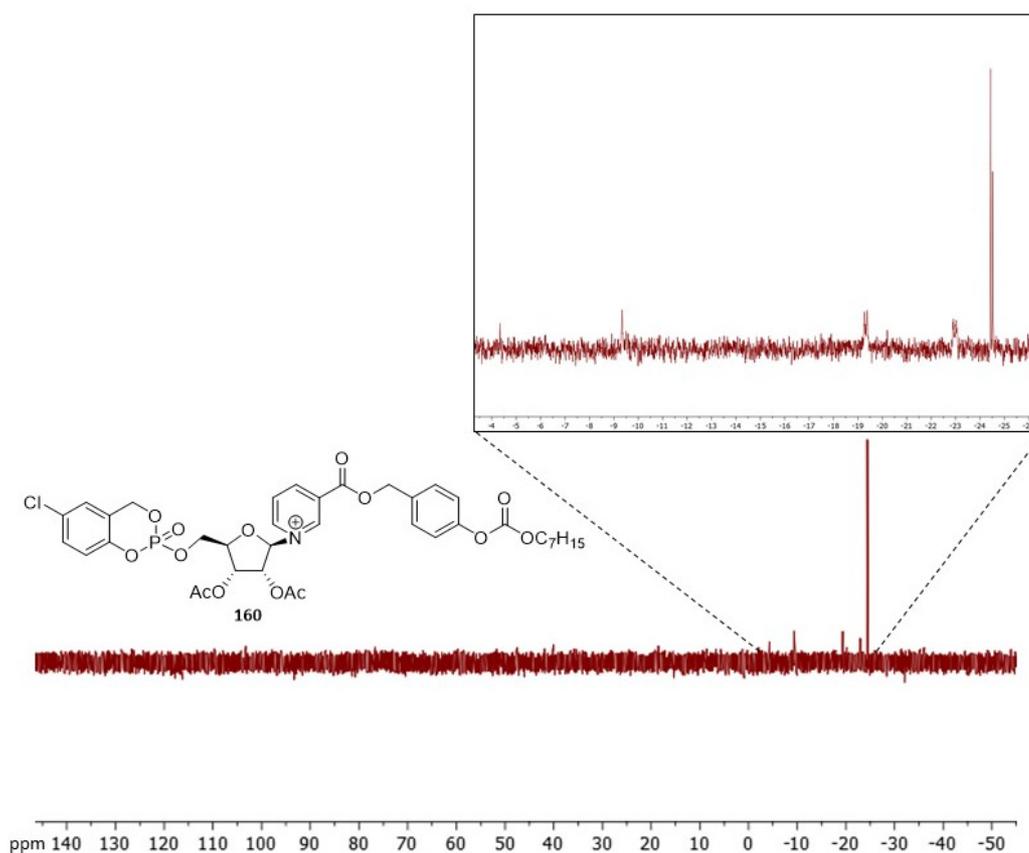
Aus diesem Grund sollte eine veränderte Aktivierungsstrategie gewählt werden. Hierfür schien die milde Redox-Aktivierungsmethode zum Methylimidazolat adaptiert nach HURLY *et al.* unter neutralen Reaktionsbedingungen geeignet zu sein.<sup>254,255</sup> Ausgehend von dem *H*-Phosphonat **139** beginnt die Kupplungsmethode wie schon zuvor mit einer Voraktivierung zur Einführung des 1-Methylimidazols. Zunächst wurde das *H*-Phosphonat **139** mit Triphenylphosphin und 2,2'-Dipyridinyldisulfid umgesetzt. Die hierbei oxidativ gebildete Phosphorthioat- oder Phosphordithioatspezie wird direkt weiter umgesetzt mit 1-Methylimidazol zum *N*-Methylimidazolidsalz, welches nucleophil von dem Adenosin-2',5'-diphosphat **32** angegriffen werden kann und zum maskiertem NAADP **156** führen sollte. Es konnte wie schon in der vorherigen Reaktion kein gewünschtes Produkt **156** isoliert werden und lediglich das Adenosin-

2',5'-diphosphat **32** zurückgewonnen werden (**Abb.96**). Die Vermutung liegt nahe, dass das Nicotinsäurenucleotid **139** durch die potenziell reduktiven Bedingungen zu einer Zersetzung geführt haben, da der Elektronenmangel des Pyridinrings eine treibende Kraft für die Aufnahme eines Hydrid-Ions in der 4-Position des Pyridinrings darstellt. Hierbei werden zwei Elektronen bei dem Angriff auf die 4-Position aufgenommen, wodurch das aromatische System aufgehoben wird, da der Stickstoff und das Kohlenstoff in *para*-Stellung reduziert werden.



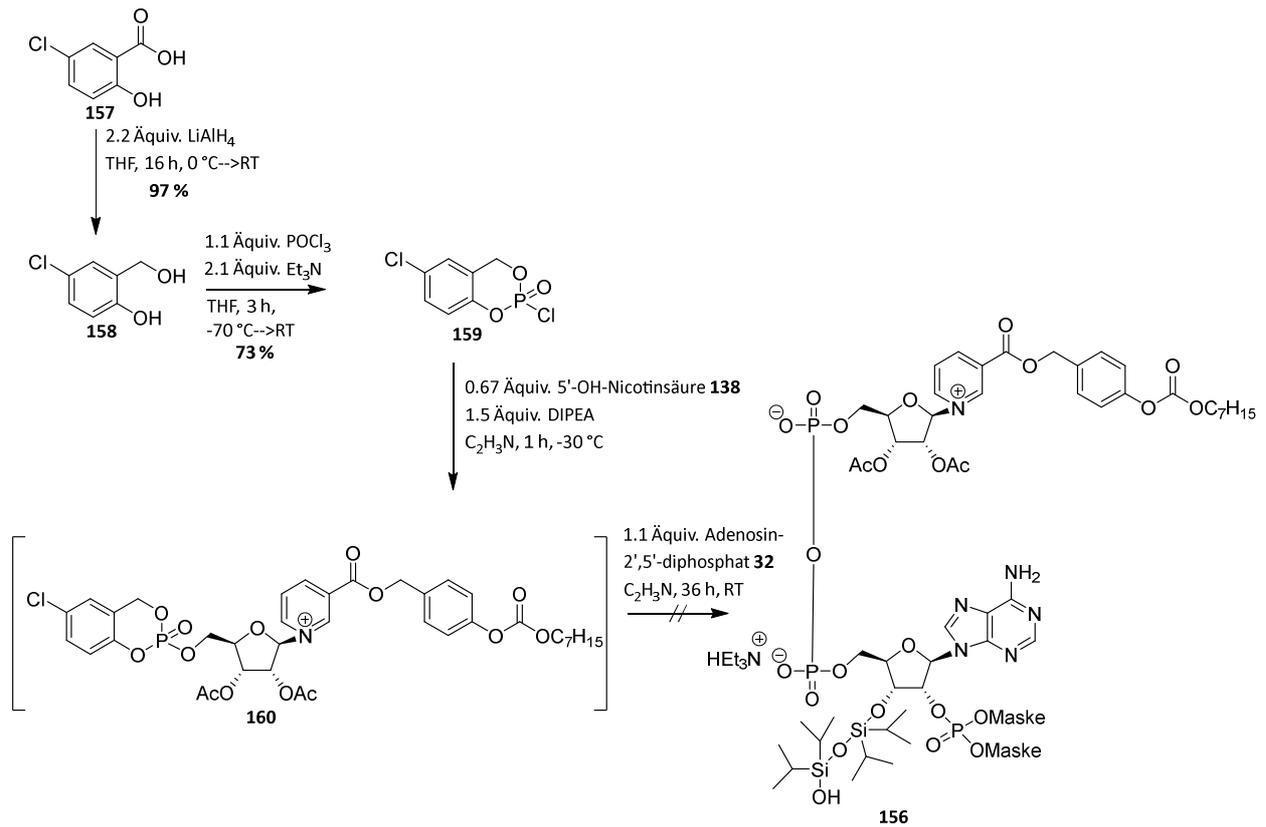
**Abb.96:** Versuch der Synthese des maskierten NAADP **156** mittels Methode adaptiert nach MUKAIYAMA und HASHIMOTO.

Folglich sollte eine Methode gewählt werden, welche sowohl in neutralen Bedingungen, als auch in keiner Redox-Umgebung stattfinden kann. Für diese Anforderungen bietet sich die Verwendung der *cycloSal*-Methode nach WARNECKE und MEIER an.<sup>160</sup> Die Kupplungsreaktion verläuft hier über einen *cycloSal*-Triester in der Oxidationsstufe V, welcher nucleophil von einem Nucleotid angegriffen wird und hierdurch die Ringöffnung initiiert wird. Um eine ausreichende Reaktivität des Phosphortriesters für die Kupplung zu gewährleisten wurde in diesem Fall mit 5-Chlor-substituierter Salicylsäure **157** begonnen. Diese wurde zum Salicylalkohol **158** reduziert und unter basischen Bedingungen mit POCl<sub>3</sub> zum 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **159** umgesetzt. Das Chloridat **159** wurde daraufhin mit dem Nicotinsäurenucleosid **138** zur Reaktion gebracht. Die Bildung des Triesters **160** konnte mit Hilfe eines <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum vom Rohprodukt nicht eindeutig bewiesen werden, da das übliche Duplett des Phosphorsignals bei einer chemischen Verschiebung zwischen -8 - -11 ppm nicht zu erkennen war, sondern lediglich ein Duplett bei -22 ppm, sowie eine Vielzahl an Nebenprodukten (**Abb.97**).



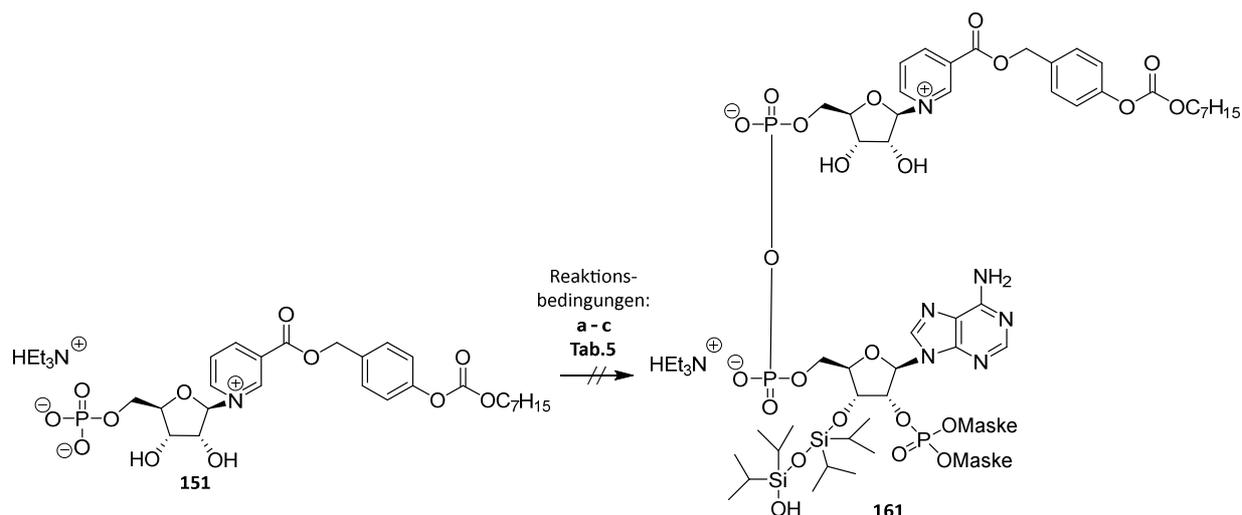
**Abb.97:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Rohprodukts aus der Reaktion zum Triester-Zwischenprodukts **160**.

Trotzdem wurde versucht, den vermeintlichen Triester **160** aufgrund von möglichen hydrolytischen Zersetzungen direkt mit dem Adenosin-2',5'-diphosphat **32** umzusetzen. Erwartungskonform konnte auch bei dieser Reaktion kein maskiertes NAADP isoliert werden (**Abb.98**). Dieser Versuch der Kupplungsreaktion generiert aber die Erkenntnis, dass der Nicotinsäurebaustein bereits während der Aktivierung zersetzt wurde.



**Abb.98:** Versuch der Synthese des maskierten NAADP **156** nach einer Methode von WARNECKE und MEIER.

Angesichts der nicht erfolgreichen Synthesen wurden im Folgendem angepasste Synthesevarianten verwendet, welche schon in der NAD-Synthese eingesetzt werden, auch wenn hierbei sehr niedrige Ausbeuten von <20 % mit sehr langen Reaktionszeiten bis >3 Tagen zu erwarten sind. Aktiviert wurde in diesem Fall das 2',3'-ungeschützte Nicotinsäuremonophosphat **151**, da sich dieses ebenso gut in Acetonitril lösen ließ und mögliche Nebenreaktionen durch die verwendeten Kupplungsmethoden unterdrückt werden (**Abb.99**).



**Abb.99:** Versuch der Synthese des maskierten NAADPs **161** unter Verwendung verschiedener Methoden.

In **Tab. 5** sind die verwendeten Reaktionsbedingungen zusammengefasst. Es wurde mit einer Aktivierung des Nicotinsäurenucleotids **151** in den ersten beiden Reaktionsvarianten angefangen. Hierzu wurde das 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) zur Erzeugung eines gemischten Anhydrids verwendet. Nach erfolgter Synthese des Imidazolidats wurden diese *in situ* mit dem Adenosinmonophosphat **32** umgesetzt, wobei in Variante **a** *N*-Methylimidazolium-hydrochlorid als Katalysator zugegeben wurde und in Variante **b**  $\text{MgCl}_2$  als divalente Metallionenquelle.<sup>240,256</sup> Diese Katalysatoren sollten der Reaktionsbeschleunigung dienen, da in Kapitel **6.7** und **6.8** die Zersetzung der Nicotinsäurenucleotide beobachtet werden konnte und somit lange Reaktionszeiten zu vermeiden sind. Bei beiden Reaktionsvarianten konnte kein maskiertes NAADP **161** und auch kein eindeutiger Reaktionsumsatz in der HPLC-Reaktionsverfolgung beobachtet werden. Das Signal des aktivierten Nicotinsäurenucleotids **151** konnte zwar nicht weiter detektiert werden, aber das Integral des Adenosin-2',5'-diphosphats **32** hat zugleich nicht merklich abgenommen.

In Variante **c** erfolgte die Verwendung von einer neuentwickelten vielversprechenden Variante zur Pyrophosphatsynthese nach TAYLOR *et al.* verwendet werden, welche einen sehr hohen Reaktionsumsatz innerhalb von Minuten verspricht, wodurch die Zersetzung des Nicotinsäurenucleotids **151** verhindert werden soll.<sup>257</sup> Gemäß der Methode wurde zunächst ein Sulfonylimidazolium-Salz synthetisiert und mit dem Nicotinsäurenucleotid **151** umgesetzt, worauf nach 1 Minute die Zugabe des Adenosin-2',5'-diphosphats **32** folgte und zur weiteren Reaktionsbeschleunigung  $\text{MgCl}_2$  zugegeben wurde. Auch hier konnte ausschließlich die

Zersetzung des Nicotinsäurenucleotids **151** beobachtet werden und nach der Reinigung einzig das Adenosin-2',5'-diphosphat **32** zurückerhalten werden.

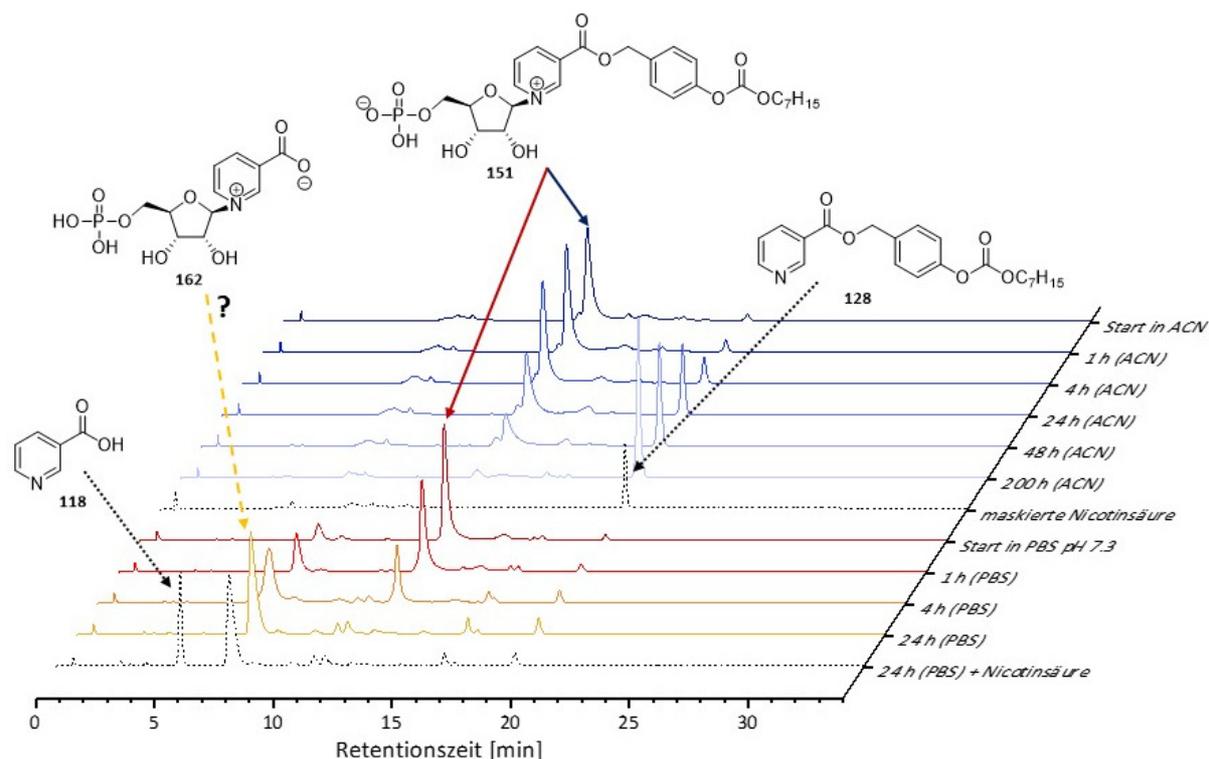
**Tab.5:** Übersicht der Reaktionsbedingungen der NAADP-Synthese.

<i>Vari- ante</i>	<i>Bedingungen</i>	<i>Resultat</i>
<b>a</b>	1. 4.0 Äquiv. CDI, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 4 h, RT	Nicotinsäurenucleotid
	2. 8.0 Äquiv. MeOH, 30 min, RT	<b>151</b> zersetzt, bzw.
	3. 1.1 Äquiv. Adenosin-2',5'-diphosphat <b>32</b> , 4.0 Äquiv. <i>N</i> -Methylimidazolium-hydrochlorid, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 16 h	kein Umsatz
	4. 1 M TEAB-Puffer, 15 min, RT	
<b>b</b>	1. 4.0 Äquiv. CDI, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 4 h, RT	Nicotinsäurenucleotid
	2. 8.0 Äquiv. MeOH, 30 min, RT	<b>151</b> zersetzt, bzw.
	3. 1.1 Äquiv. Adenosin-2',5'-diphosphat <b>32</b> , 2.0 Äquiv. MgCl <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 16 h	kein Umsatz
	4. 1 M TEAB-Puffer, 15 min, RT	
<b>c</b>	1. 3.0 Äquiv. DIPEA, 1.2 Äquiv. <i>N</i> -Methylimidazoltosylat, DMF, 1 min, RT	Nicotinsäurenucleotid <b>151</b> zersetzt
	2. 1.2 Äquiv. Adenosin-2',5'-diphosphat <b>32</b> , 1.0 Äquiv. MgCl <sub>2</sub> , DMF, 1 h, 0 °C → RT	
	3. 1 M TEAB-Puffer, 15 min, RT	

Da die durchgeführten Synthesen mit keiner konventionellen Methode aus **Tab.5** zum gewünschten Kupplungsprodukt **161** führten, wurden mögliche Ursachen konstatiert und hierzu Stabilitätsstudien am Nicotinsäurenucleotids **151**, welches als limitierender Faktor bei der Synthese galt, durchgeführt. Die Stabilitätsprüfung am Nucleotid **151** erfolgte zum einen in wasserfreiem Acetonitril und zum anderen in PBS-Puffer mit pH-Wert 7.3. Da der Zerfall des Nucleotids **151** bereits bei der Verwendung des herkömmlichen Laufmittels mit einem pH 6.0 beobachtet werden konnte, wurde ein HPLC-Laufmittel mit pH 7.0 verwendet. Für die

Hydrolyse wurden jeweils Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt und diese für eine definierte Zeit bei 37 °C inkubiert. Insbesondere bei der Hydrolyse in Acetonitril (**Abb.100**, blauer Verlauf), welches als Lösungsmittel für die Kupplungsreaktionen diente, ist eine schnelle Abspaltung der maskierten Nicotinsäure **128** zu beobachten. Bereits nach 24 h ist bei ungefähr der Hälfte des Nucleotids die *N*-glycosidische Bindung gespalten. Die Identifikation der maskierten Nicotinsäure **128** erfolgte durch die Injektion des synthetisierten Nicotinsäurederivats. Aufgrund des  $pK_s$ -Werts 25.0 von Acetonitril kann eine säurekatalysierte Hydrolyse ausgeschlossen werden und es kann von einer Zersetzung ausgegangen werden, wodurch die Synthese signifikant erschwert ist.<sup>258</sup>

Bei der zweiten Hydrolysestudie in PBS-Puffer pH 7.3 ist ein rapider Zerfall des Nucleotids **151** zu beobachten, wobei eine polarere Substanz entsteht (**Abb.100**, roter Verlauf). Durch Coinjektion der 24 h-Hydrolyseprobe mit Nicotinsäure **118** konnte eine Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung und simultane Spaltung der bioreversiblen Schutzgruppe ausgeschlossen werden, da es sich bei der neuentstandenen Substanz weder um Nicotinsäure **118** noch um die maskierte Nicotinsäure **128** handelt. Es wird vermutet, dass es sich bei dem Signal bei einer Retentionszeit von 7 Minuten um das unmaskierte Nucleotid **162** handelt. Die chemische Spaltung der bioreversiblen Maske war hierbei zu erwarten, wobei die Stabilität der *N*-glycosidischen Bindung überraschend ist. Die *N*-glycosidische Bindung scheint entweder intramolekular durch die Bildung des Zwitterions durch die nahegelegene negative Ladung des Carboxylats stabilisiert zu werden oder durch eine Solvatation des Monophosphats eine Stabilisierung zu erfahren, bzw. hierdurch ein nucleophiler Angriff des Phosphats verhindert wird. Die Annahme, dass die maskierte Carboxyfunktion einen destabilisierenden Effekt auf die *N*-glycosidische Bindung besitzt, ist auch dadurch bekräftigt, dass die NAD-Synthese mit dem aktivierten Nicotinamid möglich ist und in moderaten Ausbeuten literaturbekannt synthetisiert werden kann.<sup>205</sup>



**Abb.100:** HPLC-Hydrolysestudien des Nicotinsäurenucleotids **151**. Dargestellt ist die Hydrolyse in wasserfreiem Acetonitril (bläulich) und die Hydrolyse in PBS-Puffer pH 7.3 (rötlich), zudem ist das HPL-Chromatogramm der bioreversibel maskierten Nicotinsäure **128** abgebildet (schwarz gestrichelt) und die PBS-Hydrolyseprobe nach 24 h mit einer Coinjektion der ungeschützter Nicotinsäure **118** (schwarz gestrichelt).

Die hohe Labilität der *N*-glycosidischen Bindung des Pyridinnucleotids wird durch den ausgeprägten Elektronenmangel des Pyridin-Stickstoffatoms mittels Quaternisierung verursacht und erfährt noch eine Verstärkung aufgrund des elektronenziehenden Effekts der Carboxylgruppe, weshalb eine erfolgreiche chemische Synthese des maskierten NAADP ausgesprochen schwierig erscheint. Verdeutlicht wird diese Labilität der *N*-glycosidischen Bindungen des Nicotinamids gegenüber Nucleophilen in zahlreichen Studien zur Ermittlung der intrazellulären Stabilität von NAD.<sup>259,260</sup> Durch die enzymatische Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung bei NAD kann z.B. cADPR gebildet werden, ein weiterer wichtiger sekundärer Botenstoff für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung.

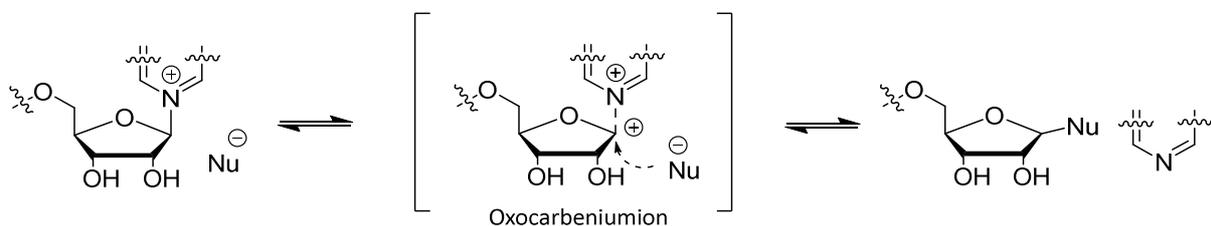
Synthetisch kann alternativ die Überlegung getroffen werden, auf der einen Seite gezielt die reduzierte Form des Nicotinsäurezuckers zu synthetisieren, um auf diese Weise die benötigte Stabilität zu generieren und nach erfolgter Kupplung die Nicotinsäure abschließend zu oxidieren.<sup>261</sup> Auf der anderen Seite ist die Synthese von chemisch stabilisierten Nicotinsäurederivaten synthetisch leichter zugänglich und auch vermutlich zielführend, da auch die Stabilität der

reduzierten Form der Nicotinsäure gegenüber chemischen Reaktionsbedingungen fraglich ist. Für eine erfolgreiche Synthese zum NAADP mit befriedigenden und reproduzierbaren Ausbeuten ist folglich eine chemische Stabilisierung der *N*-glycosidischen Bindung des Nicotinsäurebausteins elementar wichtig.

### 6.11 Synthese von chemisch stabilisierten Nicotinsäurenucleosiden

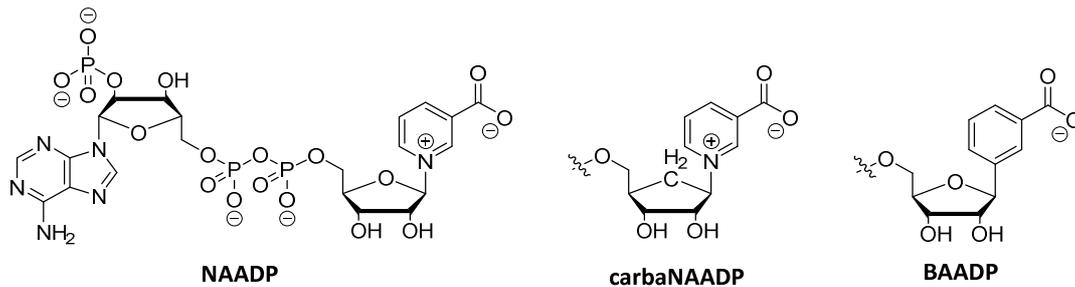
Die wichtigste Anforderung an ein chemisch stabilisiertes Nicotinsäuremimetikum ist neben einer Minimierung der Vulnerabilität der glycosidischen Bindung, ein möglichst simultanes Verhalten in den komplexen biologischen Prozessen.

Die Spaltungsrate der glycosidischen Bindung wird durch den pH-Wert beeinflusst, bzw. durch die enzymatische Veränderung der lokalen Säure-Base-Umgebung, wobei die C-N-Spaltung entweder durch einen nucleophilen Angriff auf das Kohlenstoff in 1'-Position oder durch die Stabilisierung einer Austrittsgruppe initialisiert wird.<sup>262</sup> Infolge der Beeinflussung der C-N-Bindung bildet sich als Zwischenprodukt ein positiv geladenes Oxocarbeniumion am Zuckerring, wodurch die Stabilität beeinflusst wird und ein Bindungsbruch erfolgt (**Abb.101**).



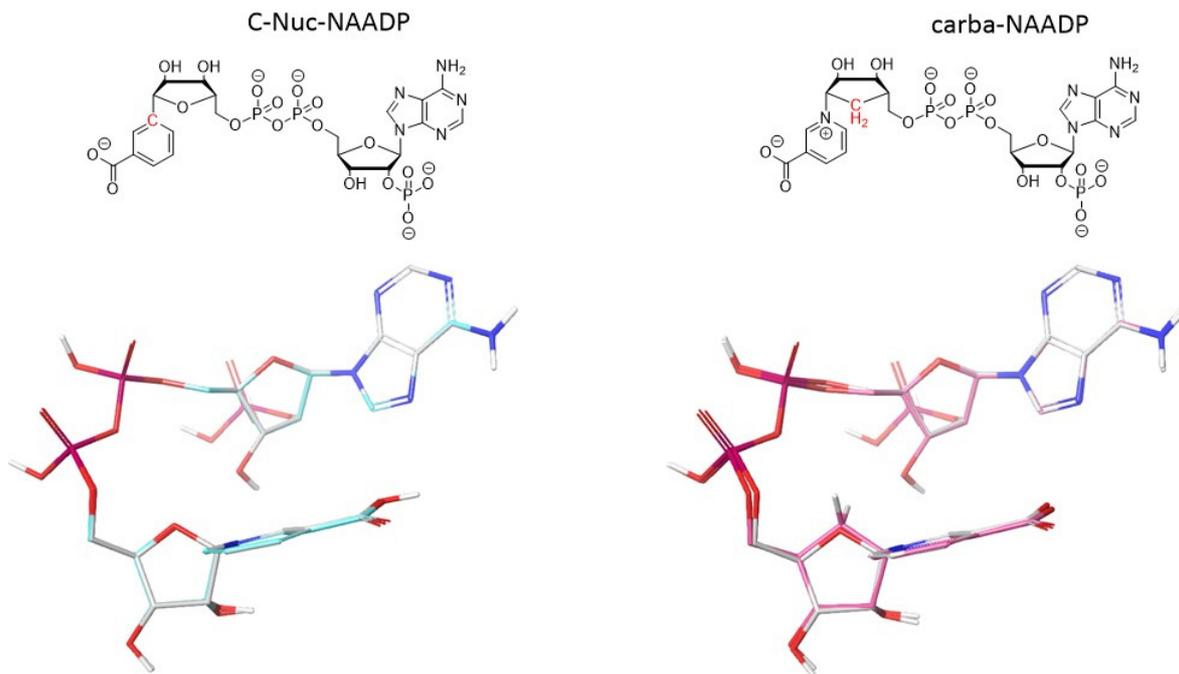
**Abb.101:** Bildung des Oxocarbeniumions. Die Stabilisierung der Abgangsgruppe, sowie das Nucleophil bestimmen dabei die Akkumulation der positiven Ladung.

Im Zuge dessen wird ersichtlich, dass die Veränderung der N,O-acetalischen Bindung zielführend ist. Als Möglichkeit bieten sich zum einen die Synthese von carbocyclischen Nicotinsäurederivaten an, bei denen der Sauerstoff im Furanosezuckerring gegen eine Methylengruppe ausgetauscht ist. Eine weitere Stabilisierungsmöglichkeit ist die Synthese von C-nucleosidischen Derivaten, welche eine C-glycosidische Bindung aufweisen (**Abb.102**). Bei beiden Modifikationsvarianten ist eine signifikante hydrolytische Stabilität charakteristisch.



**Abb.102:** Struktur des NAADP im Vergleich mit dem carbocyclischen NAADP und dem C-nucleosidischen NAADP (Benzoessäureadenindinucleotidphosphat).

Als ein Modell zur Vorhersage für die biologische Wirksamkeit kann die Struktur-/Aktivitätsbeziehung (structure/activity relationship, SAR) genutzt werden. Die Kalkulationen der Strukturen von den NAADP-Analoga und des natürlichen NAADPs wurden mit Hilfe des Programms Schrödinger Maestro von C. FOHRMANN durchgeführt. In beiden Fällen ist keine entscheidende strukturelle Abweichung zum natürlichen NAADP zu erkennen, wobei insbesondere die deckungsgleiche Position der strukturelevanten Merkmale (Kapitel 4.1.7) eine biologische Korrelation für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität beider Analoga vermuten lässt (**Abb.103**). Die geringfügige Verdrehung der carbocyclischen Zuckereinheit wird vermutlich durch dessen Ringflexibilität kompensiert, womit sich beide Modifikationen potenziell für eine Stabilisierung anbieten.



**Abb.103:** Kalkulierte Strukturen im Vergleich. Das C-nucleosidische Analogon im Vergleich zum NAADP (links) und das carbocyclische Analogon im Vergleich zum NAADP (rechts).

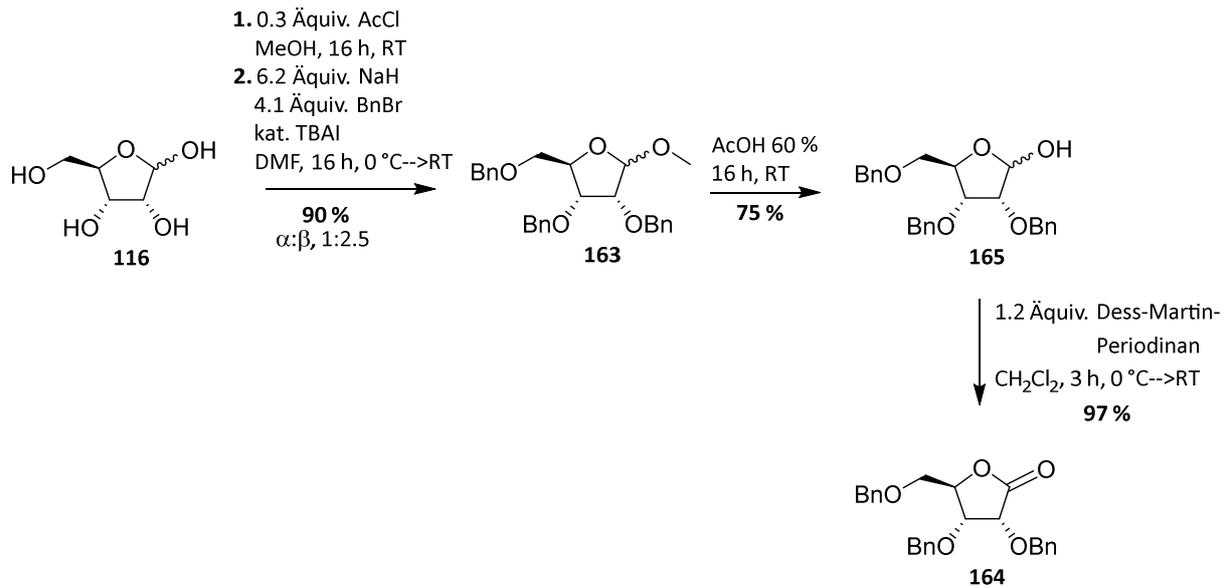
Die Synthese des carbocyclischen Nicotinsäuremimetikums erscheint zunächst am naheliegendsten, da dieses aus chemischer Sicht die höchste Übereinstimmung mit der natürlichen Nicotinsäure aufweist. Zum einen sind die Strukturen laut Kalkulation nahezu deckungsgleich und die einzige chemische Strukturänderung ist die Substitution des Sauerstoffs im Furanoserings gegen eine Methylengruppe und somit eine räumlich entfernte Veränderung zu den strukturelevanten Merkmalen des NAADPs. Zum anderen bleibt auf diese Weise die positive Ladung des Pyridinnucleotids erhalten.<sup>263–266</sup> Andererseits wird aber partiell von einer herabgesetzten Aktivität des carbaNAD-Analogons in Konkurrenz zum C-nucleosidischen Pendant bei biologischen Untersuchung zur Enzymwechselwirkungen berichtet, zudem scheint die Synthese zum C-nucleosidischen NAADP-Derivat aufgrund der sehr hohen Stabilität am unproblematischsten.<sup>267</sup>

Aus diesem Grund sollte zunächst mit der Synthese des C-nucleosidischen Analogons begonnen werden, da dieses nicht hydrolysierbar ist und als NAD-Analogon in biologischen Studien aussichtsreiche Ergebnisse geliefert hat, wenngleich die positive Ladung des Pyridiniums nicht gegenwärtig ist.<sup>268–270</sup> Die Bedeutung einer positiven Ladung eines Nicotinsäuremimetikums ist bislang nicht bekannt und kann mit der Synthese eines C-nucleosidischen NAADP-Derivats ebenso untersucht werden. Als C-nucleosidische Derivate stehen zwei Moleküle aus den literaturbekannten NAD-Untersuchungen zur Auswahl, zum einen das Thiazol-4-carboxamidadenindinucleotid (TAD) oder zum anderen das Benzamidadenindinucleotid (BAD). Die Wahl des BADs ähnlichem Nicotinsäurederivats wurde aufgrund von besseren Enzymwechselwirkungen und einer SAR-Kalkulation des BADs im Vergleich zum TAD in Untersuchungen zu NAD umsetzenden Enzymen getroffen.<sup>271</sup>

### 6.11.1 Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäureanalogons

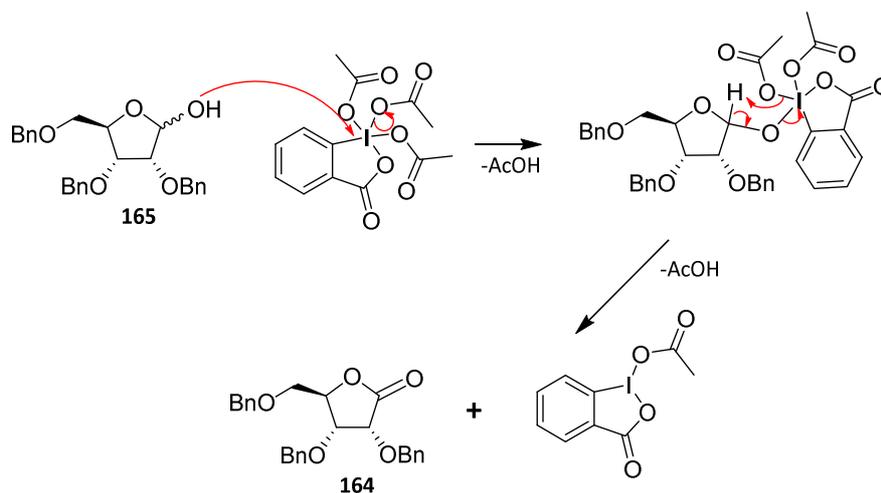
Die Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäureanalogons kann prinzipiell auf verschiedene Syntheserouten realisiert werden. Die Knüpfung der C-glycosidischen Bindung kann mittels Reaktion von Ribofuranosen, Ribonolactonen oder 1'-Halo-Zuckern mit Organometallverbindung durchgeführt werden oder auch mit einer HECK-Kupplung oder einer LEWISSÄUREN vermittelten Glycosylierung realisiert werden. Die Knüpfung der C-glycosidischen Bindung sollte aufgrund der bekannten guten Ausbeuten dieser Methode über ein entsprechend geschütztes  $\gamma$ -Ribolacton mit einer Organometallverbindung erfolgen. Hierbei muss dieses zunächst mit

geeigneten Schutzgruppen versehen werden, welche gegen die harschen Reaktionsbedingungen bei der Synthese des C-Nucleosids resistent sind. Aus diesem Grund wurde die Benzylschutzgruppe gewählt. Nach der Synthesevorschrift von RUSSEL *et al.* wurde ausgehend von D-Ribose **116** in einer „one-pot“-Reaktion die 1'-Position mit einer Methoxygruppe geschützt durch die Reaktion in Methanol und einer katalytischen Menge Acetylchlorid. Im darauffolgenden Reaktionsschritt erfolgte die Benzylschützung der 2',3',5'-Positionen. Hierzu erfolgte die Umsetzung der Methoxy-geschützten Ribose mit Benzylbromid und Natriumhydrid. Als Katalysator wurde der Reaktion TBAI hinzugefügt, um über eine FINKELSTEIN-Reaktion die Umsetzung zu beschleunigen.<sup>272</sup> Über beide Stufen konnte eine sehr gute Ausbeute von 90 % 1-O-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranose **163** nach säulenchromatischer Trennung vom möglichen Benzylalkohol oder vom überschüssigen Benzylbromid erhalten werden, wobei ein Anomerenverhältnis von  $\alpha:\beta/1:2.5$  vorlag. Eine Trennung des Anomerenmischens erfolgte nicht, da beide Anomere bei gleicher Reaktionsführung zum gewünschten Lacton **164** umgesetzt werden können. Nachfolgend wurde die anomere 1'-Position mit Hilfe von 60 %iger Essigsäure entschützt. Eine säurekatalysierte Spaltung der Benzylether konnte unter diesen mild-sauren Bedingungen nicht beobachtet werden und es wurde 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranose **165** in einer Ausbeute von 75 % isoliert. Anschließend erfolgte die Oxidation des Anomerenmischens zum 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribo- $\gamma$ -lacton **164** mit Hilfe des DESS-MARTIN-Periodinan. Abweichend zur Literatur, welche häufig die ALBRIGHT-GOLDMAN-Oxidationsmethode unter Verwendung von DMSO und Essigsäureanhydrid verwendet, wurde die Oxidation mit dem DESS-MARTIN-Periodinan durchgeführt, da sich hierdurch die Bildung von geruchsbelästigendem Dimethylsulfid verhindern lässt und darüberhinaus sehr gute Ausbeuten in kurzen Reaktionszeiten möglich sind.<sup>273</sup> Nach 3 h wurde dünnschichtchromatographisch ein vollständiger Umsatz beobachtet und die Reaktion mit einer gesättigten Lösung aus Natriumthiosulfat und Natriumhydrogencarbonat beendet, um das überschüssige Oxidationsreagenz zu reduzieren und entstandene Essigsäure zu neutralisieren. Die abschließende säulenchromatographische Reinigung lieferte das geschützte Lacton **164** in einer Ausbeute von 97 % (**Abb.104**).



**Abb.104:** Synthese des Benzyl-geschützten  $\gamma$ -Ribolacton **164**.

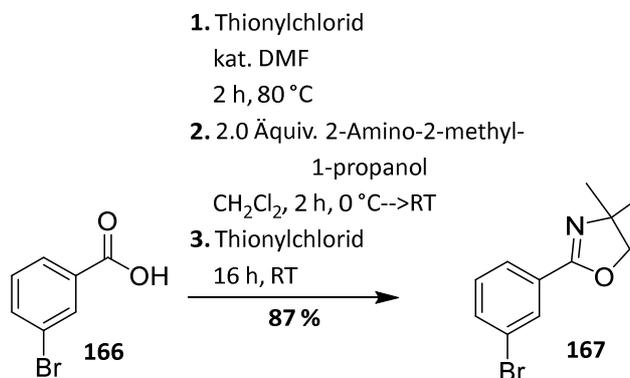
Die DESS-MARTIN-Oxidation verläuft ausgehend von dem sekundären Alkohol **165** sehr selektiv zum Keton **164** unter milden Bedingungen ab. Gemäß dem Reaktionsmechanismus greift der Alkohol nucleophil das Iod an, wodurch eine Essigsäuregruppe abgespalten wird. Im weiteren Verlauf wird unter  $\alpha$ -Proton-Eliminierung eine weitere Essigsäuregruppe abgespalten und der Alkohol oxidiert. Das Iodatom wird dabei von der Oxidationsstufe +V auf +III reduziert (**Abb.105**).<sup>274</sup>



**Abb.105:** Mechanismus der DESS-MARTIN-Oxidation vom Halbacetal **165** zum Lacton **164**.

Die Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäurederivats **169** erfolgte nach der Vorschrift von KROHN *et al.*<sup>275</sup> Für eine erfolgreiche C-Glycosylierung musste die 3-Brombenzoesäure **166**,

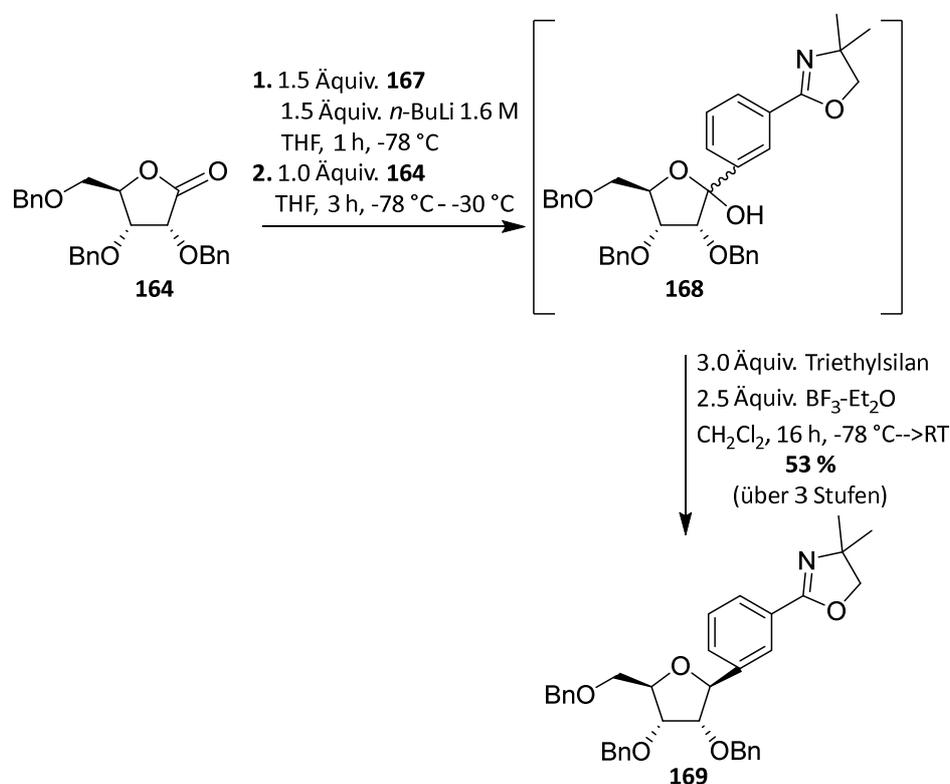
welche als Nicotinsäurederivat fungieren sollte, mit einer Schutzgruppe versehen werden. Als eine geeignete Schutzgruppe, die stabil gegenüber der später verwendeten Organolithiumverbindungen sind, haben sich die Oxazoline bewährt. Zur Einführung der Oxazolinschutzgruppe wurde zunächst die Benzoesäure mit Thionylchlorid *in situ* in das Säurechlorid umgewandelt. Nach vollständiger Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Diethylether coevaporiert. Ohne weiterführende Reinigung wurde der Rückstand in Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Hierzu erfolgte die tropfenweise Zugabe einer Lösung aus 2.0 Äquiv. 2-Amino-2-methyl-1-propanol in Dichlormethan. Dabei reagiert der 2-Aminoalkohol sowohl mit dem Säurechlorid und diente gleichzeitig als Base zur Bildung der Ammoniumchlorid-Abgangsgruppe. Das daraufhin als Feststoff ausgefallene Ammoniumsalz konnte nach Beendigung der Reaktion durch Filtration entfernt werden. Nach Entfernung des Lösungsmittels des Filtrats wurde der Rückstand wiederum in Thionylchlorid gelöst, so dass die Alkoholfunktion in eine Chloridabgangsgruppe überführt wurde und ein intramolekularer Ringschluss zum Oxazolin-geschützten Produkts **167** erfolgte. Hierbei konnte nach erfolgreicher Reinigung mittels Extraktion eine Ausbeute von 87 % erreicht werden (**Abb.106**).



**Abb.106:** Schützung der 3-Brombenzoesäure **166** zum Oxazolin **167**.

Gemäß KROHN *et al.* diene für die C-Glycosylierung das Oxazolin **167** und das geschützte  $\gamma$ -Lacton **164** als Ausgangssubstanzen. Begonnen wird *in situ* mit einem Lithiumaustausch an der Oxazolin-geschützten 3-Brombenzoesäure **167**. Hierfür wird das Oxazolin **167** in THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wird innerhalb von 30 Minuten *n*-Butyllithium in *n*-Hexan zugetropft. Nach dem erfolgten Austausch des Broms gegen Lithium wurde langsam das in THF gelöste Lacton **164** zugetropft. Mit Hilfe des Brom-Lithium-Austausches wird ein nucleophiler Angriff des Oxazolinaromaten **167** auf das Lacton **164** ermöglicht, dabei erfolgt

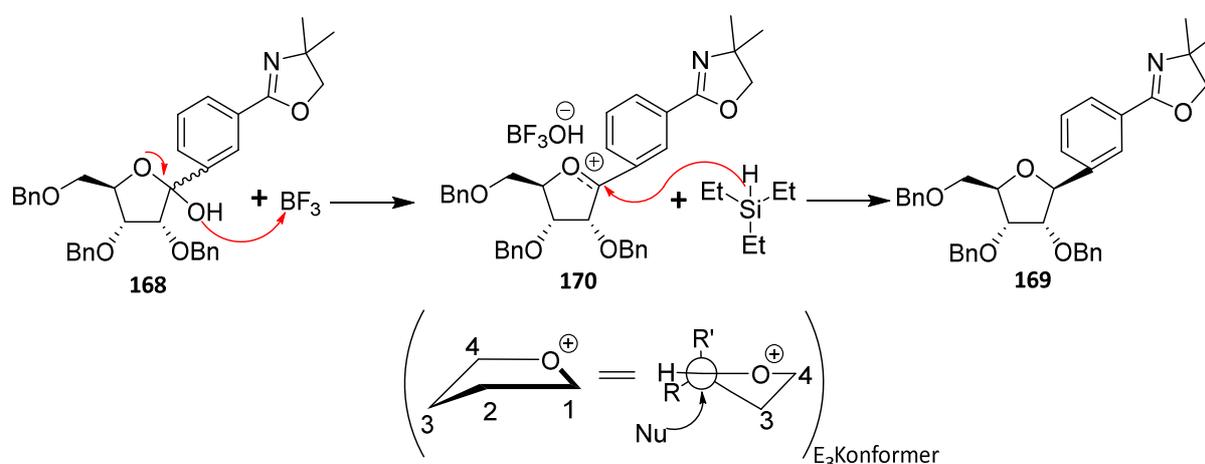
der nucleophile Angriff auf die *si*-Seite des Lactons **164** und der Aromat wird in  $\beta$ -Stellung verknüpft. Aufgrund der Instabilität des entstandenen Lactolzwischenprodukts **168** erfolgte keine Aufarbeitung und die anschließende Dehydroxylierungsreaktion wurde direkt durchgeführt. Für die Dehydroxylierung diente Bortrifluorid-etherat und Triethylsilan, zudem wurde die Reaktion bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt (**Abb.107**). Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte eine Ausbeute von moderaten 53 % des Benzyl-geschützten Produkts **169** erhalten werden. Als Nebenreaktion kann die Deprotonierung der Oxazolin-geschützten Benzoesäure **167** auftreten und in einer anschließenden Reaktion mit dem Lacton **164** zu Nebenprodukten führen. Dies könnte eventuell mit dem Wechsel des Lösungsmittels zum unpolaren Diethylether teilweise unterdrückt werden oder einer langsameren Zugabe des *n*-Butyllithiums.



**Abb.107:** Glycosylierungsreaktion zum Benzyl-geschütztem Produkt **169** über das planare Zwischenprodukt **168**.

Mechanistisch greift bei der Dehydroxylierung das Bortrifluorid die Alkoholgruppe des Lactols **168** elektrophil an und spaltet diese ab. Das dabei entstehende Oxocarbeniumion ist durch das benachbarte Sauerstoffatom stabilisiert. Das verwendete Triethylsilan dient bei der Reaktion als Hydriddonor, wobei das Hydrid selektiv von der *re*-Seite des Zuckers angreift, also

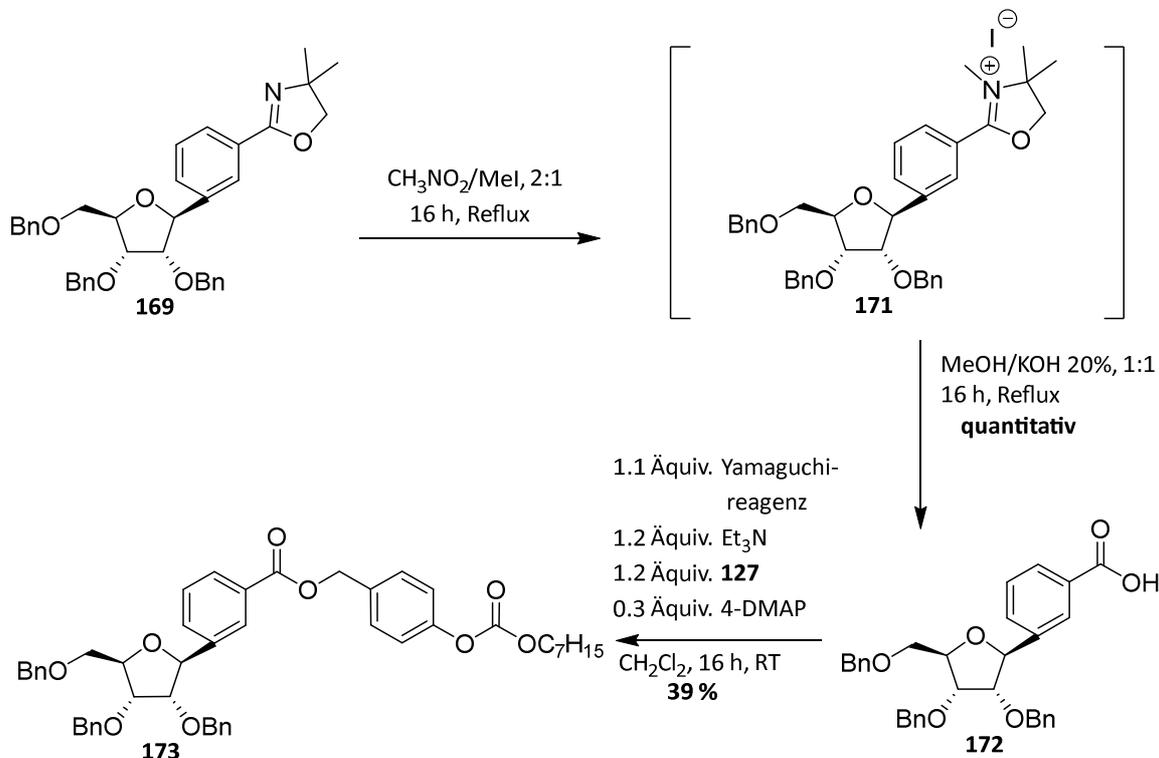
dementsprechend von der äquatorialen Seite und sich somit ausschließlich das  $\beta$ -Produkt **169** bildet, obgleich ein planaren Übergangszustands **170** durchlaufen wird (**Abb.108**).<sup>276</sup> Zudem kann die stereochemische Steuerung mit Hilfe der Konformation des Übergangszustands erklärt werden, da in diesem Fall das  $E_3$ -Konformer vorliegt durch die Dipol-Interaktion des Sauerstoffs an der 5'-Position mit der positiven Ladung der Furanose. Darüberhinaus stabilisieren die pseudoäquatoriale 2'-Position und die pseudoaxiale 3'-Position zusätzlich das  $E_3$ -Konformer. Aufgrund der erhöhten Stabilität des  $E_3$ -Konformers kann das Nucleophil nur von der  $\alpha$ -Seite angreifen und der Aromat wird auf die  $\beta$ -Seite gedrängt.<sup>277,278</sup>



**Abb.108:** Mechanistische Dehydroxylierung des Lactols **168** zum Produkt **169**.

Nachfolgend wurde die Oxazolinschutzgruppe entfernt, indem das Oxazolin **169** zunächst mit Methyljodid unter Reflux für 16 Stunden methyliert wurde. Das entstandene Ammoniumsalz **171** wurde in einer „one-pot“-Reaktion *in situ* unter basischen Bedingungen hydrolysiert und abgespalten. Eine säulenchromatographische Reinigung war nicht notwendig, wobei eine quantitative Ausbeute des Benzyl-geschützten Carboxylderivats **172** erhalten wurde. Die anschließende Veresterung zum maskierten Derivat **173** erfolgte unter STEGLICH-Bedingungen mit dem YAMAGUCHI-Reagenz, welche in Kapitel **6.7** zu sehr guten Ausbeuten führte. Hierbei konnte dünnschichtchromatographisch nach 1 h Reaktionszeit kein weiterer Umsatz beobachtet werden und auch die Zugabe von zusätzlichem YAMAGUCHI-Reagenz und  $\text{Et}_3\text{N}$ , sowie der bioreversiblen Maske **127** führte zu keinem weiteren Umsatz. Daher wurde die Reaktion abgebrochen und das Produkt **173** säulenchromatographisch in einer Ausbeute von lediglich 39 % isoliert (**Abb.109**). Eine Erklärung für die niedrige Ausbeute könnte die Störung der

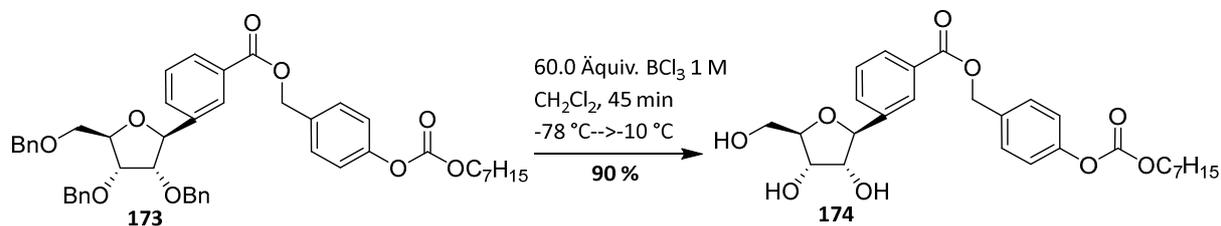
Veresterungsreaktion durch ionische Verunreinigungen aus der vorherigen Reaktion erklärt werden, welche im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht ersichtlich waren. Dies bleibt durch eine weitere vorherige Reinigung oder in der Verwendung von weiteren Veresterungsmethoden zu validieren.



**Abb.109:** Synthese zum maskierten C-nucleosidischem Nucleosid **173**.

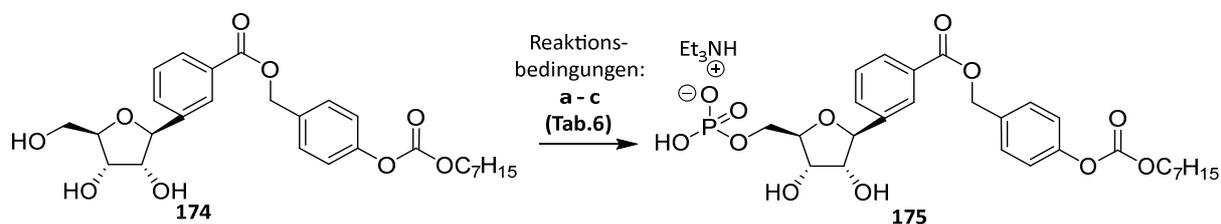
Die anschließende Debenzylierung wurde zunächst versucht, hydrogenolytisch unter Wasserstoffatmosphäre und der Verwendung eines Palladium-Katalysator auf Kohlenstoff durchzuführen. Hierbei war neben den teilweise entschützten Produkten, die Entstehung von Nebenprodukten zu beobachten. Vermutlich wird unter diesen reduktiven Bedingungen die bioreversible Maskierung ebenfalls abgespalten. Die chemoselektive Debenzylierung konnte unter Verwendung von 60 Äquiv. Bortrichlorid als LEWISSÄURE in Dichlormethan bei  $-10^\circ\text{C}$  realisiert werden. Die Spaltung der Ether verlief sehr schnell und es konnte kein Nebenprodukt beobachtet werden, sondern ausschließlich das entschützte Nucleosid **174** nach säulenchromatographischer Reinigung in 90 %iger Ausbeute isoliert werden (**Abb.110**). Die Etherspaltung verläuft dabei über den nucleophilen Angriff des Sauerstoffs vom Ether auf das Boratom des Bortrichlorids, wonach anschließend durch den intramolekularen Angriff eines Chlorid-Anions auf

das Kohlenstoffatom des Benzylethers und nach wässriger Aufarbeitung die Hydroxylgruppe und Benzylchlorid entsteht.<sup>279</sup>



**Abb.110:** Debenzylierung zum Nucleosids **174**.

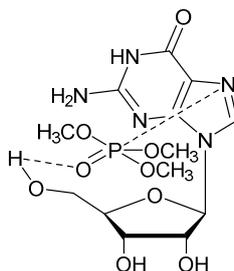
Abschließend sollte die regioselektive Phosphorylierung an der 5'-Position mit der YOSHIKAWA-Methode durchgeführt werden. Hierfür wurde das Nucleosid **174** mit POCl<sub>3</sub> in Trimethylphosphat als Lösungsmittel bei 0 °C umgesetzt (**Abb.111**). Anlässlich des trägen Reaktionsverhaltens des C-nucleosidischen Nucleosids mussten Optimierungen der Reaktionsparameter vorgenommen werden.



**Abb.111:** Phosphorylierung zum Nucleotid **175**.

Die verschiedenen Reaktionsbedingungen sind in **Tab.6** dargestellt. Erstaunlicherweise zeigte die Phosphorylierung nach Variante **a** mit den üblichen Reaktionsparametern keinen Umsatz und nach 16 h Reaktionszeit konnte das Edukt zurückgewonnen werden. Auch der Zusatz von Proton Sponge® in Reaktionsvariante **b**, wodurch üblicherweise für eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit gesorgt wird, durch die Protonenabstraktion in 5'-Position, zeigte keinen Umsatz nach 16 h Reaktionszeit. Erst die Phosphorylierung nach Variante **c** war erfolgreich und es konnte nach entsprechender Reinigung eine Ausbeute von 42 % des maskierten C-nucleosidischen Nucleotids **175** erhalten werden. Trotz der langen Reaktionszeit von 16 h zeigte sich die essentielle Bedeutung der Zugabe der Base Bu<sub>3</sub>N für eine erfolgreiche Phosphorylierung. Es wurde von NARA *et al.* postuliert, dass das Lösungsmittel Trimethylphosphat mit dem zu

phosphorylierenden Nucleosid eine Komplexierung eingeht und auf diese Weise die regioselektive Phosphorylierung in 5'-Position ermöglicht wird (**Abb.112**).<sup>280</sup>



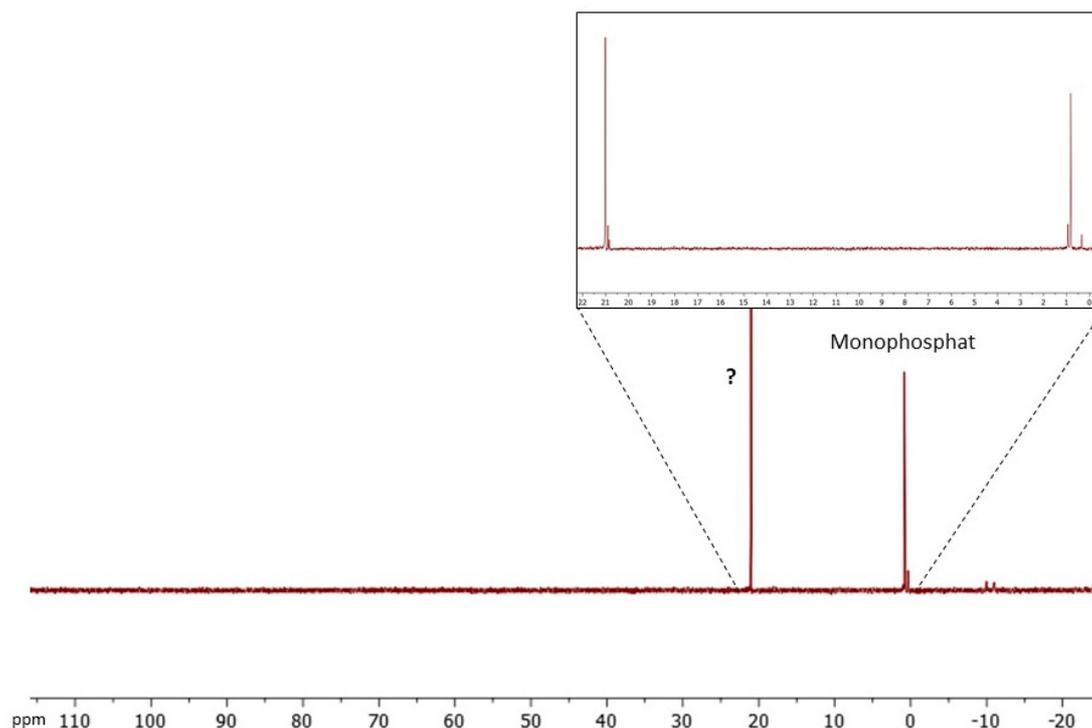
**Abb.112:** Postuliertes Intermediat während der YOSHIKAWA-Phosphorylierung am Beispiel von Guanosin.

Hierbei zeigt sich anhand des Beispiels von Guanosin, dass das Trimethylphosphat mit dem nucleophilsten Stickstoff der Nucleobase koordiniert und das Reaktionsintermediat aus **Abb.112** bildet, da in dem C-Nucleosid **174** kein Heteroatom vorhanden ist, scheint die Phosphorylierung erschwert und der Zusatz einer Base ist notwendig.<sup>280</sup>

**Tab.6:** Übersicht zu den Phosphorylierungsreaktionsbedingungen.

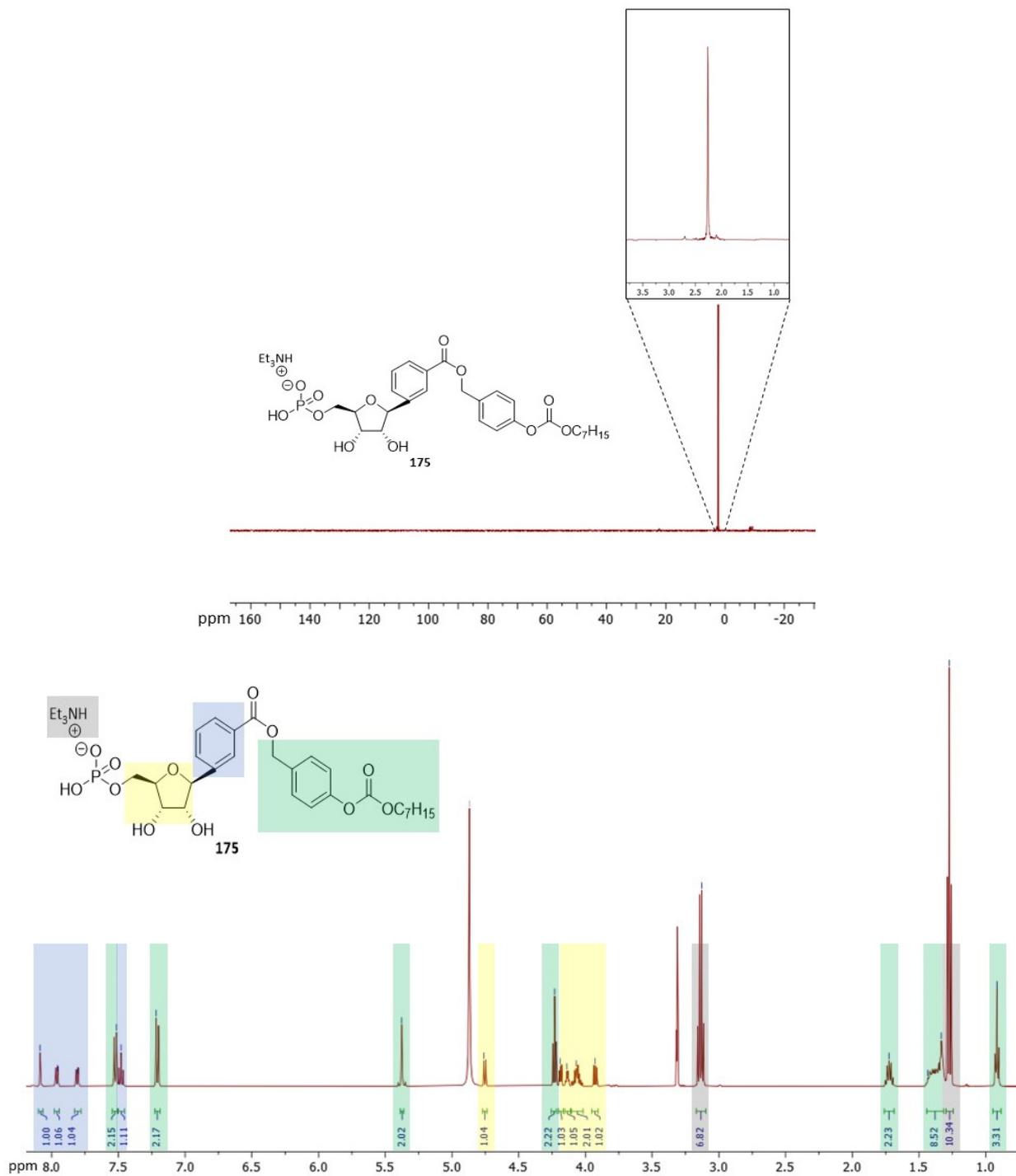
<i>Variante</i>	<i>Bedingungen</i>	<i>Resultat</i>
<b>a</b>	4.0 Äquiv. POCl <sub>3</sub> , TMP, 0 °C, 16 h	Kein Umsatz
<b>b</b>	1.1 Äquiv. POCl <sub>3</sub> , 1.5 Äquiv. Proton Sponge <sup>®</sup> , TMP, 0 °C, 16 h	Kein Umsatz
<b>c</b>	2.0 Äquiv. POCl <sub>3</sub> , 2.5 Äquiv. Bu <sub>3</sub> N, TMP, 0 °C, 16 h	42 %

Als herausfordernd stellte sich die Reinigung des Nucleotids **175** dar. Nach einer RP-18-säulenchromatographischen Reinigung mit Acetonitril/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradient zeigte sich im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum eine unbekannte phosphorhaltige Spezies bei einer chemischen Verschiebung von 21 ppm (**Abb.113**). Auch die wiederholte Reinigung über eine RP-18-Säule zeigte keine Trennung von der Verunreinigung.



**Abb.113:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Nucleotids **175** mit Verunreinigung nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung.

Es wurde vermutet, dass es sich um eine Phosphorammoniumspezie handeln könnte, welches aus der Reaktion von  $\text{POCl}_3$  und  $\text{Bu}_3\text{N}$  entstanden ist und eine vergleichbare chemische Verschiebung im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum aufweist. Es handelt sich dabei um ein positiv geladenes Ammoniumion, weshalb die Trennung mittels Ionenaustausch an Sephadex als zielführend erschien. Die Trennung wurde mittels Wasser/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradient durchgeführt. Hierbei konnte das Nucleotid **175** in hoher Reinheit erhalten werden und das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum und das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigen ausschließlich die gewünschten Signale des Monophosphats **175** (**Abb.114**).



**Abb.114:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (oben) und das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (unten) des Nucleotids **175**.

Die Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäurederivats **175** war somit erfolgreich und konnte für die Synthese zum chemisch stabilisierten NAADP-Derivat in der Folge eingesetzt werden.

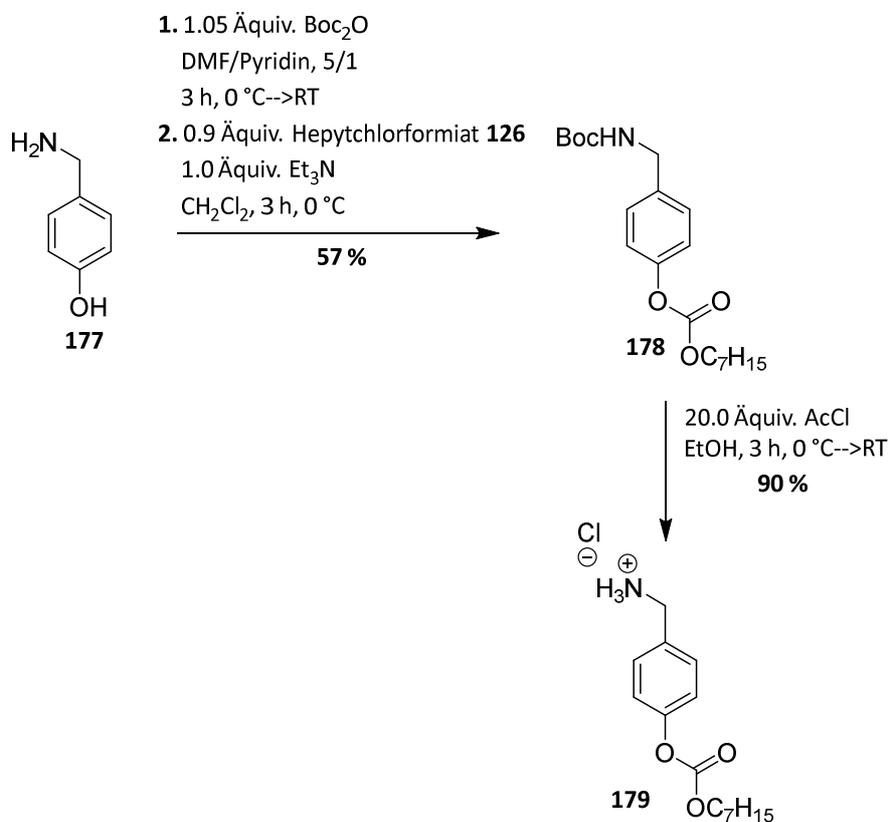
### 6.11.2 Synthese des C-nucleosidischen Nicotinamidanalogs

Aufgrund der erfolgreichen Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäurederivats sollte die Synthese eines nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden äquivalenten Derivats für eine Negativkontrolle in biologischen Untersuchungen synthetisiert werden. Als geeignetes C-nucleosidisches Analogon bietet sich die Synthese eines Analogons des Nicotinamidadenindinucleotidphosphats (NADP) an, da dieses bis auf die Carboxyfunktion am Pyridinnucleotid ein Carboxamid aufweist und daneben eine identische Struktur besitzt. Das NADP weist keine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Eigenschaften auf und ist physiologisch als Coenzym an Redoxreaktionen des Stoffwechsels in Zellen beteiligt.

Anfänglich wurde eine Hydrolysestudie durchgeführt, welche die Spaltbarkeit der bioreversibel geschützten Carboxamids überprüfen sollte, damit eine identische Maskierung zum C-nucleosidischem NAADP-Analoga durchgeführt werden konnte. Hierfür wurde die Stabilität von einem mit der bioreversiblen Maskierung 4-(Hydroxymethyl)phenyloctylcarbonat geschütztem Nicotinamid **176** sowohl enzymatisch mit PLE, als auch chemisch in PBS-Puffer pH 7.3 untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Halbwertszeit nicht von denen in Kapitel **6.7** ermittelten Halbwertszeiten für die 4-(Hydroxymethyl)phenyloctylcarbonat-Maskierung **127** an Nicotinsäure **118** abweicht und somit die Carboxamidgruppe identisch geschützt werden konnte.

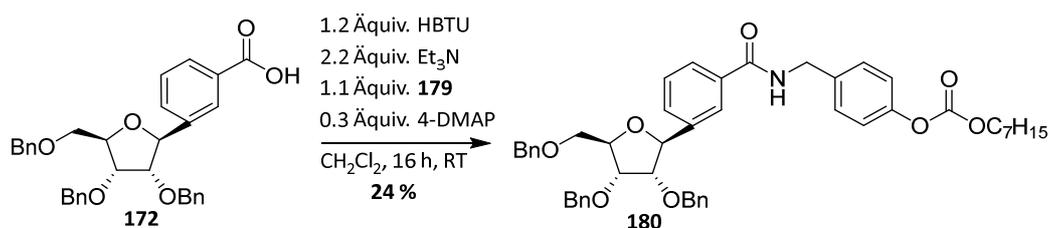
Um später die Amidbindung am Pyridinnucleotid knüpfen zu können, musste die bioreversible Maskierung dementsprechend angepasst werden. Ausgehend von 4-Hydroxybenzylamin **177** wurde die Aminfunktion mit einer Boc-Schutzgruppe mittels Di-*tert*-butyldicarbonat ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) versehen, damit eine Veresterung mit der Aminfunktion verhindert wird. Nach Extraktion wurde das Boc-geschützte Zwischenprodukt **178** direkt weiter umgesetzt und mit Hilfe der üblichen Bedingungen wurde das Boc-geschützte Phenol zum geschützten bioreversiblen Carbonat **179** umgesetzt. Über beide Stufen konnte hierbei eine Ausbeute von 57 % nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. Diese Ausbeute ist auch mit den zuvor synthetisierten bioreversiblen Masken vergleichbar (Kapitel **6.3.1**). Die anschließende Boc-Entschützung konnte unter Verwendung von Acetylchlorid in Ethanol realisiert werden. Bei der Zugabe von Acetylchlorid bildet sich *in situ* HCl, welches zu der säurekatalysierten Spaltung der Boc-Schutzgruppe führt. Besonders vorteilhaft bei dieser Entschützungsvariante ist der simple Reinigungsschritt, da alle Reagenzien flüchtig sind, können diese im Vakuum entfernt

werden. Das Ammoniumsalz wurde ohne weitere Reinigung sauber in einer Ausbeute von 90 % erhalten (**Abb.115**).



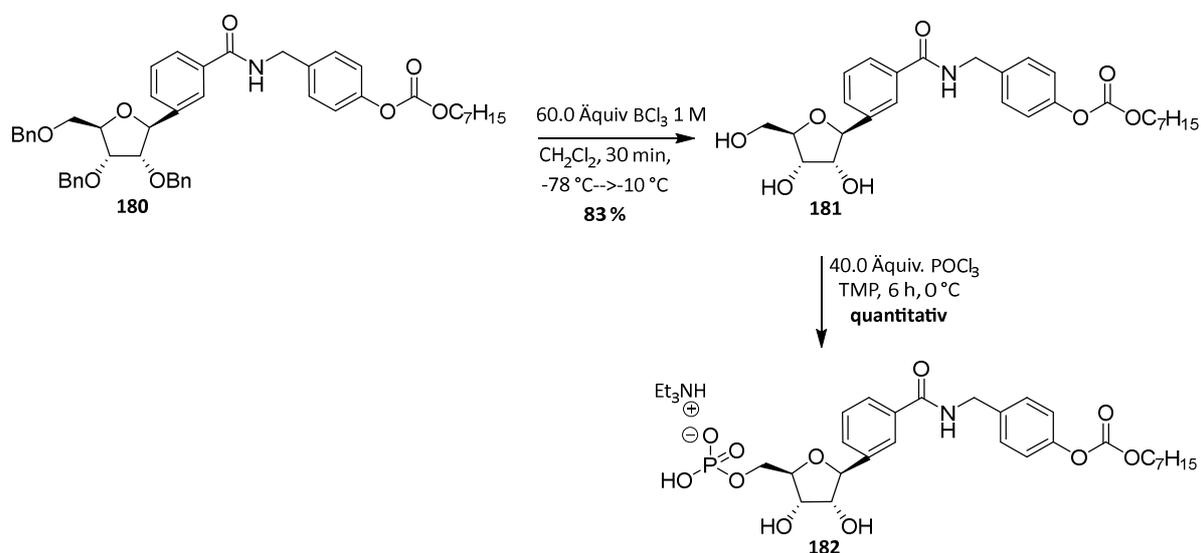
**Abb.115:** Synthese der Amino-bioreversiblen Schutzgruppe 179.

Aufgrund der in Kapitel 6.11.1 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Veresterung des Nucleosids 172 mit der bioreversiblen Schutzgruppe sollte ein abweichendes Kupplungsreagenz gewählt werden. Die Veresterung wurde ebenfalls nach der STEGLICH-Methode mit dem speziell für die Peptidsynthese entwickelten Reagenz (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) durchgeführt. Auch hier konnte nach 1 h kein weiterer Umsatz, wie in Kapitel 6.11.1, beobachtet werden, wodurch die Vermutung bestätigt wurde, dass das Edukt wahrscheinlich mit ionischen Substanzen verunreinigt war und hierdurch die Veresterung gestört wurde, bzw. die Ausbeute durch verunreinigtes Edukt beeinflusst wurde (**Abb.116**).



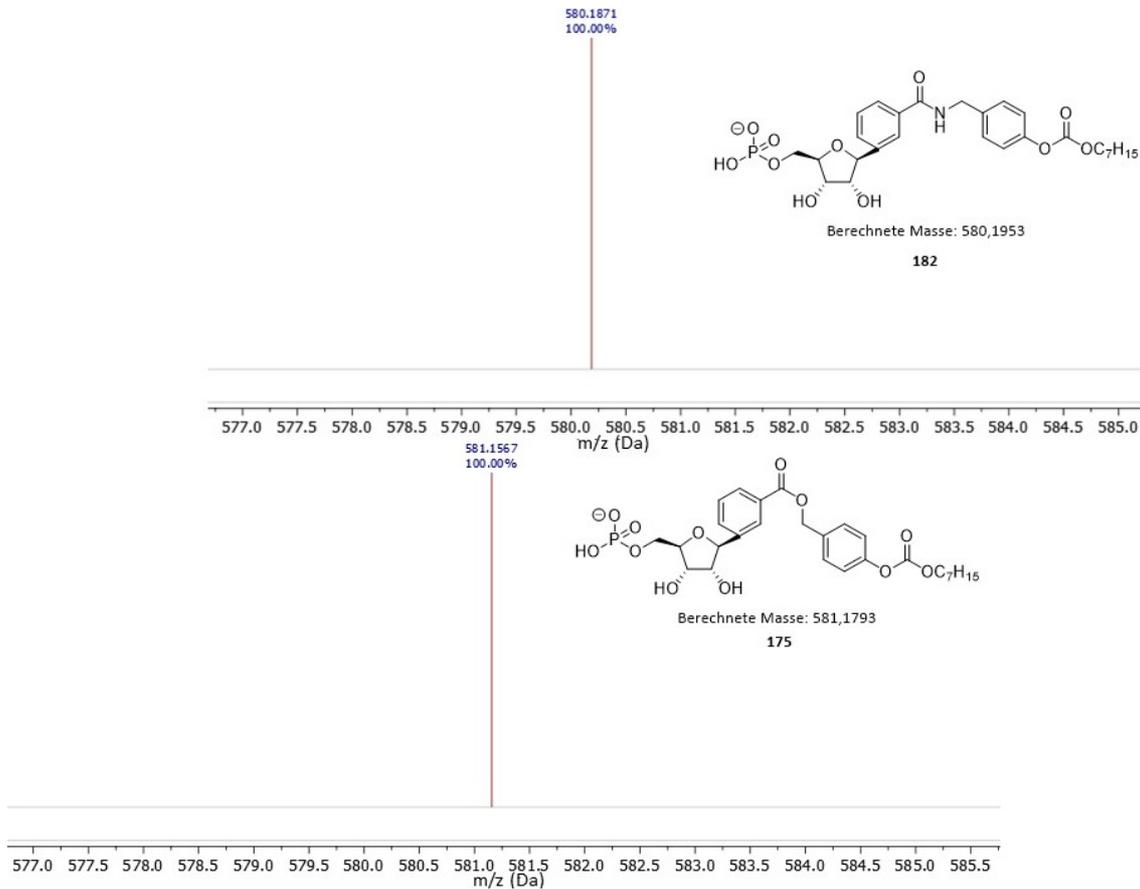
**Abb.116:** Synthese des bioreversibel maskierten Nucleosids **180**.

Die darauffolgende Debenzylierung des Benzyl-geschützten Nucleosids **180** gelang unter den zuvor verwendeten Reaktionsbedingungen mit 60 Äquiv. BCl<sub>3</sub> in Dichlormethan in Kapitel **6.11.1** mit sehr guten Ausbeuten von 83 % des Nucleosids **181**. Die abschließende regioselektive Phosphorylierung erfolgte nach YOSHIKAWA. Abweichend zu den Ergebnissen in Kapitel **6.11.1** gelang die Phosphorylierung mit stark erhöhten 40 Äquiv. an POCl<sub>3</sub>. Hierbei konnte bei einer Reaktionszeit von 6 h eine quantitative Ausbeute des Nucleotids **182** nach einmaliger RP-18-säulenchromatographischer Reinigung mit einem Acetonitril/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradienten erzielt werden (**Abb.117**). Vermutlich kann das Stickstoffatom des Carboxamids im Gegensatz zum Sauerstoff der Carboxyfunktion eine Komplexierung mit Trimethylphosphat eingehen, wodurch die Phosphorylierung an der 5'-Position ohne Zusatz einer Base ermöglicht ist.



**Abb.117:** Debenzylierung zum ungeschützten Nucleosids **181** und anschließender Phosphorylierung zum Nucleotid **182**.

Die aufgenommenen HRMS-ESI-Massen der beiden Monophosphate **182** und **175** zeigen die Masse des jeweiligen Molekülpeaks und es ist der Unterschied von einer Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) zu erkennen, welcher auch historisch zur Identifizierung des NAADP geführt hat (**Abb.118**).<sup>11,66</sup>



**Abb.118:** Vergleich der HRMS-ESI-Spektren von den Nucleotiden des Nicotinsäureanalogons **175** und des Nicotinamidanalogs **182** aufgenommen im negativen Messmodus.

Auch wenn die Synthese des C-nucleosidischen Nicotinsäureanalogons **175**, sowie die Synthese des korrespondierenden, nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden C-nucleosidischen Nicotinamidanalogs **182** für die Negativkontrolle erfolgreich waren, sollte im Folgenden, zur Überprüfung der Bedeutung der positiven Ladung des Pyridinnucleotids, die Synthese des carbocyclischen Nicotinsäurederivats erfolgen. Aussichtsreich erscheint zudem die Untersuchung von dem intrazellulären Metabolismus mit dem carbocyclischen Analogon, da dieses zwar chemisch stabilisiert ist, aber trotzdem hydrolysiert werden kann. Zusätzlich ist dieses Derivat in der Lage, Redoxreaktionen aufgrund des Pyridinrings mit positiver Ladung einzugehen.

### 6.11.3 Synthese des carbocyclischen Nicotinsäureanalogons

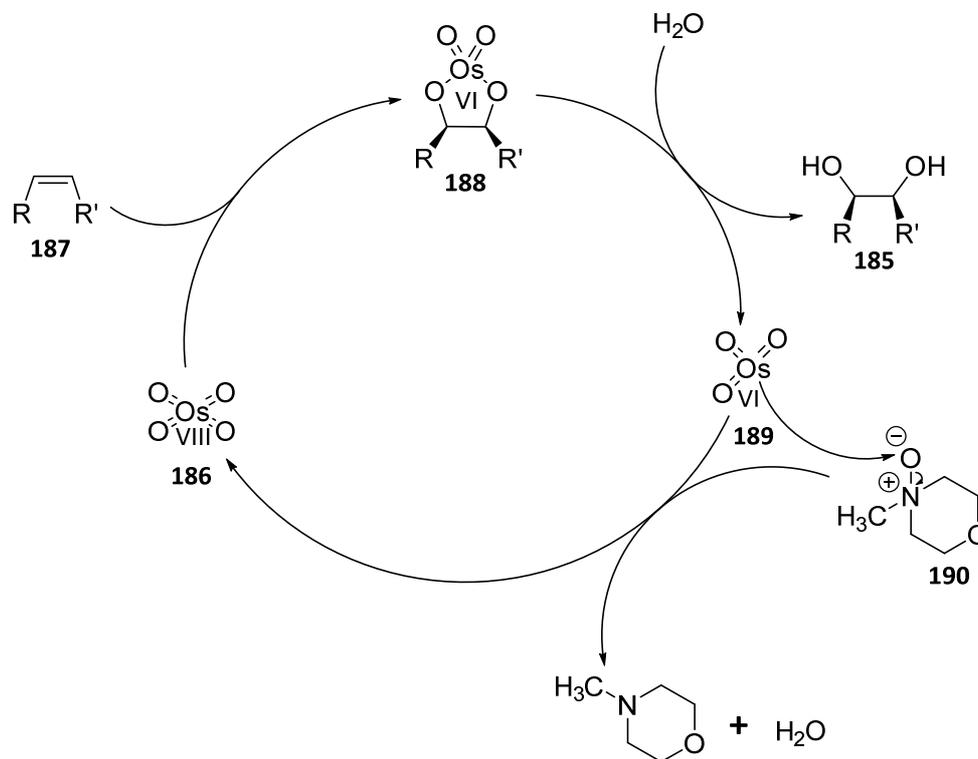
Carbocyclische Nucleoside sind generell Nucleosidanaloga bei denen der Furanosering gegen einen Carbocyclus substituiert ist. Mit dem Austausch des Sauerstoffs gegen eine Methylen-Einheit erhöht sich die Stabilität der Analoga gegenüber hydrolytischem Abbau und macht, durch die fehlende Aminalstruktur, die carbocyclischen Nucleoside metabolisch stabil gegenüber Phosphorylasen.<sup>281,282</sup> Zusätzlich weisen die carbocyclischen Grundgerüste eine deutlich gesteigerte Flexibilität auf, als ein Furanosering, wodurch die Anzahl an Ringkonformationen erhöht ist und im Fall des carbocyclischen Nicotinsäureanalogons eine verbesserte Affinität zu möglichen Bindeproteinen gewährleistet ist.

Carbocyclische Nucleoside können prinzipiell auf zwei konvergenten Syntheserouten dargestellt werden. Zum einen ausgehend vom Natriumcyclopentadienid oder zum anderen vom VINCE-Lactam. Im Fall der Synthese zum carbocyclischen Pyridinnucleosids hat sich die Reaktion nach ZINCKE *et al.* bewährt, bei der eine Aminfunktion mit einem aktivierten Pyridinderivat selektiv verknüpft werden kann.<sup>283</sup> Angesichts des verringerten synthetischen Aufwands und der Bildung einer benötigten 1'-Aminofunktion im Laufe der Syntheseroute wurde ausgehend von dem kommerziell erhältlichen (-)-VINCE-Lactam **183** die Synthese zum carbocyclischen Grundgerüst **184** angelehnt nach den Vorschriften von SINGH *et al.* und SZCZEPANKIEWICZ *et al.* durchgeführt.<sup>266,284</sup>

Begonnen wurde hierbei mit einer Boc-Schätzung des Amins, wobei eine Ausbeute von 88 % der Verbindung **192** erzielt wurden. Die darauffolgende UPJOHN-Dihydroxylierung erforderte die Boc-Schutzgruppe nicht zwangsläufig, erleichterte aber die säulenchromatographische Reinigung und verbesserte das Lösungsverhalten des Lactams. Die UPJOHN-Dihydroxylierung zur Einführung von *cis*-ständigen Hydroxylgruppen an der Doppelbindung gelang unter Verwendung von einer katalytischen Menge OsO<sub>4</sub> und dem Cooxidants *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid·monohydrat. Das Diol **185** konnte in einer Ausbeute von 66 % isoliert werden. Der ablaufende Katalysezyklus ist in **Abb.119** dargestellt.

Initialisiert wird die Dihydroxylierung durch eine 1,3-Cycloaddition des OsO<sub>4</sub> **186** an das Olefin **187**, welches daraufhin einen Osmium-Olefin-Komplex **188** (Osmatester) bildet. Anschließend wird das *cis*-ständige Diol **185** unter Hydrolyse gebildet und die Os(VI)-Verbindung **189** mit

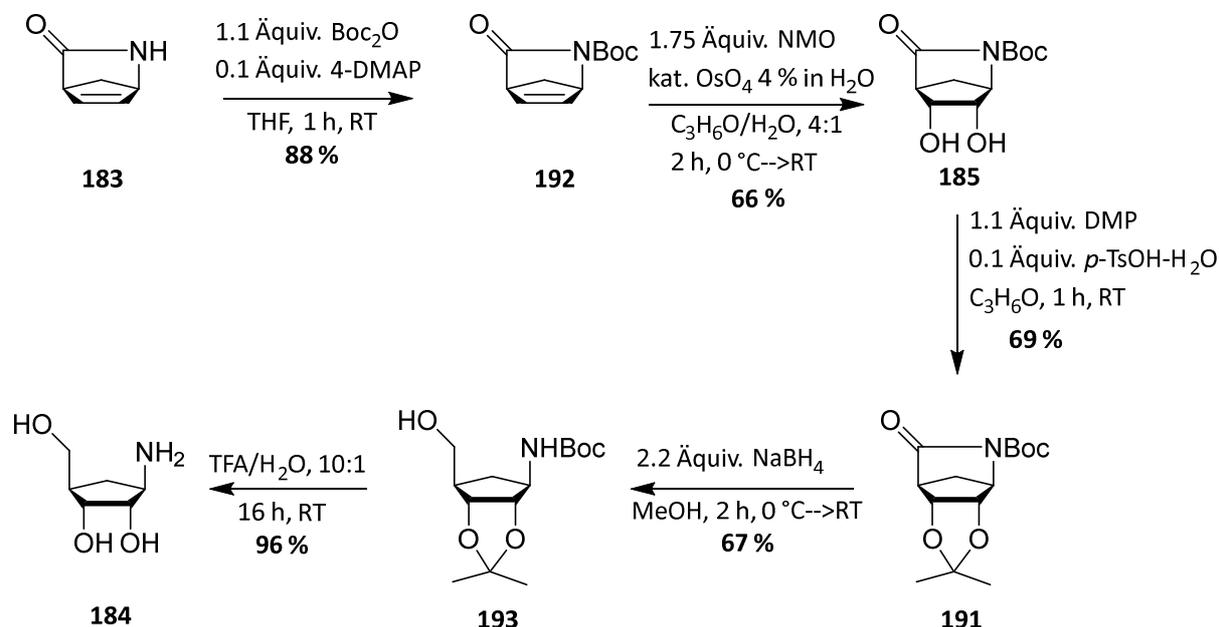
dem Cooxidationsmittels *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid **190** zu der Os(VIII)-Verbindung **186** regeneriert, so dass der Katalysezyklus fortgeführt wird.



**Abb.119:** Mechanistische Darstellung der UPJOHN-Dihydroxylierung.

Die Diolfunktion in 2',3'-Position wurde mit Hilfe von 2,2-Dimethoxypropan (DMP) in Aceton säurekatalysiert mit *para*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) zu einem Isopropyliden geschützt, um auf diese Weise die Löslichkeit für die nachfolgende Reaktion zu verbessern und zudem eine selektive Phosphorylierung an der 5'-Position und anschließender Kupplung zum Nucleosid zu ermöglichen, was sich als nicht effizient herausstellte und deshalb verworfen wurde. Nach Extraktion konnte eine Ausbeute von 69 % des vollgeschützten Lactams **191** isoliert werden. Darauffolgend wurde der Lactamzyklus reaktiv mittels  $\text{NaBH}_4$  geöffnet und zum Alkohol **193** reduziert in einer Ausbeute von 67 % nach säulenchromatographischer Reinigung. Abschließend erfolgte die vollständige Entschützung im sauren Milieu mit Trifluoressigsäure und Wasser, da die zuvor erwähnte Kupplung des phosphorylierten carbocyclischen Grundgerüsts mit der Nicotinsäure nicht gelang. Nach vollständiger Entschützung wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit  $\text{NaOH}$  1 M neutralisiert. Aus der wässrigen Lösung konnte mit Hilfe einer RP-18-säulen-

chromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 96 % das carbocyclische Grundgerüst **184** isoliert werden (**Abb.120**).



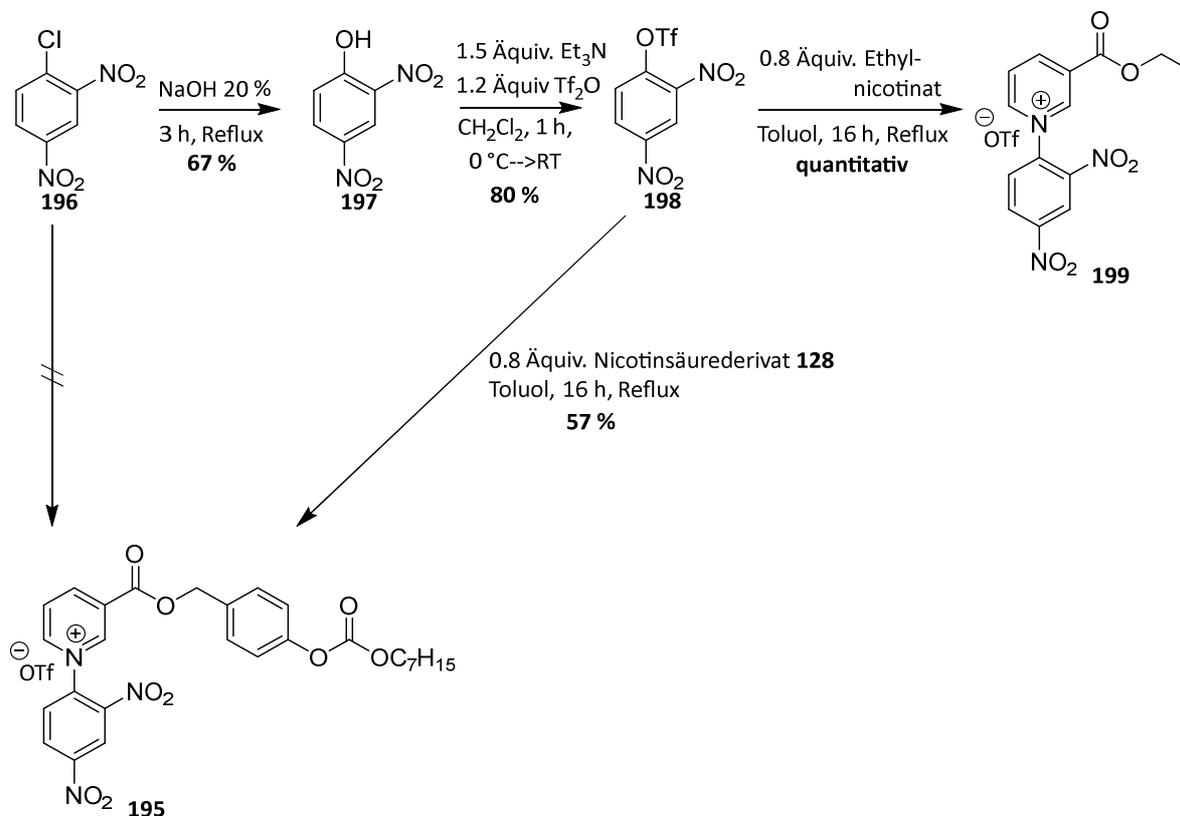
**Abb.120:** Synthese des carbocyclischen Grundgerüsts **184** ausgehend vom (-)-VINCE-Lactams **183**.

Für eine Kupplung des carbocyclischen Grundgerüsts zum Nicotinsäurederivat **194** musste zunächst ein bioreversibel maskiertes *N*-(2,4-dinitrophenyl)-3-carboxylpyridinium Salz **195** synthetisiert werden. Literaturbekannte Synthesen dieser ZINCKE-Salze beginnen mit der Reaktion von dem elektronenarmen 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol **196** und Nicotinamid.<sup>266</sup> Von diesen Reaktionen sollte die Synthese der ZINCKE-Salze auf die maskierte Nicotinsäure übertragen werden. Ausgehend von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol **196** wurde versucht, die bioreversibel maskierte Nicotinsäure **128** zu verknüpfen. Die Reaktion gelang nicht. Hierbei wurden verschiedene Reaktionsparameter verwendet, aber auch die Reaktion in hochsiedenden Lösungsmitteln oder Reaktionen in der Schmelze bei sehr langen Reaktionszeiten führten nicht zum gewünschten Produkt **195**, da die Reaktion anscheinend durch die lange Alkylkette sterisch gehindert wird. Demzufolge wurde ein Wechsel der Chlorid-Abgangsgruppe zu einer besseren Triflat-Abgangsgruppe vorgenommen. Hierfür erfolgte zunächst die Synthese des 2,4-Dinitrophenols **197** aus dem 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol **196** mit Hilfe von Natriumhydroxid in der Hitze. Die Bildung des Phenols **197** verlief dabei über einen MEISENHEIMER-Komplex, welcher an seiner roten Färbung identifizierbar war.<sup>285</sup> Es konnte eine 67 %ige Ausbeute erzielt werden.

Die Einführung der sehr guten Triflat-Abgangsgruppe wurde mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid ( $\text{Tf}_2\text{O}$ ) unter basischen Bedingungen durchgeführt. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung konnte der aktivierte Dinitroaromat **198** in 80 % Ausbeute erhalten werden.

Die Reaktion des Nitroaromaten **198** mit der bioreversiblen maskierten Nicotinsäure **128** wurde im hochsiedenden Lösungsmittel Toluol durchgeführt. Nach 16 h Reaktionszeit unter Reflux war eine eindeutige Rotfärbung durch das ZINCKE-Salz **195** zu erkennen. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten und es konnte eine Ausbeute von 57 % erzielt werden.

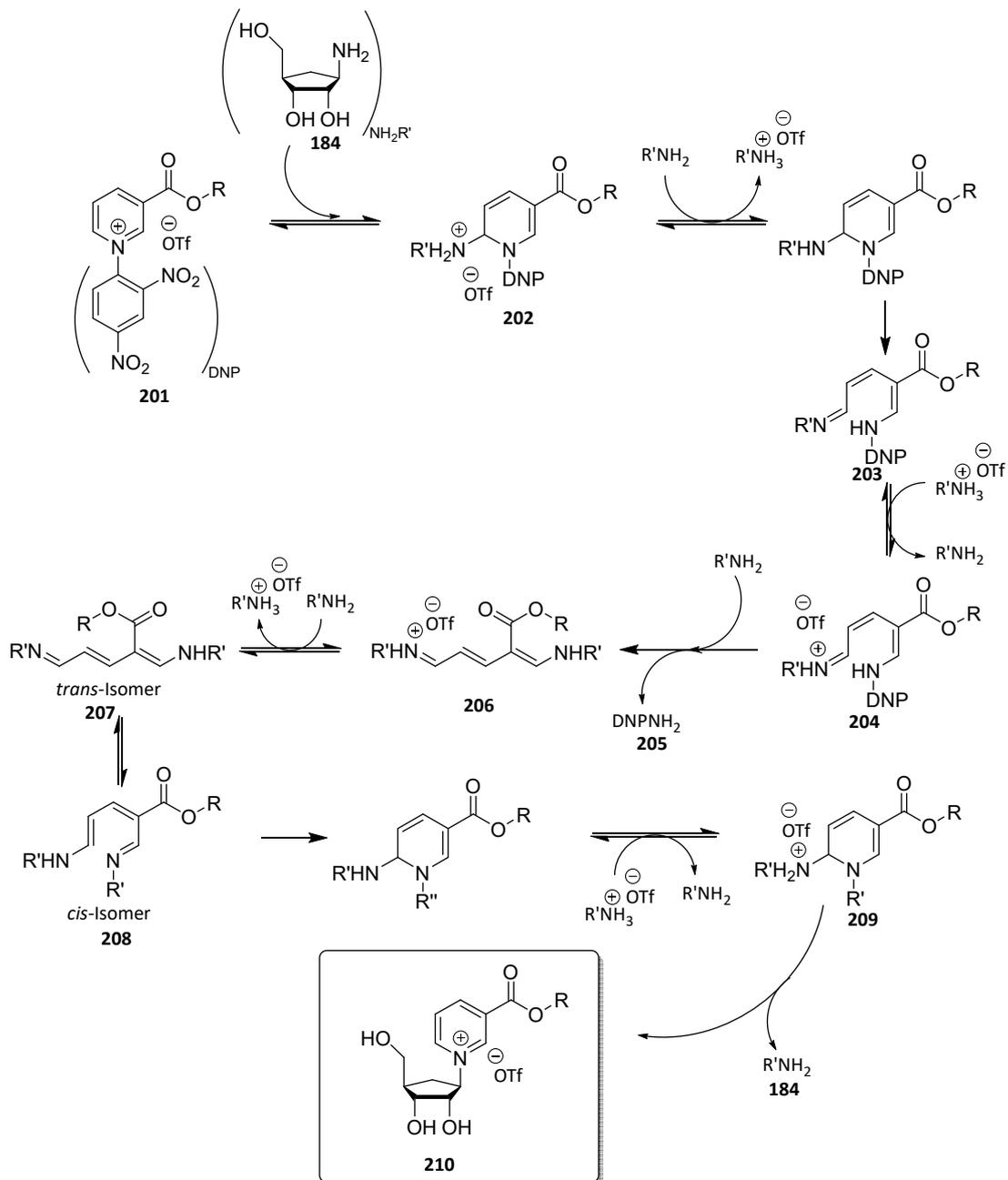
Zusätzlich sollte das Ethylnicotinat-ZINCKE-Salz **199** zur Erprobung der Reaktionsparameter synthetisiert werden. Hierfür wurde die gleichen Bedingungen verwendet wie für die bioreversibel maskierte Nicotinsäure **195**. Im Laufe der Reaktion fiel in diesem Fall das Produkt aufgrund der erhöhten Polarität aus der Lösung aus und konnte durch Filtration und Waschen mit Dichlormethan gereinigt werden. Das Ethylnicotinat-ZINCKE-Salz **199** konnte in einer quantitativen Ausbeute erhalten werden (**Abb.121**).



**Abb.121:** Synthese des bioreversibel maskiertem ZINCKE-Salzes **195** und des Ethylnicotinat-ZINCKE-Salzes **199**.



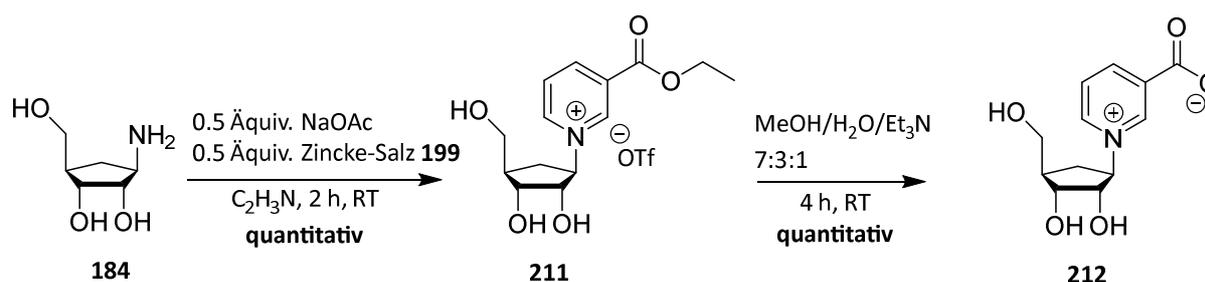
zwitterionischen Intermediats weiter reagiert. Hierdurch kommt es zum Ringschluss. In der Literatur wird dieser Schritt als geschwindigkeitsbestimmend beschrieben. Im Fall der bioreversibel maskierten Nicotinsäure kann sich vermutlich das benötigte Isomer aufgrund des sterisch anspruchsvollen Restes nicht bilden und das Zwischenprodukt reagiert nicht weiter. Der Reaktionsmechanismus würde weiter unter Protonierung des Amins in der 2-Position **209** und dessen Eliminierung zum gewünschten Pyridiniumprodukt **210** verlaufen (**Abb.123**).<sup>286</sup> Die Reaktion teilt sich also in 4 Unterschritte auf: **1. Nucleophile Addition**, **2. Ringöffnung**, **3. cis-trans-Konvertierung**, und der **4. Ringschluss**.



**Abb.123:** Schematische Darstellung des ZINCKE-Reaktionsmechanismus.<sup>286</sup>

Für die Validierung der Ergebnisse aus der vorangegangenen ZINCKE-Reaktion sollte ein Umsatz des Ethylnicotinat-ZINCKE-Salz **199** mit dem Amin **184** geprüft werden. Hierfür wurden 2.0 Äquiv. des Amins **184** und 1.0 Äquiv. von Natriumacetat in Acetonitril suspendiert und langsam das ZINCKE-Salz **199** gelöst in Acetonitril zugetropft. Wie zuvor färbte sich die Reaktionslösung direkt rötlich. Nach einer Reaktionszeit von ungefähr 10 Minuten war keine Rotfärbung zu erkennen und es lag ein gelber Niederschlag vor. Dieser Niederschlag, bei dem es sich um das Dinitroanilin handelte, konnte mittels Filtration abgetrennt werden. Nachdem die flüchtigen Bestandteile des Filtrats entfernt wurde, konnte der Rückstand RP-18-säulenchromatographisch gereinigt werden und das Produkt **211** in quantitativer Ausbeute erhalten werden, somit konnte gezeigt werden, dass die ZINCKE-Reaktion mit Nicotinsäurederivaten durchaus möglich ist, aber sterisch anspruchsvolle Derivate die Reaktion beeinträchtigen können. Es handelt sich ausschließlich um das  $\beta$ -Anomer, da aufgrund der Stellung der 1-Aminofunktion sich lediglich das  $\beta$ -Anomer bilden kann und keine Epimerisierung während der Reaktion stattfindet.

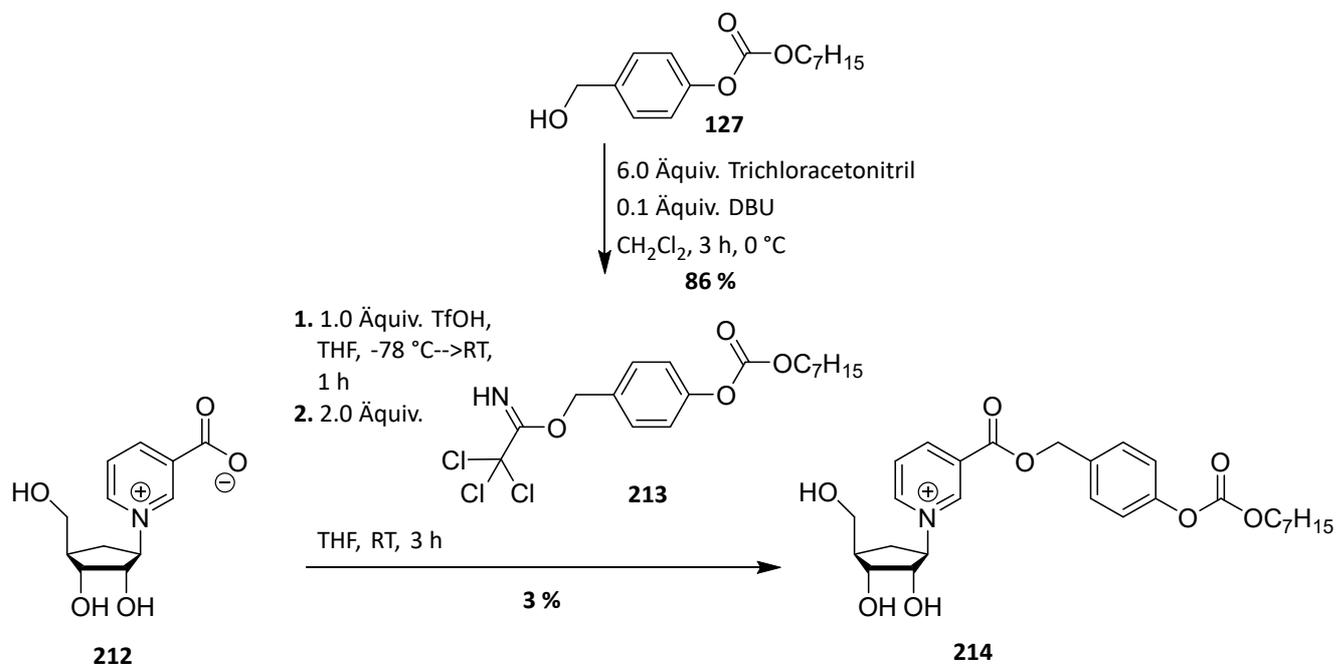
Aus diesem Grund wurde versucht, das carbocyclische Nucleosid **211** zu entschützen und daraufhin eine Veresterung mit der bioreversiblen Maske durchzuführen. Die Verseifung wurde in einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Triethylamin bewerkstelligt. Das entschützte Produkt **212** wurde daraufhin ebenfalls nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung in quantitativer Ausbeute erhalten (**Abb.124**).



**Abb.124:** Synthese des carbocyclischen Nicotinsäurenucleosids **212**.

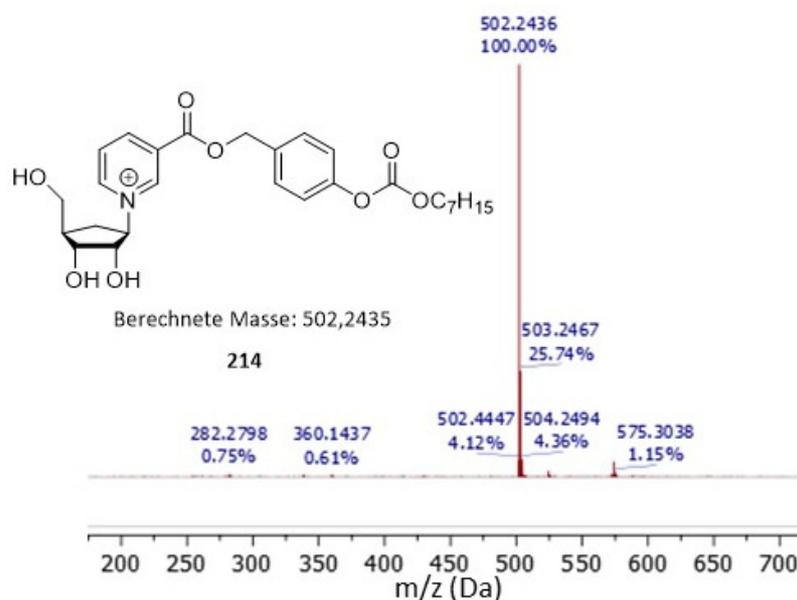
Problematischer sollte sich die Veresterungsreaktion mit der bioreversiblen Maske darstellen, da aus Vorversuchen mit dem Nicotinsäurenucleosid die Inertheit der Carboxylfunktion aufgrund des zwitterionischen Charakters bekannt war. Daher sollte zunächst das Carboxylat einer Reaktion zugänglich gemacht werden, indem dieses protoniert wird und anschließend

verestert wird. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit den ungeschützten Hydroxygruppen des carbocyclischen Nucleosids **212** und zur chemoselektiven Veresterung der Carboxylgruppe mit der bioreversiblen Maske wurde diese mit einer Trichloracetimidat-Abgangsgruppe versehen, damit daraufhin eine synergistische säurekatalysierte Veresterung durchgeführt werden kann.<sup>287</sup> Die Einführung der Trichloracetimidat-Abgangsgruppe gelang mit einer Ausbeute von 86 % des Produkts **213** unter den etablierten Bedingungen (Kapitel 6.8). Für die Veresterung wurde zunächst das carbocyclische Nucleosid **212** in THF gelöst und auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt, da die Trifluormethansulfonsäure eines der höchsten Protonierungsvermögen aufweist und sich ein Triflat-Gegenion bildet, wurde diese Säure, gelöst in THF, zum Protonieren verwendet (**Abb.125**). Nach 1 h langsamen Erwärmens auf Raumtemperatur wurde anschließend innerhalb von 30 Minuten die aktivierte bioreversible Maske **213**, gelöst in THF, zugegeben. Da sich nach 3 h Reaktionszeit kein weiterer Umsatz zeigte, wurde die Reaktion aufgearbeitet. Nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte maskierte, carbocyclische Nucleosid **214** mit einer sehr geringen Ausbeute von 3 % isoliert werden. Weitere Optimierungsversuche über die Änderung des Lösungsmittels, der Reaktionszeit oder langsamerer Zugabe der bioreversiblen Maske **213** resultierten in allen Versuchen in keinem Produkt (**Abb.125**). Vermutlich ist die Veresterung an dem Zwitterion nicht zielführend, da in allen Fällen das carbocyclische Edukt **212** reisoliert werden konnte.



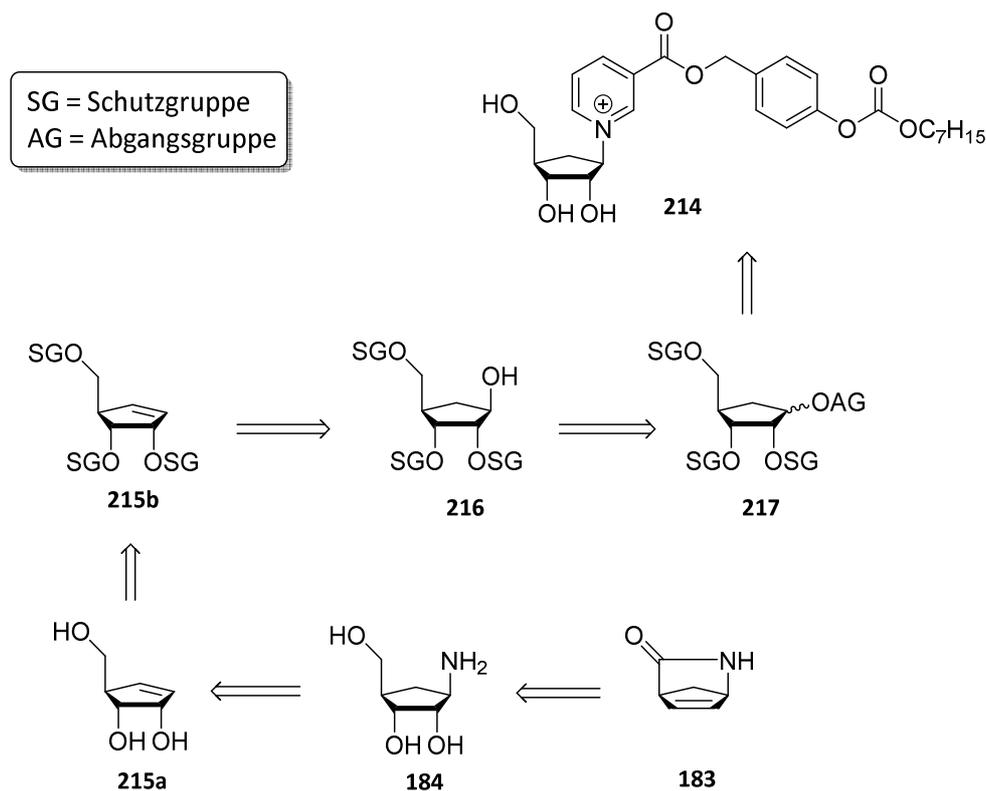
**Abb.125:** Synthese des bioreversibel maskiertem carbocyclischem Nicotinsäureanalogon **214**.

Das HRMS-ESI-Spektrum zeigt die gewünschte Masse des Molekülpeaks für das bioreversibel maskierte, carbocyclische Nucleosid **214** (Abb.126).



**Abb.126:** HRMS-ESI-Spektrum des carbocyclischen Nucleosids **214** im positivem Messmodus.

Die isolierte Menge des carbocyclischen Nucleosids **214** reichte unglücklicherweise nicht für die nachfolgende Phosphorylierung aus und deshalb wurde hinsichtlich zeitlicher Gründe eine Synthese des carbocyclischen Nicotinderivats nicht weiterverfolgt. Für eine zukünftige erfolgreiche Syntheseführung bietet sich alternativ die in **Abb.127** dargestellte Syntheseroute an. Hierbei erfolgt ausgehend vom (-)-VINCE-Lactam **183** über den 1-Amino-carbozyklus **184** eine Diazotierungs-Eliminierungsreaktion zum Olefin **215**. Anschließend würde eine Hydroborierung folgen, zum 1-OH-Cyclopentanol **216**, womit die Einführung einer geeigneten Abgangsgruppe, z.B. die Trichloracetimidat-Gruppe (Kapitel **6.8**), möglich ist. Hierdurch würde eine Alternative gebildet, zu der empfindlichen ZINCKE-Reaktion und die Knüpfung des carbocyclischen Grundgerüsts **217** mit der bioreversibel maskierten Nicotinsäure zum gewünschten Nucleosid **214** wäre zu bewerkstelligen (**Abb.127**). Die Steuerung der Stereoselektivität ohne anomeren Effekt bleibt dabei zu erproben.



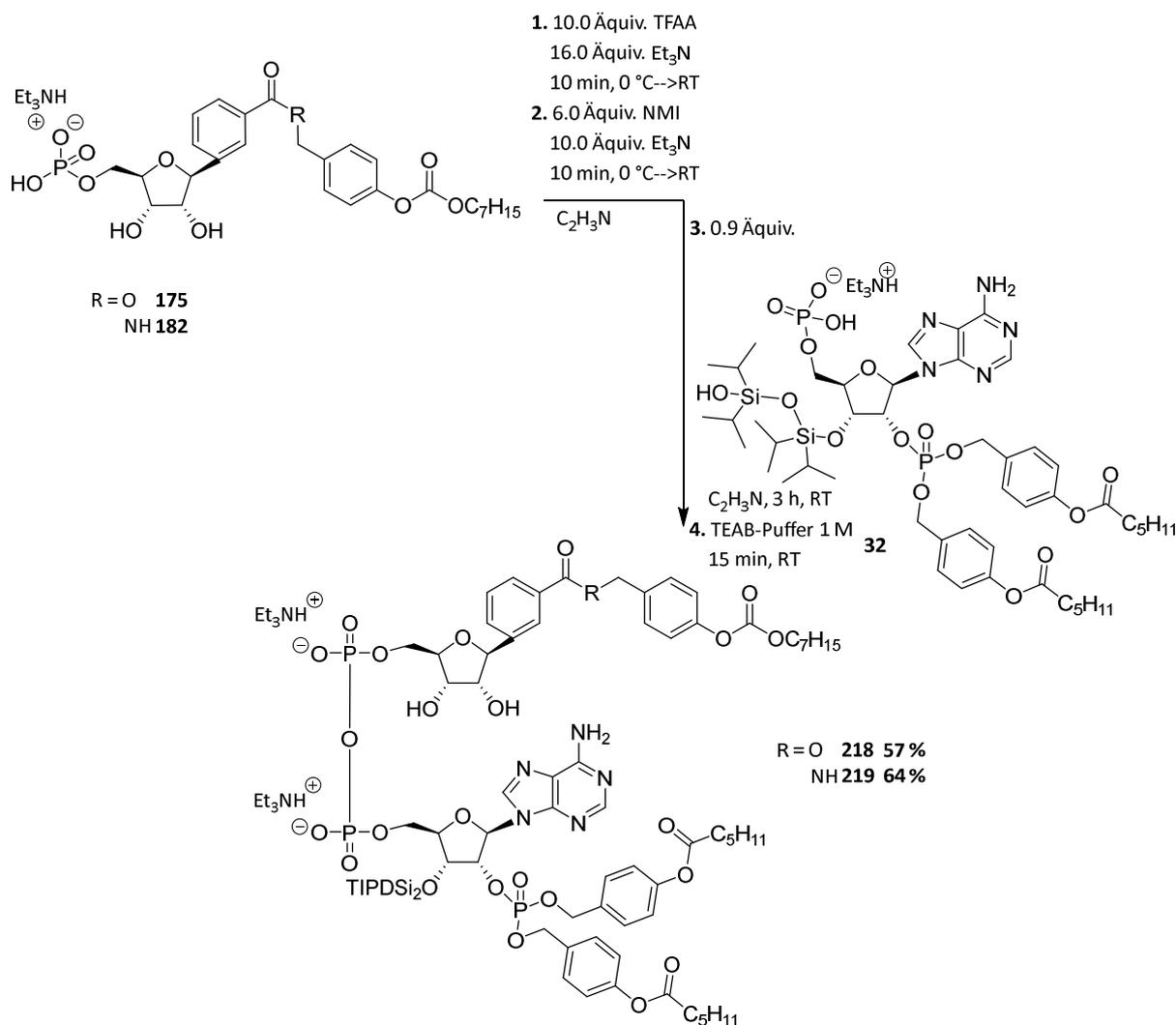
**Abb.127:** Alternative Retrosynthese zum carbocyclischen Nicotinsäureanalogon **214**.

### 6.12 Synthese des C-nucleosidischen NAADP-Analogons

Synthetisch abschließend sollte zum einen das C-nucleosidische Nicotinsäurederivat **175** und zum anderen das C-nucleosidische Nicotinsäurederivat **182** zu dem NAADP-Analogon und NADP-Analogon mit Adenosin-2',5'-diphosphat gekuppelt werden. Zur Bildung der Pyrophosphatbindung sollte die etablierte Methode von BOGACHEV *et al.* zum Einsatz kommen. Aktiviert wurden die Monophosphate von der Nicotinsäure, bzw. Nicotinamid, da unter Verwendung dieser Methode die 2',3'-Positionen vorübergehend geschützt werden und somit keine Nebenreaktionen eingehen können. Als Adenosinbaustein wurde zunächst das ausschließlich bioreversibel maskierte Diphosphat **32** verwendet, um auf diese Weise die Membrangängigkeit und die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität des C-nucleosidischen Analoga mit geringem experimentalen Aufwand zu validieren.

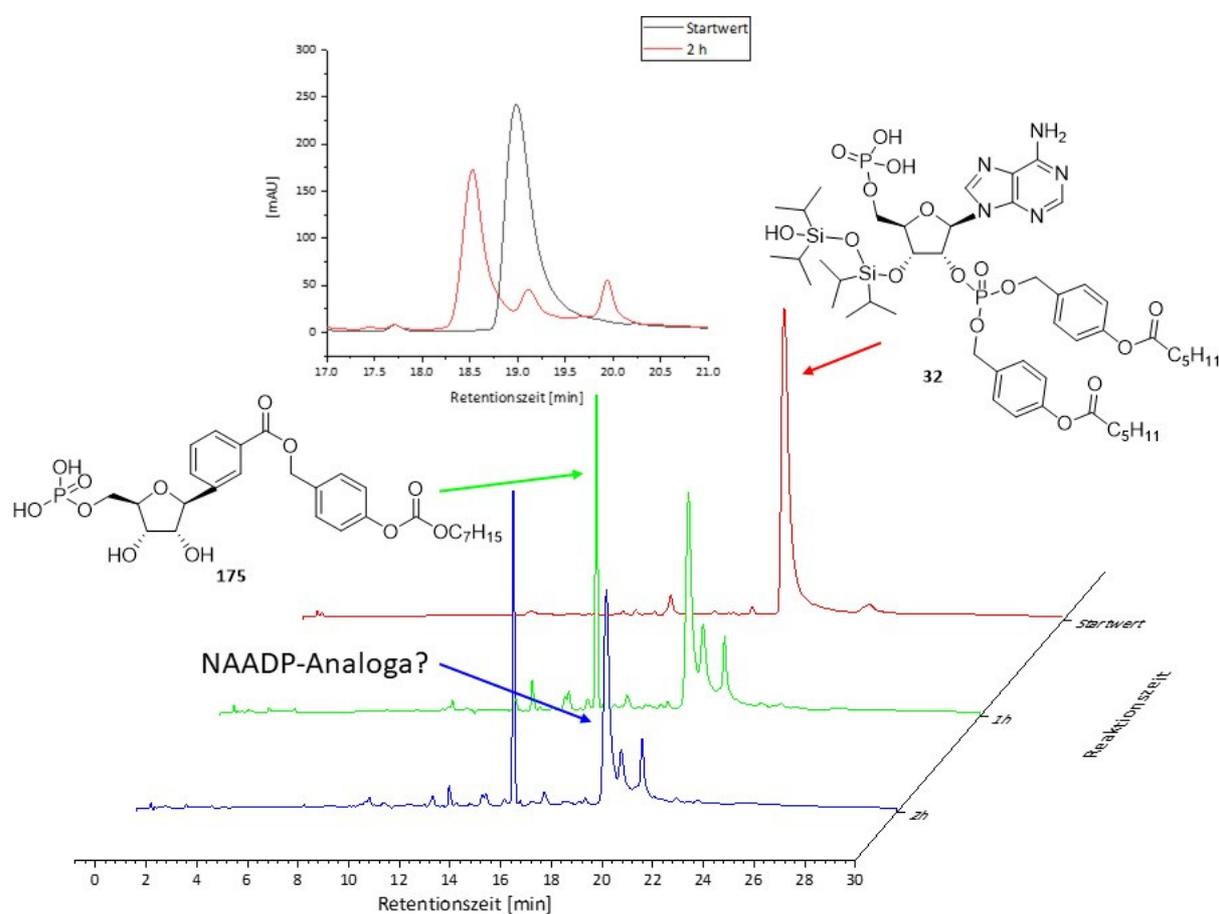
Für die Kupplung wurde in einem separaten Reaktionskolben die Trifluoressigsäureanhydrid und Triethylamin in Acetonitril bei 0 °C gerührt. Diese Reaktionslösung wurde daraufhin langsam bei 0 °C zu dem in Acetonitril gelöstem C-nucleosidischem Monophosphat getropft. Nach 10 Minuten Reaktionszeit wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der

Rückstand wurde wiederum in Acetonitril gelöst und bei 0 °C Triethylamin und *N*-Methylimidazol zugegeben. Nach 10-minütigem Rühren wurden 0.9 Äquiv. des Adenosin-2',5'-diphosphats **32** in Acetonitril zugegeben, welches zuvor dreimal mit Acetonitril coevaporiert wurde. Mittels HPLC-Reaktionsverfolgung konnte nach 3 h ein vollständiger Umsatz beobachtet werden, worauf zur Beendigung der Reaktion und zum Abspalten der Trifluoracetylenschutzgruppe in 2',3'-Position an den C-nucleosidischen Bausteinen TEAB-Puffer 1 M zugegeben wurde und anschließend nach 15-minütigem Rühren das Acetonitril möglichst vollständig im Vakuum entfernt wurde. Abschließend erfolgte eine RP-18-säulenchromatographische Reinigung mit der wässrigen Phase und einem Acetonitril/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradienten. Für das Nicotinsäureanalogon **175** konnte eine Ausbeute von 57 % und für das Nicotinamidanalogen **182** eine Ausbeute von 64 % erhalten werden (**Abb.128**).



**Abb.128:** Synthese zum Silyl-geschütztem C-nucleosidischem NAADP-Derivat **218** und zum NADP-Derivat **219**.

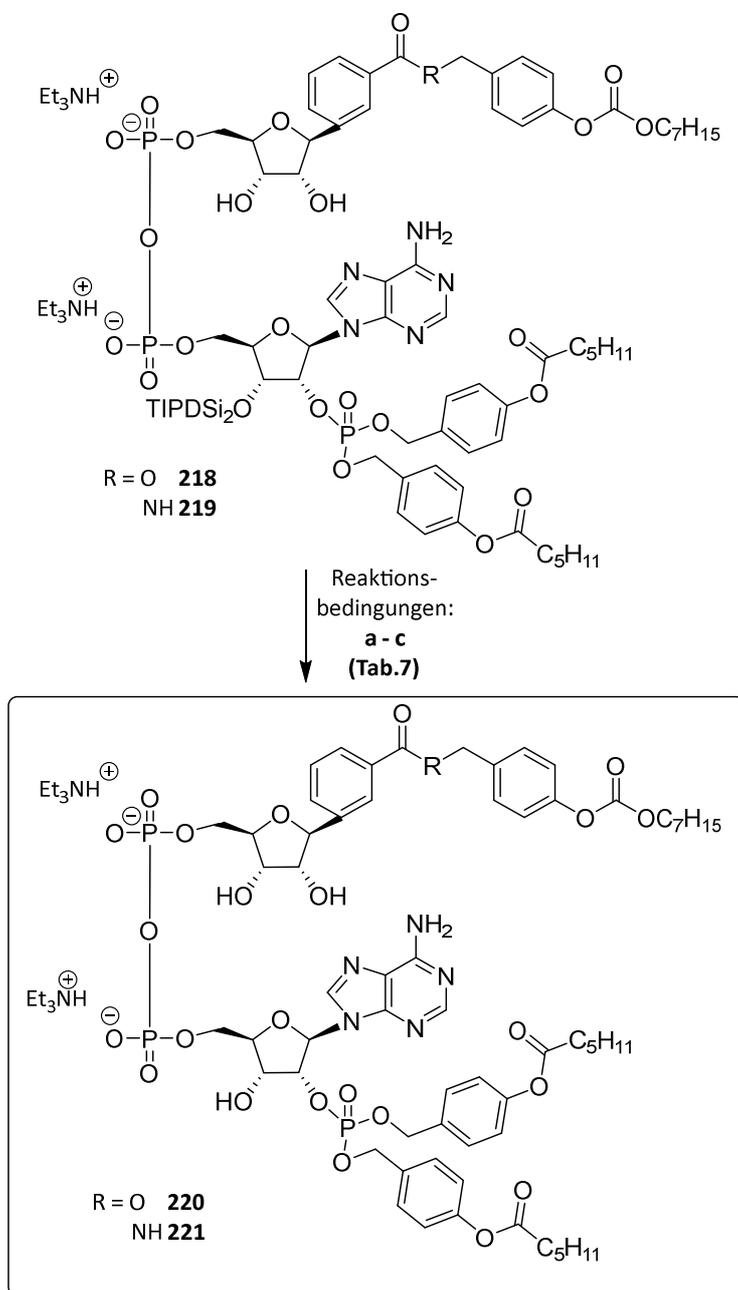
Die HPLC-Reaktionsverfolgung zeigt die Abnahme des im Unterschuss verwendeten Adenosin-2',5'-diphosphats **32**. Bereits nach 1 h Reaktionszeit ist der größte Anteil des Adenosin-2',5'-diphosphats **32** verbraucht und zwei neue Peaks entstanden, wobei die Retentionszeit des vermeintlichen Produkts **218** sehr ähnlich zu dem des Adenosin-2',5'-diphosphats **32** ist (**Abb.129**). Der zweite, entstandene Peak bei einer Retentionszeit von 21 min konnte mit Hilfe der spezifischen UV-Absorption als *N*-Methylimidazol identifiziert werden. Daraus wird zudem ersichtlich, dass das Adenosin-2',5'-diphosphat **32** im Unterschuss eingesetzt werden muss, um die säulenchromatographische Reinigung zu erleichtern.



**Abb.129:** HPLC-Reaktionsverfolgung der Synthese zum Pyrophosphat **218**.

Abschließend sollte nun die Spaltung der Silylschutzgruppe in 3'-Position des Adenosins erfolgen. Als herausfordernd galt hierbei die Verhinderung der Migration des 2'-Phosphats und der effizienten Spaltung der stabilen Silylschutzgruppe. Aus Vorarbeiten von ALEXANDRA RUTHENBECK war bereits bekannt, dass der Einsatz von gepuffertem TBAF, LEWISSÄUREN oder *N*-Iodsuccinimid ungeeignet sind, da diese die Phosphatmigration initialisieren unter Abspaltung der

Masken am 2'-Phosphat.<sup>155</sup> Als zielführend zeigte sich hier die Verwendung von TREAT-HF als Fluoridquelle, weshalb diese Methode zunächst auf das NAADP-Analogon angewendet werden sollte (**Abb.130**).



**Abb.130:** Entschützung zu den C-nucleosidischen NAADP-Analogon **220** und dem NADP-Analogon **221**.

In **Tab. 7** ist die Übersicht der Reaktionsbedingungen für die Silylschutzgruppenspaltung dargestellt. Für die Spaltung der Silyl-Schutzgruppe wurde eingangs die etablierte Bedingung mit TREAT-HF als Fluorid-Quelle gewählt (**Variante a**). Die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung zeigte die Bildung von mehreren Produkten bei denen es sich vermutlich um

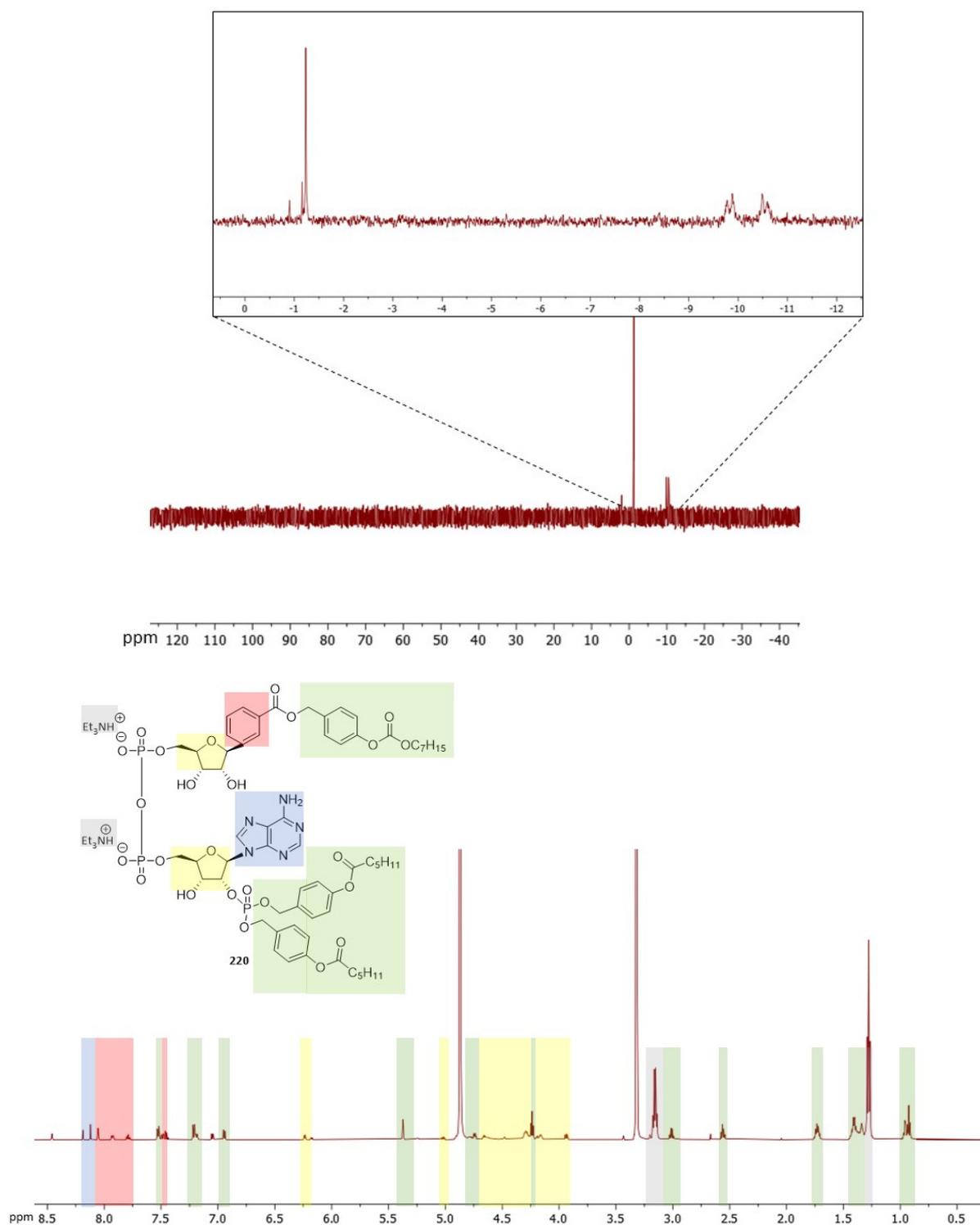
die Nebenprodukte mit migriertem Phosphat und abgespalteter bioreversibler Maske handelt. Die leicht sauren Bedingungen bei der Verwendung des TREAT-HF-Reagenzes begünstigen eine Phosphatmigration. Zusätzlich konnte nach einer Reaktionszeit von 8 h kein vollständiger Umsatz beobachtet werden, weshalb zur Vermeidung der Bildung von weiteren Nebenprodukten die Reaktion abgebrochen wurde. Tris(dimethylamino)sulfonium-difluorotrimethylsilicat (TASF) stellt eine neutrale Fluorid-Quelle dar, welche effizient Silylschutzgruppen spalten kann und deshalb oft in Totalsynthesen bei empfindlichen Naturstoffen mit verschiedenen funktionellen Gruppen verwendet wird.<sup>288</sup> Aus diesem Grund sollte eine Anwendung von TASF bei der Entschützung der Silylschutzgruppe erprobt werden. Bei der Entschützung unter Einsatz von 2.0 Äquiv. TASF als Fluorid-Quelle in Acetonitril bei 0 °C zeigte dünnschichtchromatographisch innerhalb von 1 h einen vollständigen Umsatz, wobei wiederum die Bildung von mehreren Nebenprodukten beobachtet werden konnte (**Variante b**). Es ist bekannt, dass TASF ein „nacktes“-Fluorid bildet, welches eine hohe Nucleophilie aufweist und so die Phosphatmigration initialisieren kann oder die bioreversiblen Schutzgruppe spalten kann. Daher wurde in einer weiteren **Variante c** neben den 2.0 Äquiv. TASF 4.0 Äquiv. H<sub>2</sub>O zugegeben, um auf diese Weise die Nucleophilie des Fluorids herabzusetzen und ausschließlich die Spaltung der Silylschutzgruppe zu erzielen.<sup>289</sup> Nach 1 h Reaktionszeit konnte lediglich die Bildung von dem vermeintlichen Produktpot beobachtet werden, weshalb die Reaktion mit der Zugabe von Kieselgel beendet wurde. Das gewünschte C-nucleosidische NAADP-Analogon **220** konnte nach RP-18-säulenchromatographischer Reinigung unter Verwendung von einem Acetonitril/TEAB-Puffer (0.05 M)-Gradienten in 62 %iger Ausbeute isoliert werden. Analog wurde das NADP-Mimetikum **221** synthetisiert in einer Ausbeute von 55 %. In beiden Fällen wiesen die Produkte einen amphiphilen Charakter auf und neigten zur Schaumbildung.

Der Versuch eines Ionenaustausches von Triethylammonium-Gegenionen zu den natürlichen Natrium-Gegenionen misslang, da ausschließlich eine Zersetzung die Folge war und kein Produkt erhalten werden konnte, daher wurden die Produkte mit Triethylammonium-Gegenionen verwendet. Die Gegenionen sollten keinen Einfluss auf die biologischen Untersuchungen haben, da diese meist außerhalb der Zelle gegen Kationen aus dem verwendeten Puffer der jeweiligen Bioassays austauschen.

**Tab.7:** Übersicht der Reaktionsbedingungen für die Silylgruppenentschützung.

<i>Variante</i>	<i>Bedingungen</i>	<i>Resultate</i>
<b>a</b>	12.0 Äquiv. TREAT-HF, THF, 0 °→RT, 8 h	viele nicht trennbare Produkte, kein vollständiger Umsatz
<b>b</b>	2.0 Äquiv. TASF, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 0 °C, 1 h	schnelle Spaltung, erhöhte Phosphatmigration
<b>c</b>	2.0 Äquiv. TASF, 4.0 Äquiv. H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 0 °C, 1 h	62 % NAADP-Analogon <b>220</b> 55 % NADP-Analogon <b>221</b>

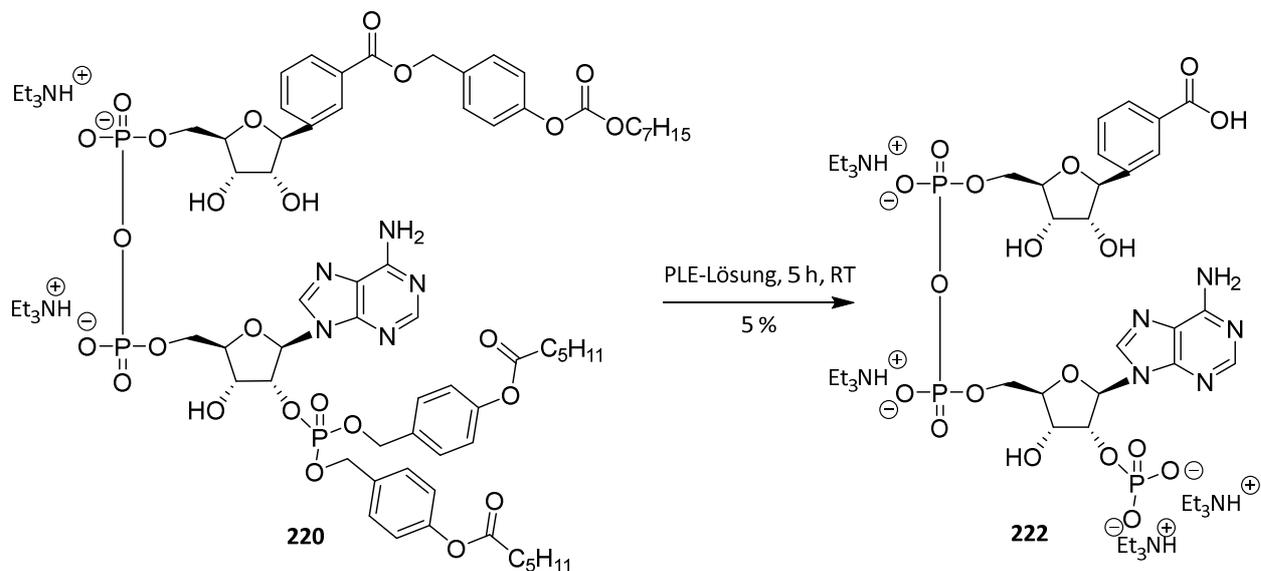
Die Synthese zum C-nucleosidischem NAADP-Analogon **220** und zum C-nucleosidischem NADP-Analogon **221** waren erfolgreich. Die beiden Verbindungen konnten in der Folge für biologische Untersuchungen verwendet werden und auf ihre Membrangängigkeit und deren Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Aktivität untersucht werden. In **Abb.131** sind die zugehörigen <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektren dargestellt, welche die erfolgreiche Synthese des NAADP-Analogons **220** bestätigen.



**Abb.131:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (oben) und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (unten) des NAADP-Analogons **220**.

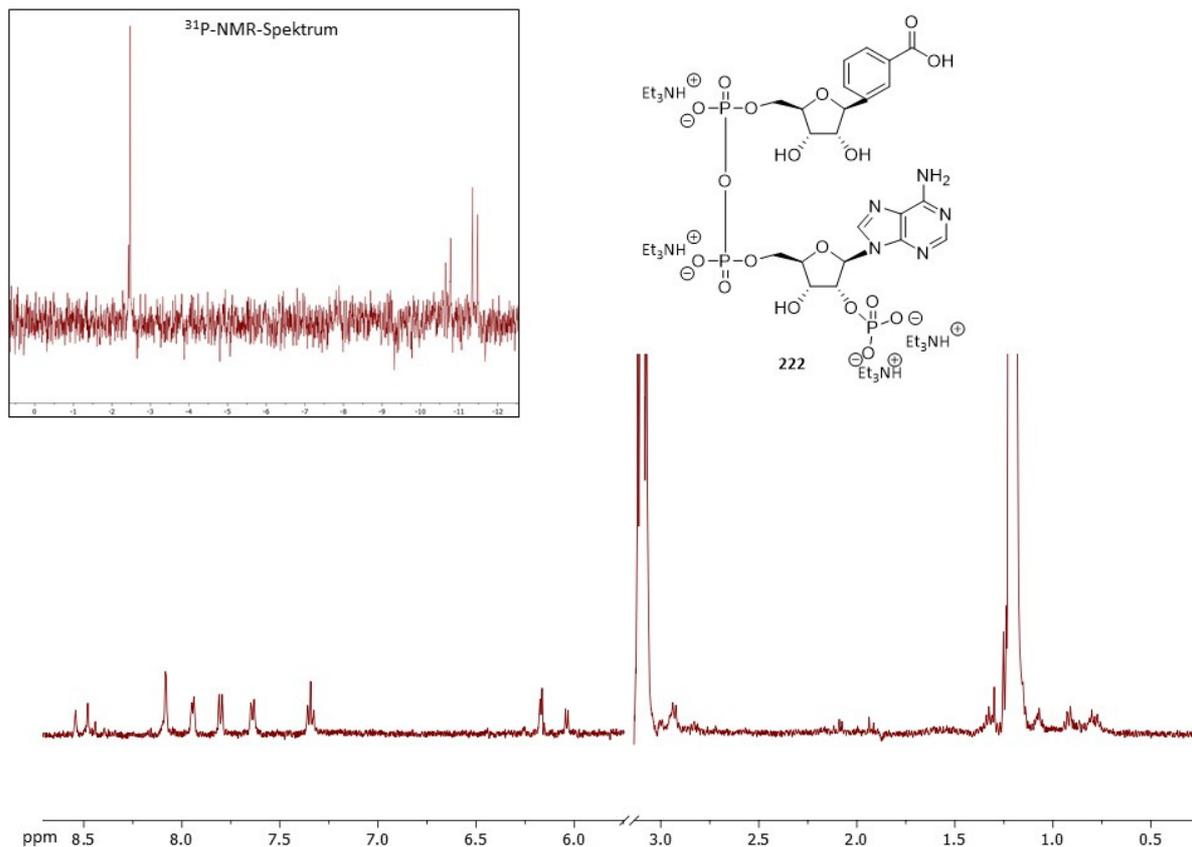
Falls eine Membrangängigkeit gegeben ist, war es von Interesse eine Negativkontrolle zur Verfügung zu haben und einen aktiven Transport der Analoga durch die Zellmembran auszuschließen. Aus diesem Grund wurde in einer gezielten enzymatischen Hydrolyse mit PLE-Lösung über 5 h die bioreversiblen Schutzgruppen gespalten. Nach RP-18-säulen-

chromatographischer Reinigung wurde das entschützte C-nucleosidische NAADP-Analogon **222** in 5 % Ausbeute erhalten (**Abb.132**).



**Abb.132:** Enzymatische Hydrolyse mit PLE-Lösung zur Synthese des ungeschützten C-nucleosidischen NAADP-Analogon **222** als Negativkontrolle für die Untersuchung zur Membrangängigkeit.

In dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **222** können die Protonensignale der Benzoesäure und des Adenins, sowie die anomerischen Protonen erkannt werden. Zudem sind keine Signale der abgespaltenen Maskierungen zu erkennen, wodurch die erfolgreiche Spaltung der Maskierungen bestätigt werden kann (**Abb.133**). Im  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum wird die Integrität der Verbindung **222** bestätigt, dabei kann eine Phosphatmigration nicht ausgeschlossen werden und ist unter den leicht basischen Spaltungsbedingungen begünstigt.



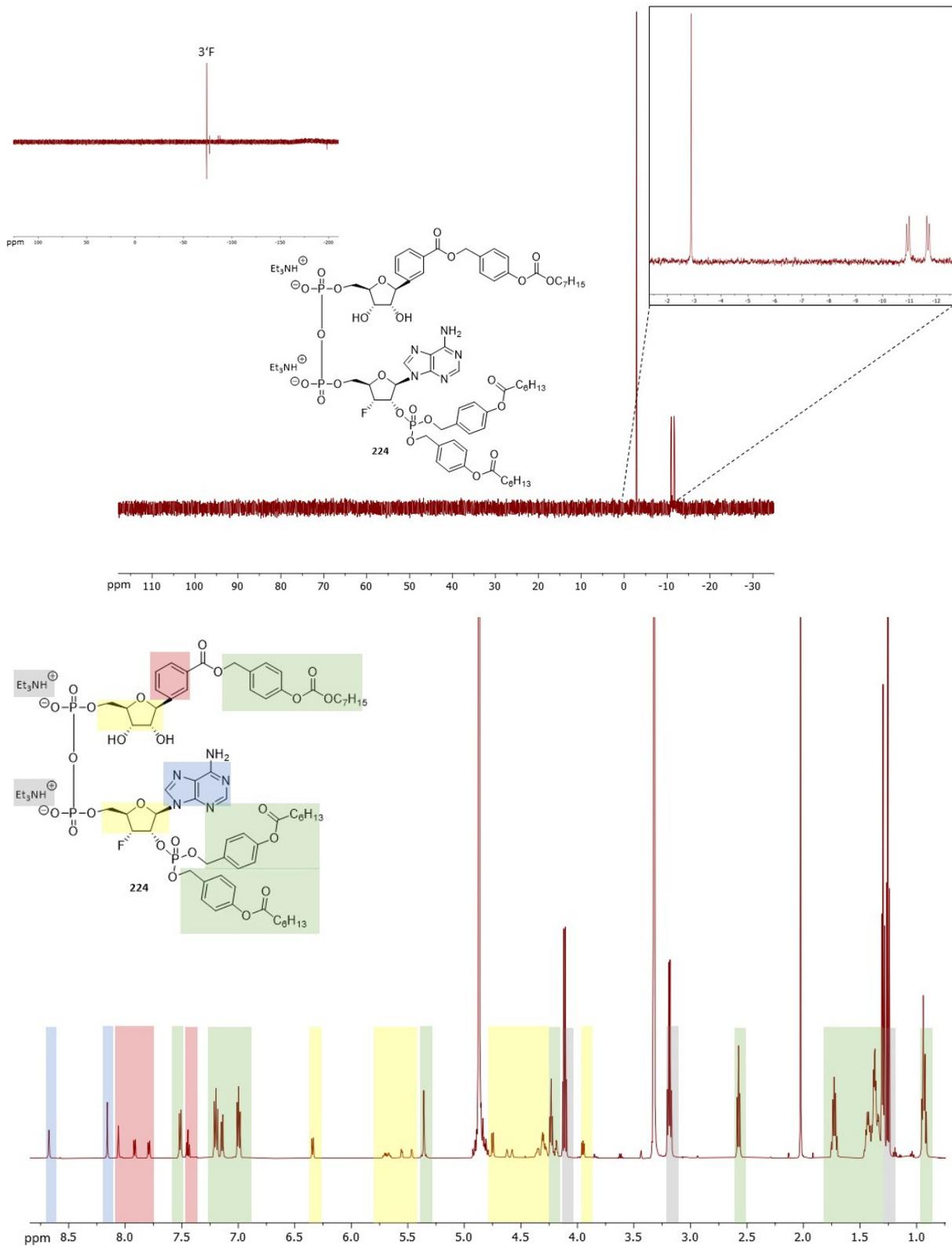
**Abb.133:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums und des  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums des unmaskierten 3'OH-NAADP-Analogos **220**.

Das nicht maskierte NAADP-Analogon **222** sollte nicht in der Lage sein passiv, durch die Membran zu diffundieren und sollte in der Folge keine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität besitzen.

In Zusammenarbeit mit SARAH POST, welche den bioreversibel maskierten 3'Fluor-Adenosinbaustein **223** zur Verfügung gestellt hat, wurde im Folgenden ein NAADP-Analogon nach den bekannten Reaktionsbedingungen synthetisiert. Der 3'Fluor-Adenosinbaustein ist hierbei symmetrisch mit zwei bioreversiblen Maskierungen geschützt. Als entscheidender Vorteil zum C-nucleosidischen NAADP-Analogon **220** ist die Unterdrückung der Phosphatmigration, auf die in Kapitel **6.13** näher eingegangen wird. Die Kupplung des C-nucleosidischen Nucleotids **175** und des 3'Fluor-Adenosinbausteins **223** konnte in einer mit den zuvor durchgeführten Kupplungen mit einer vergleichbaren Ausbeute von 57 % realisiert werden (**Abb.134**). Die bei dem 3'F-Adenosinbaustein **223** verwendeten jeweils um ein Kohlenstoffatom längeren Alkylketten der bioreversiblen Schutzgruppen zur Maskierung des 2'-Phosphats haben einen geringfügigen Einfluss auf die Polarität des Analogons **224**, da aber zudem die Substitution der



## 6 Resultate und Diskussion

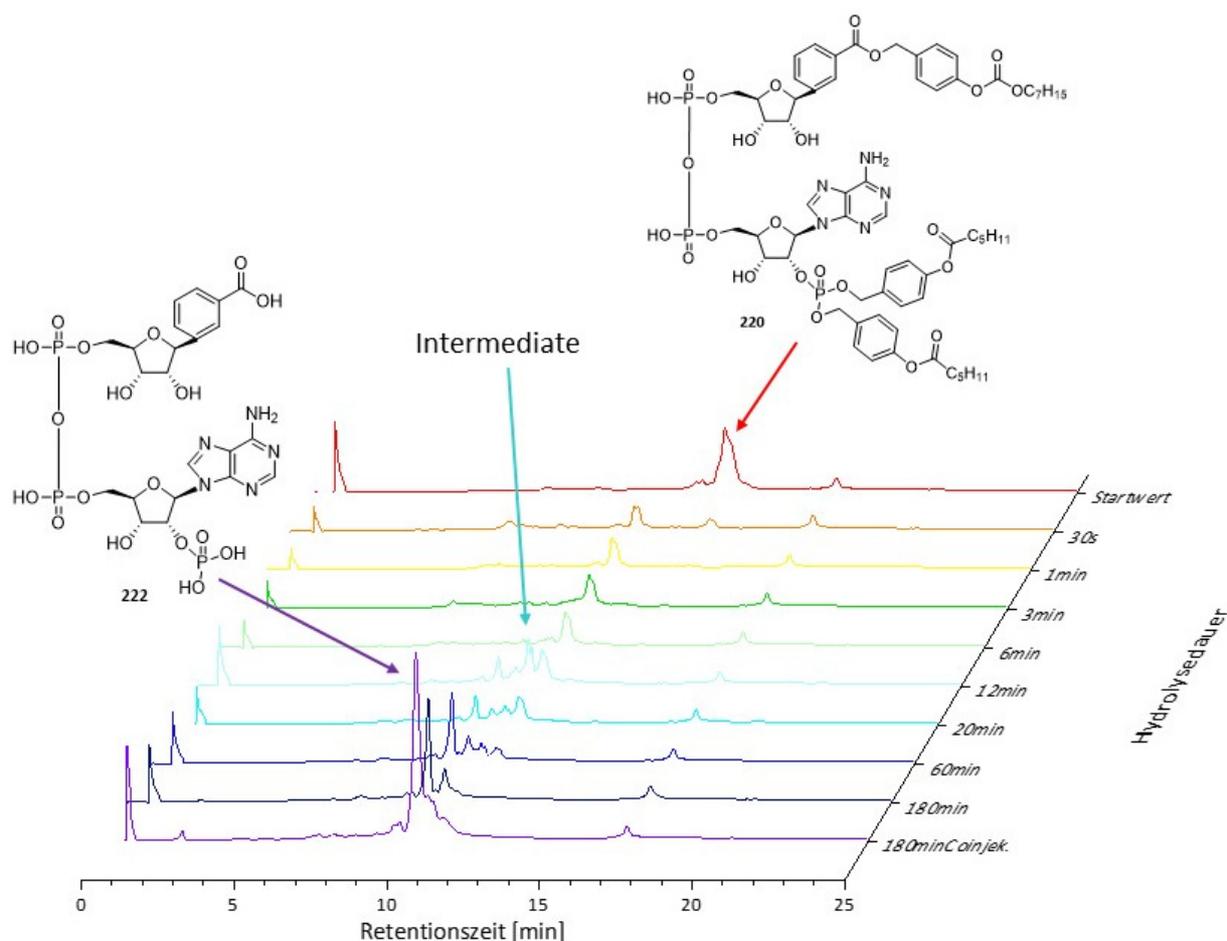


**Abb.135:**  $^{31}\text{P}$ -NMR- und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (oben) und das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (unten) des 3'F-NAADP-Analogon **224**.

Im Folgendem wurden an den synthetisierten Analoga Untersuchungen hinsichtlich ihrer Stabilität und biologischen Aktivität vorgenommen. Dabei sollte zum einen die Einsatzmöglichkeit in biologischen Untersuchungen, als auch das Vermögen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung geprüft werden.

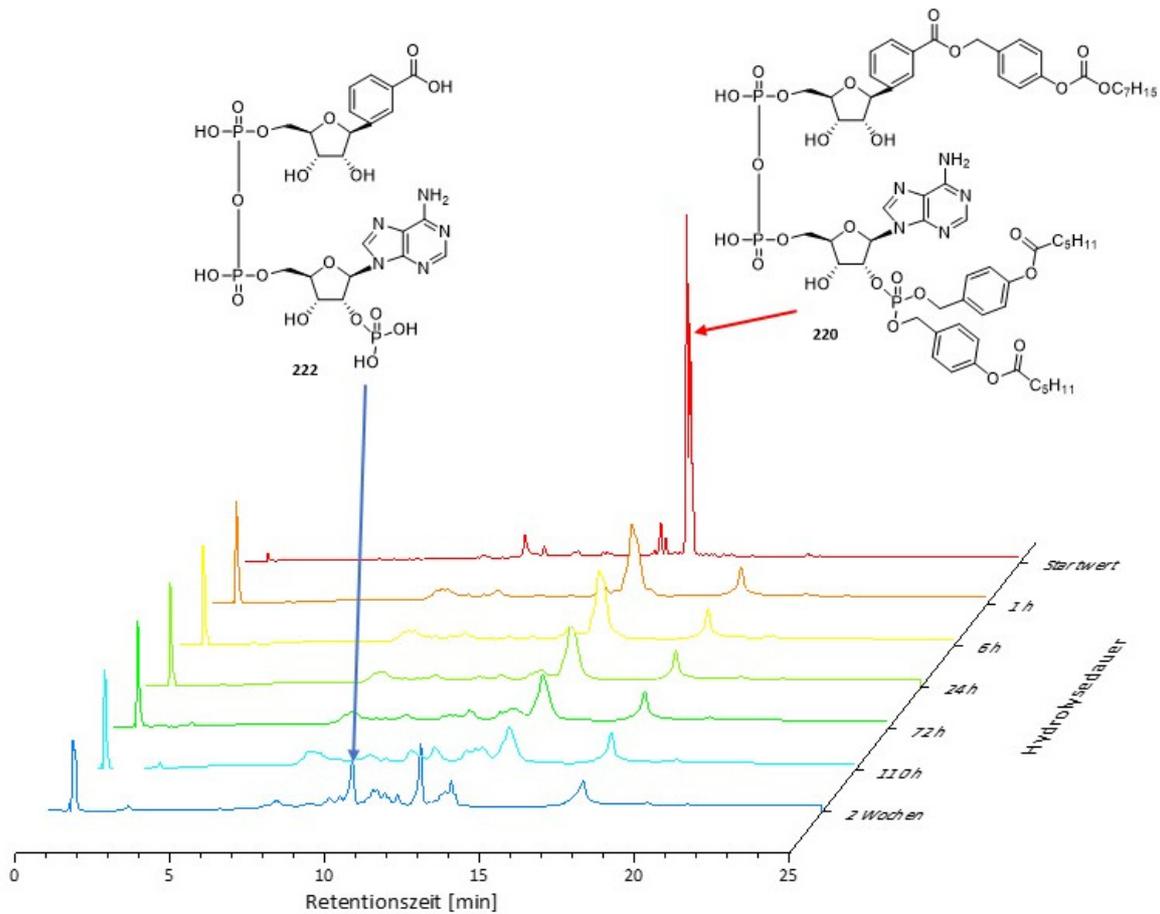
### 6.13 Stabilitätsstudien und Bioassay zur $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Aktivität von dem NAADP-Analoga

Abschließend wurde in Hydrolysestudien sowohl die enzymatische, als auch die chemische Stabilität des NAADP-Analogons **220** überprüft. Hierfür wurden die gleichen Parameter, wie in Kapitel **6.3.3** beschrieben, verwendet. Das Edukt **220** besitzt ein breites Signal mit einer Retentionszeit von 14 min, dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass hier bereits eine Migration der 2'-Phosphatgruppe stattgefunden hat. Bereits nach 1 min Inkubationszeit mit einer PLE-Lösung konnte eine vollständige Spaltung von mindestens einer der drei bioreversiblen Schutzgruppen zu einem Intermediat bei einer Retentionszeit von 13 min beobachtet werden, wodurch vermutlich eine intrazelluläre Akkumulation des NAADP-Analogons oder bereits extrazellulär eine Spaltung stattfinden kann. Die genaue Zuordnung der Spaltungsreihenfolge der Schutzgruppen mittels Coinjektion der entsprechenden Intermediate erfolgte nicht. Eine Identifikation der Spaltungsreihenfolge ist nicht essentiell, da jede Schutzgruppe für eine vollständige Deaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Wirkung ausreichend ist und erst das unmaskierte NAADP-Analoga **222** eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Wirkung erzielt (Kapitel **4.1.7**). Im Retentionszeitbereich zwischen 11 – 12 min sind die Intermediate mit mindestens zwei gespaltenen bioreversiblen Schutzgruppen zu erkennen. Ab einer Inkubationszeit unterhalb von 12 min ist das vollständig entschütztes NAADP-Analoga **222** mit einer Retentionszeit von 10 min zu erkennen, welches ab einer Inkubationszeit von 180 min vollständig freigesetzt ist. Dies konnte mit einer Coinjektion mit dem zuvor synthetisierten entschütztem NAADP-Analoga **222** bestätigt werden (**Abb.136**). Das vollständig entschütztes C-nucleosidische NAADP-Analoga **222** besitzt eine vergleichbare Polarität wie das natürliche NAADP **6** (s. Kapitel **6.3.2**).



**Abb.136:** Enzymatischer Hydrolyseverlauf des bioreversibel geschützten NAADP-Analogons **220** in PLE-Lösung.

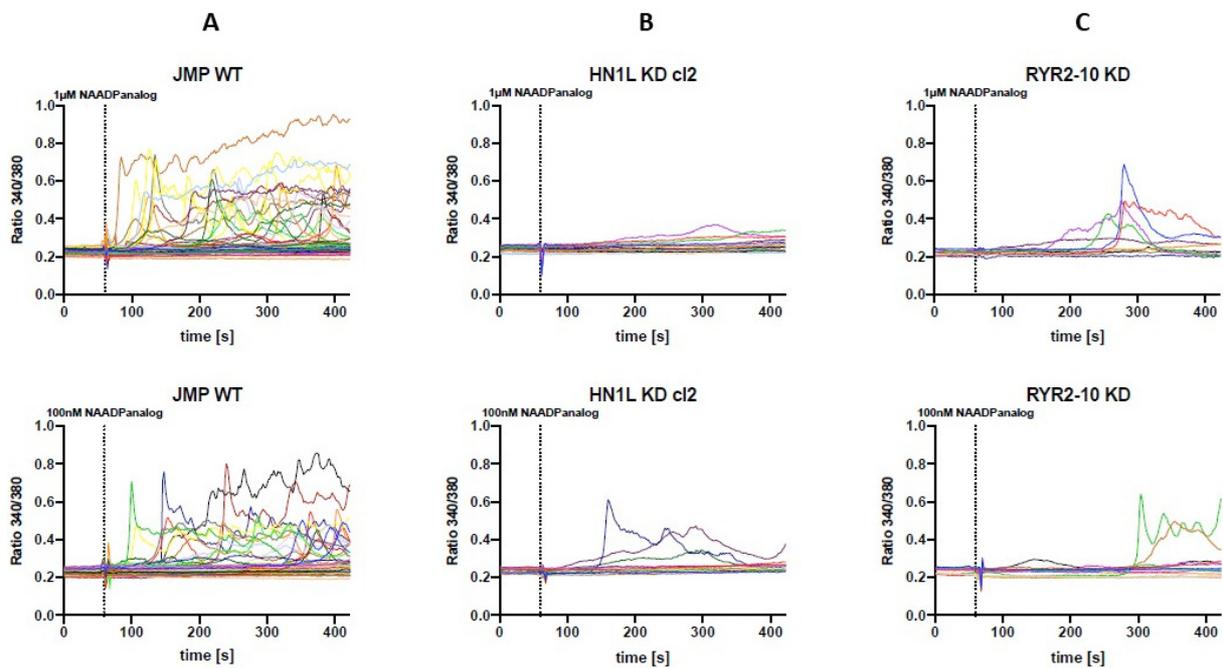
Anschließend erfolgte die Überprüfung der chemischen Stabilität des NAADP-Analogons **220** in PBS-Puffer. Die Hydrolyse wurde ebenfalls unter den gleichen Parametern, wie in Kapitel **6.3.3** beschrieben, durchgeführt. Das Edukt **220** ist wie zuvor bei einer Retentionszeit von 14 min zu erkennen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h in PBS-Puffer ist bereits die Spaltung einer bioreversiblen Schutzgruppen am 2'-Phosphat zu beobachten, wobei dies vermutlich durch eine chemisch induzierte Phosphatmigration beschleunigt wird. Im weiteren Hydrolyseverlauf werden die weiteren Schutzgruppen nur sehr langsam gespalten und erst nach 2 Wochen Inkubationszeit kann eine Freisetzung des entschützten NAADP-Analogons **222** bei einer Retentionszeit von 10 min beobachtet werden, damit kann eine hohe chemische Stabilität bei einer hohen enzymatischen Labilität bestätigt werden (**Abb.137**). Eine Verwendung der Verbindung **220** ist daher als Tool für biologische Untersuchungen geeignet.



**Abb.137:** Chemischer Hydrolyseverlauf des bioreversibel geschützten NAADP-Analogons **220** in PBS-Puffer.

Die darauffolgenden biologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von A. Guse im Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) durchgeführt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität des Analogons **220** wurde an immortalisierten T-Lymphozyten untersucht. Es wurde mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Lösungen des NAADP-Analogons **220** inkubiert, dabei wurden Lösungen mit einer Konzentration von 100 nM und 1  $\mu\text{M}$  verwendet. Die mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde mit Hilfe vom  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoff Fura2 und anschließender Fluoreszenzspektroskopie mittels des Verhältnisses aus den Anregungswellenlängen bei 340 nm und 380 nm mit der Emissionswellenlänge von 520 nm detektiert. Bei der Verwendung von Wildtyp Jurkatzellen, welche mit den Lösungen inkubiert wurden, konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung innerhalb von wenigen Sekunden beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in **A** der **Abb.138** zusammengefasst. Teilweise ist eine Oszillation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals zu beobachten, wobei dies auf eine nicht kontinuierliche Freisetzung oder Diffusion des NAADP-Analogons **220** hindeuten kann. Die Ergebnisse von der anschließenden Verwendung von

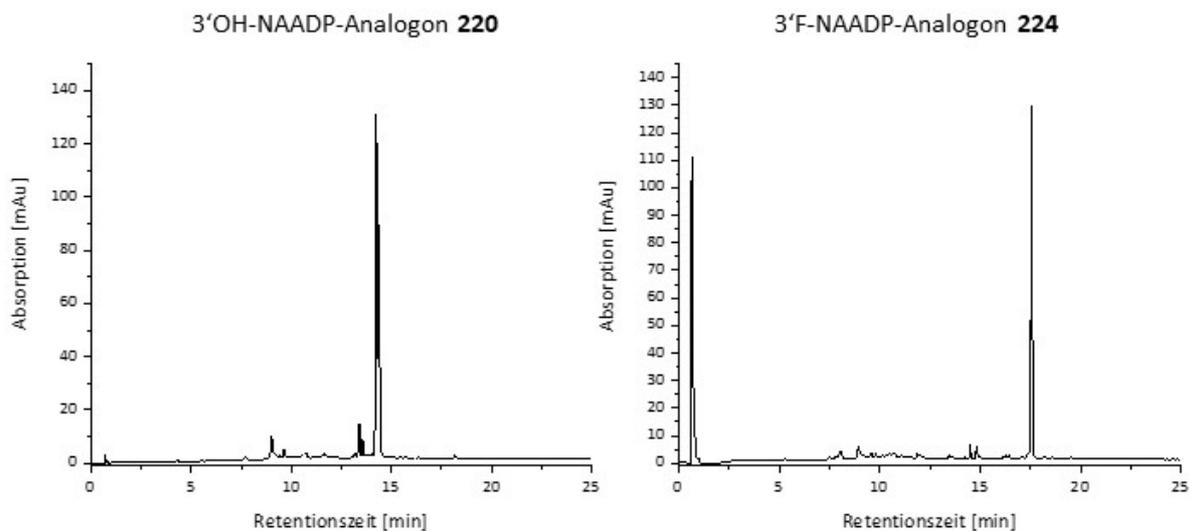
Jurkatzellen bei denen ein potenzielles HN1L-Bindeprotein des NAADPs für die Rezeptorbindung ausgeschaltet wurde, ist in **B** dargestellt.<sup>290</sup> Hierbei kann keine signifikante  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beobachtet werden, was auf eine notwendige Verfügbarkeit dieses Bindeproteins für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hindeutet. Die Verwendung von Jurkatzellen bei denen der mutmaßliche Ryanodin-Rezeptor auf dem ER/SR deaktiviert ist, sind in **C** dargestellt.<sup>291,292</sup> Hier konnte wiederholt keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beobachtet werden, wodurch der Ryanodin-Rezeptor vermutlich eine essentielle Rolle für die NAADP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung einnimmt (**Abb.138**).



**Abb.138:** Bioassay zum  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Potenzial des C-nucleosidischen NAADP-Analogon **220**. Verwendet wurden die Wildtyp Jurkatzellen (**A**), Jurkatzellen ohne HN1L-Bindeprotein (**B**) und Jurkatzellen ohne Ryanodin-Rezeptor (**C**).

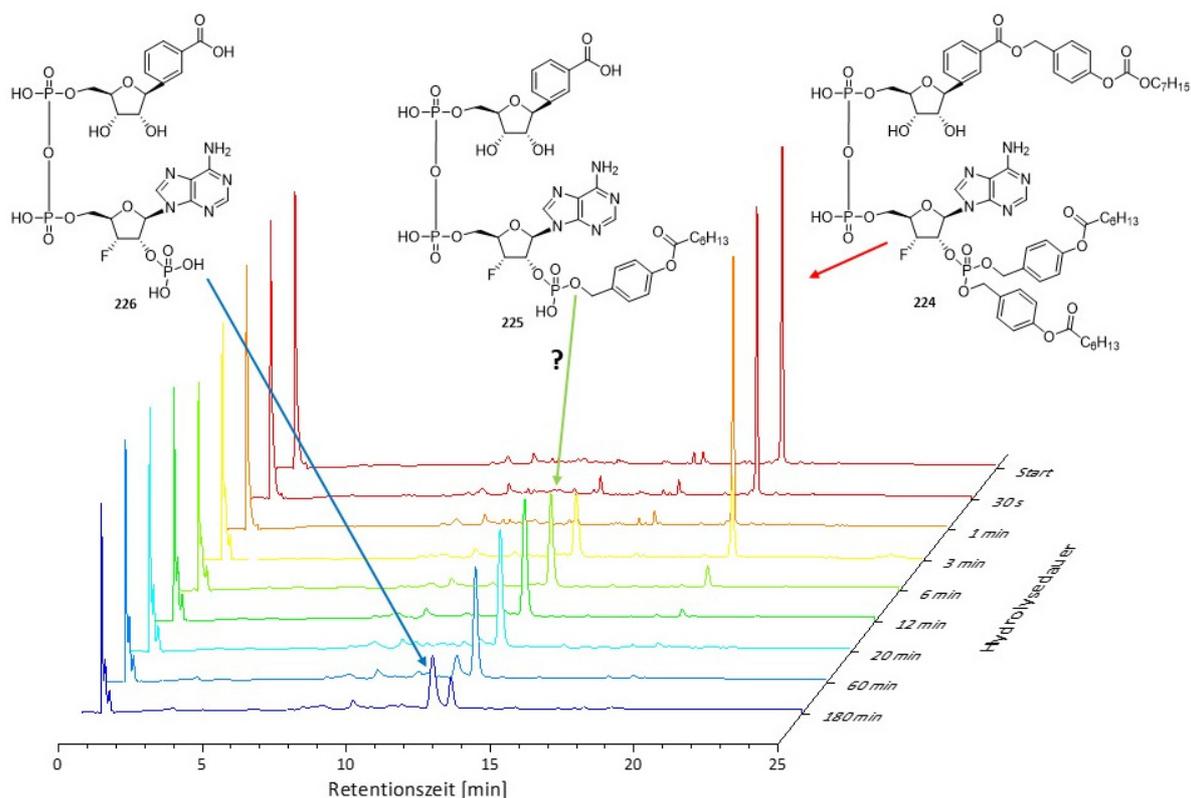
Durch die biologische Untersuchung kann vermutet werden, dass das NAADP-Analogon **220** passiv in die Zelle diffundiert und intrazellulär eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induziert. Außerdem kann durch diese Ergebnisse angenommen werden, dass die im Pyridinring vorkommende positive Ladung des natürlichen NAADPs anscheinend keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität hat und vermutlich eher eine Rolle im Metabolismus einnimmt. Eine Bestätigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach passiver Diffusion durch das NAADP-Analogon **220** bleibt durch die Negativkontrollen mit dem NADP-Analogon **221** und des vollständig entschützten NAADP-Analogons **222** zu validieren. Die weiterführende Synthese von unterschiedlichen modifizierten Analoga kann zur Identifizierung von weiteren strukturelevanten Merkmalen genutzt werden.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde zunächst in Hydrolysestudien die Stabilität des 3'-NAADP-Analogons **224**, sowohl enzymatisch, als auch chemisch untersucht. Wie bereits in Kapitel **6.12** beschrieben, ist von einer erniedrigten Polarität auszugehen. Dies wird bestätigt mit einer erhöhten Retentionszeit des Edukts **224** von 17.5 min im Vergleich zur Retentionszeit des NAADP-Analogons **220** (**Abb.139**).



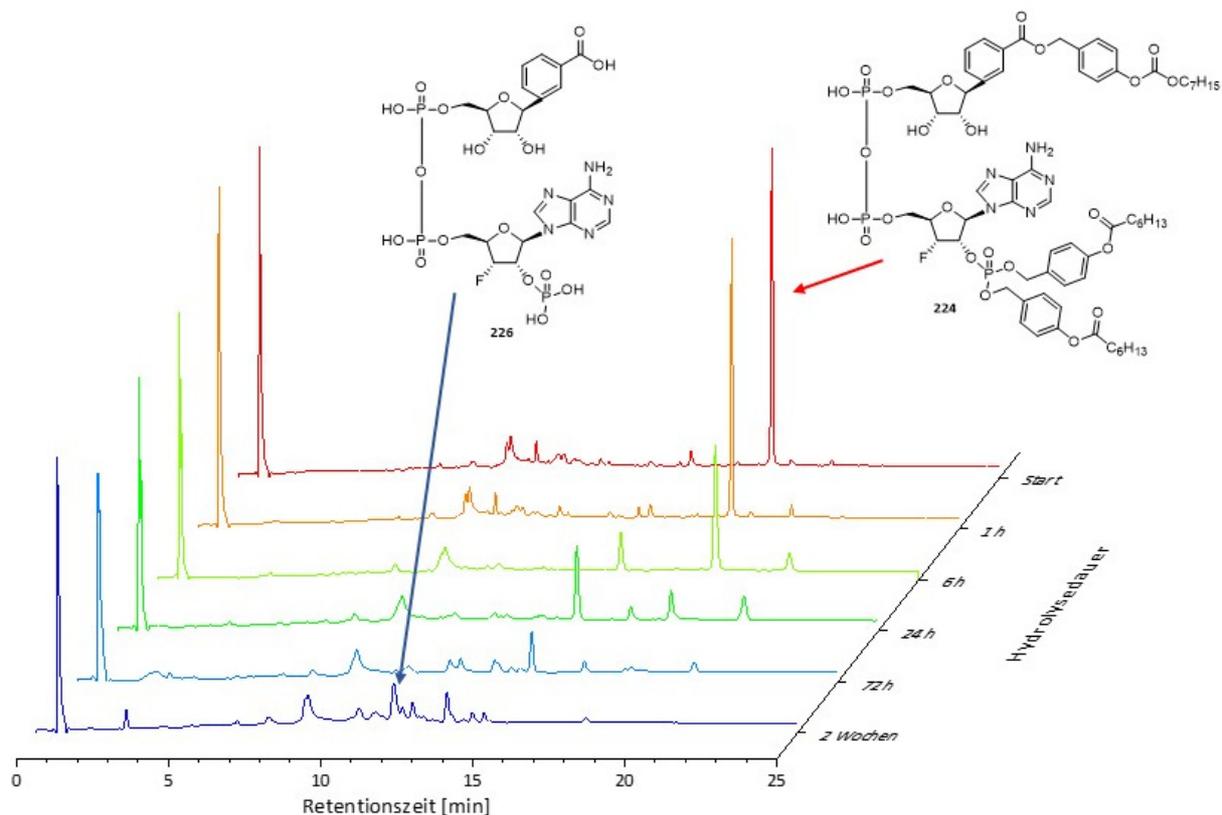
**Abb.139:** HPL-Chromatogramme zur Reinheitskontrolle der zwei NAADP-Analoga **220/224**.

Im Gegensatz zur enzymatischen Hydrolyse des NAADP-Analogons **220** ist eine signifikant langsamere Spaltung der ersten bioreversiblen Schutzgruppe zu beobachten, da erst nach 20 min eine vollständige Hydrolyse des Edukts **224** unter Spaltung von mindestens einer bioreversiblen Schutzgruppe beobachtet werden kann. Die langsame Spaltung der ersten bioreversiblen Schutzgruppe kann als Indiz zur Unterdrückung der Phosphatmigration gesehen werden, da diese vermutlich initialisierend bei dem NAADP-Analogon **220** zu einer sehr schnellen Spaltung der ersten bioreversiblen Schutzgruppe geführt hat. Nach 20 min ist eine Bildung eines Intermediats aus dem Edukt **225** bei einer Retentionszeit von 13 min zu beobachten, dabei handelt es sich vermutlich um das Intermediat **225**, welches eine bioreversible Schutzgruppe an dem 2'-Phosphat trägt, da diese am langsamsten abgespalten werden sollte, aufgrund der repulsiven Wirkung der benachbarten negativen Ladung. Nach 180 min wurde der Hauptteil des Intermediats **225** zum vollständig ungeschützten Produkt **226** mit einer Retentionszeit von 12.5 min enzymatisch hydrolysiert, eine Identifikation erfolgte mittels LC-MS, wobei eine Coinjektion nicht vorgenommen wurde (**Abb.140**).



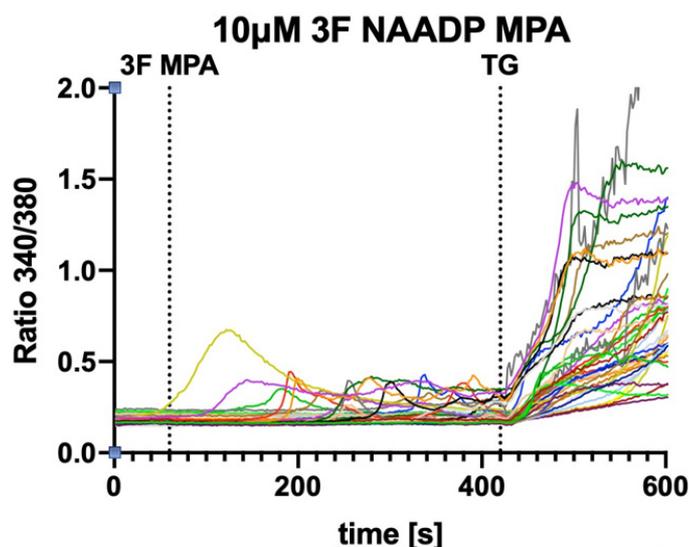
**Abb.140:** Enzymatischer Hydrolyseverlauf des bioreversibel geschützten 3'-F-NAADP-Analogons **224** in PLE-Lösung.

Im Anschluss wurde zur Überprüfung der chemischen Stabilität eine Hydrolyse in PBS-Puffer durchgeführt. Das Edukt **224** eluiert mit einer Retentionszeit von 17.5 min. Konträr zur enzymatischen Hydrolyse ist die stufenweise Abspaltung der bioreversiblen Schutzgruppen zu beobachten. Ab einer Hydrolysedauer von 6 h ist bei einer Retentionszeit von 15.5 min ein Intermediat zu erkennen, bei dem vermutlich eine bioreversible Schutzgruppe chemisch gespalten wurde. Nach einer Hydrolysedauer von 72 h ist geringfügig die Freisetzung des unmaskierten Produkts **226** zu erkennen, wobei nach 2 Wochen Inkubation eine signifikante Menge des vollständig ungeschützten Produkts **226** zu erkennen ist. Es ist zwar eine erhöhte chemische Stabilität im Vergleich zum 3'-OH-NAADP-Analogon **220** gegenüber der Spaltung der ersten bioreversiblen Maskierung zu beobachten, wohingegen die Freisetzung des vollständig entschützten Derivats **226** grundsätzlich vergleichbar ist (**Abb.141**).



**Abb.141:** Chemischer Hydrolyseverlauf des bioreversibel geschützten 3'F-NAADP-Analogons **224** in PBS-Puffer.

Erste Daten der biologischen Assays zur  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Aktivität des 3'F-NAADP-Analogons **224**, welche vom Arbeitskreis A.GUSE durchgeführt wurden, zeigen eine vielversprechende Aktivität (**Abb.142**). Es wurden analog die Parameter wie bei der Untersuchung des 3'OH-NAADP-Analogons **220** verwendet. Zur Überprüfung der Zellaktivität wurden zusätzlich bei 420 s mit dem Antagonisten Thapsigargin (TG) die SERCA-Pumpen nicht-kompetitiv inhibiert, wodurch der aktive intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport ins sarkoplasmatische Retikulum gehindert ist und es zum unkontrolliertem Konzentrationsanstieg von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  kommt.

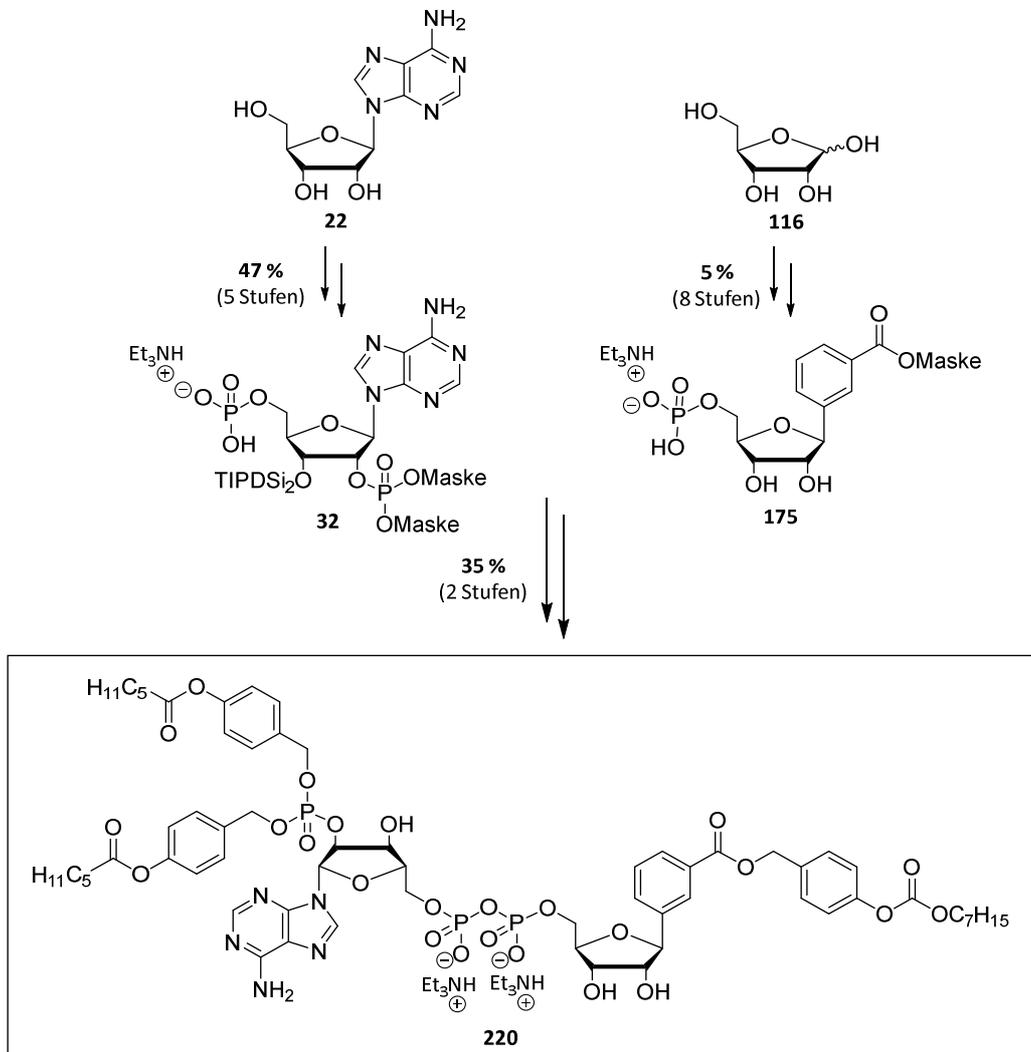


**Abb.142:** Bioassay zum  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Potenzial des C-nucleosidischem 3'-F-NAADP-Analogon **224**. Verwendet wurden die Wildtyp Jurkatzellen.

Insbesondere durch die erhöhte Stabilität ist das maskierte 3'-F-NAADP-Analogon **224** von großem Interesse, da die mögliche vorzeitige extrazelluläre Spaltung der bioreversiblen Schutzgruppen am 2'-Phosphat, induziert durch die Phosphatmigration verhindert wird und eine effektivere, passive Diffusion angenommen werden kann. Die beschleunigte Phosphatmigration insbesondere bei Phosphateestern unter physiologischem pH-Wert konnte bereits beobachtet werden.<sup>293</sup> Aufgrund dieser Annahme der intrazellulären Phosphatmigration und der Gleichgewichtseinstellung zwischen dem 2'-, 3'-Phosphat und 2', 3'-cyclo-Phosphats wäre eine Überprüfung der Aktivität des 3'-Phosphat-Analogons erstrebenswert, mit Hilfe des maskierten 2'-F-NAADP-Analogons. Eine Phosphatmigration wäre auf diese Weise unterdrückt, wobei kein Gleichgewicht eingestellt wird und hierdurch gezielt die Aktivität des 3'-P-NAADP-Analogons untersucht werden kann. Dies ist von Interesse, da die hierzu durchgeführten Untersuchungen an NAADP aus der Literatur nicht vollumfänglich valide sind und eine intrazelluläre Gleichgewichtseinstellung angenommen werden kann.<sup>105</sup> Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen konnte belegt werden, dass die 2'-P-Spezies von NADP und vermutlich auch von NAADP die aktive, bindende Verbindung ist, wobei die Relevanz der unterdrückten Phosphatmigration hinsichtlich der Protein- oder Rezeptorbindungsaffinität nicht vollständig untersucht ist.<sup>294,295</sup>

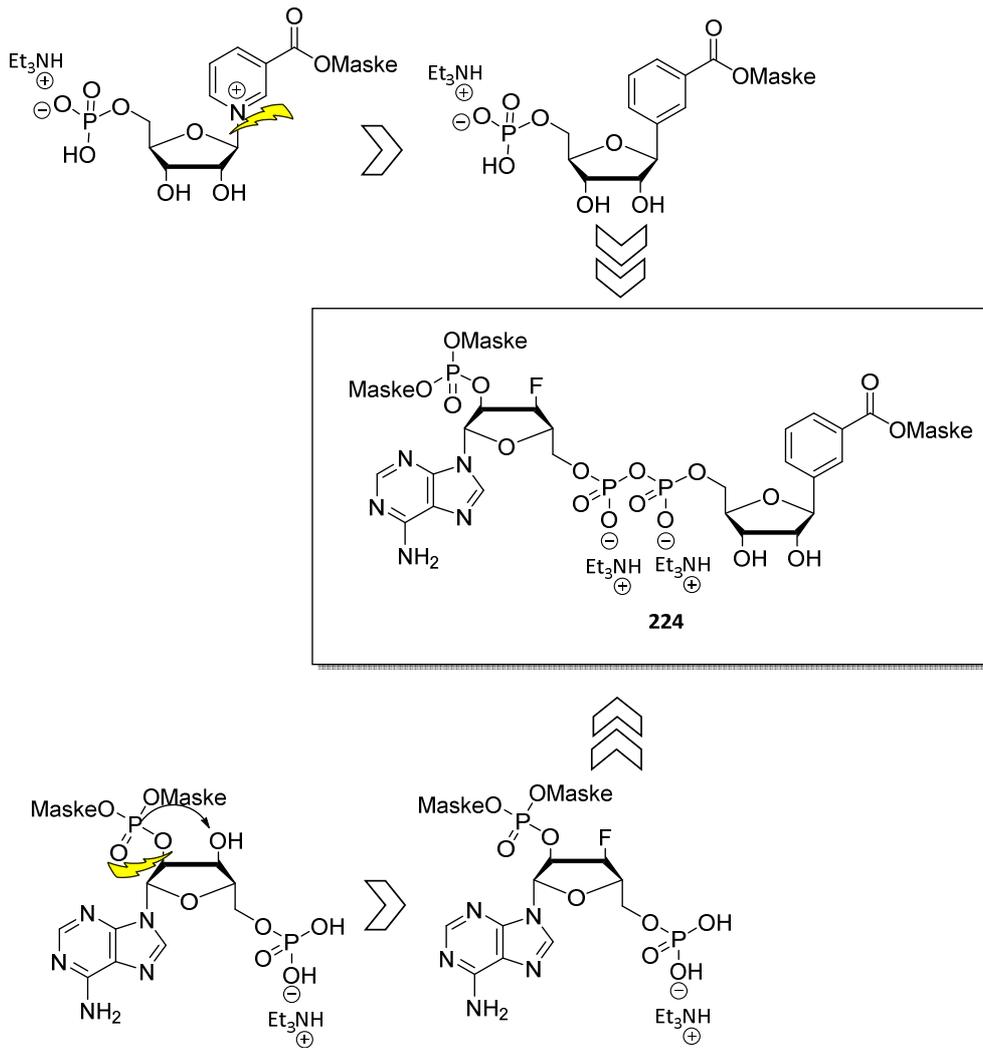
### 6.14 Fazit und Ausblick zur Synthese des NAADP-Analogons und der Hydrolysestudien

Zusammenfassend ist es zunächst gelungen, ein bioreversibel geschütztes NAADP-Analogon **220** über 15 Stufen zu synthetisieren, welches nicht nur eine ausreichende Stabilität für biologische Untersuchungen besitzt, sondern auch passiv in die Zellen diffundieren kann und somit für detaillierte Untersuchungen zu der Rolle von dem NAADP in der Signaltransduktion geeignet ist (**Abb.143**). Erste biologische Untersuchungen zeigen eine signifikante  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Eigenschaft, welche durch die weiterführenden Untersuchungen mit den Zellen ohne Bindeprotein und Zellen ohne Ryanodin-Rezeptor eine dem NAADP entsprechende  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung belegen sollen.



**Abb.143:** Totalsynthese des C-nucleosidischen NAADP-Analogons **220**.

Bei dem Entwicklungsprozess über das 3'OH-NAADP Analogon **220** zum 3'F-NAADP-Analogon **224** zeigte sich zunächst bei der Synthese des maskierten natürlichem NAADP eine charakteristische Instabilität der *N*-glycosidischen Bindung der Nicotinsäure, welche durch die Maskierung der negativen Ladung des Carboxylats gesteigert wurde und eine erfolgreiche Synthese zum NAADP verhindert war. Mit der Synthese des C-nucleosidischen Derivats konnte die Instabilität der *N*-glycosidischen Bindung umgangen werden. Zudem konnte mit den nachfolgenden Bioassays eine Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Aktivität des C-nucleosidischen NAADP-Analogons **220** bewiesen werden. Bei den Hydrolyseuntersuchungen, sowie bei der praktischen Anwendung in den Bioassays zeigte sich eine rasche Polaritätszunahme des Analogons **220**, bzw. ein gehemmtes passives Diffusionsvermögen. Dies wurde auf die Spaltung von mindestens einer bioreversiblen Schutzgruppe zurückgeführt, welche durch eine Phosphatmigration zwischen der 2'-Position zur 3'-Position hervorgerufen wurde. Mit der erfolgreichen Einführung eines 3'-Fluorids bei der Synthese des bioreversibel maskierten 3'F-NAADP-Analogons **224** zeigte sich bereits in den durchgeführten Hydrolysestudien eine Unterdrückung der Phosphatmigration. Darüberhinaus wurde bei ersten biologischen Untersuchungen eine effiziente Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Aktivität gezeigt, womit das 3'F-NAADP-Analogon **224** ein weiteres interessantes Tool für biologische Untersuchungen darstellt. Sollte das 3'F-NAADP-Analogon **224** in weiterführenden biologischen Untersuchungen eine vergleichbare Aktivität aufweisen, wie das 3'OH-NAADP-Analogon **220**, ist eine Verwendung aufgrund der unterdrückten Phosphatmigration favorisiert. Es stellt somit eine revolutionäre, fortschrittliche Verbindung zur Aufklärung der Rolle des NAADP in der Signatranduktion dar, womit erleichtert neue Erkenntnisse gewonnen werden können (**Abb.144**).



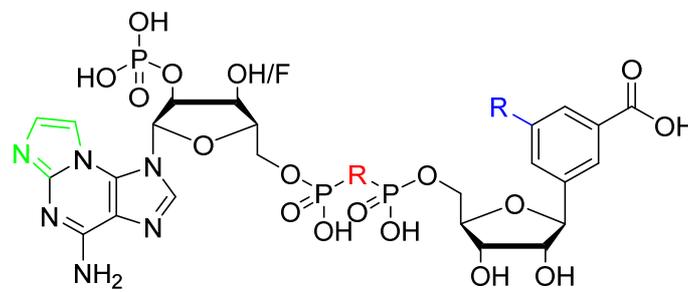
**Abb.144:** Entwicklungsprozess zum optimierten 3'-F-NAADP-Analogon **224**.

Ferner kann durch die Synthese von photolabil und bioreversibel kombiniert geschütztem NAADP-Analogon (S. Kapitel **6.3.3**) eine räumlich und zeitlich genaue Freisetzung mit einer gesteigerten intrazellulären Akkumulation des Analogons erzielt werden. Darauf aufbauend wäre zudem die Synthese des kombiniert geschützten 3'-F-NAADP-Analogons (s. Kapitel **6.3.4**) zur Vermeidung der Phosphatmigration zielführend. Hierbei muss aber zunächst der Einfluss der Fluorsubstitution auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften des NAADP-Analogons hinreichend überprüft werden.

Die biologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die positive Ladung des Pyridinrings, welche im natürlichen NAADP vorkommt, vermutlich keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften hat. Die Synthese eines carbocyclischen NAADP-Analogons anstatt des C-nucleosidischen Analogons könnte für die Bestätigung des Einflusses der positiven Ladung

genutzt werden (s. Kapitel **6.11.3**). Zudem ist die Untersuchung des Metabolismus vom NAADP mit dem C-nucleosidischen Analogon nur begrenzt möglich, bedingt durch die fehlenden Redox-Eigenschaften der Benzoesäure, weshalb eine Synthese des carbocyclischen Analogons ebenfalls von großem Interesse ist.

Weiterführende Modifikationen an dem 3'-F- oder dem 3'-OH-NAADP-Analogon **224/220**, wie die Synthese von intrinsisch fluoreszierenden Derivaten oder die Einführung von Bindungsstellen für die Click-Chemie, sind unproblematisch an diesem Molekül durchführbar.<sup>107</sup> In **Abb.145** sind die Strukturpositionen markiert, welche für weiterführende Modifikationen besonders geeignet sind, da diese nur geringfügigen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität in früheren Untersuchungen gezeigt haben.<sup>105,109</sup>



**Abb.145:** NAADP-Analogon mit favorisierten Positionen für weiterführende Modifikationen.

Zu den bereits dargestellten positiven Ergebnissen der 3'-Fluor-Modifikation und der C-nucleosidischen Modifikation wäre zunächst eine zusätzliche Stabilisierung, bzw. die Untersuchung der Einflussnahme auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Aktivität der Pyrophosphatfunktion mittels Verbrückung über ein Bis(phosphonat), von Interesse. Hierbei ist das verbindende Sauerstoff zwischen den Phosphoratomen der Pyrophosphatfunktion durch eine Methylenfunktion ( $\text{CH}_2$ ) oder eine Difluormethylenfunktion ( $\text{CF}_2$ ) verknüpft (Rot) und somit unempfindlich gegenüber intrazellulärer Pyrophosphatasen.

Die Synthese eines intrinsisch fluoreszierenden Etheno-Adenosinderivats kann favorisiert ausgehend vom 2,6-Diaminpurinnucleosid mit Chloracetaldehyd erfolgen (Grün), da hierdurch eine räumliche Distanz zur strukturelevanten Aminfunktion vorherrscht und demgemäß vermutlich die  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Eigenschaften verglichen zum bekannten 1,N6-Etheno-NAADP tendenziös weniger negativ beeinflusst wird.<sup>107,296</sup> Mit Hilfe von intrinsisch fluoreszierenden, unhydrolysierbaren NAADP-Derivaten ist die Ermittlung der Effizienz der passiven Diffusion

realisierbar, wodurch der Anteil der intrazellulären Menge an NAADP-Analogons ermittelt werden kann und hierdurch das Schutzgruppenkonzept hinsichtlich der Diffusionseffektivität und der Freisetzungsgeschwindigkeit optimiert werden kann. Zudem ist die Identifikation von möglichen Rezeptoren, bzw. von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des NAADP erleichtert.

Die Einführung von Substituenten mit Alkin-, Alken- oder Azidfunktionen für die Click-Chemie wird erfahrungsgemäß in 5-Position der Nicotinsäure toleriert oder in diesem Fall an der Benzoesäure (Blau).<sup>109</sup> Eine mögliche weitere Position zur Einführung von Substituenten ohne relevante Erniedrigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Aktivität ist die 2-Position des Adenins. Diese Modifikationen wären insbesondere für die erleichterte Identifikation der möglichen Bindeproteine für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung interessant, z.B. mittels intrazellulärer Biotinylierung des NAADP-Analogons und anschließender Isolierung mit Affinitätschromatographie von intrazellulär gebundener Bindeproteine, welche infolge von massenspektroskopischen Untersuchungen identifiziert werden können.

## 7 Experimentalteil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 Lösungsmittel für die Chromatographie

Folgende Lösungsmittel wurden in technischer Qualität erworben und sofern nötig, wie folgt für die Chromatographie behandelt.

Acetonitril:	$C_2H_3N$ , Sdp.: 81–82 °C; HPLC-grade, ohne Reinigung eingesetzt.
Dichlormethan:	$CH_2Cl_2$ , Sdp.: 40 °C; bei Normaldruck destilliert.
Ethylacetat:	$C_4H_8O_2$ , Sdp.: 77 °C; bei Normaldruck destilliert.
Isopropanol:	$C_3H_8O$ , Sdp.: 82 °C; HPLC-grade, ohne Reinigung eingesetzt.
Methanol:	$CH_4O$ , Sdp.: 64 °C; bei Normaldruck destilliert.
Petrolether (50–70):	Sdp.: 50–70 °C; bei Normaldruck destilliert.
Wasser:	$H_2O$ , Sdp.: 100 °C; Milli-Q, als Reinstwasser verwendet.

#### 7.1.2 Absolute Lösungsmittel

Die Lösungsmittel Acetonitril, Dichlormethan, Diethylether, Pyridin und Tetrahydrofuran wurden aus einem Lösungsmittelsystem „MB SPS-800“ der Firma MB Braun entnommen und über Molekularsieb (3 Å: Acetonitril, 4 Å: Dichlormethan, Diethylether, Pyridin, Tetrahydrofuran) gelagert.

Die nachfolgenden Lösungsmittel wurden unter Sauerstoff- und Feuchtigkeitsausschluss erworben und gelagert.

Aceton:	$C_3H_6O$ ; von Acros Organics (extra Dry, max. 0.005% Wasser, über Molekularsieb) erworben.
Ethanol:	$C_2H_6O$ ; von Acros Organics (extra Dry, $\leq$ 0.005% Wasser, über Molekularsieb) erworben, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (4 Å) gelagert.

Methanol:  $\text{CH}_4\text{O}$ ; von Acros Organics (extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molekularsieb) erworben, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb ( $4 \text{ \AA}$ ) gelagert.

*N,N*-

Dimethylformamid:  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ ; von Acros Organics (extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molekularsieb) erworben.

Dimethylsulfoxid:  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ; von Acros Organics (extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molekularsieb) erworben.

Methanol:  $\text{CH}_4\text{O}$ ; von Acros Organics (extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molekularsieb) erworben.

Toluol:  $\text{C}_7\text{H}_8$ ; von Acros Organics (extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser, über Molekularsieb) erworben.

### 7.1.3 Deuterierte Lösungsmittel

Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel, wie *Chloroform- $d_1$*  ( $\text{CDCl}_3$ ), *Deuteriumoxid* ( $\text{D}_2\text{O}$ ), *Dimethylsulfoxid- $d_6$*  ( $\text{DMSO-}d_6$ ), *Acetonitril- $d_3$*  ( $\text{MeCN-}d_3$ ) und *Methanol- $d_4$*  ( $\text{MeOD}$ ) von Euriso-Top und Deutero erworben. Zur Messung von hydrolyse- und oxidationsempfindlicher Substanzen wurde  $\text{CDCl}_3$  vor der Messung mit Hilfe von aktiviertem Molekularsieb ( $4 \text{ \AA}$ ) absolutiert.

### 7.1.4 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Edukte und Reagenzien wurden von Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Grüsing GmbH, Sigma-Aldrich, TCI und VWR erworben und ohne weitere Reinigung verwendet, außer Diisopropylamin,  $\text{POCl}_3$  und  $\text{PCl}_3$ , welche unter Inertgas destilliert wurden.

### 7.1.5 Chromatographie

#### Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL g/UV254 der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Die  $R_f$ -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer UV-Lampe detektiert. Andere Substanzen wurden mit einem Färbereagensatz bestehend aus Vanillin in konz. Schwefelsäure, Methanol und Essigsäure unter Hitze, gefärbt.

#### Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Trennung erfolgte mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Macherey Nagel. Für Flash-Chromatographien wurde ein Überdruck 0.2-0.4 bar angelegt und es wurden ausschließlich destillierte Lösungsmittel verwendet.

#### Ionenaustausch an DOWEX-NH<sub>4</sub><sup>±</sup>

Das Ionenaustauscherharz DOWEX 50W-X8, 50-100 mesh, der Firma Sigma-Aldrich wurde zunächst mit dem dreifachen Säulenvolumen mit 1 M HCl gespült. Anschließend wurde bis zum Neutralpunkt mit Reinstwasser gewaschen. Für den Austausch der Kationen auf Ammoniumionen wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen mit einer 1 M NH<sub>3</sub>-Lösung gespült und anschließend wiederum bis zum neutralem pH-Wert mit Reinstwasser gewaschen. Daraufhin wurde die jeweilige Verbindung in Reinstwasser aufgetragen und mit Reinstwasser oder einem Gemisch aus Reinstwasser und Acetonitril als Laufmittel von der Säule eluiert.

#### HPLC-Methode A:

Von 0 min bis 5 min: isokratisch (95 % TBAA-Laufpuffer (2 mM), 5 % Acetonitril), von 5 min bis 15 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (5-50 %), von 15 min bis 16 min: isokratisch (50 % Laufpuffer, 50 % Acetonitril), 16 min bis 18 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (50-5 %), 18 min bis 20 min: isokratisch (95 % Laufpuffer, 5 % Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, Säulentemperatur: 25 °C, UV-Detektion: 272 nm, Säule: Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub> ec.

### HPLC-MS-Methode B:

Von 0 min bis 15 min: Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (0-100 %), von 15 min bis 20 min: isokratisch (100 % Acetonitril), von 20 min bis 22 min: Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (100-0 %), von 22 min bis 27 min: isokratisch (100 % H<sub>2</sub>O). Flussrate 0.5 mL/min, Säulenofentemperatur: 20 °C, UV-Detektion: 272 nm, MS-Scans: 150-1600 m/z, Scanzeit: 271, Scangeschwindigkeit: 3506 m/z/sec, Säule: Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> 2.7 µm, 4.6 x 50 mm.

### **7.1.6 Spektroskopie**

#### Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden auf Bruker-Geräten in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für organische Chemie und dem Institut für anorganische Chemie an der Universität Hamburg aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden an den Modellen Fourier 300, AMX 400, AV 400, DRX 500 und auf dem AV 600 aufgenommen. Es wurden zur Verbindungsbestimmung zusätzlich die Korrelationsspektren H,H-COSY, HSQC, HMBC und NOESY aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden auf die entsprechenden Lösungsmittel kalibriert, bei CDCl<sub>3</sub> auf 7.26 ppm (<sup>1</sup>H), bzw. auf 77.16 ppm (<sup>13</sup>C). Bei D<sub>2</sub>O wurde auf 4.79 ppm (<sup>1</sup>H) kalibriert. Bei DMSO-d<sub>6</sub> wurde auf 2.5 ppm (<sup>1</sup>H), bzw. auf 39.52 ppm (<sup>13</sup>C) kalibriert. Bei MeOD auf 3.31 ppm (<sup>1</sup>H), bzw. auf 49.00 ppm (<sup>13</sup>C) kalibriert.

#### Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden an einem Bruker-Gerät des Modells Alpha P in einem Messbereich von 400–4000 cm<sup>-1</sup> bei Raumtemperatur aufgenommen.

#### Massenspektrometrie (MS)

Die MS-Spektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Instituts für organische Chemie an der Universität Hamburg aufgenommen. Die MS-Spektren wurden nach der ESI-HR-Methode (electrospray ionization – high resolution) an einem Massenspektrometer der Firma Finnigan des Modells ThermoQuest MAT 95XL und einem Detektor des Modells 6224 Uni-TOF der Firma Agilent gemessen.

### Ultraviolett-spektroskopie (UV)

Die UV-Spektren wurden an einem Thermo Scientific-Gerät des Modells NanoDrop 2000c in einem Messbereich von 200–800 nm bei Raumtemperatur aufgenommen oder an einem *Cary 300 Bio* der Firma Varian.

### **7.1.7 Geräte**

#### Automatisierte Chromatographie

Für die Normalphasen, als auch für die Umkehrphasenchromatographie wurde eine automatisierte Puriflashanlage vom Typ 430 der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für die Normalphasenchromatographie wurden selbst gepackte Säulen mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.040–0.063 mm) der Firma Macherey Nagel verwendet. Für die Umkehrphasenchromatographie wurden Chromabond® Flash, RS 16 C<sub>18</sub> ec, RS 40 C<sub>18</sub> ec oder RS 120 C<sub>18</sub> Säulen (Macherey-Nagel) verwendet.

#### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC Analysen wurden an einer Agilent 1260 Infinity II (Pumpe G7111A, Autosampler G7129A, Detektor DAD G7117C) durchgeführt.

#### HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Die HPLC-MS Analysen wurden an einer Agilent 1260 Infinity HPLC (Pumpe G1311B, Autosampler G1329B, Säulenfach G1316A, Detektor DAD G4221B) durchgeführt, welche mit einem single-quad MS von der Firma Advion expression<sup>L</sup> CMS (Software Advion Data Express) gekoppelt war oder an einer Dionex Ultimate 3000 UPLC durchgeführt, welche mit einem Bruker maXis ESI-Q-TOF (Software Bruker DataAnalysis 4.2) gekoppelt war.

#### Gefriertrocknung

Für die Gefriertrocknung wurden wässrige Lösungen an einer Christ Alpha 2-4 LDPlus Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

### Mikrowelle

Mikrowellenreaktionen wurden in einem CEM discover Reaktor durchgeführt, entweder im offenen oder geschlossenem Vessel Modus mit unterschiedlicher Temperatur und Leistung.

### Reinstwasseranlage

Das Reinstwasser wurde von einem arium® pro UV-Reinstwassersystem der Firma Sartorius verwendet.

### Zentrifuge

Die Aufarbeitung der Proben bei den hydrolytischen Analysen wurde mit einer Zentrifuge der Firma IKA® des Modells *mini G* durchgeführt.

## **7.2 Herstellung der Pufferlösungen**

### 1 M Triethylammoniumbicarbonat Puffer (pH 8.0)

Es wurden 140 mL (1.01 mol) Et<sub>3</sub>N mit 860 mL des. Milli-Q Wasser verdünnt. In einer weiteren Flasche wurde Trockeneis sublimiert und das CO<sub>2</sub>-Gas in die Triethylaminlösung geleitet. Nach 2-3 Stunden war der pH-Wert von 8 erreicht.

### 2 mM Tetrabutylammoniumacetat Puffer (pH 6.0)

Es wurden 12.7 mL (4.90 mmol) 10 % wässrige Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung mit 2.4 L des. Milli-Q Wasser verdünnt. Der pH-Wert wurde mit (etwa 6 mL) 1 M Essigsäure auf 6.0 eingestellt.

### 1 M Triethylammoniumacetat Puffer (pH 7.0)

Es wurden 140 mL (1.01 mol) Et<sub>3</sub>N mit Milli-Q Wasser verdünnt. Der pH-Wert wurde mit (57.2 mL) konz. Essigsäure auf 7.0 eingestellt.

### PBS-Puffer (pH 7.3)

Es wurden 142 mg (1.18 mmol)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 27.0 mg (0.198 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 800 mg (13.7 mmol)  $\text{NaCl}$  und 200 mg (2.68 mmol)  $\text{KCl}$  in 100 ml des. Milli-Q Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M  $\text{NaOH}$ -Lösung eingestellt.

## 7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### **AAV 1: Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoaten und 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbonaten**

Unter Inertgas wurden (1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin, (1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol und eine katalytische Menge 4-DMAP in abs. Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden (1.0 Äquiv.) des Säurechlorids oder Alkylchlorformiats in abs. Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten bei 0 °C zu getropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung 2–3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 2: Nitrierung der NPP-Schutzgruppen-Derivate**

Der zu nitrierende (1.0 Äquiv.) Aromat wurde in Essigsäure (10 mL pro 10 mmol) gelöst und mit der Hälfte des Volumens mit Wasser versetzt. Daraufhin wurde auf 0 °C gekühlt und langsam (4.0 Äquiv.) Salpetersäure (65 %) zugetropft. Die Reaktion wurde bei 0 °C für 30 Minuten gerührt und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Wasser wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 3: Williamsonsche Ethersynthese**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde das jeweilige (1.0 Äquiv.) Phenol in abs. DMF (8 mL pro mmol) gelöst. Danach wurden (2.0 Äquiv.) Kaliumcarbonat und jeweils des (1.5 Äquiv.) 1-Bromalkans zugegeben. Die Suspension wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Natriumhydroxid-Lösung (1 M) zugegeben und anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 4: Hydroxymethylierung der NPP-Schutzgruppen-Derivate**

Der jeweilige (1.0 Äquiv.) *ortho*-Nitroaromat wurde in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (5 mL pro Äquiv.) gelöst. Daraufhin wurde (4.1 Äquiv.) Paraformaldehyd und (0.7 Äquiv.) Triton B, gelöst in wenig wasserfreiem Dimethylsulfoxid, zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Wasser (20 mL pro Äquiv.) zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 5: Synthese von symmetrischen Phosphoramiditen**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde (1.0 Äquiv.) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit in wasserfreiem Tetrahydrofuran (6 mL pro Äquiv.) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Der jeweilige (2.0 Äquiv.) Alkohol und (2.2 Äquiv.) wasserfreies Et<sub>3</sub>N wurden ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre in wasserfreiem Tetrahydrofuran (6 mL pro Äquiv.) gelöst. Anschließend wurde die Alkohollösung innerhalb von 30 Minuten zu der gekühlten Phosphoramiditlösung getropft und daraufhin für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 6: Phosphorylierung von Ribose über die Phosphoramiditroute**

Die zu phosphorylierende (1.0 Äquiv.) Ribose wurde unter Stickstoffatmosphäre in wasserfreiem Acetonitril oder wasserfreiem Dichlormethan gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt.

Zu der Lösung wurde das jeweilige (1.5 Äquiv.) Amidit gegeben und anschließend tropfenweise (1.3 Äquiv.) DCI-Aktivator (0.25 M in Acetonitril) oder BTT-Aktivator (0.3 M in Acetonitril) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1–3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde zur Oxidation (2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt, welche daraufhin eine weitere Stunde gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 7: Yamaguchi-Veresterung an der Nicotinsäure**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden (1.5 Äquiv.) Nicotinsäure, (2.0 Äquiv.) wasserfreies Et<sub>3</sub>N und (1.0 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die jeweiligen (1.0 Äquiv.) bioreversiblen oder photolabilen Schutzgruppen und (0.3 Äquiv.) 4-DMAP zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung der Reaktion mit ges. NaCl-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 8: Synthese von 5'-Monophosphaten**

Das zu phosphorylierende (1.0 Äquiv.) Nucleosid wurde unter Stickstoffatmosphäre in wasserfreiem Trimethylphosphat gelöst und die Lösung auf -5 °C gekühlt. Die Lösung wurde anschließend mit (2.5 Äquiv.) Tributylamin, 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin oder aktiviertem gemörsertem Molsieb (3 Å) versetzt. Die Lösung wurde für 15 Minuten bei -5 °C gerührt und anschließend langsam mit (2.0–4.0 Äquiv.) POCl<sub>3</sub> versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 3–16 h bei 0 °C gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine 1 M TEAB-Pufferlösung zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde, wenn möglich, dreimal mit Hexan extrahiert. Die wässrige Phase wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

#### **AAV 9: Darstellung von TBDMS- oder DMTr-5'-geschützter peracetylierter Ribose**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde D-Ribose in wasserfreiem Pyridin (10 mL pro 10 mmol) gelöst und (1.1 Äquiv.) TBDMSCl oder DMTrCl hinzugefügt. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung der Reaktion (9.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Die Lösung wurde weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in ausreichend Ethylacetat gelöst und einmal mit Wasser gewaschen, anschließend zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlsg., sowie weitere zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

#### **AAV 10: Silylierung von Ribonsäure- $\gamma$ -lacton**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde (1.0 Äquiv.) Ribonsäure- $\gamma$ -lacton in wasserfreiem Dimethylformamid (10 mL pro 10 mmol) gelöst. Zu der Lösung wurden (5.0 Äquiv.) TBDMSCl oder TESCl und (7.0 Äquiv.) Imidazol zugegeben oder es wurden (3.1 Äquiv.) des Silyltriflats und (4.0 Äquiv.) DIPEA zugegeben. Die Reaktionslösung wurde daraufhin für 16 h oder für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

#### **AAV 11: Selektive Reduktion des Lactons zum Alkohol**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde (1.0 Äquiv.) der jeweiligen 2,3,5-geschützten Ribonsäure- $\gamma$ -lacton in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL pro 10 mmol) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten (3.0 Äquiv.) DIBAL-H-Lösung (1.5 M in Toluol) zugetropft und für 4 h bei -78 °C gerührt. Nach vollständiger Reduktion wurde die Reaktion mit wenig Methanol beendet und anschließend mit ges. Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydratlsg. versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

### **AAV 12: Einführung der Trichloracetimidatabgangsgruppe**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde (1.0 Äquiv.) des jeweiligen 2,3,5-geschützten D-Ribose in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurde (6.0 Äquiv.) Trichloracetonitril, sowie (0.3 Äquiv.) DBU zugegeben und das Reaktionsgemisch für 3 h bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch eingeengt. Daraufhin wurde der Rückstand in wenig Dichlormethan gelöst und auf Kieselgel (Chromabond) rotiert. Abschließend wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

### **AAV 13: Glykosylierung zum Nicotinsäurenucleosids**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde (1.1 Äquiv.) des jeweiligen Trichloracetimidats in wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden (1.0 Äquiv.) der geschützten Nicotinsäure und (2.0 Äquiv.) des Imidazoliumtriflats gegeben. Die Lösung wurde für 4 h im Ultraschallbad bei gelegentlichem Schwenken behandelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

### **AAV 14: Selektive Spaltung der 5-OH-Position von TIPDSi-Schutzgruppen**

Das 5',3' geschützte (1.0 Äquiv.) Adenosinderivat wurde in THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde daraufhin Wasser und langsam TFA zugegeben (THF/H<sub>2</sub>O/TFA 4:1:1 v/v/v). Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt und nach Beendigung der Reaktion mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

### **AAV 15: Selektive Phosphitylierung**

Zur Phosphitylierung wurden zunächst (5.0 Äquiv.) Imidazol und (3.5 Äquiv.) wasserfreies Et<sub>3</sub>N in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Zu der Lösung wurden langsam (1.1 Äquiv.)  $\text{PCl}_3$  zugetropft und für 15 Minuten gerührt. Die Suspension wurde

auf -5 °C heruntergekühlt und anschließend das zu phosphitylierende (1.0 Äquiv.) Nucleosid gelöst in wasserfreiem Dichlormethan zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine 1 M TEAB-Pufferlösung zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an einer RP-Säule gereinigt.

### **AAV 16: Oxidation zum Phosphat**

Das zu oxidierende Phosphit wurde in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit (5.0 Äquiv.) BSA versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit CSO versetzt. Die Lösung wurde daraufhin für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel wieder entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und mit dem gleichen Volumen an 1 M TEAB-Pufferlösung versetzt. Für die Hydrolyse wurde die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Lösung bis zur Hälfte des Volumens im Vakuum eingeeengt. Die wässrige Phase wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

### **AAV 17: Kupplung zum NAADP-Analoga**

Die (1.0 Äquiv.) Nicotinsäureeinheit oder deren Analoga wurde in wasserfreiem Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. In einem separaten Kolben wurde in wasserfreiem Acetonitril (16.0 Äquiv.) wasserfreies Et<sub>3</sub>N gegeben und anschließend langsam (10.0 Äquiv.) TFAA zuge tropft. Nach 10 Minuten Rühren bei 0 °C wurde diese Lösung langsam zur Lösung der Nicotinsäure/Analoga getropft. Die Lösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde daraufhin in wasserfreiem Acetonitril gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit (6.0 Äquiv.) NMI versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde (0.9 Äquiv.) des jeweiligen Adenosinderivats dreimal mit wasserfreiem Acetonitril coevaporiert und anschließend gelöst in wasserfreiem Acetonitril zugetropft. Es wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine 1 M TEAB-Pufferlösung zugegeben und

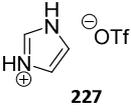
für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

### AAV 18: Abspaltung der TIPDS Schutzgruppe

Das (1.0 Äquiv.) 3'-TIPDSi<sub>2</sub>-geschütztes NAADP/-Analog wurde in wasserfreiem Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde (4.0 Äquiv.) Wasser und anschließend (2.0 Äquiv.) TASF zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion mit Kieselgel beendet. Die Suspension wurde filtriert und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

## 7.4 Zusätzliche Synthese von Reagenzien

### 7.4.1 Synthese von Imidazoliumtriflat 227

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (15.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Imidazol in 5 mL abs. Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurde daraufhin langsam 2.70 mL  (15.0 mmol, 1.0 Äquiv.) TMSOTf zugetropft und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde durch Zugabe von 20 mL Diethylether auskristallisiert und nach Abkühlen auf 0 °C durch Filtration isoliert.

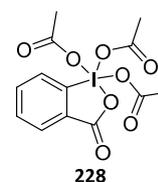
**Ausbeute:** 3.00 g (14.0 mmol, 93 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 218.15 g/mol

**Summenformel:** C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>297</sup>

### 7.4.2 Synthese von Dess-Martin-Periodinan 228

Es wurden 20.0 g (80.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Iodbenzoesäure und 72.0 g (470 mmol, 1.3 Äquiv.) Oxone<sup>®</sup> zusammen in 300 mL dest. Wasser gelöst und auf 72 °C innerhalb von 20 Minuten erwärmt. Die Lösung wurde anschließend 3 h bei dieser Temperatur weitergerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur



wurde die Suspension filtriert und zunächst mit Wasser gewaschen und anschließend mit

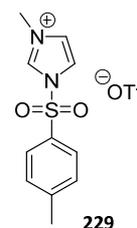
Aceton. Der farblose Feststoff wurde 3 h unter Vakuum getrocknet. Unter Stickstoffatmosphäre wurde das so erhaltene IBX in 100 mL Essigsäureanhydrid suspendiert und mit einer katalytischen Menge Toluolsulfonsäure\*monohydrat versetzt. Die Suspension wurde anschließend für 3 h bei 80 °C gerührt und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur filtriert. Der Rückstand wurde mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 31.7 g (74.7 mmol, 93 %) eines beigen gelblichen Feststoffes. **Molmasse:** 424.14 g/mol **Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>IO<sub>8</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>298</sup>

#### 7.4.3 Synthese von 3-Methyl-1-tosyl-1H-imidazol-3-ium triflat 229

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.00 g (73.0 mmol, 3.0 Äquiv.) Imidazol in 40 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und portionsweise mit 4.70 g (25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Tosylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend einmal mit Wasser und zweimal mit NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde daraufhin aus Hexan umkristallisiert. Der Rückstand wurde unter Stickstoffatmosphäre in 40 mL abs. THF gelöst. Zu der Lösung wurden langsam 2.50 mL (23.0 mmol, 1.1 Äquiv.) Methyltriflat zugetropft. Die Reaktionslösung wurde daraufhin für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die entstandene Suspension filtriert und im Vakuum getrocknet.



**Ausbeute:** 5.40 g (14.0 mmol, 58 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 386.36 g/mol **Summenformel:** C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>

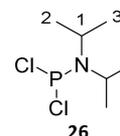
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>299</sup>

#### 7.4.4 Synthese von Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 26

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 4.58 mL (51.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Phosphortrichlorid **25** in 100 mL abs. Diethylether gelöst und auf -10 °C gekühlt. Die zweite Lösung bestand aus 14.3 mL (102 mmol, 2.0 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylamin, welches in 40 mL abs. Diethylether gelöst war.

Diese Lösung wurde ebenfalls auf  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Zu der Phosphortrichloridlösung wurde nun innerhalb von 1 Stunde die *N,N*-Diisopropylaminlösung getropft. Die entstandene Suspension wurde 90 Minuten bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und anschließend unter Schlenkbedingungen filtriert. Der Rückstand wurde mit abs. Diethylether gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 7.23 g (35.8 mmol, 70 %) eines leicht gelblichen Öls. **Molmasse:** 202.06 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{NP}$



**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.97-3.87 (m, 2H, H-1), 1.27 (d, 12H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6\text{ Hz}$ , H-2, H-3).

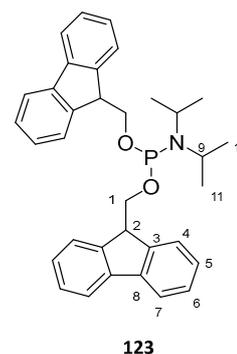
**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.6.

#### 7.4.5 Synthese von Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **123**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.51 g (17.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26** in 50 mL abs. THF gelöst. Die Lösung wurde anschließend auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Für eine zweite Lösung wurden ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre 6.83 g (34.8 mmol, 2.0 Äquiv.) 9-Fluorenylmethanol in 30 mL abs. THF gelöst und mit 5.30 mL (38.3 mmol, 2.2 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Die Fluorenylmethanollösung wurde langsam zur Amiditlösung getropft und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde anschließend filtriert und mit THF gewaschen. Das Filtrat wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel daraufhin im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE/ $\text{Et}_3\text{N}$  97:2:1 v/v/v).

**Ausbeute:** 7.32 g (14.0 mmol, 81 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 521.63 g/mol **Summenformel:** C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>2</sub>P

**Anmerkung:** Aufgrund der Instabilität des Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR- sowie des Protonenbreitband entkoppelten <sup>31</sup>P-NMR-Spektrums.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.42 (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.77 (d, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H<sub>ar</sub>), 7.67 (dd, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.3 Hz, H<sub>ar</sub>), 7.40 (dd, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H<sub>ar</sub>), 7.31 (dddd, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.1 Hz, H<sub>ar</sub>), 4.21 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-2), 4.05-4.01 (m, 2H, fluorenyl-H<sub>2</sub>), 3.86-3.82 (m, 2H, fluorenyl-H<sub>2</sub>), 3.71-3.65 (m, 2H, H-9), 1.18 (d, 12H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-10, H-11).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 149.2.

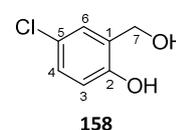
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2962, 2923, 1776, 1201, 1006, 727, 550, 517.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>2</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 522.2562, gefunden: 522.3008.

#### 7.4.6 Synthese von 5-Chlorsalicylalkohol **158**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.93 g (76.9 mmol, 2.2 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 40 mL abs. Tetrahydrofuran suspendiert und auf -50 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 6.00 g (34.9 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Chlorsalicylsäure **157** gelöst in 20 mL abs. Tetrahydrofuran langsam zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt und anschließend vorsichtig mit Eis versetzt. Daraufhin wurde der pH-Wert auf 4 mit konz. HCl eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 5.40 g (34.1 mmol, 97 %) eines gelblichen Öls. **Molmasse:** 158.58 g/mol **Summenformel:** C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.35 (PE/EE 2:1 v/v).

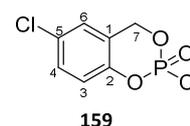
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>300</sup>

#### 7.4.7 Synthese von 5-Chlor-cycloSaligenylphosphorchloridat **159**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 320  $\mu\text{L}$  (3.47 mmol, 1.1 Äquiv.)  $\text{POCl}_3$  in 5 mL abs. THF gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu der Lösung wurde langsam eine Lösung aus 500 mg (3.15 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Chlorsalicylalkohol **158** und 920  $\mu\text{L}$  (6.62 mmol, 2.1 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  in 10 mL abs. THF zugetropft und anschließend für 1 Stunde bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , sowie 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde daraufhin filtriert und mit THF gewaschen. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:1 v/v + 0.1 % AcOH).

**Ausbeute:** 546 mg (2.28 mmol, 73 %) eines leicht gelblichen Öls. **Molmasse:**

238.99 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_2\text{O}_3\text{P}$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.47 (PE/EE 1:1 v/v + 0.1 % AcOH).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.34 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7\text{ Hz}$ , H-4), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.06 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.9\text{ Hz}$ , H-3), 5.50-5.42 (m, 2H, H-7).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 146.9 (C-2), 131.2 (C-1), 130.5 (C-4), 129.9 (C-5), 125.3 (C-1), 120.8 (C-3), 66.7 (C-7).

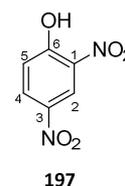
**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -6.61.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3\text{P}$  [M+H]<sup>+</sup> 238.9432, gefunden: 238.9429.

#### 7.4.8 Synthese von 2,4-Dinitrophenol **197**

Es wurden 3.00 g (14.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol **196** in 10 mL NaOH-Lsg. (20 %) suspendiert und für 3 h refluxiert. Anschließend wurde mit HCl (3 M) ein pH-Wert von 3 eingestellt. Der entstandene Feststoff wurde daraufhin filtriert und mit Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde abschließend aus Methanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 1.83 g (9.94 mmol, 67 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:** 184.11 g/mol **Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.67 (PE/EE 4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 11.01 (s, 1H, -OH), 9.06 (s, 1H, H-2), 8.45 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, H-4), 7.35 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 159.2 (C-6), 139.9 (C-3), 133.5 (C-1), 131.8 (C-4), 122.0 (C-2), 121.4 (C-5).

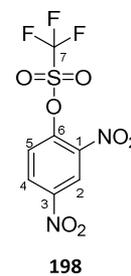
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3260, 2955, 2918, 1621, 1595, 1429, 1328, 1250, 1179, 1103, 913, 835, 672, 636, 516.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 207.0018, gefunden: 207.0145.

#### 7.4.9 Synthese von 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat 198

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 750 mg (4.07 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenol **197** und 850 µL (6.11 mmol, 1.5 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N in 10 mL abs. Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurde anschließend langsam 820 µL (4.89 mmol, 1.2 Äquiv.) Tf<sub>2</sub>O zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL Wasser beendet und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.03 g (3.26 mmol, 80 %) einer gelben Flüssigkeit. **Molmasse:** 316.16 g/mol **Summenformel:** C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.55 (PE/EE 4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.03 (s, 1H, H-2), 8.61 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, H-4), 7.73 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 146.5 (C-6), 145.7 (C-1), 129.2 (C-3), 125.9 (C-4), 122.7 (C-2), 119.2 (C-5), 117.6 (C-7).

**<sup>19</sup>F-NMR:** (565 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -72.44

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3114, 1608, 1542, 1433, 1343, 1211, 1128, 1064, 865, 780, 605, 477.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet  $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  338.9511, gefunden: 338.3103.

## 7.5 Synthese der Schutzgruppen

### 7.5.1 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat 125

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 3.72 g (30.0 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **81** mit 3.74 mL (27.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 35 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Anschließend wurden 4.42 g (27.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Octansäurechlorid, gelöst in 20 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , zugetropft. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:3 v/v).

**Ausbeute:** 3.60 g (14.4 mmol, 53 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 250.33 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$

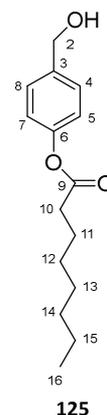
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.49 (PE/EE 4:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.33 (m, 2H, H-5, H-7), 7.05 (m, 2H, H-4, H-8), 4.49 (s, 2H, H-2), 2.54 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-10), 1.63 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-11), 1.36-1.23 (m, 8H, H-12, H-13, H-14, H-15), 0.86 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-16).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.9 (C-9), 149.2 (C-6), 140.0 (C-3), 127.4 (C-4, C-8), 121.3 (C-5, C-7), 62.4 (C-2), 33.5 (C-10), 31.1, 28.4, 24.4, 22.1 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 13.9 (C-16).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3387, 2926, 2856, 1756, 1606, 1507, 1196, 1014, 878, 849, 504.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  251.1647,  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  273.1467, gefunden: 233.1457 (30%), 394.2842 (100%), 452.2886 (15%), 575.2895 (15%).



### 7.5.2 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat 24

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 4.00 g (32.2 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **81** mit 4.06 mL (29.3 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 40 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Anschließend wurden 4.10 mL (29.3 mmol, 1.0 Äquiv.) Hexansäurechlorid,

gelöst in 20 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , zugetropft. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 2.89 g (13.0 mmol, 44 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 222.28 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$

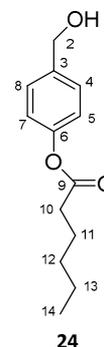
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.43 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.35 (m, 2H, H-5, H-7), 7.06 (m, 2H, H-4, H-8), 4.66 (s, 2H, H-2), 2.55 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-10), 1.76 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-11), 1.41-1.36 (m, 4H, H-12, H-13), 0.93 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-14).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 173.1 (C-9), 150.3 (C-6), 139.6 (C-3), 128.2 (C-4, C-8), 121.8 (C-5, C-7), 66.5 (C-2), 34.5 (C-10), 32.4 (C-11), 26.0 (C-12), 22.4 (C-13), 13.7 (C-14).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2956, 2867, 1736, 1609, 1463, 1198, 1161, 1144, 1038, 892, 823, 505.

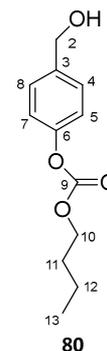
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  223.1334, gefunden: 223.1231, berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  245.1154, gefunden: 245.0981, berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{K}$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  261.0893, gefunden: 261.0685.



### 7.5.3 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat 80

Die Reaktion wurde analog zur AAV 1 durchgeführt. Es wurden 7.45 g (60.0 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **81**, 5.46 g (54.0 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin in 40 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und anschließend mit 7.38 g (54.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Butylchlorformiat, gelöst in 20 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:2 v/v).

**Ausbeute:** 8.28 g (36.9 mmol, 68 %) einer gelblichen, viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 224.26 g/mol **Summenformel:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>



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

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.39-7.31 (m, 2H, H-5, H-7), 7.19-7.12 (m, 2H, H-4, H-8), 4.64 (s, 2H, H-2), 4.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-10), 2.00 (s, 1H, H-1), 1.72 (dtt, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, H-11), 1.53-1.36 (m, 2H, H-12), 0.97 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-13).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 153.9 (C-9), 150.6 (C-4), 138.8 (C-1), 128.1 (C-5, C-7), 121.2 (C-4, C-8), 68.9 (C-10), 64.7 (C-2), 30.7 (C-11), 19.0 (C-12), 13.7 (C-13).

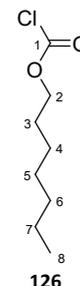
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2934, 2873, 1757, 1508, 1391, 1206, 1118, 1012, 926, 823, 603, 506.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 247.0946, gefunden: 247.0895.

#### 7.5.4 Synthese von Heptylchlorformiat 126

Unter Stickstoff als Inertgasatmosphäre wurden 17.0 g (57.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Triphosgen in 50 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 20.0 g 1-Heptanol (172 mmol, 3.0 Äquiv.) tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurden 13.9 mL abs. Pyridin (172 mmol, 3.0 Äquiv.), welches in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst wurde, tropfenweise zu der Reaktionslösung hinzugegeben. Dabei wurde eine Temperatur von 0–5 °C beibehalten. Danach wurde das Reaktionsgemisch 15 h bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin zweimal mit kaltem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

**Ausbeute:** 28.7 g (161 mmol, 93 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 178.66 g/mol **Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>2</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ [ppm] = 4.31 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-2), 1.77-1.67 (m, 2H, H-3), 1.48-1.18 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-7), 0.92-0.86 (m, 3H, H-8).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ [ppm] = 151.1 (C-1), 72.8 (C-2), 32.0 (C-5), 29.1 (C-4), 28.7 (C-3), 25.9 (C-6), 22.9 (C-7), 14.4 (C-8).

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 200.0580, gef.: 200.1874.

### 7.5.5 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonat **127**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 1 durchgeführt. Es wurden 7.45 g (60.0 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **81**, 5.44 g (54.0 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin in 40 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und anschließend mit 9.65 g (54.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Heptylchlorformiat **126**, gelöst in 20 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:2 v/v).

**Ausbeute:** 10.6 g (39.5 mmol, 74 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 266.34 g/mol

**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

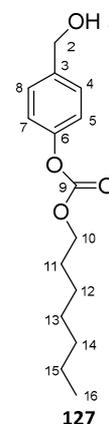
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.70 (PE/EE 3:2 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.44-7.32 (m, 2H, H-4, H-8), 7.19-7.13 (m, 2H, H-5, H-7), 4.68 (s, 2H, H-2), 4.24 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-10), 1.73 (dt, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-11), 1.46-1.26 (m, 8H, H-12, H-13, H-14, H-15), 0.94-0.85 (m, 3H, H-16).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.9 (C-9), 150.7 (C-3), 138.8 (C-6), 128.2 (C-4, C-8), 121.3 (C-5, C-7), 69.2 (C-10), 64.8 (C-2), 31.8 (C-11), 29.0 (C-12), 28.7 (C-13), 25.8 (C-14), 22.7 (C-15), 13.7 (C-16).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2956, 2857, 1758, 1509, 1391, 1209, 1048, 1012, 824, 726, 604, 507.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 289.1402, gef.: 289.1342.



### 7.5.6 Synthese von *tert*-butyl-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)carbammat **178**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 750 mg (6.09 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylamin **177** in 5 mL in einem Gemisch aus abs. DMF und Pyridin (5:1 v/v) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde langsam 1.37 mL (6.40 mmol, 1.05 Äquiv.) Boc<sub>2</sub>O zugetropft und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung mit 30 mL Wasser und mit 30 mL Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und anschließend mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Die darauffolgende Reaktion des Rohprodukts wurde analog zur AAV 1 durchgeführt. Es wurde das Rohprodukt mit 844  $\mu\text{L}$  (6.09 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin in 40 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und anschließend mit 980 mg (5.48 mmol, 0.9 Äquiv.) Heptylchlorformiat **126**, gelöst in 20 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.28 g (3.50 mmol, 57 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 365.47 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_5$

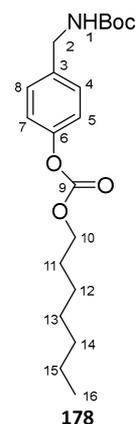
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.65 (PE/EE 4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.30-7.28 (m, 2H, H-4, H-8), 7.14-7.12 (m, 2H, H-5, H-7), 4.84 (bs, 1H, NH), 4.31 (s, 2H, H-2), 4.24 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-10), 1.74 (dt, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-11), 1.45 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -Boc), 1.42-1.27 (m, 8H, H-12, H-13, H-14, H-15), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$  Hz, H-16).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.9 (C-9), 150.5 (C-3), 136.9 (C-6), 127.8 (C-4, C-8), 121.4 (C-5, C-7), 79.8 ( $\text{C}_q$ -Boc), 69.2 (C-10), 44.2 (C-2), 31.8 (C-11), 29.0 (C-12), 28.7 (C-13), 28.5 ( $\text{CH}_3$ -Boc), 25.8 (C-14), 21.7 (C-15), 14.2 (C-16).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3361, 2957, 2927, 2857, 1760, 1697, 1507, 1390, 1245, 1216, 1162, 1073, 780, 730.

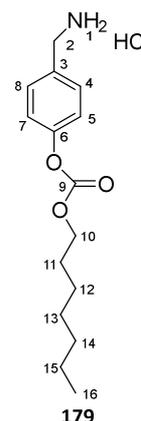
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  388.2100, gef.: 388.2156.



### 7.5.7 Synthese von 4-(Aminomethyl)phenylheptylcarbonat\*hydrochlorid **179**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 1.25 g (3.42 mmol, 1.0 Äquiv.) tert-butyl-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)carbamate **178** in 20 mL abs. Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde langsam 4.88 mL (68.4 mmol, 20.0 Äquiv.) Acetylchlorid getropft und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

**Ausbeute:** 930 mg (3.08 mmol, 90 %) eines leicht beigen Feststoffs. **Molmasse:** 301.81 g/mol **Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.43 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.54-7.52 (m, 2H, H-4, H-8), 7.30-7.28 (m, 2H, H-5, H-7), 4.26 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-10), 4.16 (s, 2H, H-2), 1.75 (dt, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-11), 1.47-1.33 (m, 8H, H-12, H-13, H-14, H-15), 0.94 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, H-16).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 155.1 (C-9), 153.3 (C-3), 132.2 (C-6), 131.5 (C-4, C-8), 123.1 (C-5, C-7), 70.2 (C-10), 43.7 (C-2), 32.9 (C-11), 30.0 (C-12), 29.7 (C-13), 26.8 (C-14), 23.6 (C-15), 14.4 (C-16).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3394, 2927, 2511, 1756, 1513, 1462, 1256, 1219, 825.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>Na [M+H-HCl]<sup>+</sup> 266.1756, gef.: 266.1691.

### 7.5.8 Synthese von 4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl 2,2,2-trichloroacetimidat 213

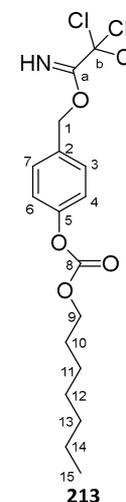
Die Reaktion wurde analog zur AAV 12 durchgeführt. Es wurden 300 mg (1.13 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonat **127**, 680 μL (6.76 mmol, 6.0 Äquiv.) Trichloroacetonitril in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und anschließend mit 20.0 μL (113 μmol, 0.1 Äquiv.) DBU versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v + 2 % Et<sub>3</sub>N).

**Ausbeute:** 394 mg (959 μmol, 86 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 410.72 g/mol

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.65 (PE/EE 2:1 v/v + 2 % Et<sub>3</sub>N).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.41 (s, 1H, -NH), 7.46-7.44 (m, 2H, H-3, H-7), 7.21-7.19 (m, 2H, H-4, H-6), 5.33 (s, 2H, H-1), 4.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, H-9), 1.75 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, H-10), 1.44-1.26 (m, 8H, H-11, H-12, H-13, H-14), 0.94-0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, H-15).



**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 161.7 (c-a), 153.8 (C-5), 151.2 (C-8), 133.3 (C-2), 128.7 (C-3, C-7), 121.4 (C-4, C-6), 70.2 (C-1), 69.3 (C-9), 31.8, 29.0, 28.7, 25.8, 22.7 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14), 13.6 (C-15).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3233, 2956, 2857, 1758, 1653, 1247, 1211, 1012, 829, 677.

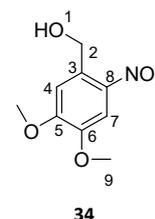
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{NO}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  432.0512, gef.: 432.0534.

### 7.5.9 Synthese von (4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol **34**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 500 mg (2.37 mmol, 1.0 Äquiv.) des Aldehyds **33** in 5 ml absolutem Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 90.0 mg (2.37 mmol, 1.0 Äquiv.)  $\text{NaBH}_4$  zugegeben und 2 Stunden bei 0 °C und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mL Wasser beendet und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 460 mg (2.16 mmol, 93 %) eines gelben Feststoffs. **Molmasse:**

213.19 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_5$



**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 7.75 (s, 1H, H-4), 7.43 (s, 1H, H-7), 5.46 (s, 2H, H-2), 3.99 (s, 3H, H-9'), 3.92 (s, 3H, H-9'').

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 155.4 (C-5), 150.1 (C-6), 139.4 (C-8), 134.0 (C-3), 111.9 (C-4), 109.2 (C-7), 62.2 (C-2), 56.8 (C-9).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2939, 2641, 1717, 1680, 1584, 1507, 1368, 1274, 1228, 1156, 1071, 989, 879, 778.

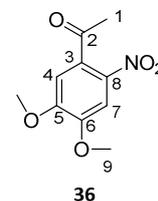
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  196.0609, gefunden: 196.0646.

### 7.5.10 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanon **36**

Es wurden 1.80 g (10.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 3,4-Dimethoxyacetophenon **35** in 10.0 mL (265 mmol, 26.5 Äquiv.) Ameisensäure (100 %) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden vorsichtig 6.00 mL (129 mmol, 12.9 Äquiv.) Salpetersäure (65 %) getropft. Die Lösung wurde bis auf 60 °C erwärmt. Die entstehende Suspension wurde für weitere

30 Minuten gerührt und anschließend in Eiswasser gegossen. Die Suspension wurde filtriert und mit Wasser gespült. Das Produkt wurde daraufhin gefriertrocknet.

**Ausbeute:** 1.62 g (7.20 mmol, 72 %) eines gelben Feststoffs. **Molmasse:** 225.06 g/mol **Summenformel:** C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.62 (s, 1H, H-4), 6.76 (s, 1H, H-7), 3.98 (s, 6H, H-9), 2.50 (s, 3H, H-1).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 200.2 (C-2), 154.1 (C-5), 149.8 (C-6), 133.0 (C-8), 117.9 (C-3), 108.8 (C-4), 107.0 (C-7), 56.8 (C-9'), 56.7 (C-9''), 30.5 (C-1).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3011, 2974, 1699, 1575, 1462, 1395, 1181, 882, 758, 665, 565.

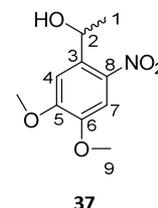
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 226.0715, gefunden: 226.0701.

### 7.5.11 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **37**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (4.40 mmol, 1.0 Äquiv.) des Ketons **36** in 30 ml absolutem Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 170 mg (4.49 mmol, 1.0 Äquiv.) NaBH<sub>4</sub> zugegeben und 2 Stunden bei 0 °C und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL Wasser beendet und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 969 mg (4.26 mmol, 96 %) eines gelben Feststoffs. **Molmasse:** 227.22 g/mol **Summenformel:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, H-4), 7.31 (s, 1H, H-7), 5.57 (q, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-2), 4.00 (s, 3H, H-9'), 3.94 (s, 3H, H-9''), 1.56 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-1).



**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.9 (C-5), 147.9 (C-6), 137.0 (C-8), 118.0 (C-3), 108.6 (C-4), 107.8 (C-7), 65.9 (C-2), 56.6 (C-9), 24.4 (C-1).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3266, 2961, 2917, 2437, 1747, 1689, 1500, 1366, 1056, 894, 796, 593.

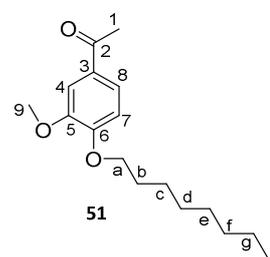
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub> [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 210.0766, gefunden: 210.0795.

**7.5.12 Synthese von 1-(3-methoxy-4-(octyloxy)phenyl)ethan-1-one 51**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (6.02 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxy-3-methoxy-acetophenon **50**, 1.26 mL (7.22 mmol, 1.2 Äquiv.) 1-Bromooctan und 830 mg (6.02 mmol, 1.0 Äquiv.)  $K_2CO_3$  in 4 ml absolutem Ethanol gelöst. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 140 °C und 150 W in einem geschlossenem Mikrowellengefäß behandelt. Die Reaktionslösung wurde mit 10 mL NaOH-Lsg. 1 M versetzt und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 1.42 g (5.10 mmol, 84 %) eines gelben Feststoffs. **Molmasse:**

278.39 g/mol **Summenformel:**  $C_{17}H_{26}O_3$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.43 (PE/EE 4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.56 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 8.2$  Hz,  $^4J_{HH} =$

2.1 Hz, H-8), 7.52 (s, 1H, H-4), 6.88 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8.3$  Hz, H-7), 4.06 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 6.7$  Hz, H-a)

3.93 (s, 3H, H-9), 2.56 (s, 3H, H-1), 1.86 (quint., 2H,  $^3J_{HH} = 7.8$  Hz, H-b), 1.46 (quint., 2H,  $^3J_{HH} =$   
7.5 Hz, H-c), 1.39-1.24 (m, 8H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.88 (t, 3H,  $^3J_{HH} = 6.5$  Hz, H-h).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 197.0 (C-2), 153.8 (C-6), 148.7 (C-5), 130.6 (C-3), 123.2 (C-8), 111.7 (C-7), 110.4 (C-4), 69.3 (C-a), 56.2 (C-9), 32.0, 29.5, 29.4, 29.2, 26.4, 26.1, 22.8 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-1), 14.2 (C-h).

**IR:**  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] (Film) = 2960, 2869, 1672, 1583, 1508, 1424, 1286, 1215, 1144, 1045, 809, 778, 643, 591.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $C_{17}H_{27}O_3$  [M+H]<sup>+</sup> 279.1960, gefunden: 279.1957.

**7.5.13 Synthese von 1-(5-methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)ethan-1-one 52**

Es wurden 1.40 g (5.03 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-(3-methoxy-4-(octyloxy)phenyl)ethan-1-one **51** in 5.02 mL (0.133 mol, 26.5 Äquiv.) Ameisensäure (100 %) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden vorsichtig 3.03 mL (64.9 mmol, 12.9 Äquiv.) Salpetersäure (65 %) getropft. Die Lösung wurde bis auf 60 °C erwärmt. Die entstehende Suspension wurde für weitere 30 Minuten gerührt und anschließend in Eiswasser gegossen. Die Suspension wurde

filtriert und mit Wasser gespült. Das Produkt wurde daraufhin gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.40 g (4.33 mmol, 86 %) eines gelben Feststoffs. **Molmasse:**

323.39 g/mol **Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.38 (PE/EE 4:1 v/v).

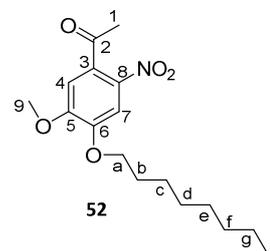
**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.61 (s, 1H, H-4), 6.73 (s, 1H, H-

7), 4.09 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, H-a) 3.96 (s, 3H, H-9), 2.49 (s, 3H, H-1), 1.87 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, H-b), 1.46 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-c), 1.38-1.24 (m, 8H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-h).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 200.4 (C-2), 153.9 (C-6), 149.9 (C-5), 133.0 (C-8), 117.6 (C-3), 109.5 (C-4), 107.1 (C-7), 70.0 (C-a), 56.7 (C-9), 31.9, 30.6, 29.4, 29.3, 28.9, 25.9, 22.8 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-1), 14.2 (C-h).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2925, 2854, 1705, 1575, 1515, 1333, 1277, 1212, 1042, 867, 794.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 324.1811, gefunden: 324.1821.



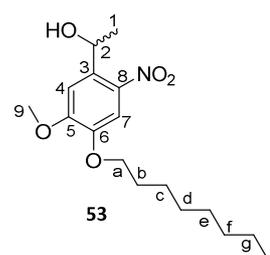
#### 7.5.14 Synthese von 1-(5-methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)ethan-1-ol 53

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (4.40 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-(5-methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)ethan-1-one **52** in 10 ml absolutem Ethanol und 5 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 160 mg (4.17 mmol, 1.0 Äquiv.) NaBH<sub>4</sub> zugegeben und 2 Stunden bei 0 °C und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL Wasser beendet und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 1.36 g (4.18 mmol, quantitativ) eines gelben Feststoffs. **Mol-**

**masse:** 325.41 g/mol **Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.38 (PE/EE 4:1 v/v).



**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.55 (s, 1H, H-4), 7.27 (s, 1H, H-7), 5.55 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz, H-2), 4.12 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-a) 3.91 (s, 3H, H-9), 1.88 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-b), 1.54 (d, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-1), 1.47 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-c), 1.41-1.23 (m, 8H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.88 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-h).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.7 (C-6), 148.1 (C-5), 139.6 (C-8), 136.9 (C-3), 109.6 (C-4), 108.1 (C-7), 69.6 (C-a), 65.9 (C-2), 56.5 (C-9), 31.9, 29.4, 29.3, 29.0, 26.0, 24.4, 22.8 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-1), 14.2 (C-h).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2926, 2855, 1580, 1513, 1332, 1265, 1213, 1265, 1213, 1099, 1021, 797, 759.

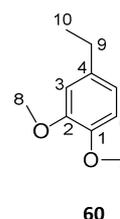
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  348.1787, gefunden: 348.1784.

### 7.5.15 Synthese von 4-Ethyl-1,2-dimethoxybenzol 60

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (6.57 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Ethylguajacol **59** in 10 ml absolutem Aceton gelöst. Zu der Lösung wurden 1.66 g (13.1 mmol, 2.0 Äquiv.) Dimethylsulfat und 900 mg (6.57 mmol, 1.0 Äquiv.)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL Wasser beendet und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 5:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.09 g (6.53 mmol, 99 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 166.22 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.31 (PE/EE 5:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 6.80 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7$  Hz, 1H, H-5), 6.76-6.73 (m, 2H, H-3, H-6), 3.88 (s, 3H, H-7), 3.86 (s, 3H, H-8), 2.60 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 2H, H-9), 1.23 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 3H, H-10).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 149.2 (C-2), 147.4 (C-1), 137.4 (C-4), 119.9 (C-5), 111.7 (C-6), 111.6 (C-3), 56.4 (C-7), 56.2 (C-8), 28.9 (C-9), 16.3 (C-10).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2960, 2932, 2871, 1606, 1589, 1462, 1336, 1191, 1060, 902, 807, 699, 595.

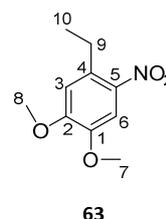
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  167.1067, gefunden: 167.1020.

**7.5.16 Synthese von 1-Ethyl-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzol 63**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 2 durchgeführt. Es wurden 1.00 g (6.02 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Ethyl-1,2-dimethoxybenzol **60** und 2.29 mL (24.1 mmol, 4.0 Äquiv.) Salpetersäure (65 %) in 11 mL Essigsäure und 6 mL Wasser gelöst. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 5:1 v/v).

**Ausbeute:** 750 mg (3.55 mmol, 59 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:**

211.22 g/mol **Summenformel:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.51 (PE/EE 5:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.62 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-3), 3.99 (s, 3H, H-7), 3.95 (s, 3H, H-8), 2.99 (q, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-9), 1.31 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-10).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.6 (C-2), 147.4 (C-1), 141.8 (C-5), 135.0 (C-4), 113.0 (C-3), 108.6 (C-6), 56.7 (C-7), 56.6 (C-8), 27.5 (C-9), 15.5 (C-10).

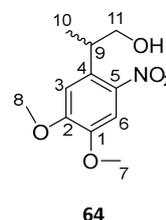
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2924, 2852, 1707, 1637, 1579, 1461, 1360, 1217, 1069, 966, 866, 646, 597.

**7.5.17 Synthese von 2-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol 64**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 4 durchgeführt. Es wurden 750 mg (3.55 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Ethyl-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzol **63**, 430 μL (2.49 mmol, 0.7 Äquiv.) Triton B und 437 mg (14.6 mmol, 4.1 Äquiv.) Paraformaldehyd in 5 mL DMSO eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

**Ausbeute:** 750 mg (3.11 mmol, 87 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:**

241.24 g/mol **Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.26 (PE/EE 1:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, H-6), 6.83 (s, 1H, H-3), 3.97 (s, 3H, H-7), 3.93 (s, 3H, H-8), 3.85-3.71 (m, 3H, H-9, H-11), 1.62 (s, 1H, -OH), 1.32 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, H-10).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.9 (C-2), 146.7 (C-1), 142.1 (C-5), 134.1 (C-4), 110.5 (C-3), 110.1 (C-6), 71.7 (C-a), 68.4 (C-11), 56.7 (C-7), 56.6 (C-8), 36.6 (C-9), 18.0 (C-10).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2917, 2848, 1718, 1641, 1581, 1505, 1462, 1371, 1214, 1068, 1019, 910, 847, 728, 646.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_4$  [ $\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ ]<sup>+</sup> 224.0917, gefunden: 224.0901.

### 7.5.18 Synthese von 1-(Benzyloxy)-4-ethyl-2-methoxybenzol **61**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.00 g (32.9 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Ethylguajakol **59** in 50 mL Aceton gelöst. Zu der Lösung wurden 5.53 g (40.0 mmol, 1.2 Äquiv.) Kaliumcarbonat und 240 mg (649  $\mu\text{mol}$ , kat.) TBAI zugegeben. Danach wurden 5.11 mL (43.0 mmol, 1.3 Äquiv.) Benzylbromid langsam zugetropft. Daraufhin wurde die Reaktionslösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde 150 mL Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 10:1 v/v).

**Ausbeute:** 11.0 g (45.5 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls. **Molmasse:**

242.32 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2$

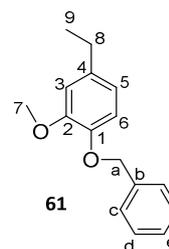
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.58 (PE/EE 10:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.45 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, H-c), 7.37 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, H-d), 7.30 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, H-e), 6.82 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$  Hz, H-5), 6.76 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, H-6), 6.68 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ ,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, H-3), 5.14 (s, 2H, H-a), 3.90 (s, 3H, H-7), 2.60 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-8), 1.23 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-9).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 149.9 (C-2), 146.6 (C-1), 138.1 (C-4), 137.9 (C-b), 128.9 (C-d), 128.1 (C-e), 127.7 (C-c), 119.9 (C-3), 114.7 (C-5), 112.3 (C-6), 71.6 (C-a), 56.4 (C-7), 28.9 (C-8), 16.2 (C-9).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2960, 2868, 1589, 1456, 1378, 1318, 1156, 1080, 903, 850, 734, 635.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{Na}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> 265.1199, gefunden: 265.1201.



### 7.5.19 Synthese von 1-(Benzyloxy)-4-ethyl-2-methoxy-5-nitrobenzol **62**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 2 durchgeführt. Es wurden 6.00 g (24.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-(Benzyloxy)-4-ethyl-2-methoxybenzol **61** und 4.13 mL (99.0 mmol, 4.0 Äquiv.) Salpetersäure

(65 %) in 41 mL Essigsäure und 20 mL Wasser gelöst. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 5:1 v/v).

**Ausbeute:** 6.03 g (21.0 mmol, 60 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:**

287.32 g/mol **Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>

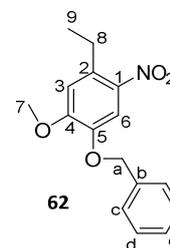
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.76 (PE/EE 5:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.65 (s, 1H, H-6), 7.45 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, H-c), 7.39 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-d), 7.33 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, H-e), 6.74 (s, 1H, H-3), 5.16 (s, 2H, H-a), 3.96 (s, 3H, H-7), 2.95 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-8), 1.28 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-9).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.1 (C-4), 146.4 (C-5), 141.2 (C-1), 136.3 (C-b), 135.4 (C-2), 129.0 (C-d), 127.8 (C-c), 128.8 (C-e), 112.8 (C-3), 110.8 (C-6), 71.6 (C-a), 56.8 (C-7), 27.4 (C-8), 15.4 (C-9).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2934, 2872, 1707, 1612, 1517, 1388, 1208, 1066, 996, 864, 803, 697, 481.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 288.1231, gefunden: 288.1208.



### 7.5.20 Synthese von 2-(4-(Benzyloxy)-5-methoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol 65

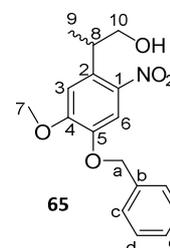
Die Reaktion wurde analog zur AAV 4 durchgeführt. Es wurden 2.54 g (8.85 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Ethyl-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzol **62**, 2.50 mL (6.19 mmol, 0.7 Äquiv.) Triton B und 1.08 g (35.6 mmol, 4.1 Äquiv.) Paraformaldehyd in 10 mL DMSO eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

**Ausbeute:** 2.49 g (7.85 mmol, 89 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:**

317.34 g/mol **Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.52 (PE/EE 1:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.50 (s, 1H, H-6), 7.46-7.43 (m, 2H, H-c), 7.41-7.37 (m, 2H, H-d), 7.36-7.31 (m, 1H, H-e), 6.90 (s, 1H, H-3), 5.16 (s, 2H, H-a), 3.96 (s, 3H, H-7), 3.85-3.71 (m, 3H, H-8, H-10), 1.62 (s, 1H, -OH), 1.32 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, H-9).



**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.9 (C-4), 146.7 (C-5), 142.1 (C-1), 129.1 (C-c), 136.2 (C-b), 134.1 (C-2), 128.7 (C-e), 127.9 (C-d), 110.5 (C-6), 110.1 (C-3), 71.7 (C-a), 68.4 (C-10), 56.7 (C-7), 36.6 (C-8), 18.0 (C-9).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2933, 2872, 1660, 1577, 1463, 1368, 1267, 1066, 976, 910, 805, 731, 607.

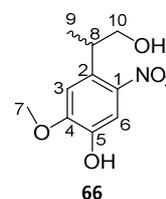
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_4$  [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 299.1157, gefunden: 299.1158.

### 7.5.21 Synthese von 4-(1-Hydroxypropan-2-yl)-2-methoxy-5-nitrophenol **66**

Es wurden 3.20 g (10.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-(4-(Benzyloxy)-5-methoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol **65** in 10 mL THF gelöst und mit 30 mL konz. Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung der Reaktion mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

**Ausbeute:** 2.09 g (9.19 mmol, 91 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:**

227.22 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_5$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.54 (PE/EE 1:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.46 (s, 1H, H-6), 6.87 (s, 1H, H-3), 3.98 (s, 3H, H-7), 3.85-3.72 (m, 2H, H-10), 3.73-3.62 (m, 1H, H-8), 1.60 (s, 1H, -OH), 1.31 (d, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-9).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 150.6 (C-4), 144.29 (C-1), 143.8 (C-5), 132.5 (C-2), 111.6 (C-6), 109.2 (C-3), 68.5 (C-10), 56.7 (C-7), 36.5 (C-8), 18.1 (C-9).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3506, 3138, 2962, 1517, 1451, 1378, 1297, 1163, 1074, 898, 802, 718, 631, 516.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_4$  [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 210.0761, gefunden: 210.0713.

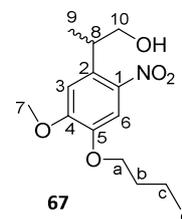
### 7.5.22 Synthese von 2-(4-Butoxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol **67**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 3 durchgeführt. Es wurden 340 mg (1.50 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(1-Hydroxypropan-2-yl)-2-methoxy-5-nitrophenol **66**, 310 mg (2.25 mmol, 1.5 Äquiv.)

1-Brombutan und 410 mg (3.00 mmol, 2.0 Äquiv.) Kaliumcarbonat in 8 mL DMF eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

**Ausbeute:** 426 mg (1.50 mmol, quantitativ) eines gelben Öls. **Molmasse:**

283.32 g/mol **Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.28 (PE/EE 1:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.43 (s, 1H, H-6), 6.87 (s, 1H, H-3), 4.04 (td, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.3 Hz, H-a), 3.94 (s, 3H, H-7), 3.86-3.69 (m, 3H, H-8, H-10), 1.84 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-b), 1.64 (s, 1H, -OH), 1.54-1.45 (m, 2H, H-c), 1.32 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, C-9), 0.98 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-d).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.4 (C-4), 146.9 (C-5), 142.8 (C-1), 133.1 (C-2), 109.7 (C-6), 109.2 (C-3), 69.3 (C-a), 68.2 (C-10), 56.4 (C-7), 36.3 (C-8), 31.1 (C-b), 19.3 (C-c), 17.7 (C-9), 14.0 (C-d).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3395, 2958, 2872, 1664, 1576, 1464, 1334, 1208, 1096, 1012, 958, 865, 758, 663, 606.

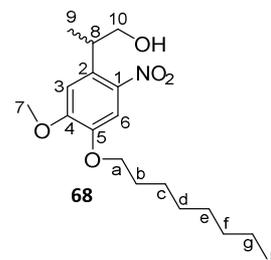
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub> [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 266.1367, gefunden: 266.1350.

### 7.5.23 Synthese von 2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol 68

Die Reaktion wurde analog zur AAV 3 durchgeführt. Es wurden 340 mg (1.50 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(1-Hydroxypropan-2-yl)-2-methoxy-5-nitrophenol **66**, 430 mg (2.25 mmol, 1.5 Äquiv.) 1-Bromooctan und 410 mg (3.00 mmol, 2.0 Äquiv.) Kaliumcarbonat in 8 mL DMF eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

**Ausbeute:** 534 mg (1.50 mmol, quantitativ) eines gelben Öls. **Mol-**

**masse:** 339.43 g/mol **Summenformel:** C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.41 (PE/EE 1:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.42 (s, 1H, H-6), 6.87 (s, 1H, H-3), 4.03 (td, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.2 Hz, H-a), 3.94 (s, 3H, H-7), 3.84-3.71 (m, 3H, H-8, H-

10), 1.85 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-b), 1.62 (s, 1H, -OH), 1.50-1.40 (m, 2H, H-c), 1.39-1.22 (m, 11H, H-9, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.88 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-h).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.7 (C-4), 147.2 (C-5), 143.0 (C-1), 133.4 (C-2), 109.9 (C-6), 109.5 (C-3), 69.8 (C-a), 68.5 (C-10), 56.7 (C-7), 36.6 (C-8), 32.2 (C-b), 29.7, 29.6, 29.3, 26.3, 23.1 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g), 18.0 (C-9), 14.5 (C-h).

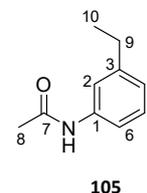
**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2924, 2854, 1657, 1577, 1516, 1368, 1267, 1066, 976, 864, 758, 646, 606.

**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NO}_4$  [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 322.2013, gefunden: 322.1954.

### 7.5.24 Synthese von *N*-(3-Ethylphenyl)acetamid **105**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 10.0 g (82.5 mmol, 1.0 Äquiv.) 3-Ethylanilin **104** in 50 ml abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Zu der Lösung wurde 9.36 mL (97.6 mmol, 1.2 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL Wasser beendet und die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

**Ausbeute**: 13.7 g (83.9 mol, quantitativ) eines farblosen Feststoffs. **Molmasse**: 163.22 g/mol **Summenformel**:  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$



**R<sub>f</sub>-Wert**: 0.10 (PE/EE 10:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.35 (s, 1H, H-2), 7.31 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3$  Hz, 1H, H-6), 7.22 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3$  Hz, 1H, H-5), 6.95 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3$  Hz, 1H, H-4), 2.63 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 2H, H-9), 2.16 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Acetyl), 1.22 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 3H, H-10).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 168.3 (C-7), 145.3 (C-3), 137.9 (C-1), 128.9 (C-5), 123.9 (C-4), 119.4 (C-2), 117.2 (C-6), 29.0 (C-9), 24.7 (C-8), 15.6 (C-10).

**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3299, 2965, 2873, 1662, 1593, 1550, 1486, 1370, 1270, 1167, 1017, 993, 880, 729, 665, 615, 539, 451.

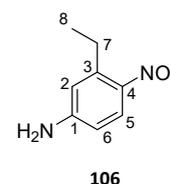
**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}$  [M+H]<sup>+</sup> 164.1070, gefunden: 164.1240.

**7.5.25 Synthese von 3-Ethyl-4-nitroanilin 106**

Es wurden 13.7 g (83.9 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(3-Ethylphenyl)acetamid **105** langsam in 42 ml konz. Schwefelsäure gegeben und dabei auf eine Temperatur zwischen -20 °C und 10 °C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurde 3.99 g (2.64 mL, 63.3 mmol, 0.75 Äquiv.) Salpetersäure (60 %) langsam zugetropft. Nach 30 Minuten rühren wurde die Reaktionslösung auf Eis gegossen und daraufhin mit NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Zwischenprodukt wurde mit 50 mL konz. Salzsäure versetzt und 16 h refluxiert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit 1 M NaOH-Lsg. gelöst. Die wässrige Phase wurde daraufhin zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 10:1 v/v).

**Ausbeute:** 7.20 g (43.3 mmol, 68 %) eines braunen Feststoffs. **Molmasse:**

166.18 g/mol **Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.38 (PE/EE 10:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 6.53-6.45 (m, 2H, H-2, H-6), 4.26 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.95 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-7), 1.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 3H, H-8).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 151.4 (C-4), 143.4 (C-3), 139.6 (C-1), 128.5 (C-5), 115.5 (C-2), 111.9 (C-6), 27.6 (C-7), 14.8 (C-8).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3327, 2960, 2872, 1654, 1603, 1575, 1295, 1171, 1048, 867, 754, 693, 576, 452.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 167.0821, gefunden: 167.0918.

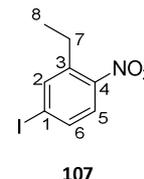
**7.5.26 Synthese von 2-Ethyl-4-iodo-1-nitrobenzol 107**

Es wurde 7.20 g (43.3 mmol, 1.0 Äquiv.) 3-Ethyl-4-nitroanilin **106** zu einer Lösung aus 130 mL und 11 mL konz. Schwefelsäure gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf eine Temperatur von 0 °C bis 5 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde 3.34 g (48.4 mmol, 1.1 Äquiv.) Natriumnitrit, gelöst in 30 mL Wasser langsam zugetropft und für 10 Minuten bei einer Temperatur zwischen 0 °C

bis 5 °C gerührt. Daraufhin wurde 10.9 g (65.4 mmol, 1.5 Äquiv.) Kaliumiodid, gelöst in 35 mL Wasser zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Ethylacetat versetzt und die organische Phase daraufhin einmal mit 1 M NaOH-Lsg. und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 8.26 g (29.8 mmol, 69 %) eines orangenen Feststoffs. **Molmasse:**

277.06 g/mol **Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>INO<sub>2</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.66 (PE/EE 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 7.94 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-2), 7.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-5), 2.78 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-7), 1.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 3H, H-8).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 148.5 (C-4), 139.9 (C-3), 139.8 (C-2), 136.2 (C-6), 125.9 (C-6), 101.7 (C-1), 24.9 (C-7), 14.8 (C-8).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3432, 2251, 2126, 1661, 1050, 1024, 1002, 822, 759, 618, 528.

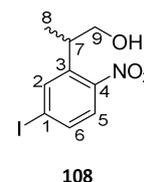
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 294.9943, gefunden: 294.9666.

### 7.5.27 Synthese von 2-(5-Iodo-2-nitrophenyl)propan-1-ol 108

Die Reaktion wurde analog zur AAV 4 durchgeführt. Es wurden 8.26 g (29.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Ethyl-4-iodo-1-nitrobenzol **107**, 9.00 mL (20.9 mmol, 0.7 Äquiv.) Triton B und 3.58 g (119 mmol, 4.1 Äquiv.) Paraformaldehyd in 50 mL DMSO eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:3 v/v).

**Ausbeute:** 6.81 g (22.2 mmol, 82 %) eines orangenen Feststoffs. **Molmasse:**

307.09 g/mol **Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>INO<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.49 (PE/EE 1:3 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.83 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz, 1H, H-2), 7.71 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.5$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz, 1H, H-6), 7.48 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.5$  Hz, 1H, H-5), 3.87-3.69 (m, 2H, H-9), 3.56-3.45 (m, 1H, H-7), 1.32 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, 3H, H-8).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 150.3 (C-4), 140.4 (C-3), 137.8 (C-2), 136.6 (C-6), 125.7 (C-5), 100.1 (C-1), 67.7 (C-9), 36.4 (C-7), 17.5 (C-8).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3372, 2967, 2928, 2875, 1592, 1557, 1517, 1463, 1348, 1290, 1229, 1186, 1156, 1087, 1019, 978, 907, 884, 850, 826, 729, 647, 582, 427.

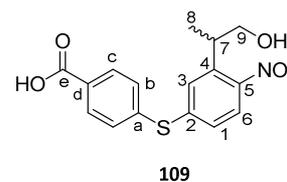
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{INO}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  289.9670, gefunden: 289.9655.

### 7.5.28 Synthese von 4-((3-(1-Hydroxypropan-2-yl)-4-nitrophenyl)thio)benzoesäure **109**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 740 mg (2.41 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-(5-Iodo-2-nitrophenyl)propan-1-ol **108**, 450 mg (2.89 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Mercaptobenzoessäure und 3.33 g (24.1 mmol, 10.0 Äquiv.)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 20 ml abs. DMF suspendiert. Die Suspension wurde für 1 h bei 150 °C gerührt und anschließend mit 1 M HCl auf pH 6 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert und daraufhin die organische Phase einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:5 v/v).

**Ausbeute:** 683 mg (2.05 mmol, 85 %) eines gelblichen Öls. **Mol-**

**masse:** 333.36 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.42 (PE/EE 1:5 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.07-8.06 (m, 2H, H-c), 7.74 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$  Hz, 1H H-6), 7.46-7.44 (m, 3H, H-3, H-b), 7.23 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 2.0$  Hz, 1H, H-1), 3.81-3.72 (m, 2H, H-9), 3.62-3.57 (m, 1H, H-7), 1.32 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, H-8).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.8 (C-e), 149.2 (C-5), 141.5 (C-4), 141.0 (C-a), 139.9 (C-2), 131.3 (C-c), 131.0 (C-b), 130.0 (C-6), 128.8 (C-d), 128.2 (C-1), 126.2 (C-3), 67.7 (C-9), 36.4 (C-7), 17.1 (C-8).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2954, 2851, 1684, 1590, 1563, 1402, 1270, 1177, 1081, 1014, 761, 689, 523, 472.

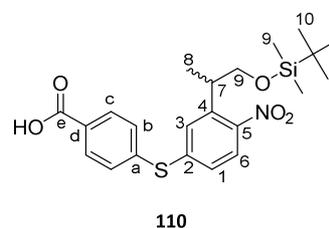
**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>S [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> 316.0643, gefunden: 316.0654.

### 7.5.29 Synthese von 4-((3-(1-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propan-2-yl)-4-nitrophenyl)thio)benzoesäure **110**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 650 mg (1.95 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-((3-(1-Hydroxypropan-2-yl)-4-nitrophenyl)thio)benzoesäure **109** in 10 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Zu der Lösung wurden 730 mg (4.88 mmol, 2.5 Äquiv.) TBDMSCl und 620 µL (7.80 mmol, 4.0 Äquiv.) *N*-Methylimidazol zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL Wasser beendet und die organische Phase daraufhin über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in 10 mL Methanol gelöst und mit 540 mg (3.90 mmol, 2.0 Äquiv.) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Nach 2 h rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser gelöst und mit 1 M HCl auf pH 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert und daraufhin die organische Phase einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:4 v/v).

**Ausbeute:** 619 mg (1.38 mmol, 71 %) eines gelblichen Öls. **Mol-**

**masse:** 447.62 g/mol **Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>2</sub>SSi



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.68 (PE/EE 1:4 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.06-8.05 (m, 2H, H-c), 7.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-6), 7.52 (s, 1H, H-3), 7.42-7.41 (m, 2H, H-b), 7.23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-1), 3.71-3.66 (m, 2H, H-9), 3.57-3.51 (m, 1H, H-7), 1.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, H-8), 0.80 (s, 9H, H-10), -0.05-0.07 (m, 6H, H-9).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 170.7 (C-e), 149.5 (C-5), 141.8 (C-4), 140.5 (C-a), 140.2 (C-2), 131.3 (C-c), 131.3 (C-b), 130.5 (C-6), 128.9 (C-d), 128.4 (C-1), 125.1 (C-3), 67.6 (C-9), 35.4 (C-7), 25.9 (C-10), 25.8 (C<sub>q</sub>-Si), 17.3 (C-8), -5.49 (C-9).

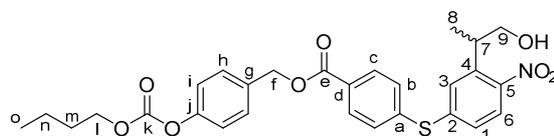
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2954, 2920, 2850, 1690, 1592, 1460, 1377, 907, 762.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>SSi [M+H]<sup>+</sup> 448.1614, gefunden: 448.1615.

### 7.5.30 Synthese von 4-((Butoxycarbonyloxy)benzyl-4-((3-(1-hydroxypropan-2-yl)-4-nitrophenyl)thio)benzoat 111

Die Reaktion wurde analog zur AAV 7 durchgeführt. Es wurden 600 mg (1.34 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-((3-(1-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)propan-2-yl)-4-nitrophenyl)thio)benzoesäure **110**, 210  $\mu\text{L}$  (1.47 mmol, 1.1 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 220  $\mu\text{L}$  (1.61 mmol, 1.2 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 360 mg (1.61 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonat **80** und 49.1 mg (402  $\mu\text{mol}$ , 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v). Unter Stickstoffatmosphäre wurde das Zwischenprodukt in 10 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Zu der Lösung wurde 640  $\mu\text{L}$  (4.02 mmol, 3.0 Äquiv.) TREAT-HF zugetropft und anschließend wurde die Lösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von Kieselgel beendet. Das Rohprodukt wurde auf Chromabond aufrotiert und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 320 mg (593  $\mu\text{mol}$ , 44 %) eines gelblichen Öls. **Molmasse:** 539.60 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{S}$



111

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.44 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.05-8.04 (m, 2H, H-c), 7.72 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.5$  Hz, 1H, H-6), 7.48-7.44 (m, 4H, H-b, H-h), 7.40 (s, 1H, H-3), 7.22-7.20 (m, 2H, H-i), 7.17 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 2.0$  Hz, 1H, H-1), 5.36 (s, 2H, H-f), 4.26 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 2H, H-l), 3.79-3.69 (m, 2H, H-9), 3.61-3.56 (m, 1H, H-7), 1.74 (quint.,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, 2H, H-m), 1.46 (sextett,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 2H, H-n), 1.27 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, H-8), 0.97 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, 3H, H-o).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 165.7 (C-e), 153.8 (C-j), 151.3 (C-k), 142.2 (C-5), 140.0 (C-4), 139.6 (C-a), 136.5 (C-g), 133.7 (C-2), 131.5 (C-c), 130.9 (C-b), 130.1 (C-6), 129.8 (C-h), 129.4 (C-d), 128.1 (C-1), 125.5 (C-3), 121.5 (C-i), 69.0 (C-9), 67.8 (C-f), 66.4 (C-l), 36.5 (C-7), 30.7 (C-m), 19.1 (C-n), 17.5 (C-8), 13.8 (C-o).

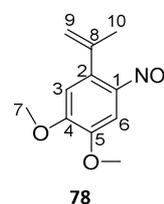
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2954, 2920, 2851, 1760, 1460, 1376, 1251, 1218, 1101, 1014, 758.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{NO}_8\text{S}$  [M+H]<sup>+</sup> 540.1692, gefunden: 540.1687.

**7.5.31 Synthese von 1,2-Dimethoxy-4-nitro-5-(prop-1-en-2-yl)benzol 78**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.38 g (6.66 mmol, 1.2 Äquiv.) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 10 mL abs. Toluol suspendiert. Zu der Suspension wurden portionsweise 750 mg (6.66 mmol, 1.2 Äquiv.) Kalium-*tert.*-butanolat zugegeben und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurde daraufhin 1.25 g (5.95 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **36** langsam zugegeben und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 636 mg (2.85 mmol, 51 %) eines gelben Feststoffes. **Molmasse:** 223.23 g/mol **Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.51 (PE/EE 4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, H-6), 6.69 (s, 1H, H-3), 5.16-5.14 (m, 1H, H-9'), 4.91-4.90 (m, 1H, H-9''), 3.96 (s, 3H, H-7'), 3.94 (s, 3H, H-7''), 2.06 (s, 3H, H-10).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.0 (C-4), 147.9 (C-5), 144.3 (C-1), 140.0 (C-2), 134.5 (C-8), 114.7 (C-9), 112.4 (C-3), 107.7 (C-6), 56.5 (C-7), 23.5 (C-10).

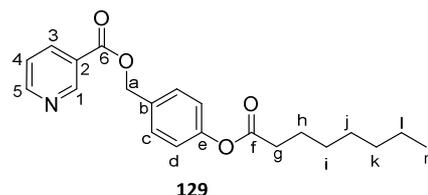
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2924, 2851, 1641, 1574, 1335, 1292, 1253, 1216, 1051, 900, 789, 760.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 224.0923, gefunden: 224.0908.

**7.5.32 Synthese von 4-(Octanyloxy)benzylnicotinat 129**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 7 durchgeführt. Es wurden 550 mg (4.50 mmol, 1.5 Äquiv.) Nicotinsäure **118**, 430 µL (3.00 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 830 µL (11.0 mmol, 2.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N, 750 mg (3.00 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat **125** und 92.0 mg (750 µmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.40 g (3.90 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 355.43 g/mol **Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.64 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.25 (s, 1H, H-1), 8.77 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-5), 8.30 (td, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.3 Hz, H-4), 7.46-7.43 (m, 2H, H-d), 7.38 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-3), 7.13-7.11 (m, 2H, H-c), 5.37 (s, 2H, H-a), 2.55 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-g), 1.67 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-h), 1.42-1.28 (m, 8H, H-i, H-j, H-k, H-l), 0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, H-m).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.3 (C-f), 165.2 (C-6), 153.7 (C-5), 151.1 (C-1), 151.0 (C-e), 137.3 (C-3), 133.0 (C-b), 129.7 (C-c), 126.1 (C-2), 123.4 (C-4), 122.0 (C-d), 66.6 (C-a), 34.5 (C-g), 31.8, 29.2, 29.0, 25.0, 22.7 (C-h, C-i, C-j, C-k, C-l), 14.2 (C-m).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2926, 2856, 1757, 1724, 1593, 1510, 1276, 1197, 1104, 1021, 740, 699.

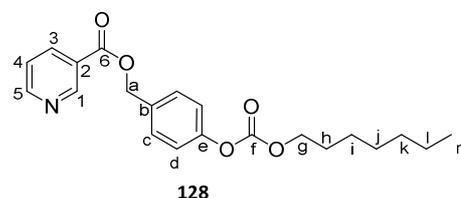
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 356.1862, gefunden: 356.1845.

### 7.5.33 Synthese von 4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl nicotinat **128**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 7 durchgeführt. Es wurden 1.04 g (8.45 mmol, 1.5 Äquiv.) Nicotinsäure **118**, 810 µL (5.63 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 1.56 mL (11.3 mmol, 2.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N, 1.50 g (5.63 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonat **127** und 170 mg (1.41 mmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.49 g (4.01 mmol, 71 %) eines farblosen Öls.

**Molmasse:** 371.43 g/mol **Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.57 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.26 (s, 1H, H-1), 8.72 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-5), 8.32 (td, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.3 Hz, H-4), 7.47-7.45 (m, 2H, H-d), 7.42 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-3), 7.24-7.21 (m, 2H, H-c), 5.38 (s, 2H, H-a), 4.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-g), 1.75 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-h), 1.45-1.25 (m, 8H, H-i, H-j, H-k, H-l), 0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, H-m).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 165.1 (C-6), 153.8 (C-5), 153.4 (C-1), 151.4 (C-f), 150.9 (C-e), 137.6 (C-3), 133.3 (C-b), 129.8 (C-c), 126.2 (C-2), 123.6 (C-4), 121.5 (C-d), 69.3 (C-a), 65.9 (C-g), 31.3, 29.0, 28.7, 25.3, 22.1 (C-h, C-i, C-j, C-k, C-l), 14.6 (C-m).

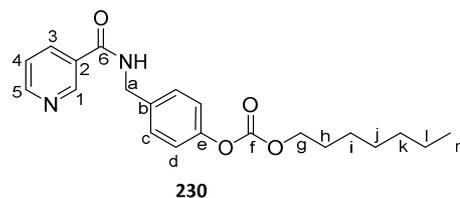
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2828, 2857, 1759, 1724, 1590, 1247, 1213, 1108, 1043, 827, 778, 701.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_5$  [M+H]<sup>+</sup> 372.1811, gefunden: 372.2583.

### 7.5.34 Synthese von Heptyl-(4-(nicotinamidomethyl)phenyl)-carbonat 230

Die Reaktion wurde analog zur AAV 7 durchgeführt. Es wurden 30.0 mg (276  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Nicotinsäure **118**, 43.5  $\mu\text{L}$  (304  $\mu\text{mol}$ , 1.1 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 91.8  $\mu\text{L}$  (663  $\mu\text{mol}$ , 2.4 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 100 mg (331  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) 4-(Aminomethyl)phenyl-heptyl-carbonat hydrochlorid **179** und 10.1 mg (82.8  $\mu\text{mol}$ , 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 79.0 mg (213  $\mu\text{mol}$ , 88 %) eines farblosen Feststoffs. **Molmasse:** 370.45 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.41 (PE/EE 2:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.01 (s, 1H, H-1), 8.72 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6$  Hz, H-5), 8.15 (td, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.1$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.8$  Hz, H-4), 7.40 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 4.9$  Hz, H-3), 7.38-7.37 (m, 2H, H-d), 7.17-7.15 (m, 2H, H-c), 6.69 (s, 1H, NH), 4.65 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.9$  Hz, H-a), 4.24 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-g), 1.74 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, H-h), 1.43-1.26 (m, 8H, H-i, H-j, H-k, H-l), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-m).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 165.5 (C-6), 153.9 (C-5), 152.3 (C-1), 150.8 (C-f), 147.9 (C-e), 135.7 (C-b), 135.6 (C-3), 130.2 (C-2), 129.3 (C-c), 123.8 (C-4), 121.7 (C-d), 65.3 (C-g), 43.8 (C-a), 31.8, 29.0, 28.7, 25.8, 22.7 (C-h, C-i, C-j, C-k, C-l), 14.2 (C-m).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3304, 2924, 2855, 1758, 1647, 1539, 1247, 1215, 731, 707.

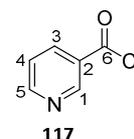
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$  [M+H]<sup>+</sup> 371.1971, gefunden: 371.2265.

**7.5.35 Synthese von Nicotinsäurechlorid 117**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.00 g (16.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Nicotinsäure **118** in 20.0 mL (0.276 mol, 17.0 Äquiv.) Thionylchlorid gelöst, welche auf 0 °C gekühlt war. Zu der Reaktionslösung wurde eine katalytische Menge Dimethylformamid zugegeben und die Lösung 3 Stunden bei 78 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 15 mL absolutem Diethylether suspendiert und 1 Stunde unter Reflux gerührt. Die Suspension wurde daraufhin filtriert und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 2.43 g (17.2 mmol, quant.) eines leicht gelben Feststoffs. **Molmasse:**

141.56 g/mol **Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>ClNO



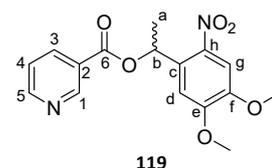
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.24 (s, 1H, H-1), 8.99 (td, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz, H-3), 8.95 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-5), 8.11 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-4).

**7.5.36 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethylnicotinat 119**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 250 mg (1.80 mmol, 1.0 Äquiv.) Nicotinsäurechlorid **117** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 440 mg (1.90 mmol, 1.1 Äquiv.) des Alkohols **37** gegeben und vorsichtig 490  $\mu$ L (3.50 mmol, 2.0 Äquiv.) Triethylamin zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei -78 °C gerührt und anschließend 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt, die wässrige Phase daraufhin dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:2 v/v). Die Reaktion und die gesamte Reinigung fand im Dunkeln statt.

**Ausbeute:** 300 mg (900  $\mu$ mol, 50 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:**

332.31 g/mol **Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.69 (PE/EE 1:2 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 9.27 (s, 1H, H-1), 8.81 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-5), 8.32 (td, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz, H-4), 7.61 (s, 1H, H-g), 7.42 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} =$

7.6 Hz, H-4), 7.08 (s, 1H, H-d), 6.76 (q, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-b), 3.94 (s, 3H, H-i'), 3.92 (s, 3H, H-i''), 1.78 (d, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-a).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 164.2 (C-6), 153.8 (C-e, C-f), 150.7 (C-5), 148.3 (C-1), 140.2 (C-h), 137.4 (C-3), 132.7 (C-c), 126.1 (C-2), 123.7 (C-4), 107.9 (C-d, C-g), 69.8 (C-b), 56.5 (C-i), 22.2 (C-a).

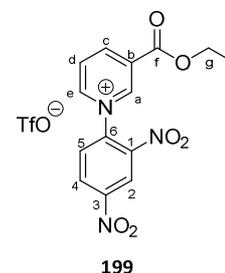
**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3025, 2919, 1713, 1511, 1378, 1137, 1021, 853, 740, 593, 566.

**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6$  [M+H]<sup>+</sup> 333.1087, gefunden: 333.1081.

### 7.5.37 Synthese von 1-(2,4-Dinitrophenyl)-3-(Ethoxy-carbonyl)pyridin-1-ium\*triflat 199

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.00 g (9.52 mmol, 1.2 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat **198** und 1.08 mL (7.94 mmol, 1.0 Äquiv.) Ethylnicotinat in 20 mL abs. Toluol gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 4 h refluxiert und nach Beendigung der Reaktion die entstandene Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Suspension wurde filtriert und der Niederschlag dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Der Feststoff wurde abschließend im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute**: 3.70 g (7.92 mmol, quantitativ) eines beigen Feststoffs. **Molmasse**: 467.33 g/mol **Summenformel**:  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$



**R<sub>f</sub>-Wert**: 0.17 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.93 (s, 1H, H-a), 9.48 (td, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.4$  Hz, H-e), 9.41 (td, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 1.4$  Hz, H-c), 9.30 (s, 1H, H-2), 8.95-8.93 (m, 1H, H-d), 8.54-8.51 (m, 1H, H-4), 8.31 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7$  Hz, H-5), 4.56 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, H-g), 1.46 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, H-h).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 162.2 (C-f), 151.5 (C-3), 150.1 (C-a), 149.9 (C-e), 148.7 (C-1), 139.9 (C-6), 132.6 (C-b), 132.6 (C-c), 131.2 (C-5), 129.6 (C-d, C-4), 123.1 (C-2), 64.6 (C-g), 14.4 (C-h).

**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3371, 3112, 2491, 1730, 1637, 1550, 1348, 1304, 1260, 1136, 1027, 773, 632.

**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6$  [M- $\text{CF}_3\text{O}_3\text{S}$ ]<sup>+</sup> 318.0721, gefunden: 318.0879.

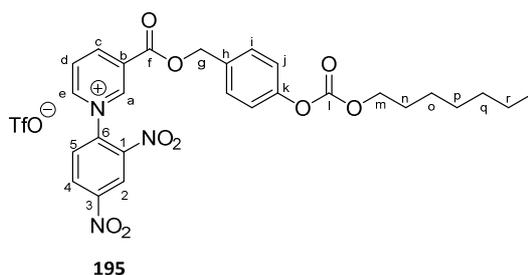
### 7.5.38 Synthese von 1-(2,4-Dinitrophenyl)-3-(((4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)oxy)carbonyl)pyridin-1-ium\*triflat 195

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (3.16 mmol, 1.2 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat **198** und 980 mg (2.64 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl nicotinat **128** in 20 mL abs. Toluol gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 16 h refluxiert und nach Beendigung der Reaktion das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1 → 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.02 g (1.48 mmol, 57 %) eines gelben

Öls. **Molmasse:** 687.60 g/mol **Summenformel:**

C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>S



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 9.96 (s, 1H, H-a), 9.51 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0 Hz, H-e), 8.32 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, H-c), 9.32 (s, 1H, H-2), 8.98-8.96 (m, 1H, H-d), 8.57-8.53 (m, 1H, H-4), 8.32 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, H-5), 7.27-7.26 (m, 2H, H-i), 7.25-7.23 (m, 2H, H-j), 5.53 (s, 2H, H-g), 4.27 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-m), 1.76 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, H-n), 1.47-1.34 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.96 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, H-s).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, MeOD): δ [ppm] = 162.4 (C-f), 153.2 (C-l), 153.0 (C-k), 152.8 (C-a), 150.2 (C-3), 149.6 (C-e), 139.3 (C-1), 134.2 (C-6), 132.6 (C-b), 131.4 (C-c), 131.1 (C-h), 129.7 (C-5), 129.1 (C-i), 123.2 (C-4), 123.1 (C-d), 122.6 (C-2), 122.0 (C-j), 70.1 (C-m), 69.3 (C-g), 32.2, 30.0, 29.0, 26.3, 23.6 (C-n, C-o, C-p, C-q, C-r), 14.4 (C-s).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3462, 2929, 2551, 1741, 1610, 1546, 1340, 1248, 1214, 1162, 1029, 835, 637.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> [M-CF<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S]<sup>+</sup> 538.1820, gefunden: 538.1323.

### 7.5.39 Synthese von 2-(3-Bromophenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol 167

Es wurden 3.00 g (15.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 3-Brombenzoesäure **166** in 10 mL Thionylchlorid suspendiert und mit einer katalytischen Menge DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 80 °C gerührt, wobei der Feststoff sich löste. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum eingengt und mit Diethylether coevaporiert. Der Rückstand wurde in 20 mL abs.

Dichlormethan gelöst und 2.90 mL (30.0 mmol, 2.0 Äquiv.) 2-Amino-2-methyl-1-propanol gelöst in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan langsam bei 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde anschließend für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Suspension filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde daraufhin im Vakuum eingengt und der Rückstand wiederum in 10 mL Thionylchlorid gelöst. Die Reaktion wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Lösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit einer 20 %igen Natriumhydroxidlösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 9:1 v/v).

**Ausbeute:** 3.30 g (13.0 mmol, 87 %) einer farblosen Flüssigkeit. **Molmasse:**

254.13 g/mol **Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>BrNO



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.46 (PE/EE 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.12 (s, 1H, H-2), 7.87 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, H-4), 7.61 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, H-6), 7.28 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, H-5), 4.13 (s, 2H, H-9), 1.39 (s, 6H, H-10).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 161.4 (C-7), 134.4 (C-6), 131.4 (C-2), 130.0 (C-5), 127.0 (C-3), 125.0 (C-4), 122.6 (C-1), 79.6 (C-9), 79.4 (C-8), 28.5 (C-10).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3318, 2957, 2923, 1725, 1643, 1562, 1464, 1366, 1251, 1121, 1065, 970, 745, 713, 674.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>BrNO [M+H]<sup>+</sup> 254.0181, gefunden: 254.0301.

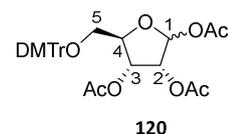
## 7.6 Synthese des 2',3'-Acetyl Nicotinsäurederivats

### 7.6.1 Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl-5-O-4,4-dimethoxytrityl-D-ribofuranose 120

Nach AAV 9 wurden 4.00 g (26.6 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Ribose **116** mit 9.91 g (29.3 mmol, 1.1 Äquiv.) DMTrCl und anschließend 23.0 mL (243 mmol, 9.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid in 40 mL wasserfreiem Pyridin umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:1 v/v +1 % Et<sub>3</sub>N).

**Ausbeute:** 13.5 g (23.3 mmol, 88 %,  $\alpha:\beta$  0.6:1) eines farblosen Schaums.

**Molmasse:** 578.61 g/mol **Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.72 (PE/EE 2:1 v/v +1 % Et<sub>3</sub>N).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.54-7.13 (m, 11H, DMTr-H), 6.84-6.68 (m, 4H, DMTr-H), 6.53 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, H-1), 5.55-5.49 (m, 1H, H-3), 5.45-5.35 (m, 1H, H-2), 4.14-4.10 (m, 1H, H-4), 3.80 (s, 3H CH<sub>3</sub>-DMTr), 3.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-DMTr), 3.37 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.5 Hz, H-5'), 3.17 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.5 Hz, H-5'), 2.13-1.99 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-Acetyl).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 170.2, 169.8, 169.5 (C<sub>q</sub>-Acetyl), 158.8, 158.6, 147.5, 144.9, 139.6, 130.3, 129.3, 128.3, 128.0, 127.9, 127.2, 113.3, 113.3, 113.2, 113.2 (DMTr-C), 98.5 (C-1), 83.8 (C-4), 74.5 (C-2), 70.6 (C-3), 60.5 (C-5), 21.3, 20.7, 20.5 (CH<sub>3</sub>-Acetyl).

**IR:**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2999, 2838, 1744, 1607, 1508, 1369, 1214, 1175, 1029, 827, 583.

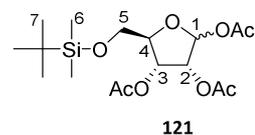
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>NaO<sub>10</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 601.2050, gefunden: 601.2030.

### 7.6.2 Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl-5-O-tertbutyldimethylsilyl-D-ribofuranose **121**

Nach AAV 9 wurden 2.00 g (13.3 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Ribose **116** mit 2.21 g (14.7 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl und anschließend 11.3 mL (120 mmol, 9.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid in 40 mL wasserfreiem Pyridin umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 3:1 v/v).

**Ausbeute:** 3.47 g (8.89 mmol, 67 %,  $\alpha:\beta$  0.9:1) eines farblosen Schaums.

**Molmasse:** 390.50 g/mol **Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>Si



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.64 (PE/EE 3:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 6.40 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, H-1), 5.42-5.24 (m, 2H, H-3, H-2), 4.29-4.28 (m, 1H, H-4), 3.82 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.5 Hz, H-5'), 3.71 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.5 Hz, H-5'), 2.11-2.05 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-Acetyl), 0.90 (s, 9H, H-7), 0.06 (s, 6H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 170.5, 169.9, 169.5 (C<sub>q</sub>-Acetyl), 98.5 (C-1), 85.3 (C-4), 74.6 (C-2), 71.1 (C-3), 63.1, (C-5), 25.9, 25.9, 25.7 (C-7), 21.3, 20.7, 20.5 (CH<sub>3</sub>-Acetyl), 20.3 (C<sub>q</sub>-Si), -5.3, -5.5 (C-6).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2954, 2858, 1745, 1369, 1213, 1007, 832, 777, 601.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{SiNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  413.1608, gefunden: 413.1621.

### 7.6.3 Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl-D-ribofuranose **122**

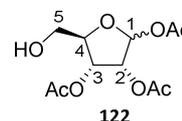
#### Variante 1:

Es wurden 2.00 g (3.46 mmol, 1.0 Äquiv.) DMTr-geschützte peracetylierte Ribose **120** in 30 mL Essigsäure (80 %) gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:3 v/v).

#### Variante 2:

Es wurden 1.00 g (2.56 mmol, 1.0 Äquiv.) TBDMS-geschützte peracetylierte Ribose **121** in 30 mL Dichlormethan gelöst und mit 2.09 mL (12.8 mmol, 5.0 Äquiv.) Triethylamin\*trihydrofluorid versetzt. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von Silicagel die Reaktion beendet. Die Suspension wurde im Vakuum getrocknet und das Silicagel/Rohproduktgemisch säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:1 → 1:2 v/v).

**Ausbeute:** Variante 1: 447 mg (1.62 mmol, 47 %,  $\alpha:\beta$  0.9:1) eines farblosen Öls. Variante 2: 703 mg (2.54 mmol, quant.,  $\alpha:\beta$  0.9:1) eines farblosen Öls.



**Molmasse:** 276.24 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_8$

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.75 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 6.43 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 0.9$  Hz, H-1), 5.41-5.39 (m, 1H, H-3), 5.22-5.20 (m, 1H, H-2), 4.29-4.28 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 3.2$  Hz,  $^2J_{\text{HH}} = 12.5$  Hz, H-5'), 3.66 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 3.2$  Hz,  $^2J_{\text{HH}} = 12.5$  Hz, H-5''), 2.15-2.03 (m, 9H,  $\text{CH}_3$ -Acetyl).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.5, 170.0, 169.3 ( $\text{C}_q$ -Acetyl), 98.3 (C-1), 84.7 (C-4), 74.7 (C-2), 70.1 (C-3), 62.1, (C-5), 21.2, 20.7, 20.5 ( $\text{CH}_3$ -Acetyl).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3492, 2940, 1739, 1370, 1212, 1010, 911, 729, 601.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  299.0743, gefunden: 299.0722.

#### 7.6.4 Synthese von Bis-*O*-(fluorenylmethyl)-[1,2,3-*O*-tri-acetyl-ribofuranose]-5-mono-phosphat **124**

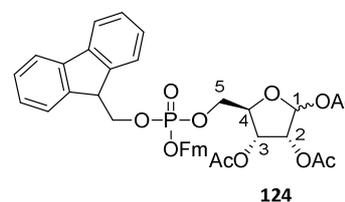
##### Variante 1:

Nach AAV 6 wurden 440 mg (1.60 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-D-ribofuranose **122** mit 1.03 g (2.40 mmol, 1.5 Äquiv.) Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **123** und 1.30 mL (8.30 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) in 20 mL absolutem Acetonitril umgesetzt. Die Oxidation erfolgte mit 71.0  $\mu\text{L}$  (580  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 3:1  $\rightarrow$  2:1 v/v).

##### Variante 2:

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 1.30 g (18.0 mmol, 5.0 Äquiv.) 1,2,4-Triazol und 2.50 mL (18.0 mmol, 5.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Zu der Lösung wurden langsam 470  $\mu\text{L}$  (5.40 mmol, 1.5 Äquiv.) PCl<sub>3</sub> zugetropft und für 15 Minuten gerührt. Die Suspension wurde auf -5 °C heruntergekühlt und anschließend 1.00 g (3.60 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-D-ribofuranose **122** gelöst in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde 2.80 g (14.0 mmol, 4.0 Äquiv.) 9-Fluorenylmethanol gelöst in 10 mL wasserfreiem Acetonitril langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung der Reaktion wurde zur Oxidation 160  $\mu\text{L}$  (1.30 mmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt, welche daraufhin eine weitere Stunde gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:3 v/v).

**Ausbeute:** Variante 1: 850 mg (1.20 mmol, 75 %,  $\alpha$ : $\beta$  0.9:1) eines leicht gelblichen Öls. Variante 2: 2.00 g (2.80 mmol, 77 %, 0.9:1) eines leicht gelblichen Öls. **Molmasse:** 712.21 g/mol **Summenformel:** C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>O<sub>11</sub>P



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.76 (PE/EE 3:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.74-7.22 (m, 16H, H<sub>ar</sub>), 6.36 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, H-1), 5.24-5.21 (m, 1H, H-3), 5.10-5.07 (m, 1H, H-2), 4.32-4.24 (m, 3H, H-4, H-5', H-5''), 4.17-4.10 (m, 2H, fluorenyl-H<sub>2</sub>), 4.07-4.04 (m, 2H, fluorenyl-H<sub>2</sub>), 2.07-1.92 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-Acetyl).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 169.7, 169.5, 169.3 (C<sub>q</sub>-Acetyl), 143.2, 141.5 (C<sub>q</sub>-Ar), 128.1, 127.3, 125.3, 120.2 (C-Ar), 100.1 (C-1), 94.2 (C-4), 74.3 (C-2), 70.2, 70.2 (fluorenyl-CH<sub>2</sub>), 69.6 (C-3), 67.2 (C-5), 48.1, 48.0 (fluorenyl-CH), 21.2, 20.8, 20.4 (CH<sub>3</sub>-Acetyl).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.64, -1.74.

**IR:**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2954, 1746, 1449, 1370, 1214, 1010, 909, 737, 513, 425.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>39</sub>H<sub>38</sub>O<sub>11</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 713.2152, gefunden: 713.2147.

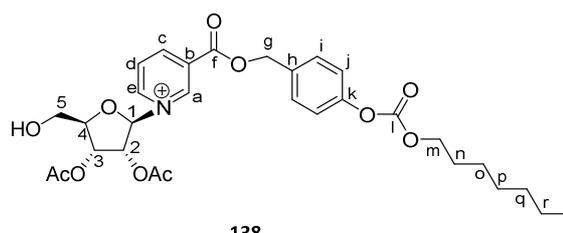
### 7.6.5 Synthese von 2,3-di-O-Acetyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)-nicotinat **138**

In 10.0 mL wasserfreiem Dichlormethan wurden unter Stickstoffatmosphäre 1.16 g (4.20 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3-Tri-O-acetyl-D-ribofuranose **122** und 2.04 mL (8.30 mmol, 2.0 Äquiv.) BSA gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde wiederum in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 1.87 g (5.04 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzylnicotinat **128** zugegeben. Anschließend wurden 910  $\mu$ L (5.04 mmol, 1.2 Äquiv.) Trimethylsilyltriflat tropfenweise bei 0 °C zu gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlsg. beendet und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 2.02 g (3.43 mmol, 82 %,  $\beta$ ) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 588.63 g/mol **Summenformel:** C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>11</sub><sup>+</sup>

**Anmerkung:** Es müsste ein Triflat-Anion als Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal

bei 120 ppm im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes



Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.39 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.73 (s, 1H, H-a), 9.59 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, H-e), 8.96 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, H-c), 8.26 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, H-d), 7.51-7.47 (m, 2H, H-i), 7.22-7.18 (m, 2H, H-j), 6.41 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.3 Hz, H-1), 5.50-5.47 (m, 1H, H-2), 5.44-5.40 (m, 3H, H-g, H-4), 4.53-4.51 (m, 3H, H-3), 4.23 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, H-m), 4.07-4.04 (m, 1H, H-5'), 3.85-3.81 (m, 1H, H-5''), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl), 1.73 (quin, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-n), 1.44-1.25 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-s).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 170.4, 169.1 (C<sub>q</sub>-Acetyl), 161.7 (C-f), 153.2 (C-l), 151.1 (C-k), 147.5 (C-a), 144.4 (C-e), 143.2 (C-c), 132.2 (C-b), 131.0 (C-h), 130.5 (C-i), 129.3 (C-d), 121.7 (C-j), 98.9 (C-1), 87.0 (C-4), 70.7 (C-m), 69.4 (C-3), 69.4 (C-2), 67.0 (C-g), 60.4 (C-5), 32.2 (C-n), 29.0, 28.7, 25.8, 22.7 (C-o, C-p, C-q, C-r), 20.7, 20.4 (CH<sub>3</sub>-Acetyl), 14.2 (C-s).

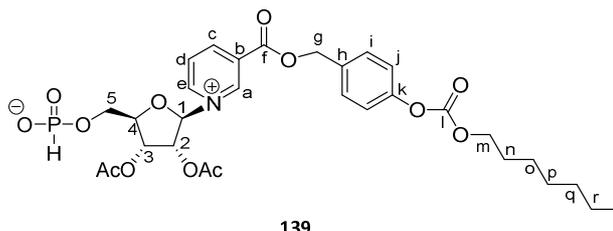
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3432, 2929, 1734, 1381, 1216, 1164, 1026, 829, 780, 673, 545.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>11</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup> 588.2438, gefunden: 588.2218.

### 7.6.6 Synthese von [(2,3-Di-O-acetyl-ribofuranosyl)-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)nicotinat]-monophosphonat **139**

In 10.0 mL wasserfreiem Acetonitril wurden unter Stickstoffatmosphäre 180 mg (249 μmol, 1.0 Äquiv.) 2,3-di-O-Acetyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)nicotinat **138** und 64.0 μL (373 μmol, 1.5 Äquiv.) DIPEA gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf -40 °C gekühlt und langsam 76.0 mg (373 μmol, 1.5 Äquiv.) Salicylchlorophosphit gelöst in 10 mL wasserfreiem Acetonitril zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 1 h bei -40 °C gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion mit für 15 Minuten mit 1 M TEAB-Puffer hydrolysiert und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe einer automatisierten RP18-Chromatographie gereinigt (H<sub>2</sub>O/MeCN-Gradient) und anschließend gefriertrocknet.

**Ausbeute:** 85.0 mg (130  $\mu\text{mol}$ , 45 %,  $\beta$ ) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 651.60 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{NO}_{13}\text{P}$



**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.70 (s, 1H, H-a), 9.57 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2$  Hz, H-e), 9.16 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-c), 8.37 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, H-d), 7.40-7.38 (m, 2H, H-i), 7.17-7.14 (m, 2H, H-j), 6.58 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.1$  Hz, H-1), 5.67-5.65 (m, 1H, H-4), 5.56-5.55 (m, 1H, H-2), 4.77-4.76 (m, 3H, H-3), 4.62 (s, 1H, H-g), 4.39-4.36 (m, 1H, H-5'), 4.24 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-m), 4.22-4.19 (m, 1H, H-5''), 2.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Acetyl), 2.16 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Acetyl), 1.74 (quin, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$  Hz, H-n), 1.45-1.33 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.93 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$  Hz, H-s).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 172.2, 171.7 ( $\text{C}_q$ -Acetyl), 166.5 (C-f), 157.2 (C-l), 154.1 (C-k), 148.7 (C-a), 147.2 (C-e), 140.3 (C-c), 131.9 (C-b), 130.8 (C-h), 130.1 (C-i), 129.1 (C-d), 122.1 (C-j), 100.3 (C-1), 78.0 (C-4), 70.7 (C-m), 71.4 (C-3), 68.7 (C-2), 64.0 (C-g), 62.8 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 4.1$  Hz, C-5), 32.4 (C-n), 30.0, 29.7, 26.3, 23.6 (C-o, C-p, C-q, C-r), 20.3, 19.7 ( $\text{CH}_3$ -Acetyl), 14.4 (C-s).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 4.10.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3317, 2627, 2857, 1758, 1733, 1246, 1213, 1050, 834, 776, 532.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}\text{P}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  652.2159, gefunden: 652.2164.

### 7.6.7 Synthese von Bis-O-(difluorenylmethyl)-[2,3-O-di-acetyl-ribofuranosyl]-1-(4-(Octanyloxy)benzyl)nicotinat]-5-monophosphat 135

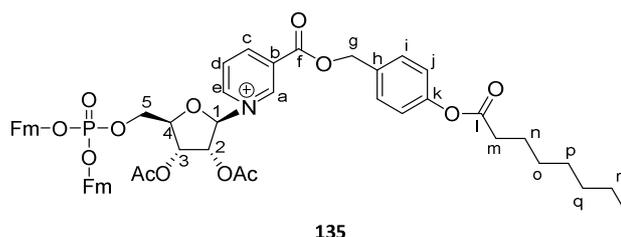
In 10 mL wasserfreiem Acetonitril wurden unter Stickstoffatmosphäre 400 mg (560  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Bis-O-(difluorenylmethyl)-[1,2,3-O-tri-acetyl-ribofuranose]-5-monophosphat **124** und 240 mg (670  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) 4-(Octanyloxy)benzylnicotinat **129** gelöst. Anschließend wurden 120  $\mu\text{L}$  (670  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) Trimethylsilyltriflat tropfenweise zu gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlsg. beendet und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1 v/v).

**Ausbeute:** 160 mg (160  $\mu\text{mol}$ , 28 %,  $\alpha:\beta$ ,

0.3:1) eines leicht gelblichen Feststoffs.

**Molmasse:** 1009.06 g/mol **Summenfor-**

**mel:**  $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{NO}_{13}\text{P}^+$



**Anmerkung:** Es müsste ein Triflat-Anion als

Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.44 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.44 (s, 1H, H-a), 9.09 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.0$  Hz, H-e), 8.75 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.1$  Hz, H-c), 7.74 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-d), 7.69-7.66 (m, 2H, H-i), 7.62-7.10 (m, 16H, H<sub>ar</sub>), 7.08-7.05 (m, 2H, H-j), 6.68 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7$  Hz, H-1), 5.37-5.24 (m, 2H, H-g), 5.22 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.6$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.3$  Hz, H-2), 5.15-5.12 (m, 1H, H-4), 4.35-4.27 (m, 3H, fluorenyl-H<sub>2</sub>, H-3), 4.05-4.03 (m, 2H, fluorenyl-H<sub>2</sub>), 3.82-3.75 (m, 1H, H-5'), 3.65-3.57 (m, 1H, H-5''), 2.53 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-m), 2.14 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Acetyl), 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Acetyl), 1.73 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-n), 1.41-1.26 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-s).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.2 (C-l), 170.2, 169.8 (C<sub>q</sub>-Acetyl), 160.5 (C-f), 151.4 (C-k), 147.0 (C-c), 144.2 (C-e), 143.0 (C-a), 142.7 (C-b), 141.7 (C-d), 141.5 (C-h), 131.8-127.2 (C<sub>q</sub>-Ar), 128.3 (C-i), 127.4-122.1 (C-Ar), 120.4 (C-j), 97.4 (C-1), 83.6 (C-4), 75.9 (C-2), 71.3 (C-3), 69.9, 69.5 (fluorenyl- $\text{CH}_2$ ), 68.4 (C-g), 65.0 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.0$  Hz, C-5), 48.1, 48.0 (fluorenyl-CH), 34.5 (C-m), 31.8 (C-n), 29.2, 29.0, 25.0, 22.7 (C-o, C-p, C-q, C-r), 20.5, 20.3 ( $\text{CH}_3$ -Acetyl), 14.2 (C-s).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -0.69.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2955, 2916, 1747, 1493, 1378, 1209, 1081, 967.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{NO}_{13}\text{P}^+$  [M]<sup>+</sup> 1008.3719, gefunden: 1008.5550.

### 7.6.8 Synthese von [(2,3-Di-O-acetyl-ribofuranosyl)-1-(4-(Octanyloxy)benzyl)nicotinat]-5-monophosphat 137

Es wurden 30.0 mg (30.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Bis-O-(difluorenylmethyl)-[2,3-O-di-acetyl-ribofuranosyl]-4-(Octanyloxy)benzylnicotinat **135** dreimal mit Toluol

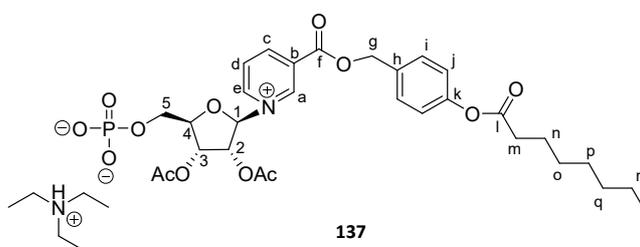
coevaporiert und anschließend in einer Mischung aus 5 mL absolutem Acetonitril und 1 mL absolutem Triethylamin gelöst. Die Lösung wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung durch Cellulose filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe einer automatisierten RP18-Chromatografie gereinigt (H<sub>2</sub>O/MeCN-Gradient) und anschließend gefriertrocknet.

**Ausbeute:** 10.0 mg (13.0  $\mu$ mol, 45 %,  $\alpha$ : $\beta$ ,

0.2:1) eines leicht gelblichen Feststoffs.

**Molmasse:** 752.79 g/mol **Summenfor-**

**mel:** C<sub>36</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>P



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 9.54 (s, 1H, H-a), 9.45-9.39 (m, 1H, H-e), 9.06-9.00 (m, 1H, H-c), 8.57-8.50 (m, 1H, H-d), 7.52-7.49 (m, 2H, H-i), 7.06-7.04 (m, 2H, H-j), 6.50 (bs, 1H, H-1), 5.50-5.44 (m, 2H, H-g), 5.23-4.99 (m, 7H, 3xCH<sub>2</sub>-Et<sub>3</sub>N, H-3), 5.41-5.37 (m, 1H, H-2), 4.59-4.53 (m, 1H, H-4), 4.36-4.28 (m, 1H, H-5'), 4.14-4.06 (m, 1H, H-5''), 2.52 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-m), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl), 1.71 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-n), 1.39-1.24 (m, 17H, H-o, H-p, H-q, H-r, 3xCH<sub>3</sub>-Et<sub>3</sub>N), 0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9 Hz, H-s).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 181.0 (C-l), 173.7, 172.3 (C<sub>q</sub>-Acetyl), 170.0 (C-f), 170.0 (C-k), 169.6 (C-c), 151.1 (C-e), 149.3 (C-a), 147.9 (C-b), 147.0 (C-d), 144.2 (C-h), 132.9-130.2 (C<sub>q</sub>-Ar), 128.2 (C-i), 122.1 (C-j), 98.3 (C-1), 88.6 (C-4), 82.4 (C-2), 75.4 (C-3), 69.8 (C-g), 56.5 (C-5), 34.5 (C-m), 31.8 (C-n), 29.2, 29.1, 25.0, 22.8 (C-o, C-p, C-q, C-r), 20.6, 20.6 (CH<sub>3</sub>-Acetyl), 14.2 (C-s).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = -0.51.

**IR:**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2923, 2854, 1740, 1237, 1199, 1102, 937, 742.

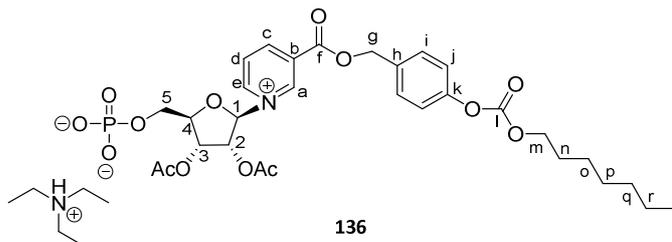
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>13</sub>P<sup>+</sup> [M+2H]<sup>+</sup> 652.2164, gefunden: 652.2168.

### 7.6.9 Synthese von [(2,3-Di-*o*-acetyl-ribofuranosyl)-1-(4-((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl-nicotinat]-5-monophosphat **136**

Die Synthese wurde analog zu der zum [(2,3-Di-O-acetyl-ribofuranosyl)-1-(4-(Octanyloxy)benzylnicotinat]-5-monophosphat **137** durchgeführt. Beide Stufen wurden hintereinander

durchgeführt ohne Reinigung der 1. Stufe. Es wurden 500 mg (702  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Bis-O-(difluorenylmethyl)-[1,2,3-O-tri-acetyl-ribofuranose]-5-monophosphat **124**, 310 mg (842  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) 4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzylnicotinat **128** und 152  $\mu\text{L}$  (842  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äquiv.) TMSOTf eingesetzt. Die Spaltung der Fm-Schutzgruppe wurde in 5 mL wasserfreiem  $\text{Et}_3\text{N}$  durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe einer automatisierten RP18-Chromatografie gereinigt ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ -Gradient) und anschließend gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 74.3 mg (96.6  $\mu\text{mol}$ , 14 %,  $\beta$ , über 2 Stufen) eines leicht gelblich-orangen Feststoffes. **Molmasse:** 768.79 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.22 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.64 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.5$  Hz, H-e), 9.60 (m, 1H, H-a), 9.13 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.1$  Hz, H-c), 8.34 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, H-d), 7.59-7.57 (m, 2H, H-i), 7.21-7.19 (m, 2H, H-j), 6.54 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.4$  Hz, H-1), 5.63 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.1$  Hz, H-3), 5.54 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.0$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.4$  Hz, H-2), 5.50 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz, H-g), 4.72-4.71 (m, 1H, H-4), 4.34 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 12.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.4$  Hz, H-5'), 4.21 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-m), 4.14 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 12.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.8$  Hz, H-5''), 3.17 (q, 6H,  $\text{CH}_2\text{-Et}_3\text{N}$ ), 2.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$ ), 2.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$ ), 1.70 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, H-n), 1.42-1.31 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 1.28 (t, 9H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-Et}_3\text{N}$ ), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-s).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 170.8, 170.1 ( $\text{C}_q\text{-Acetyl}$ ), 162.8 (C-f), 153.2, 153.0, 152.9 (C-a, C-e, C-l), 148.6 (C-k), 145.7 (C-h), 134.9 (C-b), 131.3 (C-i), 130.8 (C-d), 129.1 (C-c), 122.6 (C-j), 78.2 (C-1), 72.4 (C-4), 69.7 (C-2), 67.5 (C-3), 66.3 (C-g), 64.5 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.5$  Hz, C-5), 60.7 (C-m), 32.9 (C-n), 30.0, 29.7, 26.8, 23.7 (C-o, C-p, C-q, C-r), 20.3, 20.2 ( $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$ ), 14.2 (C-s).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 0.29.

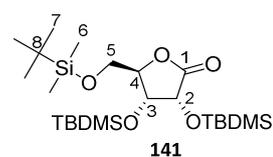
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_{14}\text{P}$  [ $\text{M-C}_6\text{H}_{16}\text{N}$ ]<sup>-</sup> 666.1957, gefunden: 666.1895.

## 7.7 Synthese des 2',3'-ungeschützten Nicotinsäurederivats

### 7.7.1 Synthese von 2,3,5-tri-*O*-TBDMS-ribono- $\gamma$ -lacton **141**

Nach AAV 10 wurden 1.00 g (6.75 mmol, 1.0 Äquiv.) Ribonsäure- $\gamma$ -lacton **140** mit 5.09 g (33.8 mmol, 5.0 Äquiv.) TBDMSCl und 3.22 g (42.3 mmol, 7.0 Äquiv.) Imidazol in 10 mL wasserfreiem DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 3.29 g (6.75 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 490.90 g/mol **Summenformel:** C<sub>23</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.71 (PE/EE 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 4.56 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, H-2), 4.28-4.26 (m, 2H, H-3, H-4), 3.86 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, H-5'), 3.78 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Hz, H-5''), 0.94-0.86 (m, 27H, H-7), 0.18-0.06 (m, 18H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 175.3 (C-1), 85.8 (C-4), 72.1 (C-2), 70.7 (C-3), 62.5 (C-5), 26.0, 26.0, 25.8 (C-7), 18.6, 18.5, 18.3 (C-8), -4.4, -4.5, -4.7, -4.9, -5.4, -5.5 (C-6).

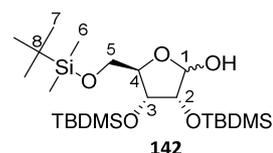
**IR:**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3442, 2956, 2889, 1777, 1468, 1339, 1252, 1161, 1098, 1009, 976, 936, 842, 757, 695, 635.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>51</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 491.3044, gefunden: 491.3055.

### 7.7.2 Synthese von 2,3,5-tri-*O*-TBDMS-ribofuranose **142**

Nach AAV 11 wurden 3.20 g (6.52 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-tri-*O*-TBDMS-ribono- $\gamma$ -lacton **141** mit 2.10 mL (20.0 mmol, 3.0 Äquiv.) DIBAL-H (1.5 M in Toluol) in 10 mL wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 3.20 g (6.50 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 492.92 g/mol **Summenformel:** C<sub>23</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.65 (PE/EE 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 5.05-5.02 (m, 1H, H-1), 4.24-4.22 (m, 1H, H-3), 4.13-4.11 (m, 1H, H-2), 4.09-4.05 (m, 1H, H-4), 3.66 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, H-5'), 3.54 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, H-5''), 0.93-0.89 (m, 27H, H-7), 0.12-0.04 (m, 18H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 98.5 (C-1), 86.0 (C-4), 74.3 (C-2), 72.6 (C-3), 63.2 (C-5), 26.1, 26.1, 25.9 (C-7), 18.5, 18.4, 18.2 (C-8), -4.5, -4.6, -4.6, -4.8, -5.2, -5.4 (C-6).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3505, 2957, 2858, 1633, 1473, 1390, 1093, 1024, 922, 838, 778, 669.

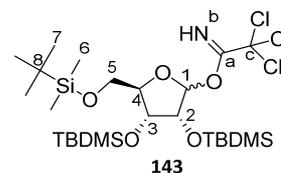
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>53</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 493.3201, gefunden: 493.3406.

### 7.7.3 Synthese von 2,3,5-tri-O-TBDMS-ribofuranose-trichloracetimidat **143**

Nach AAV 12 wurden 2.00 g (4.06 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-tri-O-TBDMS-ribofuranose **142** mit 2.44 mL (24.4 mmol, 6.0 Äquiv.) Trichloracetonitril und 180 µL (1.22 mmol, 0.3 Äquiv.) DBU in 40 mL wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 19:1 v/v + 2 % Et<sub>3</sub>N).

**Ausbeute:** 2.16 g (6.50 mmol, 83 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:**

637.30 g/mol **Summenformel:** C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.76 (PE/EE 19:1 v/v + 2 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.45 (s, 1H, H-b), 5.99 (s, 1H, H-1), 4.24-4.21 (m, 1H, H-3), 4.16-4.15 (m, 1H, H-2), 4.13-4.09 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, H-5'), 3.68 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.5 Hz, H-5''), 0.91-0.89 (m, 27H, H-7), 0.15-0.04 (m, 18H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 161.3 (C-a), 105.6 (C-1), 91.7 (C-c), 84.6 (C-4), 75.8 (C-2), 71.3 (C-3), 62.8 (C-5), 26.2, 26.0, 25.9 (C-7), 18.7, 18.3, 18.2 (C-8), -4.2, -4.3, -4.6, -4.8, -5.1, -5.3 (C-6).

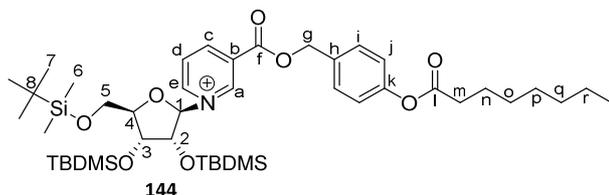
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3359, 2920, 1724, 1659, 1463, 1426, 969, 886, 779.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub>K [M-C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>N+K]<sup>+</sup> 515.2810, gefunden: 515.3006.

### 7.7.4 Synthese von 2,3,5-tri-O-TBDMS-ribofuranosyl)-1-(4-(Octanyloxy)benzyl)nicotinat **144**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 360 mg (560  $\mu\text{mol}$ , 1.1 Äquiv.) 2,3,5-tri-O-TBDMS-ribofuranose-trichloracetimidat **143** und 180 mg (510  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 4-(Octanyloxy)benzylnicotinat **128** in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu der Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten 180  $\mu\text{L}$  (1.10 mmol, 2.0 Äquiv.) TMSOTf zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde verd.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 210 mg (250  $\mu\text{mol}$ , 49 %,  $\beta$ ) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 831.35 g/mol  
**Summenformel:**  $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{NO}_8\text{Si}_3^+$



*Anmerkung:* Es müsste ein Triflat-Anion als

Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.31 (s, 1H, H-a), 9.20 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.8$  Hz, H-e), 8.91 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, H-c), 8.11 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-d), 7.49-7.47 (m, 2H, H-j), 7.13-7.11 (m, 2H, H-i), 6.61 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.4$  Hz, H-1), 5.49-5.38 (m, 2H, H-g), 4.86-4.83 (m, 1H, H-2), 4.60-4.57 (m, 1H, H-3), 4.20-4.19 (m, 1H, H-4), 3.87-3.83 (m, 1H, H-5'), 3.82-3.79 (m, 1H, H-5''), 2.56 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-m), 1.75 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-n), 1.43-1.26 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.94-0.66 (m, 30H, H-s, H-7), 0.20-0.03 (m, 18H, H-6).

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 161.4 (C-f), 150.6 (C-l), 150.2 (C-k), 146.8 (C-a), 145.1 (C-e), 142.4 (C-c), 132.4 (C-h), 130.1 (C-i), 127.3 (C-b), 125.0 (C-d), 122.0 (C-j), 95.3 (C-1), 90.2 (C-4), 73.1 (C-2), 72.5 (C-3), 67.6 (C-g), 62.6 (C-5), 33.5 (C-m), 28.3 (C-n), 25.8, 25.6, 25.4 (C-7), 23.8, 22.0, 18.0, 17.5 (C-o, C-p, C-q, C-r), 13.9 (C-s), -5.0, -5.4, -5.5 (C-6).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2954, 2929, 2858, 1729, 1509, 1255, 1160, 1106, 1030, 832, 780, 637.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{NO}_8\text{Si}_3^+$  [M<sup>+</sup>]<sup>+</sup> 830.4873, gefunden: 830.4901.

### 7.7.5 Synthese von 2,3,5-tri-O-TES-ribono- $\gamma$ -lacton **146**

#### Variante 1:

Nach AAV 10 wurden 500 mg (3.38 mmol, 1.0 Äquiv.) Ribonsäure- $\gamma$ -lacton **140** mit 2.84 mL (16.9 mmol, 5.0 Äquiv.) TESCl und 1.61 g (23.7 mmol, 7.0 Äquiv.) Imidazol in 10 mL wasserfreiem DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 19:1 v/v).

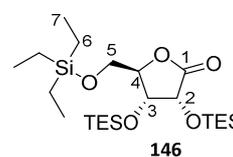
#### Variante 2:

Nach AAV 10 wurden 9.00 g (61.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Ribonsäure- $\gamma$ -lacton **140** mit 50.0 g (189 mmol, 3.1 Äquiv.) TESOTf und 41.5 mL (244 mmol, 4.0 Äquiv.) DIPEA in 50 mL wasserfreiem DMF bei 0 °C umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 19:1 v/v).

**Ausbeute:** Variante 1: 1.66 g (3.38 mmol, quantitativ) eines farblosen

Öls. Variante 2: 30.0 g (61.1 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls.

**Molmasse:** 490.90 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{O}_5\text{Si}_3$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.67 (PE/EE 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.60 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, H-2), 4.30 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.2$  Hz, H-3), 4.27-4.25 (m, 1H, H-4), 3.84 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.1$  Hz, H-5'), 3.78 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz, H-5''), 1.01-0.91 (m, 27H, H-7), 0.74-0.57 (m, 18H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 175.5 (C-1), 86.0 (C-4), 72.1 (C-2), 70.6 (C-3), 62.6 (C-5), 6.9, 6.8 (C-7), 5.0, 4.3 (C-6).

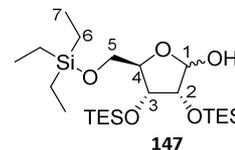
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3336, 2954, 1760, 1415, 1359, 1184, 1137, 1080, 964, 898, 764, 608.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{51}\text{O}_5\text{Si}_3$  [M+H]<sup>+</sup> 491.3044, gefunden: 491.3427.

### 7.7.6 Synthese von 2,3,5-tri-*O*-TES-ribofuranose **147**

Nach AAV 11 wurden 1.65 g (3.36 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-tri-*O*-TES-ribo- $\gamma$ -lacton **146** mit 6.59 mL (10.0 mmol, 3.0 Äquiv.) DIBAL-H (25 % in Toluol) in 20 mL wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 30:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.47 g (2.98 mmol, 89 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 492.92 g/mol **Summenformel:** C<sub>23</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.79 (PE/EE 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 5.04-5.01 (m, 1H, H-1), 4.33-4.31 (m, 1H, H-3), 4.13-4.10 (m, 1H, H-2), 4.05-4.03 (m, 1H, H-4), 3.66 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, H-5'), 3.53 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, H-5''), 1.00-0.93 (m, 27H, H-7), 0.67-0.57 (m, 18H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 98.3 (C-1), 86.0 (C-4), 74.4 (C-2), 72.3 (C-3), 63.2 (C-5), 6.9, 6.8 (C-7), 4.9, 4.8, 4.4 (C-6).

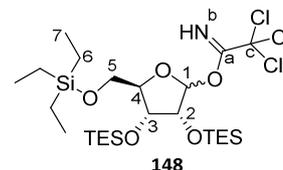
**IR:**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3327, 2928, 1718, 1645, 1457, 1341, 1032, 874, 725, 652.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 515.3020, gefunden: 515.3086.

### 7.7.7 Synthese von 2,3,5-tri-*O*-TES-ribofuranose-trichloracetimidat **148**

Nach AAV 12 wurden 900 mg (1.83 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-tri-*O*-TES-ribofuranose **147** mit 1.10 mL (11.0 mmol, 6.0 Äquiv.) Trichloracetonitril und 27.0  $\mu$ L (183  $\mu$ mol, 0.1 Äquiv.) DBU in 20 mL wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 30:1 v/v + 2 % Et<sub>3</sub>N).

**Ausbeute:** 969 mg (1.52 mmol, 84 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 637.30 g/mol **Summenformel:** C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.84 (PE/EE 19:1 v/v + 2 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.43 (s, 1H, H-b), 6.01 (s, 1H, H-1), 4.28-4.26 (m, 1H, H-3), 4.17-4.16 (m, 1H, H-2), 4.13-4.10 (m, 1H, H-4), 3.83 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz,

H-5'), 3.67 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7$  Hz, H-5''), 0.99-0.93 (m, 27H, H-7), 0.69-0.58 (m, 18H, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 161.2 (C-a), 105.4 (C-1), 91.5 (C-c), 84.5 (C-4), 76.1 (C-2), 71.4 (C-3), 62.5 (C-5), 6.9, 6.8 (C-7), 5.0, 4.9, 4.5 (C-6).

**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3318, 2920, 1719, 1601, 1444, 1030, 745, 695, 487.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{52}\text{O}_5\text{Si}_3\text{Na}$  [ $\text{M}+\text{Na}-\text{C}_2\text{HCl}_3\text{N}$ ]<sup>+</sup> 515.3020, gefunden: 515.3011.

### 7.7.8 Synthese von 2,3,5-tri-O-TES-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)-nicotinat **149**

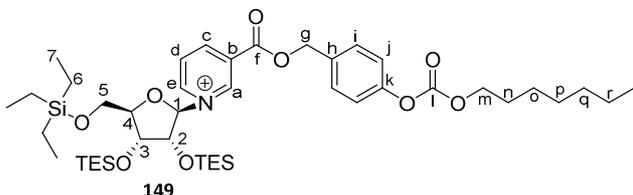
Nach AAV 13 wurden 1.00 g (1.57 mmol, 1.1 Äquiv.) 2,3,5-tri-O-TES-ribofuranose-trichloracetimidat **148**, 530 mg (1.43 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzylnicotinat **128** und 620 mg (2.86 mmol, 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** in 10 mL wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**Ausbeute**: 1.03 g (1.22 mmol, 85 %,  $\beta$ ) eines farblosen Öls. **Molmasse**:

847.34 g/mol

**Summenformel**:

$\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{NO}_9\text{Si}_3^+$



*Anmerkung*: Es müsste ein Triflat-Anion als Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**R<sub>f</sub>-Wert**: 0.26 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.23 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-e), 9.14 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, H-c), 9.13 (s, 1H, H-a), 8.32 (t, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 14.1$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$  Hz, H-d), 7.59-7.57 (m, 2H, H-j), 7.32-7.29 (m, 2H, H-i), 6.66 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.1$  Hz, H-1), 5.51 (s, 2H, H-g), 4.87-4.85 (m, 1H, H-2), 4.70-4.69 (m, 1H, H-3), 4.21 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-m), 4.16-4.15 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.6$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.5$  Hz, H-5'), 3.81 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.5$  Hz, H-5''), 1.67

(quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-n), 1.37-1.27 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.98-0.81 (m, 27H, H-7), 0.71 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.9$  Hz, H-s), 0.66-0.39 (m, 18H, H-6).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 161.0 (C-f), 152.9 (C-l), 151.3 (C-k), 146.6 (C-a), 145.1 (C-e), 142.3 (C-c), 132.6 (C-h), 130.1 (C-i), 127.5 (C-b), 127.0 (C-d), 121.4 (C-j), 95.5 (C-1), 89.9 (C-4), 72.9 (C-2), 72.5 (C-3), 68.6 (C-m), 67.5 (C-g), 62.1 (C-5), 31.1 (C-n), 28.2, 27.4, 24.4, 22.0 (C-o, C-p, C-q, C-r), 13.9 (C-s), 6.5, 6.4, 6.3 (C-7), 4.0, 3.8, 3.7 (C-6).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3387, 2930, 1740, 1251, 1151, 1025, 820, 761, 675, 516.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{NO}_9\text{Si}_3^+$  [M]<sup>+</sup> 846.4822, gefunden: 846.4830.

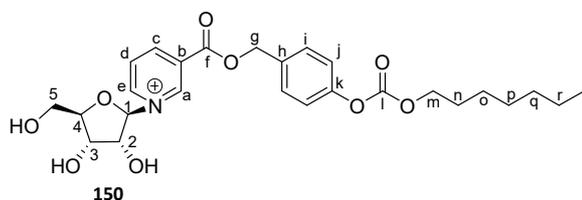
### 7.7.9 Synthese von (1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)nicotinat)-ribofuranosyl 150

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 400 mg (664  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 2,3,5-tri-O-TES-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)nicotinat **149** in 10 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden langsam 430  $\mu\text{L}$  (2.66 mmol, 4.0 Äquiv.) TREAT-HF zugetropft und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Kieselgel zugefügt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 238 mg (472  $\mu\text{mol}$ , quantitativ,  $\beta$ )

eines farblosen Öls. **Molmasse:** 504.56 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{NO}_9^+$



**Anmerkung:** Es müsste ein Triflat-Anion als

Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.36 (s, 1H, H-a), 9.22 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-e), 9.08 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$  Hz, H-c), 8.27 (t, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 14.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-d), 7.62-7.59 (m, 2H, H-j), 7.32-7.30 (m, 2H, H-i), 6.53 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.6$  Hz, H-1), 5.52 (s, 2H, H-g), 5.17-5.14 (m, 1H, H-2), 4.62-4.59 (m, 1H, H-3), 4.21 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-m), 4.11-4.09 (m, 1H, H-4), 3.65-3.60

(m, 2H, H-5', H-5''), 1.68 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-n), 1.40-1.26 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$  Hz, H-s).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 161.1 (C-f), 153.7 (C-l), 148.9 (C-k), 147.6 (C-a), 144.4 (C-e), 143.4 (C-c), 136.6 (C-h), 130.3 (C-b), 129.7 (C-i), 125.8 (C-d), 122.2 (C-j), 96.1 (C-1), 88.9 (C-4), 81.6 (C-2), 76.8 (C-3), 68.5 (C-m), 67.5 (C-g), 60.6 (C-5), 31.1 (C-n), 28.6, 28.0, 25.5, 21.8 (C-o, C-p, C-q, C-r), 13.9 (C-s).

**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3429, 2929, 1757, 1737, 1464, 1247, 1217, 1133, 1027, 740, 638.

**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{NO}_9^+$  [M]<sup>+</sup> 504.2228, gefunden: 504.2319.

### 7.7.10 Synthese von [(Ribofuranosyl)-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)nicotinat]-monophosphat **151**

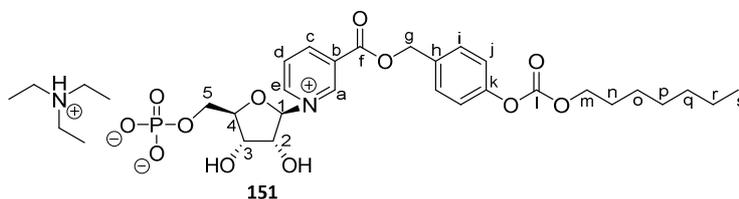
Nach AAV 8 wurden 150 mg (297  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) (1-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)nicotinat)-ribofuranosyl **150**, 81.4  $\mu\text{L}$  (892  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äquiv.)  $\text{POCl}_3$  in 2 mL wasserfreiem Trimethylphosphat und gemörserterem Molsieb umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute**: 132 mg (193  $\mu\text{mol}$ , 66 %,

$\beta$ ) eines farblosen Feststoffes. **Mol-**

**masse**: 684.72 g/mol **Summenfor-**

**mel**:  $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}$



$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.64 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-e), 9.59 (s, 1H, H-a), 9.13 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, H-c), 8.34 (t, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 14.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-d), 7.58-7.56 (m, 2H, H-i), 7.22-7.19 (m, 2H, H-j), 6.54 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.3$  Hz, H-1), 5.65-5.62 (m, 1H, H-2), 5.55-5.53 (m, 1H, H-3), 5.51-4.49 (m, 2H, H-g), 4.73-4.71 (m, 1H, H-4), 4.21 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-m), 4.34 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.4$  Hz, H-5'), 4.14 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 12.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.4$  Hz, H-5''), 3.17 (q, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NEt}_3$ ), 1.70 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.1$  Hz, H-n), 1.42-1.30 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 1.28 (t, 9H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-NEt}_3$ ), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-s).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (125 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 163.8 (C-f), 153.9 (C-l), 149.3 (C-k), 146.3 (C-a), 145.2 (C-e), 142.9 (C-c), 139.3 (C-h), 131.0 (C-b), 129.0 (C-i), 126.7 (C-d), 122.0 (C-j), 92.6 (C-1), 88.5

(C-4), 82.4 (C-2), 72.5 (C-3), 70.0 (C-m), 64.8 (C-g), 58.5 (d,  $^2J_{CP} = 5.1$  Hz, C-5), 52.2 (CH<sub>2</sub>-NEt<sub>3</sub>), 32.9 (C-n), 30.0, 29.7, 26.7, 23.6 (C-o, C-p, C-q, C-r), 14.4 (C-s), 7.4 (CH<sub>3</sub>-NEt<sub>3</sub>).

$^{31}\text{P-NMR}$ : (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 0.29.

**IR**:  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3329, 2928, 2858, 1759, 1248, 1215, 1109, 1044, 1016, 954.

**HRMS-ESI**<sup>-</sup>: (m/z) berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>12</sub>P<sup>-</sup> [M-C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>-</sup> 582.1746, gefunden: 582.1754.

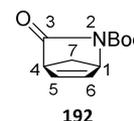
## 7.8 Synthese des carbocyclischen Derivats der Nicotinsäure

### 7.8.1 Synthese von *tert*-Butyl-(1R,4S)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylat **192**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 15.0 g (138 mmol, 1.0 Äquiv.) (-)-Vince-Lactam **183** und 1.68 g (13.8 mmol, 0.1 Äquiv.) DMAP in 50 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran suspendiert. Anschließend wurde langsam 34.8 mL (151 mmol, 1.1 Äquiv.) Boc<sub>2</sub>O zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung der Reaktion das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

**Ausbeute**: 25.3 g (121 mmol, 88 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse**:

209.25 g/mol **Summenformel**: C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert**: 0.63 (PE/EE 1:1 v/v)

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 6.87 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 5.3$  Hz,  $^4J_{HH} = 2.3$  Hz, H-5), 6.66-6.63 (m, 1H, H-6), 4.94 (d, 1H,  $^4J_{HH} = 1.8$  Hz, H-1), 3.38-3.36 (m, 1H, H-4), 2.33 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8.3$  Hz, H-7'), 2.14 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8.8$  Hz, H-7''), 1.49 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 176.4 (C-3), 150.6 (Boc-Carbonyl-C), 140.2 (C-6), 138.4 (C-5), 82.8 (C<sub>q</sub>-Boc), 62.5 (C-1), 55.1 (C-7), 54.6 (C-4), 28.2, 27.6 (Boc-CH<sub>3</sub>).

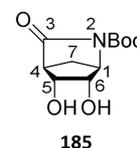
**IR**:  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2957, 2922, 1720, 1448, 1207, 1000, 970, 732, 532.

**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 232.0950, gefunden: 232.0965.

### 7.8.2 Synthese von *tert*-Butyl-(1*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-dihydroxy-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylat **185**

Es wurden 25.0 g (119 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Vince-Lactams **192** in 80 mL Aceton und 20 mL Wasser gelöst. Anschließend wurden 28.3 g (209 mmol, 1.75 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid Monohydrat zugegeben und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde langsam 1.00 mL (157 µmol, kat.) einer OsO<sub>4</sub>-Lsg (4 % in Wasser) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine ges. Natriumsulfit-Lsg. zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:4 v/v).

**Ausbeute:** 19.1 g (78.5 mmol, 66 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 243.26 g/mol **Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.72 (PE/EE 1:4 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 5.21 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, H-6), 5.15 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, H-5), 4.09-4.07 (m, 1H, H-1), 3.96-3.83 (m, 2H, -OH), 2.71-2.61 (m, 1H, H-4), 1.95 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, H-7'), 1.86 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8 Hz, H-7''), 1.42 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 173.8 (C-3), 149.2 (Boc-Carbonyl-C), 83.9 (C<sub>q</sub>-Boc), 70.4 (C-6), 67.9 (C-5), 62.4 (C-1), 53.6 (C-4), 32.0 (C-7), 28.1 (Boc-CH<sub>3</sub>).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3272, 2977, 1784, 1706, 1322, 1292, 1148, 1024, 947, 821, 774.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 266.1004, gefunden: 266.0980.

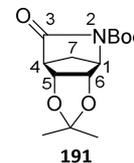
### 7.8.3 Synthese von *tert*-Butyl-(3*aS*,4*R*,7*S*,7*aR*)-2,2-dimethyl-6-oxotetrahydro-4,7-methano[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridine-5(4*H*)-carboxylat **191**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 19.0 g (78.1 mmol, 1.0 Äquiv.) des dihydroxylierten (-)-Vince-Lactam **185** und 10.5 mL (85.9 mmol, 1.1 Äquiv.) DMP in 50 mL wasserfreiem Aceton gelöst. Anschließend wurde 1.49 g (7.81 mmol, 0.1 Äquiv.) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung wurde NaHCO<sub>3</sub> zugegeben. Daraufhin wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel vom erhaltenen Filtrat im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und einmal mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-

Lsg., zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

**Ausbeute:** 15.3 g (54.0 mmol, 69 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 283.32 g/mol

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.55 (PE/EE 1:2 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.59 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, H-6), 4.48 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, H-5), 4.44-4.42 (m, 1H, H-1), 2.89-2.88 (m, 1H, H-4), 2.09 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, H-7'), 1.98 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.6 Hz, H-7''), 1.51 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 3H, Acetonide-CH<sub>3</sub>), 1.36 (s, 3H, Acetonide-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 171.5 (C-3), 141.9 (Boc-Carbonyl-C), 114.1 (Acetonide-C<sub>q</sub>) 83.6 (C<sub>q</sub>-Boc), 80.0 (C-6), 77.5 (C-5), 60.1 (C-1), 51.0 (C-4), 31.8 (C-7), 28.5, 28.2 (Boc-CH<sub>3</sub>), 25.6, 24.6 Acetonide-CH<sub>3</sub>).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2961, 2919, 1794, 1706, 1521, 1361, 1321, 1148, 1065, 940, 841, 774, 516.

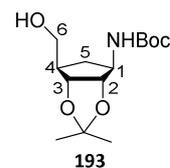
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 306.1317, gefunden: 306.1083.

#### 7.8.4 Synthese von *tert*-Butyl-((3a*S*,4*R*,6*R*,6a*R*)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydro-4*H*-cyclopenta[*d*][1,3]dioxol-4-yl)carbammat **193**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 15.0 g (52.9 mmol, 1.0 Äquiv.) des dihydroxylierten geschützten (-)-Vince-Lactams **191** in 60 mL wasserfreiem Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde 4.41 g (116 mmol, 2.2 Äquiv.) NaBH<sub>4</sub> zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung wurden 40 mL einer 1 M HCl zugegeben. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 1:2 v/v).

**Ausbeute:** 10.2 g (35.5 mmol, 67 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 287.36 g/mol

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.37 (PE/EE 1:2 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 5.32 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, -NH), 4.54-4.51 (m, 1H, H-2), 4.40-4.38 (m, 1H, H-3), 4.01-3.98 (m, 1H, H-1), 3.85-3.79 (m, 1H, H-6'), 3.70-3.63 (m, 1H, H-6''), 2.46-2.41 (m, 1H, H-5'), 2.30-2.21 (m, 2H, H-4, H-5''), 1.47 (s, 3H, Acetonide-CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 3H, Acetonide-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 164.0 (Boc-Carbonyl-C), 102.2 (Acetonide-C<sub>q</sub>), 87.1 (C-2), 86.4 (C-3), 83.3 (Boc-C<sub>q</sub>), 64.2 (C-6), 57.1 (C-1), 46.9 (C-4), 33.7 (C-5), 28.5 (Boc-CH<sub>3</sub>), 27.3, 24.9 (Acetonide-CH<sub>3</sub>).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3346, 2974, 1682, 1523, 1367, 1249, 1163, 1053, 867, 634.

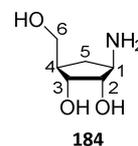
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 310.1630, gefunden: 310.1626.

### 7.8.5 Synthese von (1R,2S,3R,5R)-3-Amino-5-(hydroxymethyl)cyclopentane-1,2-diol **184**

Es wurden 2.00 g (6.96 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Cyclopentans **193** in 800 µL Wasser und 8 mL Trifluoressigsäure gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 20 mL Wasser zugefügt und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Die Lösung wurde mit 1 M NaOH neutralisiert und daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 956 mg (6.50 mmol, 96 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:**

147.17 g/mol **Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 3.90-3.87 (m, 1H, H-3), 3.68-3.56 (m, 3H, H-2, H-6', H-6''), 3.26-3.21 (m, 1H, H-1), 2.25-2.19 (m, 1H, H-5'), 2.14-2.06 (m, 1H, H-4), 1.10-1.04 (m, 1H, H-5'').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 78.5 (C-2), 73.2 (C-3), 63.9 (C-6), 54.4 (C-1), 45.0 (C-4), 31.0 (C-5).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3348, 1686, 1202, 1171, 1124, 1025, 1005, 823, 761, 719.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  170.0793, gefunden: 170.0780.

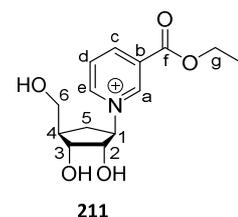
### 7.8.6 Synthese von 1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium 211

Es wurden 100 mg (679  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) des Cyclopentans **184** in 3 mL Methanol gelöst und mit 27.8 mg (346  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Natriumacetat versetzt. Daraufhin wurde zu dieser Lösung innerhalb von 10 Minuten 110 mg (346  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) des Ethylnicotinat-Zinckesalz **199** gelöst in 3 mL Acetonitril zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde 4 mL Wasser zugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Volumen des Lösungsmittels im Vakuum halbiert. Die wässrige Phase wurde filtriert und abschließend säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und daraufhin lyophilisiert.

**Ausbeute:** 149 mg (528  $\mu\text{mol}$ , quantitativ) einer farblosen Flüssigkeit.

**Molmasse:** 282.32 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_5^+$

*Anmerkung:* Es müsste ein Triflat-Anion als Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum detektiert



werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**$^1\text{H}$ -NMR:** (600 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.65 (s, 1H, H-a), 9.31 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-e), 9.10 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.1$  Hz, H-c), 8.27 (t, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 14.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-d), 5.12-5.08 (m, 1H, H-1), 4.36-4.34 (m, 1H, H-3), 4.04-4.03 (m, 1H, H-2), 3.43 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7$  Hz, H-6'), 3.69 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, H-6''), 3.60 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-g), 2.72-2.67 (m, 1H, H-5'), 2.32-2.27 (m, 1H, H-4), 2.09-2.03 (m, 1H, H-5''), 1.17 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-h).

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (151 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 168.8 (C-f), 147.6 (C-e), 147.2 (C-a), 132.1 (C-c), 131.0 (C-b), 129.7 (C-d), 79.6 (C-2), 77.9 (C-1), 74.3 (C-3), 64.1 (C-g), 58.3 (C-6), 46.7 (C-4), 30.8 (C-5), 18.4 (C-h).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3367, 1675, 1645, 1435, 1182, 1131, 1035, 840, 802, 772, 683.

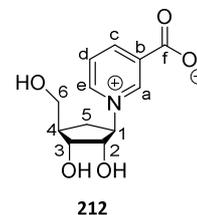
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup> 282.1336, gefunden: 282.2822.

### 7.8.7 Synthese von 1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)pyridin-1-ium-3-carboxylate **212**

Es wurde 124 mg (439 μmol, 1.0 Äquiv.) des 1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium **211** in 5 mL eines Gemisches aus Methanol:Wasser:Et<sub>3</sub>N (7:3:1) gelöst und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 111 mg (438 μmol, quantitativ) einer farblosen Flüssigkeit.

**Molmasse:** 253.25 g/mol **Summenformel:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 9.43 (s, 1H, H-a), 9.10 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, H-e), 8.197 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, H-c), 8.14 (t, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, H-d), 5.08-5.02 (m, 1H, H-1), 4.36-4.33 (m, 1H, H-3), 4.05-4.04 (m, 1H, H-2), 3.76 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.3 Hz, H-6'), 3.70 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, H-6''), 2.71-2.65 (m, 1H, H-5'), 2.33-2.27 (m, 1H, H-4), 2.08-2.02 (m, 1H, H-5'').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, MeOD): δ [ppm] = 166.7 (C-f), 153.0 (C-e), 146.9 (C-a), 145.2 (C-c), 141.2 (C-b), 128.8 (C-d), 79.3 (C-2), 77.3 (C-1), 74.1 (C-3), 64.2 (C-6), 46.7 (C-4), 30.8 (C-5).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3436, 1684, 1424, 1203, 1171, 1124, 1027, 825, 800, 762, 719.

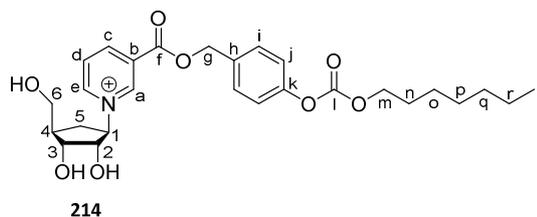
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 254.1023, gefunden: 254.1022.

### 7.8.8 Synthese von 1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-3-(((4-((heptyloxy)carbonyloxy)benzyl)oxy)carbonyl)pyridin-1-ium **214**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 62.0 mg (245 μmol, 1.0 Äquiv.) 1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium **212** in 5 mL abs. THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde 21.5 μL (245 μmol, 1.0 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäure, gelöst in 5 mL abs. THF, langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 1 h auf Raumtemperatur erwärmt. Daraufhin wurde 201 mg (490 μmol,

2.0 Äqui.) 4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl 2,2,2-trichloroacetimidat **213**, gelöst in 5 mL abs. THF, innerhalb von 1 h zugetropft. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt und anschließend mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. beendet. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 3.50 mg (6.96 μmol, 3 %) einer farblosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 502.58 g/mol **Summenformel:** C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>8</sub><sup>+</sup>



*Anmerkung:* Es müsste ein Triflat-Anion als Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

<sup>13</sup>C-NMR: Es müsste ein Triflat-Anion als Gegenion vorhanden sein, es konnte aber kein Signal bei 120 ppm im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum detektiert werden. Ebenso war kein passendes Fragment im Massenspektrum erkennbar, somit wurde die Ausbeute auf das positiv geladene Produkt bezogen.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 9.41 (s, 1H, H-a), 8.97 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, H-e), 8.92 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, H-c), 7.98 (t, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, H-d), 7.49-7.48 (m, 2H, H-i), 7.21-7.20 (m, 2H, H-j), 5.07-5.01 (m, 1H, H-1), 4.40-4.35 (m, 1H, H-3), 4.26 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-m), 4.05-4.04 (m, 1H, H-2), 3.72 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.2 Hz, H-6'), 3.67 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, H-6''), 2.80-2.73 (m, 1H, H-5'), 2.43-2.39 (m, 1H, H-4), 2.13-2.07 (m, 1H, H-5''), 1.75 (quin., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, H-n), 1.47-1.32 (m, 8H, H-o, H-p, H-q, H-r), 0.94 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, H-s).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, MeOD): δ [ppm] = 166.6 (C-f), 155.4 (C-l), 152.4 (C-k), 146.8 (C-e), 145.4 (C-a), 144.7 (C-c), 139.9 (C-h), 137.4 (C-b), 130.6 (C-i), 128.8 (C-d), 122.4 (C-j), 79.9 (C-2), 77.6 (C-1), 75.3 (C-3), 72.7 (C-m), 70.0 (C-g), 61.6 (C-6), 44.8 (C-4), 32.9, 31.2, 30.0, 26.8, (C-n, C-o, C-p, C-q), 30.8 (C-5), 23.6 (C-5), 20.9 (C-r), 14.4 (C-s).

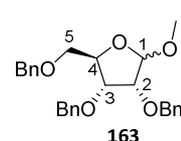
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>8</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup> 502.2435, gefunden: 502.2436.

## 7.9 Synthese des C-Nucleosidderivats der Nicotinsäure

### 7.9.1 Synthese von 1-O-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranose 163

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 4.00 g (27.0 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Ribose **116** in 50 mL MeOH gelöst und es wurden 580  $\mu$ L (8.10 mmol, 0.3 Äquiv.) Acetylchlorid zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat beendet und anschließend filtriert. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand einmal mit Toluol coevaporiert. Das Zwischenprodukt wurde anschließend in 70 mL absolutem *N,N*-Dimethylformamid gelöst und auf 0 °C gelöst. Zu der Lösung wurden 4.00 g (170 mmol, 6.2 Äquiv.) Natriumhydrid zugegeben. Zu dem Reaktionsgemisch wurden daraufhin 13.0 mL (110 mmol, 4.1 Äquiv.) Benzylbromid, sowie 150 mg (410  $\mu$ mol, 0.02 Äquiv.) TBAI hinzugegeben. Es wurde zunächst 15 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst und mit 1M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde daraufhin einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlsg. und einmal mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1  $\rightarrow$  1:1 v/v).

**Ausbeute:** 7.40 g (17.0 mmol, 64 %,  $\beta$ ) eines farblosen Öls. 3.00 g (6.90 mmol, 26 %,  $\alpha$ ), ( $\alpha$ : $\beta$  1:2.5) **Molmasse:** 434.21 g/mol **Summenformel:** C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:**  $\beta$ : 0.57,  $\alpha$ : 0.83 (PE/EE 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:  $\beta$ -Anomer:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.37-7.22 (m, 15H, CH<sub>Ar</sub>-Bn), 4.90 (s, 1H, H-1), 4.70 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.0 Hz, CHH-Bn), 4.62 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, CHH-Bn), 4.61-4.59 (m, 3H, 3xCHH-Bn), 4.47 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, CHH-Bn), 4.28-4.26 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, H-3), 3.79 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, H-2), 3.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.43 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, H-5'), 3.37 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.6 Hz, H-5'').  **$\alpha$ -Anomer:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.38-7.27 (m, 15H, CH<sub>Ar</sub>-Bn), 4.93 (s, 1H, H-1), 4.67 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, CHH-Bn), 4.60 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, CHH-Bn), 4.37-4.34 (m, 3H, 3xCHH-Bn), 4.14 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, CHH-Bn), 4.04-4.02 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> =

4.7 Hz, H-3), 3.62 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, H-5'), 3.52 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7$  Hz, H-2), 3.51 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.6$  Hz, H-5''), 3.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR: β-Anomer:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 138.3, 138.0, 137.9 (C<sub>q</sub>-Bn), 128.4, 127.7 (CH<sub>Ar</sub>-Bn), 102.5 (C-1), 82.2 (C-4), 77.9 (C-2), 75.0 (C-3), 73.5, 72.5, 72.4 (3xCH<sub>2</sub>-Bn), 70.2 (C-5), 55.6 (CH<sub>3</sub>). **α-Anomer:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 138.4, 137.9, 137.9 (C<sub>q</sub>-Bn), 128.5, 127.6 (CH<sub>Ar</sub>-Bn), 106.5 (C-1), 80.6 (C-2), 79.8 (C-4), 78.5 (C-3), 73.3, 72.5, 72.4 (3xCH<sub>2</sub>-Bn), 71.5 (C-5), 55.2 (CH<sub>3</sub>).

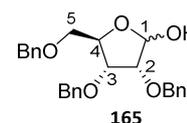
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2912, 1496, 1453, 1103, 1025, 909, 728, 695.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 457.1991, gefunden: 457.1933.

### 7.9.2 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-β-D-ribofuranose 165

Es wurden 7.40 g (17.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-O-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-β-D-ribofuranose **163** in einer Mischung aus 50 mL Essigsäure (100 %) und 12.5 mL Wasser gelöst. Die Lösung wurde 16 Stunden unter Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 6 M NaOH-Lsg. neutralisiert und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde daraufhin mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlsg. und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 3:1 → 1:1 v/v).

**Ausbeute:** 5.40 g (13.0 mmol, 75 %, β) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 420.50 g/mol **Summenformel:** C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.68 (PE/EE 3:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.40-7.25 (m, 15H, CH<sub>Ar</sub>-Bn), 5.34 (s, 1H, H-1), 4.73 (d, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 12.2$  Hz, CHH-Bn), 4.64 (d, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.5$  Hz, CHH-Bn), 4.61-4.53 (m, 3H, 3xCHH-Bn), 4.49 (d, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 12.0$  Hz, CHH-Bn), 4.34-4.32 (m, 1H, H-4), 4.01 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6$  Hz, H-3), 3.88 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.8$  Hz, H-2), 3.67 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 2.8$  Hz, H-5'), 3.37 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7$  Hz, H-5'').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 137.9, 137.6, 137.5 (C<sub>q</sub>-Bn), 128.6, 127.7 (CH<sub>Ar</sub>-Bn), 100.4 (C-1), 81.1 (C-2), 80.9 (C-4), 80.8 (C-3), 72.9, 72.6, 72.4 (3xCH<sub>2</sub>-Bn), 70.1 (C-5).

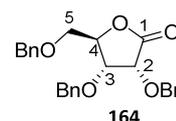
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3421, 3030, 2924, 2864, 1496, 1453, 1208, 1074, 1025, 731, 695.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 443.1834, gefunden: 443.1808.

### 7.9.3 Synthese von 2,3,5-Tri-O-Benzyl-ribo-γ-lacton **164**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.00 g (16.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-β-D-ribofuranose **165** in 50 mL absolutem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde langsam 8.10 g (19.0 mmol, 1.2 Äquiv.) Dess-Martin-Periodinan **228** zugegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde die Reaktion mit 20 mL ges. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lsg. und mit 20 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. beendet. Die organische Phase wurde daraufhin einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlsg. und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 6.40 g (15.0 mmol, 97 %) eines farblosen Pulvers. **Molmasse:** 418.49 g/mol **Summenformel:** C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.73 (PE/EE 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.39-7.16 (m, 15H, CH<sub>Ar</sub>-Bn), 4.96 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, CHH-Bn), 4.75 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, CHH-Bn), 4.71 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, CHH-Bn), 4.56-4.54 (m, 3H, 2xCHH-Bn, H-4), 4.49 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, CHH-Bn), 4.43-4.40 (m, 3H, 2xCHH-Bn, H-3), 3.88 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, H-2), 3.67 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, H-5'), 3.56 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.6 Hz, H-5'').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 173.8 (C-1), 137.4, 137.3, 137.1 (C<sub>q</sub>-Bn), 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.7 (CH<sub>Ar</sub>-Bn), 81.9 (C-2), 75.5 (C-4), 73.8 (C-3), 73.8, 72.8, 72.5 (3xCH<sub>2</sub>-Bn), 68.9 (C-5).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3421, 3030, 2924, 2864, 1496, 1453, 1208, 1074, 1025, 731, 695.

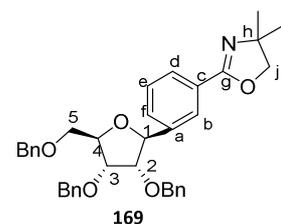
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 419.1858, gefunden: 419.1842.

#### 7.9.4 Synthese von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranosyl-1-(2-(3-bromophenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol) 169

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.99 g (11.8 mmol, 1.5 Äquiv.) 2-(3-Bromophenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol **167** in 25 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde langsam 7.89 mL *n*-BuLi (1.6 M in Hexan) innerhalb von 20 Minuten zugetropft und anschließend für 30 Minuten bei -78 °C gerührt. Daraufhin wurde zur Lösung innerhalb von 30 Minuten 3.29 g (7.86 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- $\gamma$ -lacton **164** gelöst in 20 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran zugetropft. Die Reaktionslösung wurde zunächst für 1 h bei -78 °C gerührt und anschließend innerhalb von 2 h auf -30 °C erwärmt. Nach Beendigung der Reaktion wurde vorsichtig Wasser zugefügt und die wässrige Phase zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Unter Stickstoffatmosphäre wurde der Rückstand in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt. Daraufhin wurden 3.77 mL (23.6 mmol, 3.0 Äquiv.) Triethylsilan zugegeben und anschließend langsam 2.49 mL (19.6 mmol, 2.5 Äquiv.) BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 16 h gerührt, wobei sich die Lösung langsam von -78 °C auf Raumtemperatur erwärmt hat. Nach Beendigung der Reaktion wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 2.38 g (4.12 mmol, 53 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:**

577.72 g/mol **Summenformel:** C<sub>37</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 (PE/EE 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.99 (s, 1H, H-b), 7.88 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, H-d), 7.53 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, H-f), 7.39-7.19 (m, 16H, CH<sub>Ar</sub>-Bn, H-e), 6.08 (s, 1H, H-1), 5.03 (dd, 2H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, CHH-Bn), 4.70-4.49 (m, 4H, 4xCHH-Bn), 4.37-4.34 (m, 1H, H-2), 4.07 (s, 2H, H-j), 4.04-4.02 (m, 1H, H-3), 3.85-3.82 (m, 1H, H-4), 3.70 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.2 Hz, H-5'), 3.65 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.0 Hz, H-5''), 1.38 (s, 6H, H-i).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 140.8 (C-a), 138.3, 138.1, 137.8 ( $\text{C}_q\text{-Bn}$ ), 129.4 (C-e), 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ ), 127.1 (C-c), 126.2 (C-b), 115.5 (C-f), 83.8 (C-4), 82.4 (C-2), 82.0 (C-1), 79.2 (C-j), 77.6 (C-3), 73.6, 72.4, 72.1 ( $3\times\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 70.8 (C-5), 70.1 (C-h), 28.6 (C-i).

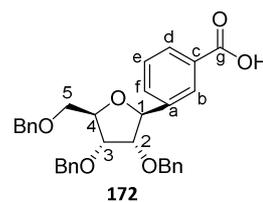
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3031, 2865, 1773, 1650, 1453, 1359, 1113, 1078, 912, 735, 695.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{NO}_5$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 578.2906, gefunden: 578.3484.

### 7.9.5 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-benzoesäure **172**

Es wurden 2.00 g (3.46 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(2-(3-bromophenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol) **169** in 10 mL Nitromethan und 5 mL Methyljodid gelöst und für 16 h refluxiert. Nach Beendigung der Methylierung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 30 mL Methanol und 30 mL einer KOH-Lösung (20 %) gelöst. Die Suspension wurde daraufhin für weitere 16 h refluxiert und nach Beendigung der Reaktion die Hälfte des Volumens der Lösung im Vakuum entfernt. Daraufhin wurde die wässrige Lösung auf einen pH-Wert von 6 mit 1 M HCl-Lösung eingestellt. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion verwendet.

**Ausbeute:** 1.81 g (3.45 mmol, quantitativ) einer leicht gelblichen Flüssigkeit. **Molmasse:** 524.22 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{O}_6$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.46 (PE/EE 1:1 v/v + 1 % AcOH)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.71 (s, 1H, H-b), 7.70 (s, 1H, H-d), 7.46 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, H-f), 7.31-7.10 (m, 16H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ , H-e), 5.00 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-1), 4.56-4.35 (m, 6H,  $6\times\text{CHH-Bn}$ ), 4.30-4.29 (m, 1H, H-2), 3.97-3.96 (m, 1H, H-3), 3.77-3.75 (m, 1H, H-4), 3.62 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.1$  Hz, H-5'), 3.55 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.7$  Hz, H-5'').

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 167.6 (C-g), 141.0 (C-a), 138.1, 137.9, 137.6 ( $\text{C}_q\text{-Bn}$ ), 129.4 (C-e), 128.9, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 127.8, 127.6, 127.4, 127.1 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ , C-c), 124.3 (C-b), 115.8 (C-f), 83.9 (C-4), 82.2 (C-2), 82.1 (C-1), 77.4 (C-3), 73.5, 72.5, 72.1 ( $3\times\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 70.3 (C-5).

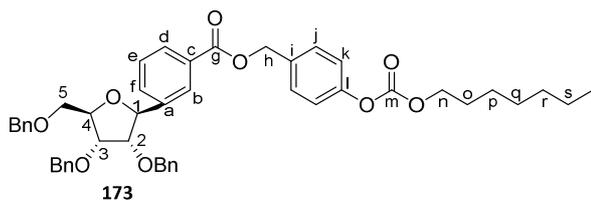
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3308, 2920, 2853, 1640, 1515, 1451, 1211, 1081, 908, 829, 731, 695.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{O}_6$  [M-H]<sup>-</sup> 523.2126 gefunden: 523.2053.

### 7.9.6 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)-benzyl)benzoesäure **173**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 7 durchgeführt. Es wurden 1.00 g (1.91 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-benzoesäure **172**, 300  $\mu\text{L}$  (2.10 mmol, 1.1 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, 320  $\mu\text{L}$  (2.29 mmol, 1.2 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 610 mg (2.29 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonat **127** und 60.0 mg (477  $\mu\text{mol}$ , 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 20 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 571 mg (739  $\mu\text{mol}$ , 39 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 772.94 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{O}_9$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.22 (PE/EE 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.13 (s, 1H, H-b), 7.99 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-e), 7.61 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.4$  Hz, H-d), 7.44-7.14 (m, 20H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ , H-f, H-j, H-k), 5.35-5.33 (m, 2H, H-h), 5.06 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-1), 4.59-4.43 (m, 6H, 6x $\text{CHH-Bn}$ ), 4.37-4.35 (m, 1H, H-2), 4.25 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-n), 4.02-4.00 (m, 1H, H-4), 3.82-3.79 (m, 1H, H-3), 3.67 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.8$  Hz, H-5'), 3.61 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-5''), 1.74 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-o), 1.43-1.28 (m, 8H, H-p, H-q, H-r, H-s), 0.90 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-t).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 167.6 (C-g), 166.5 (C-m), 151.1 (C-l), 140.4 (C-a), 138.2, 138.0, 137.3, 136.1 ( $\text{C}_q\text{-Bn}$ , C-i), 132.7 (C-d), 131.3, 131.2, 130.3, 130.2, 129.6, 129.3, 128.7, 128.3, 128.0, 127.7 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ , C-f, C-c, C-b, C-e), 121.4 (C-k), 83.9 (C-4), 82.2 (C-2), 82.0 (C-1), 77.4 (C-3), 73.6, 72.5, 72.1 (3x $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 69.3 (C-5), 66.9 (C-h), 66.1 (C-n), 31.0, 29.0, 28.7, 25.3, 22.7 (C-o, C-p, C-q, C-r, C-s), 14.2 (C-t).

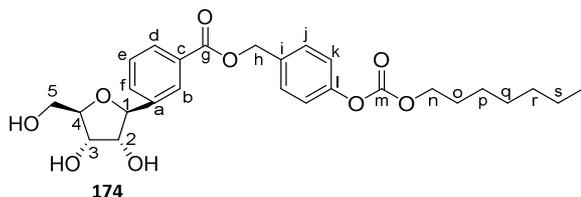
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3066, 2924, 2857, 1719, 1607, 1495, 1373, 1252, 1200, 1119, 1079, 843, 734, 696, 536.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 795.3509, gefunden: 795.3465.

### 7.9.7 Synthese von (1-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)benzoesäure)-ribofuranosyl 174

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 200 mg (259 μmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)benzoesäure **173** in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten 1.38 mL (15.5 mmol, 60.0 Äquiv.) Bortrichloridlösung (1 M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) langsam zugetropft. Die Lösung wurde bis -10 °C erwärmt und für 30 Minuten gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**Ausbeute:** 117 mg (233 μmol, 90 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 502.56 g/mol **Summenformel:** C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.46 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.10 (s, 1H, H-b), 8.01 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, H-d), 7.62 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, H-f), 7.47-7.45 (m, 2H, H-j), 7.44 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-e), 7.22-7.19 (m, 2H, H-k), 5.35 (s, 2H, H-h), 4.81 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, H-1), 4.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-n), 4.22-4.20 (m, 1H, H-2), 4.08-4.06 (m, 1H, H-3), 4.03-3.99 (m, 1H, H-4), 3.97-3.94 (m, 1H, H-5'), 3.86-3.81 (m, 1H, H-5''), 1.74 (quin., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, H-o), 1.43-1.25 (m, 8H, H-p, H-q, H-r, H-s), 0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, H-t).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 166.4 (C-g), 153.9 (C-m), 149.3 (C-l), 139.6 (C-a), 133.9 (C-i), 130.9 (C-d), 130.5 (C-e), 129.7 (C-j), 129.5 (C-b), 128.9 (C-c), 127.4 (C-f), 121.5 (C-k), 84.6 (C-4), 84.2 (C-1), 78.1 (C-2), 71.9 (C-3), 69.3 (C-h), 66.8 (C-n), 63.0 (C-5), 31.8, 29.0, 28.7, 25.5, 22.7 (C-o, C-p, C-q, C-r, C-s), 14.2 (C-t).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3362, 2955, 2858, 1761, 1716, 1447, 1254, 1193, 1103, 1025, 778.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 525.2101, gefunden: 525.2103.

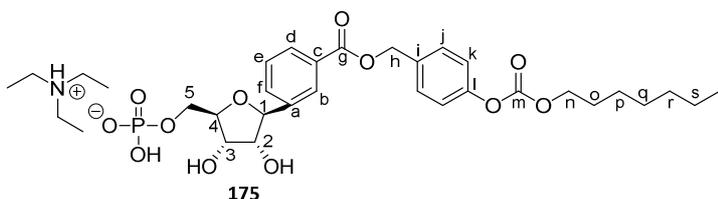
### 7.9.8 Synthese von [(Ribofuranosyl)-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)-benzoesäure]-5-monophosphat **175**

Nach AAV 8 wurden 70.0 mg (297  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) (1-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)-benzoesäure)-ribofuranosyl **174**, 25.0  $\mu\text{L}$  (274  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.)  $\text{POCl}_3$  in 2 mL wasserfreiem Trimethylphosphat und 83.0  $\mu\text{L}$  (349  $\mu\text{L}$ , 2.5 Äquiv.) Tributylamin umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 39.5 mg (233  $\mu\text{mol}$ , 42 %) eines farblosen Feststoffes.

**Molmasse:** 683.73 g/mol **Summen-**

**formel:**  $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{NO}_{12}\text{P}$



**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 8.11 (s, 1H, H-b), 7.95 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, H-d), 7.72 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-f), 7.50-7.48 (m, 2H, H-j), 7.45 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$  Hz, H-e), 7.20-7.18 (m, 2H, H-k), 5.35 (s, 2H, H-h), 4.73 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-1), 4.21 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-n), 4.03-3.99 (m, 1H, H-2), 3.99-3.96 (m, 1H, H-3), 3.83-3.79 (m, 1H, H-4), 3.77 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.9$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.9$  Hz, H-5'), 3.71 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 11.9$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.8$  Hz, H-5''), 3.13 (q, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 1.70 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-o), 1.42-1.26 (m, 8H, H-p, H-q, H-r, H-s), 1.27 (t, 9H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-t).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 165.4 (C-g), 155.2 (C-m), 152.3 (C-l), 141.5 (C-a), 135.4 (C-i), 132.1 (C-d), 131.5 (C-e), 130.6 (C-j), 130.2 (C-b), 129.9 (C-c), 128.2 (C-f), 122.4 (C-k), 85.5 (C-4), 84.8 (C-1), 84.2 (C-2), 79.5 (C-3), 70.0 (C-h), 67.1 (C-n), 65.6 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.4$  Hz, C-5), 47.7 ( $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 32.9, 30.0, 29.7, 26.8, 23.6 (C-o, C-p, C-q, C-r, C-s), 14.4 (C-t), 9.2 ( $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 0.73.

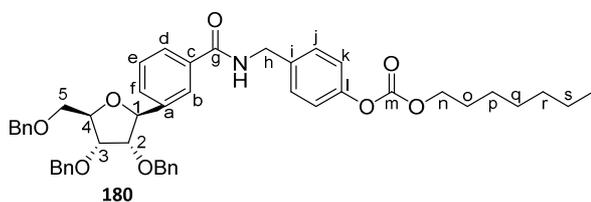
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3251, 2928, 2857, 2480, 1759, 1717, 1453, 1247, 1217, 1195, 1046, 924, 834, 781, 505.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{12}\text{P}^-$  [ $\text{M-C}_6\text{H}_{16}\text{N}$ ] $^-$  581.1793, gefunden: 581.1657.

### 7.9.9 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyloxy)benzyl)-benzamid 180

Die Reaktion wurde analog zur AAV 7 durchgeführt. Es wurden 790 mg (1.51 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-Benzyl-ribofuranosyl-1-benzoesäure **172**, 690 mg (1.81 mmol, 1.2 Äquiv.) HBTU, 460  $\mu\text{L}$  (3.31 mmol, 2.2 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 500 mg (1.66 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-(Aminomethyl)phenyl-heptyl-carbonat\*hydrochlorid **179** und 55.2 mg (452  $\mu\text{mol}$ , 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 275 mg (356  $\mu\text{mol}$ , 24 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 771.95 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{NO}_8$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.53 (PE/EE 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.77-7.75 (m, 2H, H-b, H-e), 7.52 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, H-d), 7.39-7.11 (m, 20H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ , H-f, H-j, H-k), 6.30 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.5$  Hz, NH), 5.05 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-1), 4.60-4.41 (m, 6H, 4xCHH-Bn, H-h), 4.37-4.34 (m, 1H, H-2), 4.24 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-n), 4.15-4.09 (m, 2H, 2xCHH-Bn), 4.04-4.01 (m, 1H, H-4), 3.83-3.80 (m, 1H, H-3), 3.70 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.9$  Hz, H-5'), 3.61 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, H-5''), 1.74 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, H-o), 1.45-1.29 (m, 8H, H-p, H-q, H-r, H-s), 0.89 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-t).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 167.2 (C-g), 154.6 (C-m), 150.7 (C-l), 141.4 (C-a), 138.4, 138.0, 137.3, 136.1 ( $\text{C}_{\text{q}}\text{-Bn}$ , C-i), 133.9 (C-d), 129.8, 129.1, 128.6, 128.2, 127.5, 127.0, 124.2 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$ , C-f, C-c, C-b, C-e), 121.5 (C-k), 84.0 (C-4), 82.2 (C-2), 82.1 (C-1), 76.8 (C-3), 73.5, 72.5, 72.2 (3x $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 70.4 (C-5), 69.2 (C-n), 43.5 (C-h), 31.8, 29.0, 28.7, 25.8, 22.7 (C-o, C-p, C-q, C-r, C-s), 14.2 (C-t).

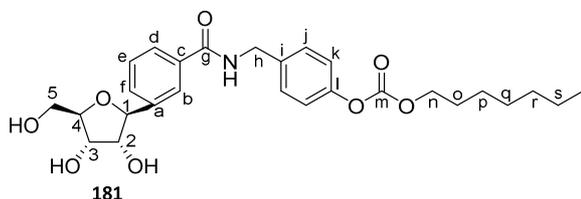
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2954, 2920, 2850, 1460, 1376, 1250, 1022, 968, 819, 734, 699.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{48}\text{H}_{54}\text{NO}_8$  [M+H]<sup>+</sup> 772.3849, gefunden: 772.3835.

**7.9.10 Synthese von (1-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)benzamid)-ribofuranosyl 181**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 270 mg (350  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)benzamid **180** in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu der Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten 1.85 mL (21.0 mmol, 60.0 Äquiv.) Bortrichloridlösung (1 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) langsam zugetropft. Die Lösung wurde bis  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und für 30 Minuten gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

**Ausbeute:** 145 mg (291  $\mu\text{mol}$ , 83 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:** 501.58 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_8$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.37 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.80 (s, 1H, H-b), 7.74-7.68 (m, 1H, H-e), 7.56 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, H-d), 7.40 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-f), 7.24-7.22 (m, 2H, H-j), 7.03-7.02 (m, 2H, H-k), 6.02-5.91 (m, 1H, NH), 4.70-4.66 (m, 1H, H-1), 4.47-4.42 (m, 2H, H-h), 4.18 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-n), 4.05-4.01 (m, 1H, H-2), 3.98-3.94 (m, 1H, H-3), 3.85-3.81 (m, 1H, H-4), 3.77-3.72 (m, 1H, H-5'), 3.67-3.62 (m, 1H, H-5''), 1.70 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-o), 1.40-1.25 (m, 8H, H-p, H-q, H-r, H-s), 0.88 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-t).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 167.2 (C-g), 154.2 (C-l), 150.6 (C-m), 139.6 (C-a), 135.7 (C-i), 134.0 (C-d), 132.0 (C-e), 129.0 (C-j), 128.7 (C-b), 127.0 (C-c), 125.9 (C-f), 121.4 (C-k), 84.9 (C-4), 83.8 (C-1), 76.8 (C-2), 74.0 (C-3), 69.0 (C-n), 62.8 (C-5), 46.5 (C-h), 31.8, 29.0, 28.2, 25.8, 22.7 (C-o, C-p, C-q, C-r, C-s), 14.2 (C-t).

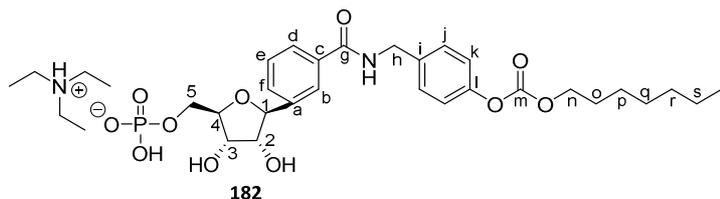
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{NO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  502.2441, gefunden: 502.2414.

### 7.9.11 Synthese von [(Ribofuranosyl)-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)-benzamid]-5-monophosphat **182**

Nach AAV 8 wurden 20.0 mg (39.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) (1-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)-benzamid)-ribofuranosyl **181** mit 146  $\mu\text{L}$  (1.60 mmol, 40.0 Äquiv.)  $\text{POCl}_3$  in 2 mL wasserfreiem Trimethylphosphat umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 27.0 mg (39.5  $\mu\text{mol}$ , quantitativ) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 682.95 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}$



**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 8.06 (s, 1H, H-b), 7.78 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-d), 7.63 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-f), 7.45-7.42 (m, 3H, H-j, H-e), 7.13-7.11 (m, 2H, H-k), 4.76 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-1), 4.58 (s, 2H, H-h), 4.21-4.20 (m, 3H, H-n, H-2), 4.14-4.12 (m, 1H, H-3), 4.11-4.08 (m, 1H, H-5'), 4.08-4.05 (m, 1H, H-5''), 4.01-3.99 (m, 1H, H-4), 3.05 (q, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 1.71 (quin., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-o), 1.43-1.30 (m, 8H, H-p, H-q, H-r, H-s), 1.23 (t, 9H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 0.91 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-t).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 170.0 (C-g), 155.3 (C-m), 151.7 (C-l), 142.9 (C-a), 138.4 (C-i), 135.5 (C-d), 131.1 (C-e), 129.8 (C-j), 129.5 (C-b), 128.0 (C-c), 126.0 (C-f), 122.3 (C-k), 85.6 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 8.7$  Hz, C-4), 84.7 (C-1), 79.3 (C-2), 73.6 (C-3), 69.9 (C-n), 66.4 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.4$  Hz, C-5), 47.5 ( $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 44.0 (C-h), 32.9, 30.0, 29.7, 26.8, 23.6 (C-o, C-p, C-q, C-r, C-s), 14.4 (C-t), 9.4 ( $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 1.11.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}\text{P}^-$  [ $\text{M-C}_6\text{H}_{16}\text{N}$ ] $^-$  580.1951, gefunden: 580.1931.

## 7.10 Synthese des Adenosin-2',5'-diphosphats

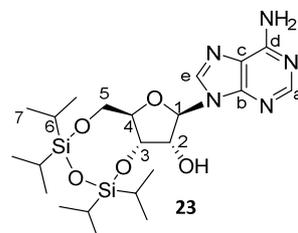
### 7.10.1 Synthese des 3',5'-o-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin **23**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.00 g (11.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin in 40 mL wasserfreiem Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurde 700 mg (5.60 mmol, 0.5 Äquiv.) DMAP zugegeben

und 4.00 mL (13.0 mmol, 1.2 Äquiv.) TIPDSiCl<sub>2</sub> langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 5.20 g (10.2 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffes.

**Molmasse:** 509.75 g/mol **Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.36 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.29 (s, 1H, H-a), 7.99 (s, 1H, H-e), 5.98 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, H-1), 5.95 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 5.09 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, H-3), 4.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, H-2), 4.19 – 4.01 (m, 3H, H-4, H-5', H-5''), 3.25 (s, 1H, -OH), 1.16 – 1.00 (m, 28H, H-6, H-7).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 155.0 (C-d), 151.8 (C-a), 149.2 (C-b), 140.2 (C-e), 120.5 (C-c), 89.8 (C-1), 82.4 (C-4), 75.3 (C-3), 70.9 (C-2), 61.9 (C-5), 17.6, 17.5, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.1, 13.4, 13.0, 12.9, 12.8 (C-6, C-7).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3320, 3128, 2866, 1645, 1576, 1465, 1383, 1293, 1156, 1034, 904, 856, 770, 598, 451.

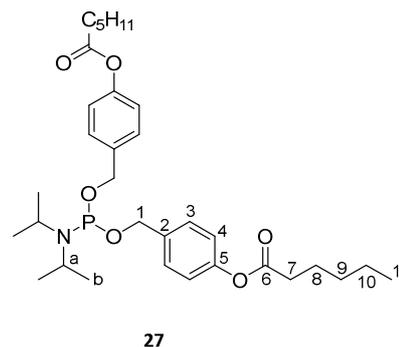
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 510.2562, gefunden: 510.2564.

### 7.10.2 Synthese von Diisopropyl-*N*-Amino(bis-4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-amidit

#### 27

Die Reaktion wurde analog zur AAV 5 durchgeführt. Es wurden 310 μL (1.69 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26**, 750 mg (3.37 mmol, 2.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat **24** und 560 μL (4.05 mmol, 2.2 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v).

**Ausbeute:** 701 mg (1.22 mmol, 72 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 573.71 g/mol **Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>6</sub>P



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.92 (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.36-7.34 (m, 4H, H-3), 7.04-7.02 (m, 4H, H-4), 4.80-4.64 (m, 4H, H-1), 3.73-3.64

(m, 2H, H-a), 2.55 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, H-7), 1.76 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-8), 1.43-1.34 (m, 4H, H-9, H-10), 1.20 (d, 12H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-b), 0.93 (t, 3H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, H-11).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.5 (C-6), 150.0 (C-5), 137.2 (C-2), 127.8 (C-3), 121.5 (C-4), 65.1, 64.9 (C-1), 43.8, 43.2 (C-a), 36.0 (C-7), 31.4 (C-8), 24.8 (C-9, C-b), 22.5 (C-10), 14.1 (C-11).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 147.88.

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2921, 2852, 2388, 1707, 1612, 1467, 1393, 1139, 976, 823, 546.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>6</sub>PK [M+K]<sup>+</sup> 612.2856, gefunden: 612.2546.

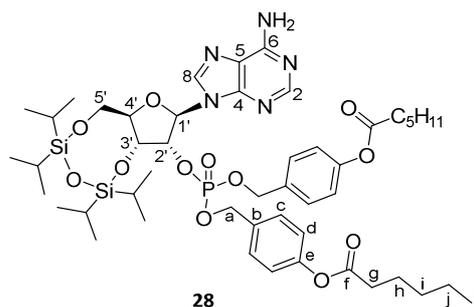
### 7.10.3 Synthese von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat **28**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 570 mg (1.11 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin **23**, 700 mg (1.22 mmol, 1.1 Äquiv.) des geschützten Amidits **27** und 1.01 mL (1.67 mmol, 1.5 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) eingesetzt. Zur Oxidation wurden 54.1 µL (1.30 mmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 780 mg (781  $\mu\text{mol}$ , 70 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 998.27 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{PSi}_2$

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.61 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.21 (s, 1H, H-2), 7.95 (s, 1H, H-8), 7.37-7.35 (m, 2H, H-c'), 7.32-7.29 (m, 2H, H-c''), 7.09-7.03 (m, 4H, H-d), 6.09 (bs, 2H, -



$\text{NH}_2$ ), 6.01 (s, 1H, H-1'), 5.30 (s, 1H, H-2'), 5.13-5.02 (m, 4H, H-a), 4.99 (ddd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 9.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.8$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz, H-3'), 4.18 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 13.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 1.8$  Hz, H-5'a), 4.07 (dt, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 9.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, H-4'), 4.01 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 2.6$  Hz, H-5'b), 2.57-2.53 (m, 4H, H-g), 1.79-1.73 (m, 4H, H-h), 1.43-1.35 (m, 8H, H-i, H-j), 1.12-1.00 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ), 0.93 (2xt, 6H,  $^{2,3}J_{\text{HH}} = 6.4$  Hz, H-k).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.3 (C-f), 154.7 (C-6), 151.7 (C-e), 149.0 (C-2), 145.4 (C-4), 140.0 (C-8), 133.0 (C-b), 129.4, 129.3 (C-d), 122.1, 122.0 (C-c), 120.2 (C-5), 88.7 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 4.4$  Hz, C-1'), 81.6 (C-4'), 79.9 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.6$  Hz, C-2'), 69.2 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.2$  Hz, C-a), 68.5 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 4.7$  Hz, C-3'), 60.0 (C-5'), 34.5 (C-g), 31.4 (C-h), 25.9 (C-i), 22.5 (C-j), 17.6, 17.4, 17.2, 17.1, 17.0, 17.1, 17.0 ( $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ), 14.1 (C-k), 13.5, 13.1, 13.0, 12.7 ( $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.45.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3109, 2929, 2865, 1758, 1687, 1508, 1463, 1203, 1141, 1036, 882, 690.

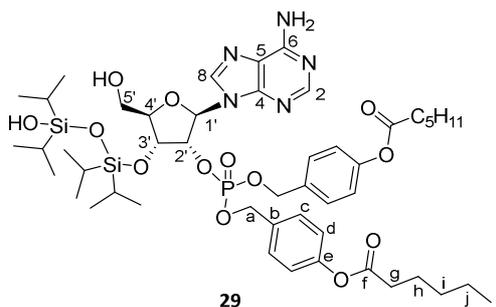
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{PSi}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 998.4532, gefunden: 998.3638.

#### 7.10.4 Synthese von 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-dioxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat **29**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 14 durchgeführt. Es wurden 750 mg (751  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-phosphat **28** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 633 mg (623  $\mu\text{mol}$ , 83 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 1016.29 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{PSi}_2$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.61 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.18 (s, 1H, H-2), 7.76 (s, 1H, H-8), 7.15-7.11 (m, 4H, H-c), 7.03-6.97 (m, 4H, H-d), 6.12 (bs, 2H,  $-\text{NH}_2$ ), 6.00 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, H-1'), 5.55-5.51 (m, 1H, H-2'), 4.93 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 1.4$  Hz, H-3'), 4.81-4.64 (m, 4H, H-a), 4.27-4.26 (m, 1H, H-4'), 3.92 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 1.6$  Hz, H-5'a), 3.76-3.73 (m, 1H, H-5'b), 2.53 (2xt, 4H,  $^2,^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-g), 1.77-1.71 (m, 4H, H-h), 1.41-1.33 (m, 8H, H-i, H-j), 1.09-1.05 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ), 0.92 (2xt, 6H,  $^2,^3J_{\text{HH}} = 6.5$  Hz, H-k).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.3 (C-f), 155.9 (C-6), 152.4 (C-e), 151.1 (C-2), 148.7 (C-4), 140.9 (C-8), 132.4 (C-b), 129.2, 129.1 (C-d), 122.0 (C-c), 119.8 (C-5), 88.8 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 6.4$  Hz, C-1'), 78.4 (C-4'), 77.4 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.2$  Hz, C-2'), 71.6 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 4.6$  Hz, C-3'), 69.4 (t,  $^2J_{\text{CP}} = 5.4$  Hz, C-a), 62.4 (C-5'), 34.9 (C-g), 31.4 (C-h), 24.7 (C-i), 22.4 (C-j), 17.6, 17.5, 17.4, 17.3 ( $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ), 14.0 (C-k), 13.7, 13.6, 13.5 ( $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.74.

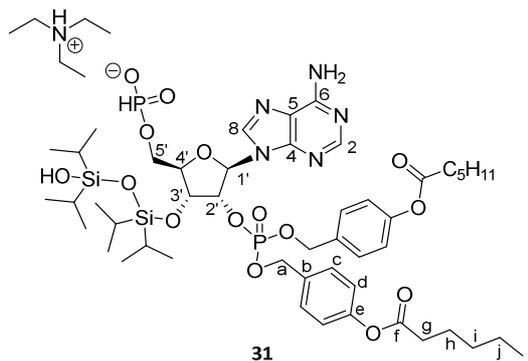
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3190, 2932, 2864, 1757, 1575, 1509, 1203, 1145, 1052, 884, 687.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{PSi}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 1016.4638, gefunden: 1016.4457.

### 7.10.5 Synthese von 5'-O-Phosphit-3'-o-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-disilo-xan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat 31

Die Reaktion wurde analog zur AAV 15 durchgeführt. Es wurden 300 mg (295  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-disilo-xan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat **29**, 28.8  $\mu\text{L}$  (330  $\mu\text{mol}$ , 1.1 Äquiv.)  $\text{PCl}_3$ , 100 mg (1.50 mmol, 5.0 Äquiv.) Imidazol und 150  $\mu\text{L}$  (1.05 mmol, 3.5 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 312 mg (264  $\mu\text{mol}$ , 89 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 1181.46 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2\text{Si}_2$



**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.17 (s, 1H, H-2), 7.73 (s, 1H, H-8), 7.21-7.18 (m, 4H, H-c), 7.02-6.99 (m, 4H, H-d), 6.33 (bs, 2H,  $-\text{NH}_2$ ), 6.15

(s, 1H, H-1'), 5.05-5.02 (m, 1H, H-2'), 4.93-4.85 (m, 6H, H-a, H-5'a, H-5'b), 4.35-4.16 (m, 2H, H-4', H-3'), 3.05 (q, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.54 (2xt, 4H,  $^{2,3}J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz, H-g), 1.78-1.71 (m, 4H, H-h), 1.43-1.37 (m, 8H, H-i, H-j), 1.30 (t, 9H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 1.08-0.98 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ), 0.93 (2xt, 6H,  $^{2,3}J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-k).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C-f), 156.8 (C-6), 152.5 (C-e), 150.4 (C-2), 142.4 (C-4), 137.3 (C-8), 133.0 (C-b), 129.6, 128.6 (C-d), 122.4 (C-c), 118.0 (C-5), 93.3 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 9.1$  Hz, C-1'), 88.0 (d,  $^4J_{\text{CP}} = 4.6$  Hz, C-4'), 78.2 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 5.5$  Hz, C-3'), 73.7 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.5$  Hz, C-2'), 70.0, 69.2 (C-a), 64.1 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5.5$  Hz, C-5'), 45.6 ( $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 34.5 (C-g), 31.4 (C-h), 24.7 (C-i), 22.5 (C-j), 17.6, 17.5, 17.3 ( $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ), 14.1 (C-k), 13.8, 13.7, 13.6 ( $\text{CH}(i\text{Pr})$ ), 8.7 ( $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.50 (P-5'), -1.53 (P-2').

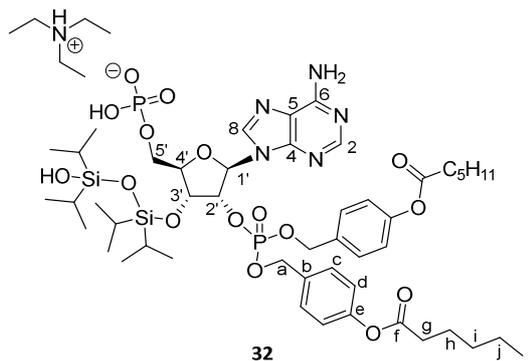
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2921, 2853, 2378, 1683, 1612, 1513, 1062, 1004, 886, 519.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_2\text{Si}_2$  [ $\text{M-C}_6\text{H}_{16}\text{N}$ ] $^-$  1078.4201, gefunden: 1078.4028.

### 7.10.6 Synthese von 5'-O-Phosphat-3'-o-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxy-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-phosphat 32

Die Reaktion wurde analog zur AAV 16 durchgeführt. Es wurden 200 mg (169  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxy-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat **31**, 410  $\mu\text{L}$  (1.69 mmol, 10.0 Äquiv.) BSA und 120 mg (507  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äquiv.) CSO eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 198 mg (165  $\mu$ mol, 99 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 1197.46 g/mol **Summenformel:** C<sub>54</sub>H<sub>90</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 8.68 (s, 1H, H-2), 8.17 (s, 1H, H-8), 7.37-7.30 (m, 2H, -NH<sub>2</sub>), 7.15-7.12 (m, 4H, H-c), 7.02-6.99 (m, 4H, H-d), 6.41 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, H-1'), 5.55-5.50 (m, 1H, H-2'), 4.92-4.90 (m, 1H, H-3'), 4.84-4.68 (m, 4H, H-a), 4.46-4.44 (m, 1H, H-4'), 4.21-4.19 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.13 (q, 6H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.57 (2xt, 4H, <sup>2,3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, H-g), 1.77-1.70 (m, 4H, H-h), 1.44-1.37 (m, 8H, H-i, H-j), 1.27 (t, 9H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 1.16-1.03 (m, 28H, CH<sub>3</sub>(iPr), CH(iPr)), 0.95 (2xt, 6H, <sup>2,3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, H-k).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.6 (C-f), 155.7 (C-6), 152.5 (C-e), 151.0 (C-2), 141.8 (C-4), 134.0 (C-8), 130.5 (C-b), 130.4, 130.3 (C-d), 123.0, 122.9 (d, <sup>4</sup>J<sub>CP</sub> = 4.8 Hz, C-c), 120.0 (C-5), 87.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 9.2 Hz, C-1'), 86.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 3.9 Hz, C-4'), 80.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 5.1 Hz, C-3'), 73.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 5.6 Hz, C-2'), 70.6, 70.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 4.8 Hz, C-a), 65.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 5.1 Hz, C-5'), 47.6 (Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 35.0 (C-g), 32.4 (C-h), 25.6 (C-i), 23.4 (C-j), 18.1, 17.9, 17.8, 17.6 (CH<sub>3</sub>(iPr)), 14.9, 14.6, 14.3 (C-k, CH(iPr)), 9.1 (Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 1.83 (P-5'), -1.02 (P-2').

**IR:**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3292, 2942, 2865, 1755, 1691, 1514, 1462, 1246, 1200, 1080, 882, 828, 684.

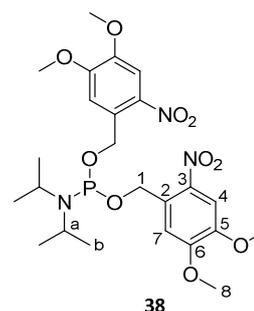
**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub> [M-C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>-</sup> 1094.4150, gefunden: 1094.4077.

### 7.10.7 Synthese von Diisopropyl-*N*-Amino(bis-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol)-amidit **38**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 5 durchgeführt. Es wurden 220  $\mu$ L (1.19 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26**, 500 mg (2.37 mmol, 2.0 Äquiv.) (4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol **34** und 390  $\mu$ L (2.84 mmol, 2.2 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v).

**Ausbeute:** 554 mg (1.22 mmol, 84 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 555.52 g/mol **Summenformel:** C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>P

**Anmerkung:** Aufgrund der Instabilität des Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR- sowie des Protonenbreitband entkoppelten <sup>31</sup>P-NMR-Spektrums.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.87 (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v)

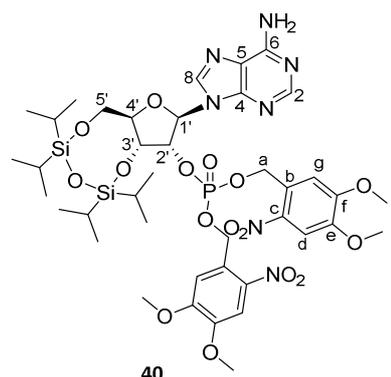
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.73 (s, 2H, H-4), 7.40 (s, 2H, H-7), 5.28-5.13 (m, 4H, H-1), 3.97 (s, 6H, H-8'), 3.96 (s, 6H, H-8''), 3.82-3.76 (m, 2H, H-a), 1.31-1.24 (m, 12H, H-b).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 147.43.

#### 7.10.8 Synthese von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-(Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol)-2'-phosphat **40**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 350 mg (686 μmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin **23**, 400 mg (720 μmol, 1.05 Äquiv.) des geschützten Amidits **38** und 300 mg (1.37 mmol, 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** eingesetzt. Zur Oxidation wurden 33.2 μL (798 μmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1 → 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 505 mg (515 μmol, 75 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 980.08 g/mol **Summenformel:** C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>PSi<sub>2</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.65 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.32 (s, 1H, H-2), 8.28 (s, 1H, H-8), 7.71 (s, 2H, H-d), 7.19, 7.17 (s, 2H, H-g), 6.17 (s, 1H, H-1'), 5.70-5.61 (m, 4H, H-a), 5.29-5.27 (m, 1H, H-2'), 4.77 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, H-3'), 4.28 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 13.7 Hz, H-5'a), 4.18 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.5 Hz, H-5'b), 4.05-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.05-3.94 (m, 12H, H-h), 1.09-0.86 (m, 28H, CH<sub>3</sub>(iPr), CH(iPr)).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 154.8 (C-6), 151.9 (C-2), 149.1 (C-4), 145.5 (C-e), 141.8 (C-b), 139.6 (C-8, C-f), 127.9 (C-d), 119.9 (C-5), 110.4 (C-g), 89.4 (C-1'), 82.5 (C-4'), 80.9 (C-2'), 77.0 (C-a), 67.7 (C-3'), 61.5 (C-5'), 56.8, 56.7 (C-h), 17.7, 16.8, 16.7 ( $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ), 13.2, 13.0, 12.7 ( $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -2.64.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3097, 2924, 2866, 1689, 1518, 1461, 1328, 1275, 1218, 1062, 1035, 866, 689.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  980.3294, gefunden: 980.3320.

### 7.10.9 Synthese von 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-(Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol)-2'-phosphat **42**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 14 durchgeführt. Es wurden 300 mg (306  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol)-2'-phosphat **40** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 271 mg (272  $\mu\text{mol}$ , 87 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 998.10 g/mol **Summenformel:**

$\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{PSi}_2$

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.56 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.28 (bs, 1H, H-2),

8.14 (s, 1H, H-8), 7.67, 7.60 (s, 2H, H-d), 7.04, 6.89 (s, 2H,

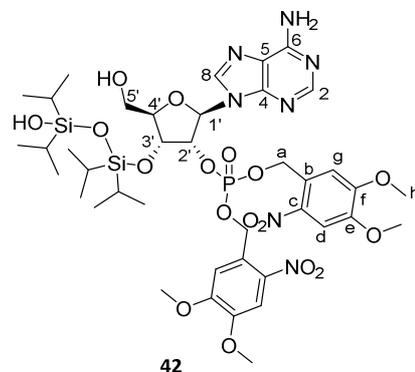
H-g), 6.21 (bs, 1H, H-1'), 5.59-5.53 (m, 1H, H-2'), 4.28 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 14.0$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.1$  Hz, H-

5'a), 5.40 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 13.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, H-5'b), 5.28-5.19 (m, 4H, H-a), 5.02-4.97 (m,

1H, H-3'), 4.30-4.27 (m, 1H, H-4'), 3.95-3.93 (m, 12H, H-h), 1.09-0.89 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,

$\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 154.7 (C-6), 151.9 (C-2), 149.0 (C-4), 145.9 (C-e), 141.5 (C-b), 139.3 (C-8), 139.2 (C-f), 126.1 (C-d), 119.2 (C-5), 108.2 (C-g), 87.6 (C-1'), 81.8 (C-4'), 80.0 (C-2'), 77.2 (C-a), 67.1 (C-3'), 56.8, 56.6 (C-h), 54.0 (C-5'), 17.5, 17.4, 17.3 ( $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ), 13.5, 13.3 ( $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).



**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -2.76.

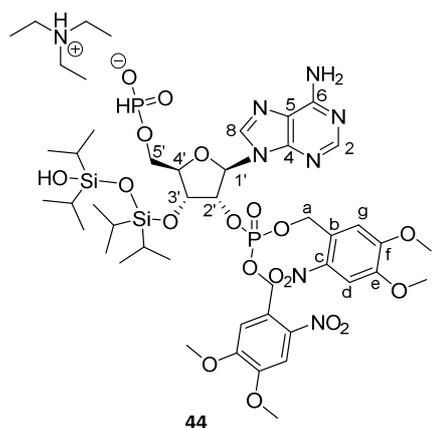
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3104, 2943, 2865, 1690, 1518, 1328, 1276, 1157, 1064, 990, 880, 791, 687.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub>PSi<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 998.3400, gefunden: 998.3397.

#### 7.10.10 Synthese von 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-(Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol)-2'-phosphat **44**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 15 durchgeführt. Es wurden 100 mg (100 μmol, 1.0 Äquiv.) 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol)-phosphat **42**, 13.1 μL (150 μmol, 1.5 Äquiv.) PCl<sub>3</sub>, 48.0 mg (700 μmol, 7.0 Äquiv.) Imidazol und 55.4 μL (400 μmol, 4.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 82.6 mg (71.0 μmol, 87 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 1163.27 g/mol **Summenformel:** C<sub>46</sub>H<sub>76</sub>N<sub>8</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.57 (bs, 1H, H-2), 8.08 (s, 1H, H-8), 7.66, 7.61 (s, 2H, H-d), 7.11, 7.02 (s, 2H, H-g), 6.38 (bs, 1H, H-1'), 5.53-5.45 (m, 5H, H-2', H-a), 5.06-5.04 (m, 1H, H-3'), 4.33 (s, 1H, H-4'), 4.27-4.13 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.93-3.89 (m, 12H, H-h), 3.10 (q, 6H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.30 (t, 9H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 1.06-0.81 (m, 28H, CH<sub>3</sub>(iPr), CH(iPr)).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.0 (C-6), 153.6 (C-2), 149.7 (C-4), 148.6 (C-e), 141.1 (C-b), 139.1, 139.0 (C-8, C-f), 126.9 (C-d), 120.2 (C-5), 108.1 (C-g), 86.3 (C-1'), 83.0 (C-4'), 80.2 (C-2'), 69.3 (C-3'), 67.0 (C-a), 60.7 (C-5'), 56.7, 56.5 (C-h), 45.6 (Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 17.6, 17.4, 17.3 (CH<sub>3</sub>(iPr)), 13.8, 13.7, 13.5 (CH(iPr)), 8.6 (Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.42 (P-5'), -2.07 (P-2').

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2954, 2866, 1687, 1608, 1515, 1461, 1210, 1080, 988, 723, 488.

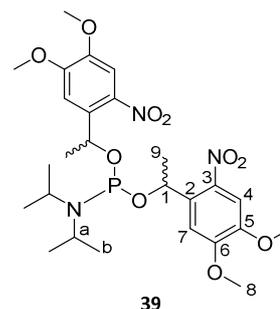
**HRMS-ESI<sup>-</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>60</sub>N<sub>7</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub> [M-C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>-</sup> 1060.2963, gefunden: 1060.2800.

### 7.10.11 Synthese von Diisopropyl-*N*-Amino(bis-1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol)-amidit **39**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 5 durchgeführt. Es wurden 500  $\mu\text{L}$  (2.72 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26**, 1.23 g (5.43 mmol, 2.0 Äquiv.) 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **37** und 830  $\mu\text{L}$  (5.98 mmol, 2.2 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE/ $\text{Et}_3\text{N}$  97:2:1 v/v/v).

**Ausbeute:** 554 mg (1.69 mmol, 62 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomere im Verhältnis 1:0.77:0.77:0.54. **Molmasse:** 583.57 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$

**Anmerkung:** Aufgrund der Instabilität des Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ - sowie des Protonenbreitband entkoppelten  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrums.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.89 (PE/EE/ $\text{Et}_3\text{N}$  97:2:1 v/v/v)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.94, 7.92, 7.91, 7.76, 7.75, 7.58, 7.56, 7.51, 7.50 (s, 2H, H-4), 7.34, 7.32, 7.17, 7.14, 6.93, 6.91 (s, 2H, H-7), 5.75-5.60 (m, 2H, H-1), 4.02-3.85 (m, 14H, H-a, H-8', H-8''), 1.59-1.56 (m, 6H, H-9), 1.54-0.98 (m, 12H, H-b).

**$^{31}\text{P-NMR}$ :** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 144.91, 143.42, 143.21.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{PK}$  [M+K]<sup>+</sup> 622.1932, gefunden: 622.2120.

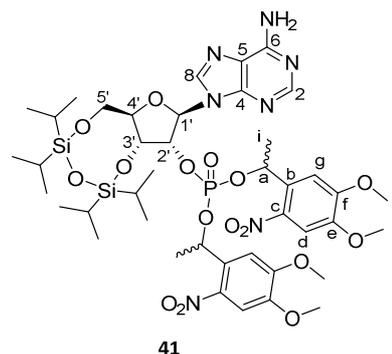
### 7.10.12 Synthese von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-disilo-xan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol)-2'-phosphat **41**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 250 mg (484  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-disilo-xan-1,3-diyl)-adenosin **23**, 400 mg (725  $\mu\text{mol}$ , 1.5 Äquiv.) des geschützten Amidits **39** und 210 mg (967  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** eingesetzt. Zur Oxidation wurden 23.7  $\mu\text{L}$  (570  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  30:1  $\rightarrow$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 428 mg (425  $\mu\text{mol}$ , 86 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.98:0.73:1:0.63. **Molmasse:**

1008.13 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomerenmischungs war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren.



Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.67 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.21, 8.18, 8.13 (s, 1H, H-2), 8.04, 8.01, 7.99, 7.92 (s, 1H, H-8), 7.53, 7.51, 7.50, 7.47, 7.44, 7.40, 7.38, 7.35 (s, 2H, H-d), 7.21, 7.05, 7.03, 7.02, 6.99, 6.98, 6.83 (s, 2H, H-g), 6.28-5.90 (m, 5H, H-1',  $-\text{NH}_2$ , H-a), 5.45-5.30 (m, 1H, H-2'), 5.11-4.89 (m, 1H, H-3'), 4.24-4.05 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 4.02-3.81 (m, 12H, H-h), 3.74-3.57 (m, 1H, H-4'), 1.62-1.53 (m, 6H, H-i), 1.12-0.97 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 155.3, 155.0, 153.9, 153.6, 152.6 (C-6, C-2), 149.1, 148.4, 148.2, 148.0 (C-4, C-e), 140.1, 140.0, 139.2, 139.0, 138.7, 138.3, 137.8 (C-b, C-8, C-f), 132.6, 132.2, 131.9 (C-d), 120.2, 120.1, 119.9 (C-5), 108.7, 108.6, 108.3, 108.2, 107.9, 107.8, 107.6, 107.5, 107.3 (C-g), 88.6, 88.0 (C-1'), 81.6, 81.5, 81.0 (C-4'), 80.0, 79.8, 79.7 (C-2'), 73.7, 73.5, 73.2, 72.9 (C-a), 70.7, 70.4, 70.3, 70.1 (C-3'), 61.7, 59.8 (C-5'), 56.7, 56.6, 56.4, 56.3 (C-h), 17.5, 17.4, 17.2, 17.1, 16.9 ( $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ , H-i), 13.5, 13.1, 12.8, 12.4 ( $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -3.78, -4.06, -4.91, -5.48.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3115, 2924, 2866, 1689, 1636, 1515, 1461, 1245, 1044, 882, 860, 689.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1008.3607, gefunden: 1008.3720.

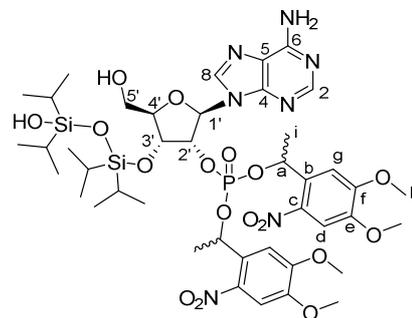
### 7.10.13 Synthese von 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylsiloxy-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol)-2'-phosphat 43

Die Reaktion wurde analog zur AAV 14 durchgeführt. Es wurden 350 mg (347  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylsiloxy-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(1-(4,5-dimethoxy-2-

nitrophenyl)ethanol)-2'-phosphat **41** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 308 mg (300 μmol, 86 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.98:0.73:1:0.63. **Molmasse:** 1026.15 g/mol  
**Summenformel:** C<sub>42</sub>H<sub>64</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub>PSi<sub>2</sub>

*Anmerkung:* Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomenrengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im <sup>31</sup>P-NMR und <sup>1</sup>H-NMR beobachtet werden.



43

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.54 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.33, 8.29, 8.27, 8.25, 8.18 (s, 2H, H-2, H-8), 7.52, 7.47, 7.44, 7.41, 7.35, 7.22 (s, 2H, H-d), 6.90, 6.84, 6.73, 6.69 (s, 2H, H-g), 6.24-5.91 (m, 3H, H-1', H-a), 5.52-5.37 (m, 1H, H-2'), 5.03-4.90 (m, 1H, H-3'), 4.20-3.74 (m, 15H, H-h, H-4', H-5'a, H-5'b), 1.59-1.24 (m, 6H, H-i), 1.13-0.89 (m, 28H, CH<sub>3</sub>(iPr), CH(iPr)).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3181, 2952, 2866, 2082, 1690, 1517, 1379, 1341, 1189, 1050, 883, 800, 583.

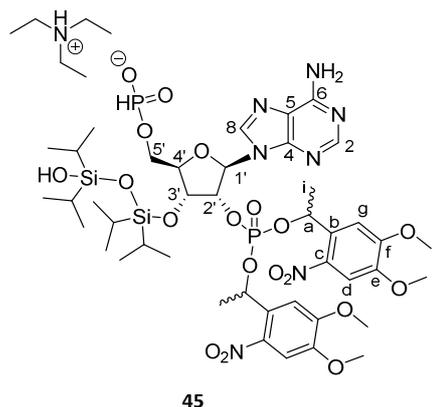
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub>PSi<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1026.3713, gefunden: 1026.3798.

#### 7.10.14 Synthese von 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-dioxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol)-2'-phosphat **45**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 15 durchgeführt. Es wurden 150 mg (146 μmol, 1.0 Äquiv.) 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-dioxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol)-2'-phosphat **43**, 38.4 μL (439 μmol, 3.0 Äquiv.) PCl<sub>3</sub>, 140 mg (2.04 mmol, 14.0 Äquiv.) Imidazol und 160 μL (1.17 mmol, 8.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 160 mg (134  $\mu\text{mol}$ , 94 %) eines farblosen Feststoffes, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.71:0.89:0.73:1. **Molmasse:** 1191.32 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{19}\text{P}_2\text{Si}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomenrengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.26-8.06 (m, 1H, H-2), 7.89-7.75 (m, 1H, H-8), 7.57-7.32 (m, 2H, H-d), 7.13-6.80 (m, 2H, H-g), 6.35-6.03 (m, 6H, H-1', H-2', H-a), 5.09-5.00 (m, 1H, H-3'), 4.39-4.18 (m, 1H, H-4'), 4.27-4.13 (m, 14H, H-5'a, H-5'b, H-h), 3.09 (q, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 1.64-1.43 (m, 6H, H-i), 1.33 (t, 9H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 1.10-0.87 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.53, 3.36 (P-5'), -2.96, -4.11, -5.81, -6.86 (P-2').

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3101, 2942, 2866, 1689, 1514, 1462, 1330, 1271, 1216, 1062, 1005, 880, 691, 521.

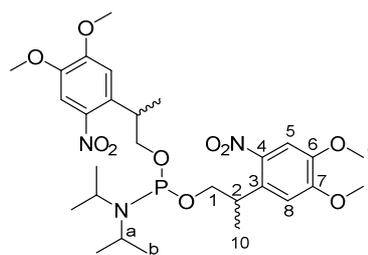
**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}_2\text{Si}_2$   $[\text{M-C}_6\text{H}_{16}\text{N}]^-$  1088.3276, gefunden: 1088.3309.

### 7.10.15 Synthese von Diisopropyl-*N*-Amino(bis-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol)-amidit 70

Die Reaktion wurde analog zur AAV 5 durchgeführt. Es wurden 120  $\mu\text{L}$  (622  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26**, 300 mg (1.24 mmol, 2.0 Äquiv.) 2-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol **64** und 200  $\mu\text{L}$  (1.36 mmol, 2.2 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE/ $\text{Et}_3\text{N}$  97:2:1 v/v/v).

**Ausbeute:** 183 mg (299  $\mu\text{mol}$ , 47 %) einer leicht gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.97:0.97:1:0.66. **Molmasse:** 611.63 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$

**Anmerkung:** Aufgrund der Instabilität des Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR- sowie des Protonenbreitband entkoppelten  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums.



70

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.75 (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.41, 7.40 (s, 2H, H-4), 6.90, 6.89, 6.88, 6.85 (s, 2H, H-8), 4.13-3.89 (m, 16H, H-1, H-9', H-9''), 3.81-3.60 (m, 4H, H-a, H-2), 1.34-1.24 (m, 6H, H-10), 1.06-1.02 (m, 12H, H-b).

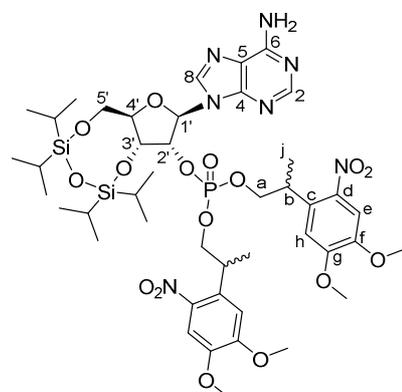
**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 146.90, 146.82, 146.65.

#### 7.10.16 Synthese von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat 71

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 151 mg (298  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin **23**, 183 mg (299  $\mu\text{mol}$ , 1.05 Äquiv.) des geschützten Amidits **70** und 130 mg (595  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** eingesetzt. Zur Oxidation wurden 14.3  $\mu\text{L}$  (344  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  30:1  $\rightarrow$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 248 mg (239  $\mu\text{mol}$ , 80 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.94:0.94:0.94:1. **Molmasse:** 1036.19 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexität der Spektren des Diastereomerenengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen



71

Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.70 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.29 (s, 1H, H-2), 8.09 (s, 1H, H-8), 7.45-7.41 (m, 2H, H-e), 6.89-6.75 (m, 2H, H-h), 6.03-5.97 (m, 1H, H-1'), 4.97 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.4$  Hz, H-2'), 4.87-4.81 (m, 1H, H-3'), 4.53-4.52 (m, 1H, H-4'), 4.34-3.85 (m, 20H, H-5'a, H-5'b, H-i, H-a, H-b), 1.40-1.26 (m, 6H, H-j), 1.14 – 0.83 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.65, -1.68, -1.96.

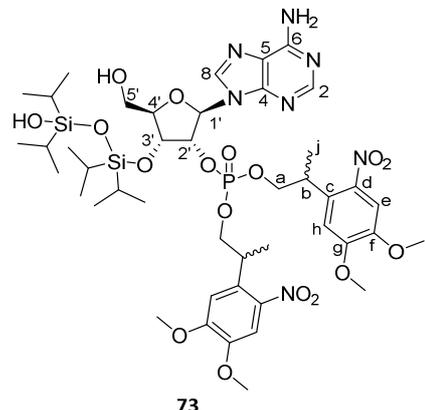
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$  [M+H]<sup>+</sup> 1036.3915, gefunden: 1036.4081.

### 7.10.17 Synthese von 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **73**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 14 durchgeführt. Es wurden 248 mg (239  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **71** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 149 mg (141  $\mu\text{mol}$ , 57 %) einer leicht gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.86:0.59:0.96:1. **Molmasse:** 1054.20 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{PSi}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexität der Spektren des Diastereomengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.11 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.26 (bs, 1H, H-2), 8.11 (bs, 1H, H-8), 7.51-7.35 (m, 2H, H-e), 6.82-6.70 (m, 2H, H-h), 6.15-6.03 (m, 3H, H-1'), 4.95-4.87 (m, 1H, H-2'), 4.24 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 17.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7 Hz, H-3'), 4.00-3.77 (m, 21H, H-a, H-4', H-5'a, H-5'b, H-b, H-i), 1.27-1.23 (m, 6H, H-j), 1.11-0.91 (m, 28H, CH<sub>3</sub>(iPr), CH(iPr)).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -2.23, -2.31, -2.53, -2.59.

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2943, 2866, 1691, 1613, 1580, 1462, 1336, 1271, 1039, 908, 864, 729, 645, 522, 404.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub>PSi<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1054.4021, gefunden: 1054.4303.

### 7.10.18 Synthese von 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **75**

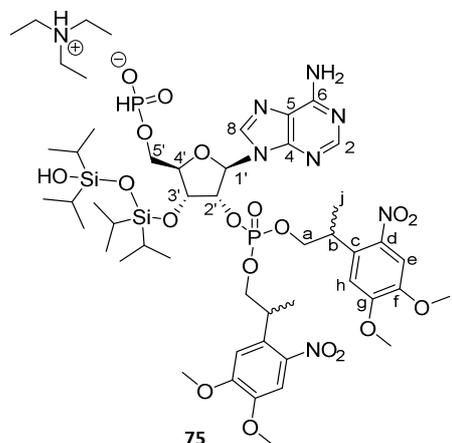
Die Reaktion wurde analog zur AAV 15 durchgeführt. Es wurden 146 mg (139 μmol, 1.0 Äquiv.) 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **73**, 13.3 μL (152 μmol, 1.1 Äquiv.) PCl<sub>3</sub>, 83.1 mg (1.22 mmol, 5.0 Äquiv.) Imidazol und 97.3 μL (701 μmol, 3.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 103 mg (84.4 μmol, 61 %) eines leicht gelblichen Feststoffes, als Gemisch von vier Diastereomeren.

**Molmasse:** 1219.38 g/mol **Summenformel:**

C<sub>50</sub>H<sub>84</sub>N<sub>8</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomerenengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im <sup>31</sup>P-NMR und <sup>1</sup>H-NMR beobachtet werden.



**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.48 (bs, 1H, H-2), 8.12 (bs, 1H, H-8), 7.45-7.34 (m, 2H, H-e), 6.85-6.70 (m, 2H, H-h), 6.30-6.07 (m, 1H, H-1'), 5.04-4.93 (m, 1H, H-2'), 4.41-4.16 (m,

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.40, 7.39 (s, 2H, H-5), 6.82, 6.80 (s, 2H, H-8), 4.05-3.90 (m, 14H, H-1, H-9, H-11), 3.82-3.69 (m, 4H, H-a, H-2), 1.88-1.82 (m, 4H, H-12), 1.47-1.41 (m, 4H, H-13), 1.36-1.23 (m, 28H, H-14, H-15, H-16, H-17, H-b), 0.88 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, 6H, H-18).

$^{31}\text{P-NMR}$ : (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.56 (P-5'), -1.93, -2.55 (P-2').

**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2943, 2865, 1647, 1578, 1463, 1334, 1215, 1036, 918, 865, 722, 646, 531, 450.

**HRMS-ESI**: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}_2\text{Si}_2$  [ $\text{M-C}_6\text{H}_{16}\text{N}$ ] $^-$  1116.3589, gefunden: 1116.3514.

### 7.10.19 Synthese von Diisopropyl-*N*-Amino(bis-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol)-phosphoramidit 69

Die Reaktion wurde analog zur AAV 5 durchgeführt. Es wurden 81.0  $\mu\text{L}$  (442  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26**, 300 mg (884  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) 2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol **68** und 130  $\mu\text{L}$  (972  $\mu\text{mol}$ , 2.2 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE/ $\text{Et}_3\text{N}$  97:2:1 v/v/v).

**Ausbeute**: 356 mg (440  $\mu\text{mol}$ , quantitativ)

einer leicht gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.20:0.17:0.40:1. **Molmasse**: 808.01 g/mol **Summenformel**:  $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$

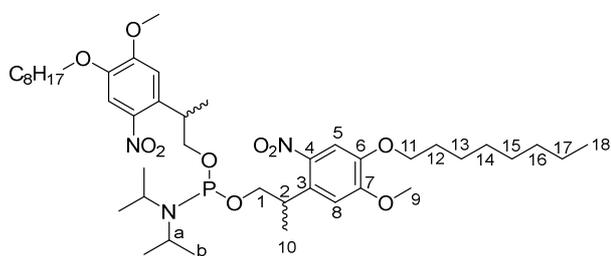
**Anmerkung**: Aufgrund der Instabilität des

Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ - sowie des Protonenbreitband entkoppelten  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrums.

**R<sub>f</sub>-Wert**: 0.88 (PE/EE/ $\text{Et}_3\text{N}$  97:2:1 v/v/v)

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.40, 7.39 (s, 2H, H-5), 6.82, 6.80 (s, 2H, H-8), 4.05-3.90 (m, 14H, H-1, H-9, H-11), 3.82-3.69 (m, 4H, H-a, H-2), 1.88-1.82 (m, 4H, H-12), 1.47-1.41 (m, 4H, H-13), 1.36-1.23 (m, 28H, H-14, H-15, H-16, H-17, H-b), 0.88 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, 6H, H-18).

$^{31}\text{P-NMR}$ : (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 138.49, 138.37, 137.88, 137.62.



69

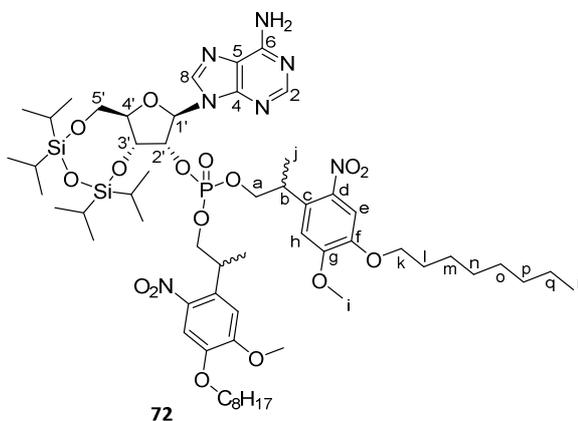
### 7.10.20 Synthese von 3',5'-O-(1,1,3,3-TETRAISOPROPYLDISILOXAN-1,3-DIYL)-adenosin-2'-Bis-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **72**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 399 mg (493  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-TETRAISOPROPYLDISILOXAN-1,3-DIYL)-adenosin **23**, 255 mg (490  $\mu\text{mol}$ , 1.05 Äquiv.) des geschützten Amidits **69** und 215 mg (987  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** eingesetzt. Zur Oxidation wurden 37.8  $\mu\text{L}$  (909  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  30:1  $\rightarrow$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 534 mg (239  $\mu\text{mol}$ , 80 %) einer gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.69:0.69:1:0.93. **Molmasse:** 1232.57 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomenrengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.70 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.05-7.97 (m, 1H, H-2), 7.89-7.84 (m, 1H, H-8), 7.29-7.27 (m, 2H, H-e), 6.77-6.61 (m, 2H, H-h), 5.82-5.79 (m, 1H, H-1'), 5.15-5.07 (m, 1H, H-2'), 4.84-4.76 (m, 1H, H-3'), 4.23-3.72 (m, 19H, H-4', H-5'a, H-5'b, H-k, H-i, H-a, H-b), 1.70 (quint., 4H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$  Hz, H-l), 1.33-1.27 (m, 6H, H-j), 1.25-0.72 (m, 50H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ , H-q, H-o, H-p, H-n, H-m, H-r).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.84, -1.96, -2.12.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2952, 2922, 2854, 1664, 1518, 1461, 1376, 1272, 1213, 1033, 908, 733, 696.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{95}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{PSi}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1232.6111, gefunden: 1232.6083.

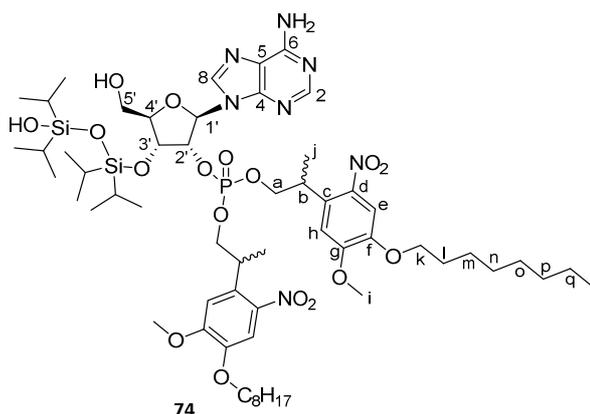
### 7.10.21 Synthese von 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **74**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 14 durchgeführt. Es wurden 215 mg (174  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **72** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 116 mg (92.8  $\mu\text{mol}$ , 53 %) einer leicht gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.97:0.53:1:0.95. **Molmasse:** 1250.58 g/mol  
**Summenformel:**  $\text{C}_{58}\text{H}_{96}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{PSi}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexität der Spektren des Diastereomerenmischungs war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzu-

ordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.44 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.26-8.19 (m, 1H, H-2), 7.89-7.85 (m, 1H, H-8), 7.45-7.34 (m, 2H, H-e), 6.75-6.54 (m, 2H, H-h), 6.06-5.99 (m, 1H, H-1'), 5.50-5.38 (m, 1H, H-2'), 4.95-4.91 (m, 1H, H-3'), 4.07-3.63 (m, 19H, H-4', H-5'a, H-5'b, H-k, H-i, H-a, H-b), 1.87-1.78 (m, 4H, H-l), 1.48-1.43 (m, 6H, H-j), 1.36-0.83 (m, 50H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ , H-q, H-o, H-p, H-n, H-m, H-r).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -2.32, -2.44, -2.58, -2.63.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3187, 2923, 2859, 1663, 1518, 1462, 1375, 1271, 1213, 1050, 908, 732, 688.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{97}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{PSi}_2$  [M+H]<sup>+</sup> 1250.6217, gefunden: 1250.6335.

**7.10.22 Synthese von 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat**

76

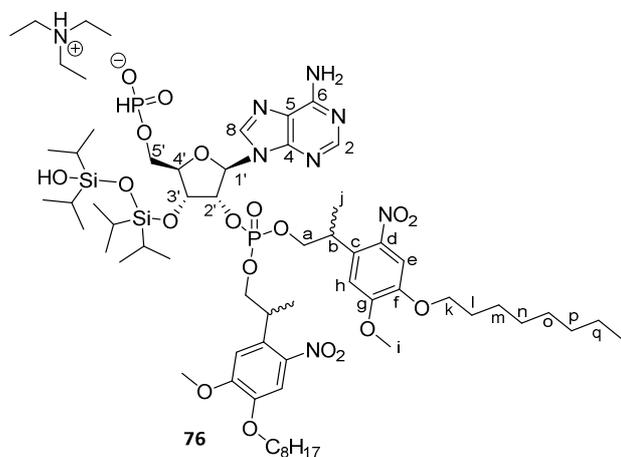
Die Reaktion wurde analog zur AAV 15 durchgeführt. Es wurden 110 mg (88.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol)-2'-phosphat **74**, 8.46  $\mu\text{L}$  (96.8  $\mu\text{mol}$ , 1.1 Äquiv.)  $\text{PCl}_3$ , 29.9 mg (440  $\mu\text{mol}$ , 5.0 Äquiv.) Imidazol und 36.6  $\mu\text{L}$  (264  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 90.9 mg (64.2  $\mu\text{mol}$ , 73 %) eines leicht gelblichen Feststoffes, als Gemisch von vier Diastereomeren. **Molmasse:** 1415.75 g/mol

$\text{C}_{64}\text{H}_{112}\text{N}_8\text{O}_{19}\text{P}_2\text{Si}_2$

**Summenformel:**

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomengemisches war es nicht möglich, jedes Signal



exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.

**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.49-8.44 (m, 1H, H-2), 8.21-8.15 (m, 1H, H-8), 7.45-7.36 (m, 2H, H-e), 6.79-6.72 (m, 2H, H-h), 6.29-6.24 (m, 1H, H-1'), 5.34-5.25 (m, 1H, H-2'), 4.98-4.92 (m, 1H, H-3'), 4.31-3.66 (m, 19H, H-4', H-5'a, H-5'b, H-k, H-i, H-a, H-b), 3.05 (q, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Et}_3\text{N}$ ), 1.87-1.77 (m, 4H, H-l), 1.47-1.39 (m, 6H, H-j), 1.36-0.80 (m, 59H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ , H-q, H-o, H-p, H-n, H-m, H-r,  $\text{CH}_3\text{-Et}_3\text{N}$ ).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.56 (P-5'), -1.87, -2.11 (P-2').

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2928, 2862, 1695, 1517, 1464, 1271, 1212, 1031, 908, 885, 728, 645, 533.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{96}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}_2\text{Si}_2$   $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}]^-$  1312.5780, gefunden: 1312.5409.

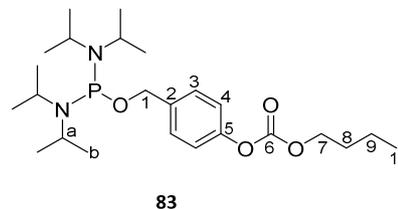
### 7.10.23 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **83**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 750 mg (2.81 mmol, 1.2 Äquiv.) Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **82** in 10 mL wasserfreiem Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 450 µL (3.28 mmol, 1.4 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N und 530 mg (2.34 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat **80** gelöst in 10 mL wasserfreiem Diethylether langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde filtriert und vom Filtrat das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v).

**Ausbeute:** 980 mg (2.16 mmol, 92 %) eines farblosen Öls.

**Molmasse:** 454.59 g/mol **Summenformel:** C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P

**Anmerkung:** Aufgrund der Instabilität des Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR- sowie des Protonenbreitband entkoppelten <sup>31</sup>P-NMR-Spektrums.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.89 (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 97:2:1 v/v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.37 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Hz, H-3), 7.12 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, H-4), 4.64 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, H-1), 4.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, H-7), 3.61-3.52 (m, 4H, H-a), 1.73 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, H-8), 1.50–1.41 (m, 2H, H-9), 1.21-1.14 (m, 24H, H-b), 0.97 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, H-10).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 123.39.

### 7.10.24 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-(diisopropylamino)phosphoramidit **79**

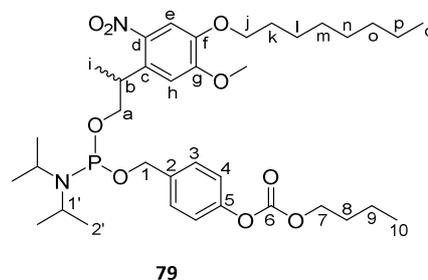
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 900 mg (1.98 mmol, 1.5 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **83** in 10 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 450 mg (1.32 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol **68** und 5.28 mL (1.32 mmol, 1.0 Äquiv.) DCI

(0.25 M in Acetonitril) gelöst in 10 mL wasserfreiem Acetonitril langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 30:1:0.5 v/v/v).

**Ausbeute:** 606 mg (875  $\mu$ mol, 66 %) eines leicht gelblichen Öls, als Gemisch von zwei Diastereomeren im Verhältnis 0.94:1. **Molmasse:** 692.83 g/mol **Summenformel:** C<sub>36</sub>H<sub>57</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>P

*Anmerkung:* Aufgrund der Instabilität des Produktes erfolgte

lediglich eine Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR- sowie des Protonenbreitband entkoppelten <sup>31</sup>P-NMR-Spektrums.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.92 (PE/EE/Et<sub>3</sub>N 30:1:0.5 v/v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.42, 7.41 (s, 1H, H-e), 7.32-7.29 (m, 2H, H-3), 7.13-7.11 (m, 2H H-4), 6.90, 6.89 (s, 1H, H-h), 4.67-4.50 (m, 2H, H-1), 4.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, H-7), 4.03-3.99 (m, 2H, H-j), 3.87, 3.86 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.83-3.70 (m, 3H, H-a, H-b), 3.62-3.49 (m, 2H, H-1'), 1.88-1.80 (m, 2H, H-k), 1.73 (quint., 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, H-8), 1.50-1.41 (m, 4H, H-9, H-l), 1.37-1.10 (m, 20H, H-m, H-n, H-o, H-p, H-2'), 0.97 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-10), 0.90-0.83 (m, 3H, H-q).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 147.44, 147.27.

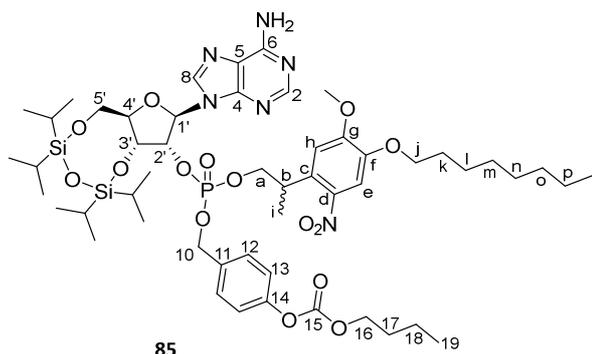
#### 7.10.25      **Synthese von 3',5'-O-(1,1,3,3-TETRAISOPROPYLDISILOXAN-1,3-DIYL)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat 85**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 410 mg (806  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-TETRAISOPROPYLDISILOXAN-1,3-DIYL)-adenosin **23**, 600 mg (886  $\mu$ mol, 1.1 Äquiv.) des geschützten Amidits **79** und 350 mg (1.61 mmol, 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** eingesetzt. Zur Oxidation wurden 38.9  $\mu$ L (935  $\mu$ mol, 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1  $\rightarrow$  19:1 v/v).

**Ausbeute:** 748 mg (669  $\mu\text{mol}$ , 83 %) einer leicht gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.29:0.34:1:0.68. **Molmasse:** 1117.39 g/mol  
**Summenformel:**  $\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{PSi}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomerenmischungs

war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.73 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.21-8.20 (m, 1H, H-2), 8.05-8.00 (m, 1H, H-8), 7.43-7.40 (m, 1H, H-e), 7.35-7.30 (m, 2H, H-12), 7.19-7.11 (m, 2H, H-13), 6.82-6.81 (m, 1H, H-h), 6.86-6.79 (m, 2H,  $-\text{NH}_2$ ), 5.99-5.97 (m, 1H, H-1'), 5.18-4.87 (m, 3H, H-2', H-10), 4.39-4.26 (m, 6H, H-a, H-16, H-2', H-3'), 4.16-3.91 (m, 5H, H-5'a, H-5'b, H-j, H-4'), 3.88 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.55-3.32 (m, 1H, H-b), 1.83 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, H-k), 1.73 (quint., 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, H-17), 1.50-1.41 (m, 4H, H-18, H-l), 1.37-1.25 (m, 8H, H-m, H-n, H-o, H-p), 1.12-0.88 (m, 34H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ , H-19, H-q)).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -0.18, -0.36, -0.42, -0.57.

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3113, 2925, 2865, 1760, 1685, 1509, 1463, 1213, 1065, 1004, 883, 537, 519.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{PSi}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 1117.5114, gefunden: 1117.5141.

### 7.10.26 Synthese von 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylsilyloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat 86

Die Reaktion wurde analog zur AAV 14 durchgeführt. Es wurden 700 mg (617  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylsilyloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat **85**

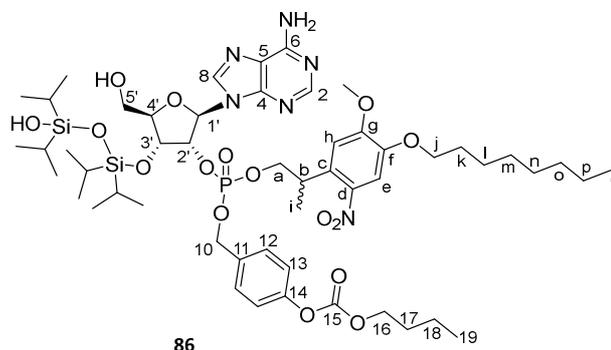
eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**Ausbeute:** 584 mg (514 μmol, 82 %) einer leicht gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 1:0.47:0.46:0.79.

**Molmasse:** 1135.41 g/mol

**Summenformel:**

C<sub>52</sub>H<sub>83</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>PSi<sub>2</sub>



**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexität

der Spektren des Diastereomenengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im <sup>31</sup>P-NMR und <sup>1</sup>H-NMR beobachtet werden.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.60 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.28-8.18 (m, 1H, H-2), 7.82-7.80 (m, 1H, H-8), 7.34-7.33 (m, 1H, H-e), 7.20-7.12 (m, 2H, H-12), 7.05-7.03 (m, 2H, H-13), 6.85-6.84 (m, 1H, H-h), 6.74-6.59 (m, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.04-5.97 (m, 3H, H-1', H-10), 5.51-5.43 (m, 1H, H-2'), 4.94-4.91 (m, 1H, H-2'), 4.65-4.62 (m, 1H, H-3'), 4.28-4.17 (m, 4H, H-a, H-16), 4.05-3.78 (m, 6H, H-j, H-4', -OCH<sub>3</sub>), 3.78-3.70 (m, 3H, H-5'a, H-5'b, H-b), 1.87-1.78 (m, 2H, H-k), 1.76-1.70 (m, 2H, H-17), 1.49-1.39 (m, 4H, H-18, H-l), 1.36-1.23 (m, 8H, H-m, H-n, H-o, H-p), 1.12-0.85 (m, 34H, CH<sub>3</sub>(iPr), CH(iPr), H-19, H-q)).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -1.99, -2.02, -2.06, -2.33

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2936, 2865, 1761, 1689, 1508, 1247, 1052, 920, 784, 720.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>84</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>PSi<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1135.5220, gefunden: 1135.5254.

**7.10.27 Synthese von 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat 87**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 15 durchgeführt. Es wurden 550 mg (485  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat **86**, 46.6  $\mu\text{L}$  (533  $\mu\text{mol}$ , 1.1 Äquiv.)  $\text{PCl}_3$ , 170 mg (2.43 mmol, 5.0 Äquiv.) Imidazol und 240  $\mu\text{L}$  (1.70 mmol, 3.5 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 397 mg (305  $\mu\text{mol}$ , 68 %) eines leicht gelblichen Feststoffes, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.49:1:0.48:0.99.

1300.58 g/mol

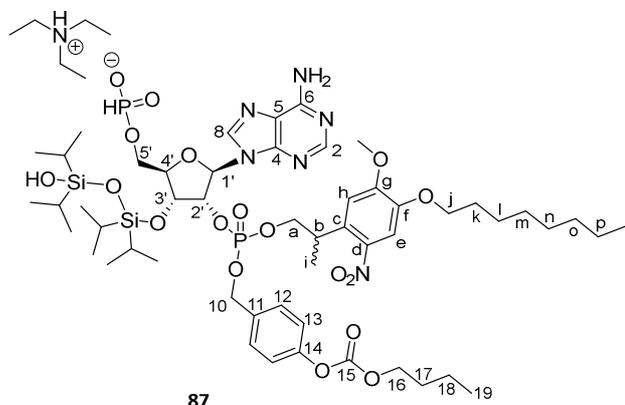
**Molmasse:**

**Summenformel:**

$\text{C}_{58}\text{H}_{99}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{P}_2\text{Si}_2$

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomerenengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.

jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**$^1\text{H}$ -NMR:** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 8.56-8.52 (m, 1H, H-2), 8.20-8.14 (m, 1H, H-8), 7.42-7.34 (m, 1H, H-e), 7.17-7.11 (m, 2H, H-12), 7.09-7.08 (m, 2H, H-13), 6.88-6.86 (m, 1H, H-h), 6.36-6.29 (m, 2H,  $-\text{NH}_2$ ), 6.06-6.05 (m, 1H, H-1'), 5.53-5.45 (m, 3H, H-2', H-10), 4.82-4.57 (m, 1H, H-2'), 4.40-4.37 (m, 1H, H-3'), 4.28 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, H-16), 4.17-3.75 (m, 8H, H-j, H-4',  $-\text{OCH}_3$ , H-a), 3.75-3.55 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.26-3.13 (m, 7H, H-b,  $\text{CH}_2\text{-Et}_3\text{N}$ ), 1.84-1.67 (m, 4H, H-k, H-17), 1.54-1.43 (m, 4H, H-18, H-l), 1.41-1.29 (m, 8H, H-m, H-n, H-o, H-p,  $\text{CH}_3\text{-Et}_3\text{N}$ ), 1.13-0.89 (m, 34H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ , H-19, H-q).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 4.52, 4.49 (P-5'), -2.24, -2.36, -2.42, -2.69 (P-2').

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3060, 2920, 1760, 1685, 1506, 1216, 1066, 1005, 884, 537.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{52}H_{83}N_6O_{18}P_2Si_2$   $[M-C_6H_{12}N]^-$  1197.4783, gefunden: 1197.4810.

**7.10.28 Synthese von 5'-O-Phosphat-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)-phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat 84**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 16 durchgeführt. Es wurden 390 mg (325  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-Phosphit-3'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-2'-phosphat **87**, 400  $\mu$ L (1.63 mmol, 5.0 Äquiv.) BSA und 750 mg (3.25 mmol, 10.0 Äquiv.) CSO eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 409 mg (310  $\mu$ mol, 95 %) eines leicht gelblichen Feststoffes, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.54:0.81:0.57:1.00.

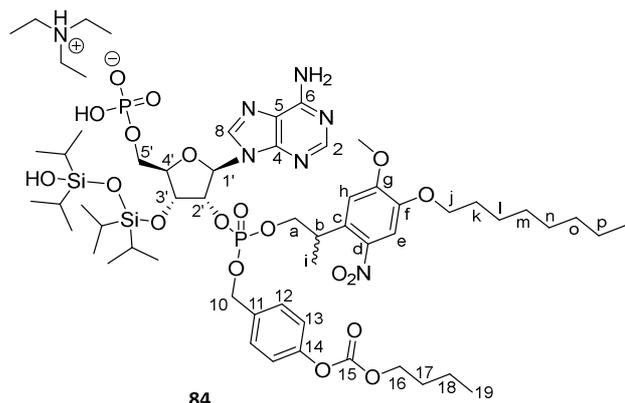
1316.58 g/mol

$C_{58}H_{99}N_7O_{19}P_2Si_2$

**Molmasse:**  
**Summenformel:**

**Anmerkung:** Aufgrund der Komplexität der Spektren des Diastereomerenmischungs

war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}P$ -NMR und  $^1H$ -NMR beobachtet werden.



**$^1H$ -NMR:** (600 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 8.66-8.64 (m, 1H, H-2), 8.20-8.11 (s, 1H, H-8), 7.41-7.31 (m, 1H, H-e), 7.14-7.07 (m, 2H, H-12), 7.01-7.00 (m, 2H, H-13), 6.85-6.83 (m, 1H, H-h), 6.37-6.34 (m, 2H,  $-NH_2$ ), 6.06-6.05 (m, 1H, H-1'), 5.50-5.43 (m, 3H, H-2', H-10), 4.71-4.61 (m, 1H, H-2'), 4.44-4.41 (m, 1H, H-3'), 4.26 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 6.6$  Hz, H-16), 4.19-3.86 (m, 10H, H-j, H-4',  $-OCH_3$ , H-a, H-5'a, H-5'b), 3.23-3.13 (m, 7H, H-b,  $CH_2-Et_3N$ ), 1.89-1.84 (m, 4H, H-k, H-17),

1.55–1.42 (m, 4H, H-18, H-1), 1.42–1.26 (m, 8H, H-m, H-n, H-o, H-p,  $CH_3$ -Et<sub>3</sub>N), 1.11–0.99 (m, 31H,  $CH_3$ (iPr),  $CH$ (iPr), H-19), 0.92 (t, 3H,  $^3J_{HH} = 6.6$  Hz, H-q).

$^{31}P$ -NMR: (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 0.71 (P-5'), -2.07, -2.28, -2.32, -2.57 (P-2').

IR:  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] (Film) = 2955, 2895, 1689, 1614, 1397, 1188, 1148, 1044, 803, 684, 492, 425.

HRMS-ESI: (m/z) berechnet für  $C_{52}H_{83}N_6O_{19}P_2Si_2$   $[M-C_6H_{16}N]^-$  1213.4732, gefunden: 1213.4705.

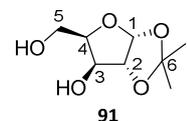
## 7.11 Synthese des 2',5'-Diphosphat-3'-desoxy-3'-fluoro-adenosins

### 7.11.1 Synthese von 1',2'-Isopropylidene-D-xylose 91

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 20.0 g (133 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Xylose **92** und 40.0 g (250 mmol, 1.9 Äquiv.)  $CuSO_4$  mit einer katalytischen Menge  $H_2SO_4$  (96 %) in 200 mL wasserfreiem Aceton gelöst. Die Suspension wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Suspension filtriert und zum Filtrat 6.4 mL Ammoniumhydroxid (25 %) zugegeben. Nach erneuter Filtration wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 150 mL Methanol gelöst und mit 44 mL HCl (0.1 M) versetzt. Die Lösung wurde für 2 h bei 40 °C gerührt und anschließend mit  $NaHCO_3$  neutralisiert. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde dreimal mit einem Ethanol/Toluol-Gemisch (1:1) coevaporiert. Das Produkt wurde daraufhin in Dichlormethan gelöst und über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 20.0 g (105 mmol, 79 %) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:**

190.20 g/mol **Summenformel:**  $C_8H_{14}O_5$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.49 (EE)

$^1H$ -NMR: (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.77 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 3.8$  Hz, H-1), 5.11 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 4.8$  Hz, H-2), 4.60–4.58 (m, 1H, H-4), 4.34 (d, 1H,  $^4J_{HH} = 4.0$  Hz, -OH), 3.97–3.91 (m, 2H, H-3, -OH), 3.57 (dd, 1H,  $^2J_{HH} = 10.9$  Hz,  $^3J_{HH} = 5.3$  Hz, H-5'), 3.46 (dd, 1H,  $^2J_{HH} = 11.4$  Hz,  $^3J_{HH} = 5.8$  Hz, H-5''), 1.34 (s, 3H, H-7'), 1.19 (s, 3H, H-7'').

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 110.3 (C-6), 104.3 (C-1), 85.1 (C-4), 81.4 (C-2), 73.4 (C-3), 58.9 (C-5), 26.7, 26.1 (C-7).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3353, 2985, 1455, 1295, 1069, 999, 885, 859, 632, 509.

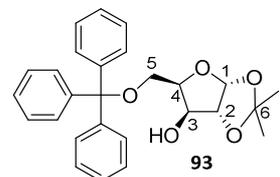
**HRMS-ESI $^+$ :** (m/z) berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5\text{Na}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  213.0739, gefunden: 213.0722.

### 7.11.2 Synthese von 1',2'-Isopropylidene-5'-Trityl-D-xylose **93**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 14.5 g (76.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 1',2'-Isopropylidene-D-xylose **91** in 40 mL wasserfreiem Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden 22.2 g (79.8 mmol, 1.05 Äquiv.) Tritylchlorid zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und einmal mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg., sowie einmal mit ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

**Ausbeute:** 30.9 g (71.4 mmol, 94 %) eines farblosen Öls. **Molmasse:**

432.52 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.53 (PE/EE 2:1 v/v)

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.48-7.24 (m, 15H, Ar-*H*), 6.03 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 3.7$  Hz, H-1), 4.55 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 3.7$  Hz, H-2), 4.31-4.28 (m, 2H, H-4, H-3), 3.58 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.2$  Hz, H-5'), 3.46 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, H-5''), 3.31 (s, 1H, -OH), 1.51 (s, 3H, H-7'), 1.34 (s, 3H, H-7'').

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 143.3 ( $\text{C}_q$ -Ar), 128.6, 128.2, 127.4 (C-Ar), 111.6 (C-6), 105.1 (C-1), 87.6 ( $\text{C}_q$ -Trityl), 85.2 (C-4), 78.6 (C-2), 76.3 (C-3), 61.9 (C-5), 26.9, 26.3 (C-7).

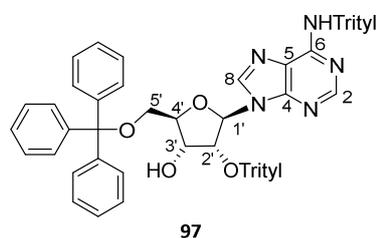
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3461, 2929, 1490, 1447, 1377, 1214, 1070, 1003, 903, 745, 699, 648.

**HRMS-ESI $^+$ :** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  455.1834, gefunden: 455.1830.

### 7.11.3 Synthese von *N*-(Triphenylmethyl)-2',5'-di-*O*-(triphenylmethyl)-adenosin **97**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.00 g (18.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin **22** und 1.14 g (9.35 mmol, 0.5 Äquiv.) DMAP in 40 mL wasserfreiem Pyridin gelöst. Anschließend wurden 26.1 g (93.5 mmol, 5.0 Äquiv.) Tritylchlorid zugegeben und für 72 h bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Ethanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst und mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde anschließend zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE/EE 7:2:1 v/v/v).

**Ausbeute:** 4.60 g (4.62 mmol, 25 %) eines farblosen Öls. **Mol-**  
**masse:** 994.21 g/mol **Summenformel:** C<sub>67</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE/EE 7:2:1 v/v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.94 (s, 1H, H-8), 7.89 (s, 1H, H-2), 7.43-7.07 (m, 46H, Trityl-H, -NH), 6.34 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-1'), 5.16 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, H-3'), 4.08-4.06 (m, 1H, H-2'), 3.28 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, H-5'a), 3.02 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, H-5'b), 2.88 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.6 Hz, H-4'), 2.29-2.26 (m, 1H, -OH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.2 (C-2), 152.5 (C-4), 149.4 (C-6), 145.2, 143.6, 143.3 (9xTrityl-Ar-C<sub>q</sub>), 139.5 (C-8), 129.2, 128.8, 128.4, 128.2, 127.9, 127.7, 127.5, 127.3, 127.1 (Trityl-Ar-C, C-5), 87.9, 87.2 (Ar-C<sub>q</sub>), 86.5 (C-1'), 84.4 (C-4'), 71.5 (Ar-C<sub>q</sub>), 70.8 (C-2'), 64.0 (C-3'), 60.5 (C-5'),

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3319, 2920, 1738, 1602, 1471, 1331, 1073, 1031, 896, 748, 696, 632.

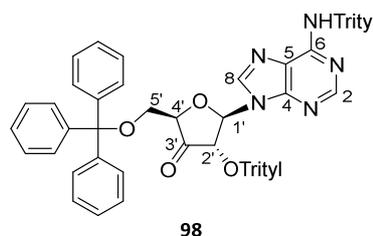
**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>67</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 994.4332, gefunden: 994.3627.

### 7.11.4 Synthese von 3'-Desoxy-3'-oxo-*N*-(triphenylmethyl)-2',5'-bis-*O*-(triphenylmethyl)-adenosin **98**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 9.50 g (9.56 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(Triphenylmethyl)-2',5'-di-*O*-(triphenylmethyl)-adenosin **97** in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 12.2 g (28.7 mmol, 3.0 Äquiv.) Dess-Martin-Periodinan **xx** gelöst in 40 mL wasserfreiem Dichlormethan langsam zugegeben und für 4 h bei 0 °C gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde eine ges. Lösung aus  $\text{NaHCO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  zugegeben. Die organische Phase wurde anschließend einmal mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und einmal mit ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$  8:2 v/v).

**Ausbeute:** 8.76 g (8.83 mmol, 92 %) eines farblosen Öls. **Mol-**  
**masse:** 992.19 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{67}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_4$



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.27 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$  8:2 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.73 (s, 1H, H-8), 7.40-6.88 (m, 47H, H-2, Trityl-H, -NH), 5.86 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.0$  Hz, H-1'), 5.44 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.0$  Hz, H-2'), 4.41-4.38 (m, 1H, H-4'), 3.39 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, H-5'a), 3.26 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HH}} = 10.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 2.4$  Hz, H-5'b).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 208.2 (C-3'), 153.9 (C-2), 152.1 (C-4), 148.1 (C-6), 145.1, 143.5, 143.4 (9xTrityl-Ar-C<sub>q</sub>), 138.9 (C-8), 129.2, 129.0, 128.8, 128.7, 128.1, 127.8, 127.1 (Trityl-Ar-C), 121.1 (C-5), 89.4, 87.3 (Ar-C<sub>q</sub>), 85.7 (C-1'), 81.3 (C-4'), 76.1 (C-2'), 71.4 (Ar-C<sub>q</sub>), 64.0 (C-3'), 60.5 (C-5'),

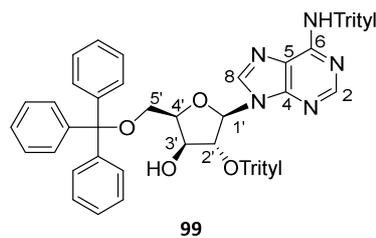
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3056, 2923, 1601, 1489, 1222, 1073, 1032, 904, 767, 731, 629.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{67}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_4$  [M+H]<sup>+</sup> 992.4176, gefunden: 992.4215.

### 7.11.5 Synthese von *N*-(Triphenylmethyl)-2',5'-di-*O*-(triphenylmethyl)- $\beta$ -D-xylo-adenosin **99**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 4.30 g (4.33 mmol, 1.0 Äquiv.) 3'-Desoxy-3'-oxo-*N*-(triphenylmethyl)-2',5'-bis-*O*-(triphenylmethyl)-adenosin **98** in 15 mL abs. Acetonitril und 5 mL Essigsäure gelöst. Anschließend wurden 1.10 g (5.20 mmol, 1.2 Äquiv.)  $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$  zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. zugegeben. Die wässrige Phase wurde anschließend zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Chromabond aufrotiert und säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{PE}/\text{EE}$  4:1 v/v).

**Ausbeute:** 2.21 g (2.22 mmol, 51 %) eines farblosen Öls. **Mol-**  
**masse:** 994.21 g/mol **Summenformel:** C<sub>67</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>



99

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.44 (PE/EE 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.96 (s, 1H, H-8), 7.93 (s, 1H, H-2), 7.46-7.08 (m, 46H, Trityl-H, -NH), 6.36 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, H-1'), 5.20 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.6 Hz, H-3'), 4.10-4.09 (m, 1H, H-2'), 3.31 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, H-5'a), 3.05 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, H-5'b), 2.91 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8 Hz, H-4'), 2.36 (bs, 1H, -OH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.1 (C-2), 152.4 (C-4), 149.4 (C-6), 145.2, 143.6, 143.3 (9xTrityl-Ar-C<sub>q</sub>), 139.5 (C-8), 129.1, 128.8, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.2, 127.0 (Trityl-Ar-C), 121.4 (C-5), 87.9, 87.2 (Ar-C<sub>q</sub>), 86.5 (C-1'), 84.4 (C-4'), 77.0 (C-2'), 71.5 (Ar-C<sub>q</sub>), 70.7 (C-3'), 63.9 (C-5'),

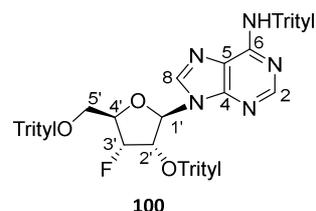
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3057, 2923, 1601, 1470, 1445, 1222, 1073, 997, 904, 697, 629.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>67</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 994.4332, gefunden: 994.4666.

### 7.11.6 Synthese von *N*-(Triphenylmethyl)-2',5'-*O*-ditrityl-3'-desoxy-3'-fluoro-β-D-xylo-adenosin 100

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.20 g (2.21 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(Triphenylmethyl)-2',5'-di-*O*-(triphenylmethyl)-β-D-xylo-adenosin **99** in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 3.57 mL (44.3 mmol, 20.0 Äquiv.) abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde anschließend auf -78 °C gekühlt und langsam 1.17 mL (8.85 mmol, 4.0 Äquiv.) DAST zugetropft. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. zugegeben und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

**Ausbeute:** 1.15 g (1.15 mmol, 52 %) einer gelblichen viskosen Flüssigkeit. **Molmasse:** 996.20 g/mol **Summenformel:** C<sub>67</sub>H<sub>54</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>



100

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.37 (PE/EE 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.63 (s, 1H, H-2), 8.62 (s, 1H, H-8), 7.42-7.03 (m, 46H, Trityl-H, -NH), 6.21 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, H-1'), 5.20-5.14 (m, 1H, H-2'), 4.23-4.12 (m, 1H, H-4'), 3.60-3.50 (m, 1H, H-3'), 3.28 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.6 Hz, H-5'a), 3.02 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, H-5'b).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.1 (C-2), 152.3 (C-4), 149.8 (C-6), 149.2, 145.2, 143.5 (9xTrityl-Ar-C<sub>q</sub>), 136.3 (C-8), 129.2, 128.8, 128.7, 128.1, 127.9, 127.5, 127.3, 127.1 (Trityl-Ar-C), 123.9 (C-5), 90.8 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 185.5 Hz, C-3'), 87.7, 87.3 (Ar-C<sub>q</sub>), 86.8 (C-1'), 82.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 23.8 Hz, C-4'), 74.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 16.7 Hz, C-2'), 71.5 (Ar-C<sub>q</sub>), 63.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 10.6 Hz, C-5').

**<sup>19</sup>F-NMR:** (565 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -192.24

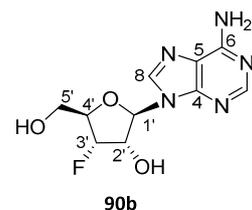
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2954, 2920, 2851, 1660, 1489, 1467, 1375, 1226, 1079, 972, 733, 697, 630.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>67</sub>H<sub>55</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 996.4289, gefunden: 996.4280.

### 7.11.7 Synthese von 3'-Desoxy-3'-fluoro-β-D-xylo-adenosin 90b

Es wurden 1.10 g (1.10 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(Triphenylmethyl)-2',5'-*O*-ditrityl-3'-desoxy-3'-fluoro-β-D-xylo-adenosin **100** in 20 mL Essigsäure (80 %) suspendiert und für 16 h zum Reflux erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde auf Chromabond aufrotiert und säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**Ausbeute:** 114 mg (423 μmol, 38 %) eines farblosen Feststoffs. **Mol-**  
**masse:** 269.24 g/mol **Summenformel:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.28 (s, 1H, H-2), 8.17 (s, 1H, H-8), 6.00 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, H-1'), 5.18-5.08 (m, 1H, H-2'), 5.02-4.96 (m, 1H, H-4'), 4.47-4.41 (m, 1H, H-3'), 3.88-3.86 (m, 1H, H-5'a), 3.81-3.78 (m, 1H, H-5'b).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, MeOD): δ [ppm] = 157.7 (C-6), 153.6 (C-2), 150.1 (C-4), 142.2 (C-8), 121.2 (C-5), 94.6 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 181.9 Hz, C-3'), 90.4 (C-1'), 86.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 22.2 Hz, C-4'), 74.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 16.4 Hz, C-2'), 63.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 11.6 Hz, C-5').

**<sup>19</sup>F-NMR:** (565 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -199.88

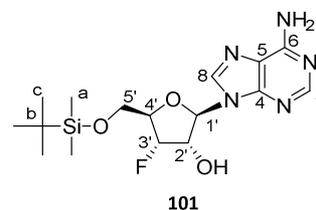
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3118, 2922, 1681, 1630, 1463, 1333, 1079, 1026, 896, 725, 593.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 270.1002, gefunden: 270.1049.

### 7.11.8 Synthese von 5'-TBDMS-3'-desoxy-3'-fluoro-β-D-xylo-adenosin **101**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 92.0 mg (342 μmol, 1.0 Äquiv.) 3'-Desoxy-3'-fluoro-β-D-xylo-adenosin **90b** in 5 mL abs. Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurde 77.3 mg (513 μmol, 1.5 Äquiv.) TBSCl zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. zugegeben und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**Ausbeute:** 140 mg (365 μmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffs. **Molmasse:** 383.50 g/mol **Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Si



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.79 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H-2), 8.12 (s, 1H, H-8), 6.04 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, H-1'), 5.21-5.11 (m, 1H, H-2'), 4.77-4.71 (m, 1H, H-4'), 4.58-4.53 (m, 1H, H-3'), 4.04-3.99 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 0.80 (s, 9H, H-c), 0.04-0.01 (m, 6H, H-a).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.8 (C-6), 151.3 (C-2), 149.4 (C-4), 139.5 (C-8), 119.9 (C-5), 93.2 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 185.1 Hz, C-3'), 89.2 (C-1'), 85.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 22.4 Hz, C-4'), 76.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 16.2 Hz, C-2'), 62.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 11.5 Hz, C-5'), 25.8 (C-c), 18.3 (C-b), -5.4, -5.5 (C-a).

**<sup>19</sup>F-NMR:** (565 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -78.4

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3434, 3338, 2952, 2855, 1690, 1636, 1580, 1469, 1419, 1241, 1090, 1029, 829, 782, 634, 488.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 384.1867, gefunden: 384.1906.

### 7.11.9 Synthese von 3'-Desoxy-3'-fluoro-β-D-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-phosphat **102**

Die Reaktion wurde analog zur AAV 6 durchgeführt. Es wurden 130 mg (339 μmol, 1.0 Äquiv.) 5'-TBDMS-3'-desoxy-3'-fluoro-β-D-xylo-adenosin **101**, 280 mg (407 μmol, 1.2 Äquiv.) des geschützten Amidits **79** und 148 mg (678 μmol, 2.0 Äquiv.) Imidazoliumtriflat **227** eingesetzt. Zur

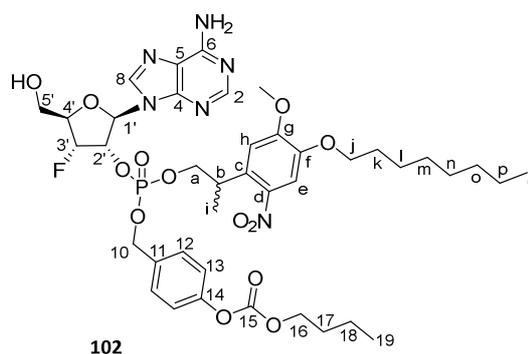
Oxidation wurden 18.8  $\mu\text{L}$  (393  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) *tert*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) zu der Lösung hinzugefügt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v). Das Zwischenprodukt wurde anschließend in 5.00 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und 164  $\mu\text{L}$  (1.01 mmol, 5.0 Äquiv.) TREAT-HF langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde Kieselgel zugegeben und das Lösungsmittel daraufhin im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

**Ausbeute:** 110 mg (126  $\mu\text{mol}$ , 37 %) einer gelblichen viskosen Flüssigkeit, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.87:0.63:0.72:1.

**Molmasse:** 876.87 g/mol **Summenformel:**

$\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{FN}_6\text{O}_{13}\text{P}$

Aufgrund der Komplexizität der Spektren des Diastereomerenmischungs war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet werden.



**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.36 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (600 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 9.01-8.95 (m, 1H, H-2), 8.20-8.10 (m, 1H, H-8), 7.60-7.59 (m, 2H, H-12), 7.44-7.37 (m, 1H, H-e), 7.32-7.31 (m, 2H, H-13), 7.21-6.90 (m, 3H, H-h, -NH<sub>2</sub>), 6.34-6.24 (m, 1H, H-1'), 5.89 (s, 2H, H-10), 5.50-5.32 (m, 1H, H-2'), 4.35-4.23 (m, 5H, H-a, H-16, H-4'), 4.02-3.87 (m, 6H, H-j, H-3', -OCH<sub>3</sub>), 3.65-3.43 (m, 3H, H-5'a, H-5'b, H-b), 1.83-1.77 (m, 2H, H-k), 1.75-1.71 (m, 2H, H-17), 1.49-1.28 (m, 15H, H-18, H-i, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p), 1.01-0.98 (m, 3H, H-19), 0.94-0.90 (m, 3H, H-q).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -3.00, -3.09, -3.11, -3.18

**$^{19}\text{F}$ -NMR:** (565 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -76.94

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3187, 2928, 1760, 1513, 1464, 1248, 1211, 1064, 1010, 869, 522.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{FN}_6\text{O}_{13}\text{P}$  [M+H]<sup>+</sup> 877.3549, gefunden: 877.3527.

### 7.11.10 Synthese von 5'-O-Phosphat-3'-desoxy-3'-fluoro-β-D-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-phosphat **103**

Nach AAV 8 wurden 39.0 mg (44.6 μmol, 1.0 Äquiv.) 3'-Desoxy-3'-fluoro-β-D-adenosin-2'-4-(Hydroxymethyl)phenylbutylcarbonat-2-(5-Methoxy-2-nitro-4-(octyloxy)phenyl)propan-1-ol-phosphat **102** mit 24.4 μL (268 μmol, 6.0 Äquiv.) POCl<sub>3</sub> in 2 mL wasserfreiem Trimethylphosphat umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 23.6 mg (22.3 μmol, 50 %) eines gelblichen Feststoffs, als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis 0.80:0.69:0.84:1.

1058.04 g/mol

**Molmasse:**

**Summenformel:**

C<sub>46</sub>H<sub>70</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub>

Aufgrund der Komplexizität der Spektren

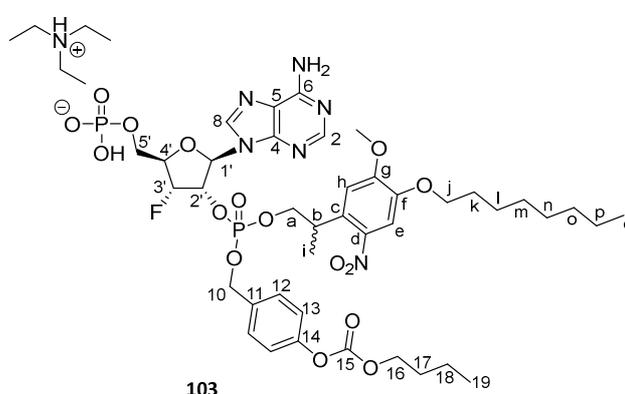
des Diastereomenrengemisches war es nicht möglich, jedes Signal exakt zuzuordnen, daher wurden die Signale nur den jeweiligen Atomen zugeordnet und nicht den jeweiligen Diastereomeren. Die verschiedenen Signale der Diastereomere konnten im <sup>31</sup>P-NMR und <sup>1</sup>H-NMR beobachtet werden.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 9.00-8.93 (m, 1H, H-2), 8.16-8.07 (m, 1H, H-8), 7.59-7.57 (m, 2H, H-12), 7.42-7.35 (m, 1H, H-e), 7.31-7.28 (m, 2H, H-13), 7.17-6.89 (m, 3H, H-h, -NH<sub>2</sub>), 6.32-6.23 (m, 1H, H-1'), 5.87 (s, 2H, H-10), 5.45-5.18 (m, 2H, H-a), 4.76-4.60 (m, 1H, H-2'), 4.33-4.21 (m, 3H, H-a, H-16, H-4'), 4.00-3.80 (m, 6H, H-j, H-3', -OCH<sub>3</sub>), 3.68-3.47 (m, 3H, H-5'a, H-5'b, H-b), 3.13-3.05 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-Et<sub>3</sub>N), 1.82-1.68 (m, 4H, H-k, H-17), 1.49-1.24 (m, 24H, H-18, H-i, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, CH<sub>3</sub>-Et<sub>3</sub>N), 1.00-0.88 (m, 6H, H-19, H-q).

**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1.64 (P-5'), -3.00, -3.09, -3.18, -3.22 (P-2').

**<sup>19</sup>F-NMR:** (565 MHz, MeOD): δ [ppm] = -80.83, -82.48

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2930, 2859, 1758, 1692, 1506, 1462, 1251, 1218, 1069, 1027, 947, 819, 819, 501.



**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{40}H_{54}FN_6O_{16}P_2^- [M-C_6H_{16}N]^-$  955.3061, gefunden: 955.2831.

## 7.12 Synthese der NAADP-Derivate

### 7.12.1 Synthese von 3'-*o*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-ProBAADP 218

Die Reaktion wurde analog zur AAV 17 durchgeführt. Es wurden 50.5  $\mu$ L (363  $\mu$ mol, 10.0 Äquiv.) TFAA, 80.4  $\mu$ L (580  $\mu$ mol, 16.0 Äquiv.)  $Et_3N$  und 24.8 mg (36.3  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) [(Ribofuranosyl)-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl-benzoessäure)]-5'-phosphat **175** zur Aktivierung eingesetzt. Anschließend wurde zur Kupplung 17.4  $\mu$ L (218  $\mu$ mol, 6.0 Äquiv.) NMI, 50.2  $\mu$ L (363  $\mu$ mol, 10.0 Äquiv.)  $Et_3N$ , sowie 44.0 mg (32.6  $\mu$ mol, 0.9 Äquiv.) 5'-*O*-Phosphat-3'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat **32** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 43.1 mg (165  $\mu$ mol, 57 %) eines farblosen Harzes. **Molmasse:** 1863.17 g/mol **Summenformel:**  $C_{87}H_{138}N_7O_{27}P_3Si_2$

**$^1H$ -NMR:** (500 MHz, MeOD):  $\delta$

[ppm] = 8.76 (s, 1H, H-2''), 8.13 (s,

1H, H-8''), 8.05 (s, 1H, H-b), 7.93

(d, 1H,  $^3J_{HH} = 7.8$  Hz, H-d), 7.79 (d,

1H,  $^3J_{HH} = 7.5$  Hz, H-f), 7.52-7.50 (m, 2H, H-j), 7.45 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 7.8$  Hz, H-e), 7.21-7.19 (m, 2H,

H-k), 7.12-7.07 (m, 4H, H-c'), 6.99-6.96 (m, 4H, H-d'), 6.43 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 7.3$  Hz, H-1'), 5.57-

5.53 (m, 1H, H-2'), 5.36 (s, 2H, H-h), 4.96 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 4.4$  Hz, H-1), 4.83-4.70 (m, 4H, H-a'),

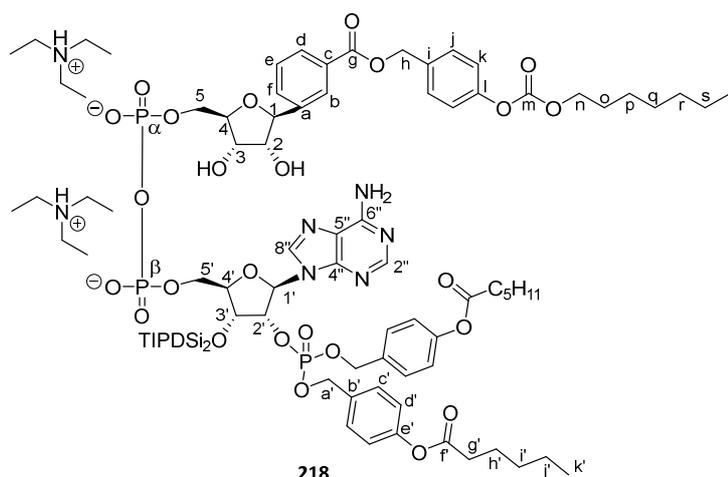
4.66-4.59 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.46-4.44 (m, 1H, H-2), 4.38-4.26 (m, 3H, H-3, H-5'a, H-5'b),

4.23 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 6.7$  Hz, H-n), 4.19-4.15 (m, 2H, H-5a, H-5b), 3.96-3.94 (m, 1H, H-4), 3.18 (q,

12H,  $^3J_{HH} = 7.3$  Hz,  $Et_3N-CH_2$ ), 2.57 (t, 4H,  $^3J_{HH} = 7.4$  Hz, H-g'), 1.76-1.70 (m, 6H, H-h', H-o),

1.44-1.32 (m, 16H, H-i', H-j', H-p, H-q, H-r, H-s), 1.29 (t, 18H,  $^3J_{HH} = 7.2$  Hz,  $Et_3N-CH_3$ ), 1.12-

1.04 (m, 28H,  $CH_3(iPr)$ ,  $CH(iPr)$ ), 0.96-0.92 (m, 9H, H-f, H-k').



**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -1.16 (P-2'), -9.98 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}} = 20.6$  Hz, P-5' $\alpha$ ), -10.40 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}} = 20.6$  Hz, P-5' $\beta$ ).

**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3383, 2998, 2491, 1643, 1454, 1342, 1168, 803, 779, 684, 584, 528, 482, 442.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{75}\text{H}_{107}\text{N}_5\text{O}_{27}\text{P}_3\text{Si}_2$   $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{30}\text{N}_2]^-$  1658.5910, gefunden: 1658.5775.

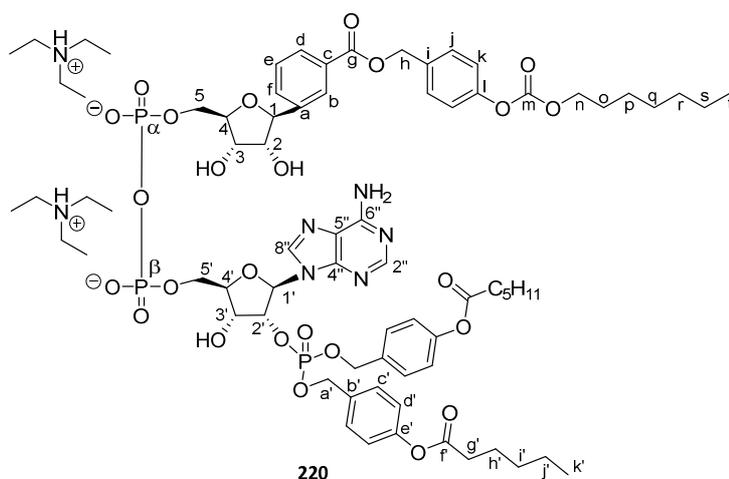
### 7.12.2 Synthese von ProBAADP 220

Die Reaktion wurde analog zur AAV 18 durchgeführt. Es wurden 40.0 mg (21.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3'-o-(1,1,3,3-TETRAISOPROPYLDISILOXAN-1,3-DIYL)-adenosin-ProBAADP **218**, 12.0 mg (42.9  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) TASF und 1.55  $\mu\text{L}$  (85.8  $\mu\text{mol}$ , 4.0 Äquiv.)  $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 21.0 mg (13.1  $\mu\text{mol}$ , 62 %) eines farblosen Feststoffes.

**Molmasse:** 1602.65 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{75}\text{H}_{110}\text{N}_7\text{O}_{25}\text{P}_3$

**$^1\text{H}$ -NMR:** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.44 (s, 1H, H-2''), 8.10 (s, 1H, H-8''), 8.04 (s, 1H, H-b), 7.92 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-d), 7.77 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2$  Hz, H-f), 7.51-7.49 (m, 2H, H-j), 7.44 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, H-e), 7.20-7.18 (m, 2H, H-k), 7.04-7.02 (m, 4H, H-c'), 6.93-6.92 (m, 4H, H-d'), 6.21 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5.3$  Hz, H-1'), 5.35 (s, 2H, H-h), 5.24-5.21 (m, 1H, H-2'), 4.89 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 4.9$  Hz, H-1), 4.78-4.75 (m, 4H, H-a'), 4.65-4.60 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.47-4.45 (m, 1H, H-2), 4.29-4.26 (m, 3H, H-3, H-5'a, H-5'b), 4.22 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.5$  Hz, H-n), 4.18-4.13 (m, 2H, H-5a, H-5b), 3.93-3.91 (m, 1H, H-4), 3.13 (q, 12H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_2$ ), 2.54 (t, 4H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, H-g'), 1.74-1.69 (m, 6H, H-h', H-o), 1.43-1.31 (m, 16H, H-i', H-j', H-p, H-q, H-r, H-s), 1.26 (t, 18H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_3$ ), 0.95-0.89 (m, 9H, H-f, H-k').



**<sup>31</sup>P-NMR:** (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = -0.57 (P-5'), -11.13 (d,  $^{2,2}J_{PP}$  = 20.4 Hz, P-5' $\alpha$ ), -11.37 (d,  $^{2,2}J_{PP}$  = 20.3 Hz, P-5' $\beta$ ).

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>50</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>23</sub>P<sub>3</sub><sup>-</sup> [M-C<sub>25</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 1194.3132, gefunden: 1194.1374.

### 7.12.3 Synthese von 3'-*o*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-ProBADP 219

Die Reaktion wurde analog zur AAV 17 durchgeführt. Es wurden 59.9  $\mu$ L (431  $\mu$ mol, 10.0 Äquiv.) TFAA, 95.5  $\mu$ L (689  $\mu$ mol, 16.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N und 29.4 mg (43.1  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) [(Ribofuranosyl)-1-(4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl-benzamid]-5-monophosphat **182** zur Aktivierung eingesetzt. Anschließend wurde zur Kupplung 20.6  $\mu$ L (258  $\mu$ mol, 6.0 Äquiv.) NMI, 59.7  $\mu$ L (431  $\mu$ mol, 10.0 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N, sowie 42.0 mg (38.8  $\mu$ mol, 0.9 Äquiv.) 5'-*O*-Phosphat-3'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-Diyl)-adenosin-2'-Bis(4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat)-2'-phosphat **32** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 51.3 mg (27.6  $\mu$ mol, 64 %) eines farblosen Harzes. **Molmasse:** 1862.19 g/mol **Summenformel:** C<sub>87</sub>H<sub>139</sub>N<sub>8</sub>O<sub>26</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, MeOD):  $\delta$

[ppm] = 8.76 (s, 1H, H-2''), 8.15 (s, 1H, H-8''), 8.10 (s, 1H, H-b), 7.80

(d, 1H,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, H-d), 7.63 (d,

1H,  $^3J_{HH}$  = 7.8 Hz, H-f), 7.46-7.41 (m, 3H, H-j, H-e), 7.13-7.09 (m, 6H, H-k, H-c'), 7.01-6.98 (m,

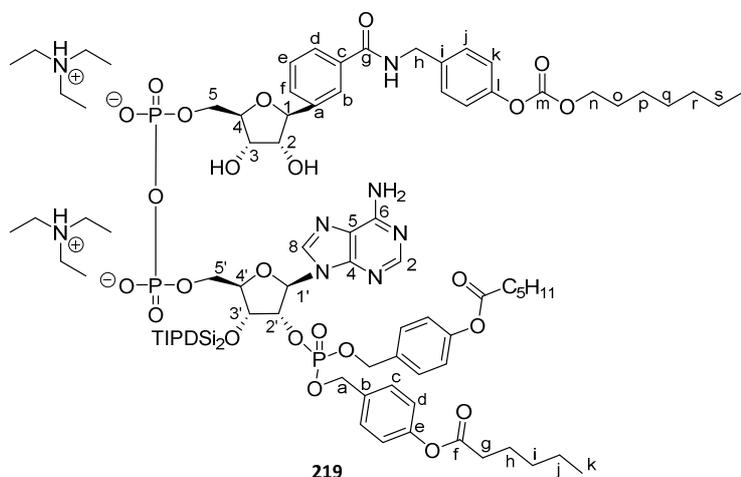
6H, H-d', -NH<sub>2</sub>), 6.42 (d, 1H,  $^3J_{HH}$  = 6.9 Hz, H-1'), 5.60-5.55 (m, 1H, H-2'), 4.96 (d, 1H,  $^3J_{HH}$  =

5.5 Hz, H-1), 4.84-4.73 (m, 4H, H-a'), 4.67-4.64 (m, 1H, H-3'), 4.60 (s, 2H, H-h), 4.46-4.44 (m,

1H, H-2), 4.37-4.29 (m, 4H, H-3, H-4', H-5'a, H-5'b), 4.21 (t, 2H,  $^3J_{HH}$  = 6.7 Hz, H-n), 4.20-4.19

(m, 2H, H-5a, H-5b), 4.06-4.03 (m, 1H, H-4), 3.15 (q, 12H,  $^3J_{HH}$  = 6.7 Hz, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.59 (t, 4H,

$^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, H-g'), 1.80-1.69 (m, 6H, H-h', H-o), 1.47-1.34 (m, 16H, H-i', H-j', H-p, H-q, H-r, H-



s), 1.27 (t, 18H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 1.17-1.06 (m, 28H,  $\text{CH}_3(i\text{Pr})$ ,  $\text{CH}(i\text{Pr})$ ), 0.99-0.92 (m, 9H, H-f, H-k').

$^{31}\text{P-NMR}$ : (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -2.42 (P-2'), -10.77 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}} = 18.1$  Hz, P-5' $\alpha$ ), -11.42 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}} = 22.4$  Hz, P-5' $\beta$ ).

**HRMS-ESI**: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{75}\text{H}_{108}\text{N}_6\text{O}_{26}\text{P}_3\text{Si}_2$   $[\text{M-H-C}_{12}\text{H}_{30}\text{N}_2]^-$  1657.6070, gefunden: 1657.5805.

#### 7.12.4 Synthese von ProBADP 221

Die Reaktion wurde analog zur AAV 18 durchgeführt. Es wurden 49.6 mg (26.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) 3'-o-(1,1,3,3-TETRAISOPROPYLDISILOXAN-1,3-DIYL)-adenosin-ProBADP **219**, 14.7 mg (53.3  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) TASF und 1.92  $\mu\text{L}$  (107  $\mu\text{mol}$ , 4.0 Äquiv.)  $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** 23.5 mg (14.6  $\mu\text{mol}$ , 55 %) eines farblosen Feststoffes.

**Molmasse:** 1601.67 g/mol **Summenformel:**  $\text{C}_{75}\text{H}_{111}\text{N}_8\text{O}_{24}\text{P}_3$

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz, MeOD):  $\delta$

[ppm] = 8.63 (s, 1H, H-2''), 8.14 (s,

1H, H-8''), 8.02 (s, 1H, H-b), 7.72

(d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, H-d), 7.55 (d,

1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, H-f), 7.38-7.34 (m, 3H, H-j, H-e), 7.06-7.04 (m, 6H, H-k, H-c'), 6.90-6.88 (m,

4H, H-d'), 6.11 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, H-1'), 5.17-5.16 (m, 1H, H-2'), 4.94 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2$  Hz, H-

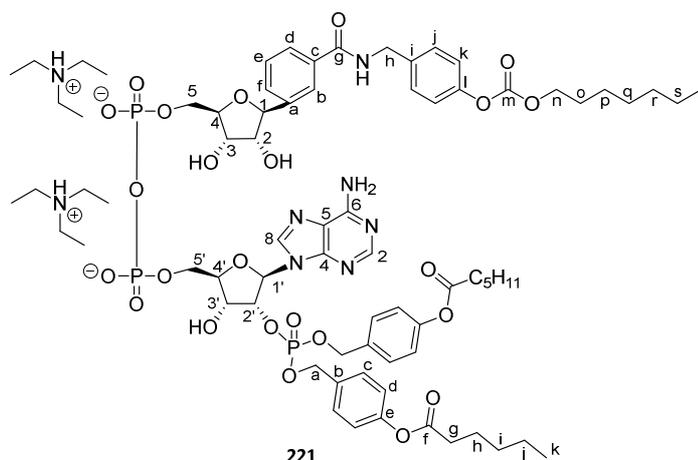
1), 4.72-4.70 (m, 4H, H-a'), 4.60-4.58 (m, 1H, H-3'), 4.53 (s, 2H, H-h), 4.43-4.40 (m, 1H, H-2),

4.27-4.20 (m, 4H, H-3, H-4', H-5'a, H-5'b), 4.15 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, H-n), 4.12-4.06 (m, 2H, H-

5a, H-5b), 3.98-3.96 (m, 1H, H-4), 3.08 (q, 12H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.50 (t, 4H,  $^3J_{\text{HH}} =$

7.2 Hz, H-g'), 1.69-1.63 (m, 6H, H-h', H-o), 1.36-1.24 (m, 16H, H-i', H-j', H-p, H-q, H-r, H-s),

1.21 (t, 18H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 0.91-0.84 (m, 9H, H-f, H-k').



**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -2.42 (P-2'), -10.80 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}}$  = 17.8 Hz, P-5'α), -11.42 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}}$  = 21.8 Hz, P-5'β).

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_{22}\text{P}_3$   $[\text{M}-\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_2]^-$  1193.3292, gefunden: 1193.2786.

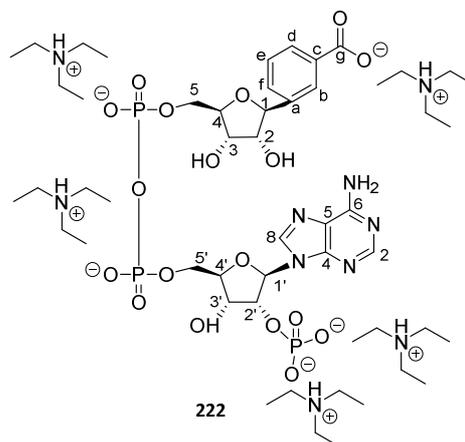
### 7.12.5 Synthese von BAADP 222

Es wurden 5.00 mg (3.12  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) ProBAADP **220** in 1 mL PBS-Puffer gelöst. Zu der Lösung wurde 100  $\mu\text{L}$  PLE-Lösung (100 U/mL in PBS, pH 7.3) zugegeben. Die Reaktion wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend das Rohprodukt säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und abschließend lyophilisiert.

**Ausbeute:** <1.00 mg (165  $\mu\text{mol}$ ,  $\approx 5\%$ ) eines farblosen Feststoffes. **Molmasse:** 1249.37 g/mol **Summenformel:**

$\text{C}_{52}\text{H}_{103}\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{P}_3$

*Anmerkung:* Aufgrund der geringen Menge des Produktes erfolgte lediglich eine Auswertung der  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren.



**$^1\text{H}$ -NMR:** (500 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 8.59 (s, 1H, H-2''), 8.53 (s, 1H, H-8''), 8.13 (s, 1H, H-b), 8.00 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 5.6 Hz,  $-\text{NH}_2$ ), 7.86 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8.1 Hz, H-d), 7.69 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8.1 Hz, H-f), 7.39 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 7.5 Hz, H-e), 6.09 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6.9 Hz, H-1'), 5.11-5.09 (m, 1H, H-2'), 4.97 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 4.5 Hz, H-1), 4.65-4.55 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.43-4.41 (m, 1H, H-2), 4.26-4.20 (m, 3H, H-3, H-5'a, H-5'b), 4.16-4.04 (m, 2H, H-5a, H-5b), 3.92-3.88 (m, 1H, H-4), 3.13 (q, 90H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 7.5 Hz,  $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_2$ ), 1.25 (t, 135H,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6.3 Hz,  $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P}$ -NMR:** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -2.47 (P-2'), -10.84 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}}$  = 21.8 Hz, P-5'α), -11.35 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}}$  = 21.2 Hz, P-5'β).



**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{65}H_{82}FN_5O_{24}P_3 [M-H-C_{12}H_{30}N_2]^-$  1428.4552 gefunden:  
1428.2814.

### 7.13 Hydrolysestudien

#### Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeit

Für die Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten wurden die Integrale der jeweiligen Signale, welche mittels HPLC aufgenommen wurden, gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Mithilfe des Kalkulationsprogramms OriginPro 2019 und der Annahme, dass die Reaktion nach einer pseudo-erster Ordnung verläuft, wurden exponentielle Ausgleichskurven ermittelt. Die Exponentialfunktion wird wie folgt beschrieben:

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

$[A]_t$  = Konzentration zum Zeitpunkt  $t$

$[A]_0$  = Anfangskonzentration

$k$  = Geschwindigkeitskonstante

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

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

#### Chemische Hydrolysestudien in Phosphatpuffer bei pH 7.3

Für die chemischen Hydrolysestudien wurde zunächst eine 25 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung in DMSO oder Wasser hergestellt. Von dieser Stammlösung wurde 22  $\mu\text{L}$  zu einer Lösung aus 300  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer, 189  $\mu\text{L}$  Wasser und 89  $\mu\text{L}$  DMSO gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Thermomixer ohne internen Standard. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 35  $\mu\text{L}$  Hydrolysealiquote entnommen und mit RP-HPLC analysiert, wobei 30  $\mu\text{L}$  injiziert wurden (Methode: A oder B).

#### Enzymatische Hydrolysestudien mit PLE bei pH 7.3

Für die enzymatischen Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase wurde zunächst eine 6 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung in DMSO oder Wasser hergestellt. Von dieser Stammlösung wurde 140  $\mu\text{L}$  zu einer Lösung aus 52.5  $\mu\text{L}$  PLE-Lösung (100 U/mL in PBS, pH 7.3),

700  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer und 105  $\mu\text{L}$  DMSO gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Thermomixer ohne internen Standard. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 105  $\mu\text{L}$  Hydrolysealiquote entnommen und mit 132.5  $\mu\text{L}$  Methanol versetzt. Die Lösung wurde für 5 Minuten auf Eis gelagert und anschließend 5 Minuten zentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde filtriert (Chromafil® AO-20/3, 0.2  $\mu\text{m}$ ) und bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Analyse erfolgte mit RP-HPLC, wobei 50-90  $\mu\text{L}$  injiziert wurden (Methode: A oder B).

### Photolytische Studien in Phosphatpuffer bei pH 7.3

Für die photolytischen Studien wurde zunächst eine Lösung der jeweiligen Verbindung in 3 mL Phosphatpuffer oder 3 mL Phosphatpuffer:Acetonitril (9:1) hergestellt (1 mg/mL). Anschließend wurde die Lösung unter Rühren entweder mit zwei 30 W UV-Röhren oder mit drei 1.3 W Hochleistungs-LEDs (365 nm) bestrahlt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 100  $\mu\text{L}$  Aliquote entnommen und filtriert (Chromafil® AO-20/3, 0.2  $\mu\text{m}$ ). Die Analyse erfolgte mit RP-HPLC, wobei 50-90  $\mu\text{L}$  injiziert wurden (Methode: B).

### **7.14 Ca<sup>2+</sup>-Imaging**

Das Ca<sup>2+</sup>-Imaging wurde von der Arbeitsgruppe A.Guse am Universitätsklinikum Eppendorf, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie vorgenommen. Es wurden 10<sup>7</sup> T-Lymphozyten in einer Dichte von 0.8 – 1.2·10<sup>6</sup> Zellen/mL bei 450 xg für 5 min (Jurkat) oder bei 300 xg für 8 min (TMBP) bei Raumtemperatur pelletiert und in 1 mL entweder Standard-JMP-Medium (Jurkat) oder Standard-Medium auf DMEM-Basis mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (v/v) (TMBP) resuspendiert. Ruhende TMBP-Zellen (Tag 5 – 7 nach der Restimulation) wurden nach der zweiten bis fünften Restimulation 12 – 40 h vor der Fura2-Zugabe aus flüssigem Stickstoff aufgetaut. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37 °C wurden die Zellen mit 4  $\mu\text{M}$  Fura2-AM für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Farbstoffs wurden die Zellen im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden die Zellen und der Farbstoff durch Zugabe von 4 mL Standardmedium verdünnt und für weitere 15 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in Ca<sup>2+</sup>-Puffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 5.5 mM Glucose; pH 7.4) gewaschen und auf eine Konzentration von 2·10<sup>6</sup> Zellen/mL verdünnt. Anschließend wurden die Zellen vor Beginn der ersten Messung für 20 min bei Raumtemperatur zur Esterverseifung gehalten. Fura2 wurde abwechselnd alle 2 s bei 340±5 nm und

380±5 nm im Abstand von jeweils 400 ms angeregt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Emissionswellenlänge von 520±5 nm für beide Anregungswellenlängen gemessen.

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

In Tabelle 8 sind alle Verbindungen und Lösungsmittel aufgelistet, mit denen während der Promotion umgegangen wurde. Die Stoffe sind mit den jeweiligen H- und P-Sätzen, sowie den Gefahrensymbolen gekennzeichnet.

**Tab.8:** Verwendete Verbindungen und Lösungsmittel.<sup>301,302</sup>

<b>Substanz</b>	<b>Gefahren- symbol</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>
<b>Aceton</b>	02, 07	225-319- 336- EUH066	210-233- 305+351+338
<b>Acetonitril</b>	02, 07	225- 302+312+ 332-319	210-305+351+338- 403+235
<b>Acetovanillon</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>Acetylchlorid</b>	02, 05	225-314 EUH014	210-280- 301+330+331- 305+351+338- 309+310
<b>Adenosin</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>AD-mix-alpha</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>AD-mix-beta</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Alkylfluor</b>	05	314	260-280- 301+330+331+310- 303+361+353+310+3 63-304+340+310- 305+351+338+310
<b>Ameisensäure</b>	02, 05, 06	226-302- 314-331 EUH071	210-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338- 403+233
<b>2-Amino-2-methylpropanol</b>	05	315-318- 412	273-280- 305+351+338
<b>Ammoniak 7 M in Methanol</b>	02, 05, 06, 08	225-301- 311-314- 331-370	210-260-280- 301+310- 305+351+338-310
<b>Ammoniumchlorid</b>	07	302-319	305+351+338
<b>Ammoniumsulfat</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Anisaldehyddimethylacetal</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>(1S)-(+)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en- 3-one</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>Benzoylchlorid</b>	05, 06	302-312- 314-317- 331	280-301+330+331- 303+361+353- 304+340- 305+351+338-310

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Benzylbromid</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>Benzyltrimethylammoniumhydroxid (40 Gew. % in Methanol)</b>	02, 05, 06, 08	225- 301+311+ 331-314- 370	210-260-280- 301+310- 305+351+338-310
<b>Bis(diisopropylamino)chlorophosphin</b>	05	314	280-305+351+338- 310
<b>1,8-Bis(N,N-dimethylamino)naphthalin</b>	07	315-319- 335	305+351+338
<b>Bis(pinacolato)diboron</b>	07	302+312+ 332-315- 319	261-270-280- 302+352+312+362+3 64-304+340+312- 305+351+338+337+3 13
<b>N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid</b>	02, 05, 07	226-302- 314	280-305+351+338- 310
<b>Bortrichlorid (1 M in Dichlormethan)</b>	02, 05, 06, 08, 09	225-300- 304-314- 331-336- 361f-373- 411	210-280-301+310- 301+310+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338-331- 403+233
<b>Bortrifluoriddiethyletherat</b>	02, 05, 07, 08	226-314- 332-372	210-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
<b>3-Brombenzoesäure</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>1-Brombutan</b>	02, 07, 09	225-315- 319-335- 411	210-273-280- 337+313-391- 403+235
<b>1-Bromdodecan</b>	07	315	264-280-302+352- 332+313-362
<b>1-Bromoctan</b>	09	410	273
<b>4-Bromthiophenol</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>tert-Butanol</b>	02, 07	225-332- 319-335	210-305+351+338- 403+233
<b>tert-Butyldimethylsilylchlorid</b>	02, 05	228-314	210-280- 305+351+338-310
<b>tert-Butylhydroperoxid 5.5 M in Decan</b>	02, 05, 06, 08, 09	226-242- 302-311- 330-314- 317-341- 411	210-280-301+312- 302+352-304+340- 305+351+338
<b>n-Butyllithium (1.6 M in Hexan)</b>	02, 05, 07, 08, 09	225-250- 260-304- 314-336- 361f-373- 411- EUH014	201-231+232-280- 305+351+338- 370+378
<b>Caesiumcarbonat</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>Caesiumfluorid</b>	05, 06	301-311- 314-331	261-280-301+310- 305+351+338-310

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
Calciumcarbonat	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
Calciumhydrid	02	260	223-231+232- 370+378-422
(1S)-(+)-(10-Camphorsulfonyl)oxa- zolidin	07	302-315- 319-335	261-301+312- 302+352-304+340- 305+351+338
Carbonyldiimidazol	05, 07	302-314	280-305+351+338- 310
Chloracetaldehyd (40 Gew. % in Was- ser)	05, 06, 08, 09	351-330- 311-301- 314-400	260-280-301-310-330 -303+361+353-304- 340-310- 305+351+338
Chlorameisensäure- <i>n</i> -butylester	02, 05, 06	226-302- 330-314- EUH071	210-280- 301+330+331- 303+361+353- 304+340+311- 305+351+338
Chloroform	07, 08	351-302- 373-315	302+352-314
Chloroform-d <sub>1</sub>	07, 08	351-302- 373-315	302+352-314
6-Chlorpurin	07	302	264-270-301+312- 330-501
5-Chlorsalicylsäure	07	315-319- 335	261-305+351+338

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b><i>N</i>-Chlorsuccinimid</b>	05, 07	302-314	280-305+351+338- 310
<b>Chlor(triethyl)silan</b>	02, 05, 07	226-302- 314- EUH014- 071	280-301+310- 305+351+338-310
<b>2,4,6-Collidin</b>	02, 06	226-302- 311-332- 315-319- 335	261-280- 305+351+338-312
<b>Diazabicycloundecen</b>	05, 06	290-301- 314-412	273-280- 301+330+331- 305+351+338
<b><i>N,N</i>-Diisopropylamin</b>	02, 05, 06	225-302- 331-314- 335	210-260-280-310- 303+361+353- 305+351+338- 403+235
<b>4-(Dimethylamino)-pyridin</b>	06	310-301- 315-319	302+352- 305+351+338
<b>Dimethylsulfat</b>	05, 06, 08	301-314- 317-330- 341-350	201-280- 301+330+331- 302+352-304+340- 305+351+338- 308+310
<b>Deuteriumoxid (D<sub>2</sub>O)</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
Dichlormethan	07, 08	315-319- 335-336- 351-373	261-281- 305+351+338
1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane	05	314	280-305+351+338- 310
4,5-Dicyanoimidazol 0.25 M in Acetonitril	05, 07	315-318- 335	261-280- 305+351+338
N,N-Dicyclohexylcarbodiimid	05, 06	302-311- 317-318	280-301+312+330- 302+352+312- 305+351+338+310
Diethylaminoschwefeltrifluorid	02, 05, 07	226-302- 312-314- 332	280-305+351+338- 310
Diethylether	02, 07	224-302- 336 EUH019- 066	210-240-403+235
N,N-Dimethylformamid	02, 07, 08	360D-226- 332-312- 319	201-302+352- 305+351+338- 308+313
Dimethylsulfoxid	Kein Gefahrstoff nach GHS		
3,4-Dimethoxyacetophenon	Kein Gefahrstoff nach GHS		
2,2-Dimethoxypropan	02, 07	225-319	210-305+351+338

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>4,4-Dimethoxytritylchlorid</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>2,4-Dinitrochlorbenzol</b>	05, 06, 08, 09	301+331- 310-315- 317-318- 373-410	261-273-280- 301+310- 305+351+338
<b>Diisobutylaluminiumhydrid (1.5 M in Toluol)</b>	02, 05	225-250- 261-314	210-222-231+232- 280-305+351+338
<b>Diisopropylethylamin</b>	02, 05, 06	225-302- 331-318- 335	210-261-280- 305+351+338-311
<b>2,2'-Dipyridyldisulfid</b>	07	315-319	264-280- 302+352+332+313+3 62+364- 305+351+338+337+3 13
<b>Di-tert-butyl dicarbonat</b>	02, 05, 06	226-330- 315-317- 318-335	210-260-280- 304+340+310- 305+351+338+310- 370+378
<b>Essigsäure</b>	02, 05	226-290- 314	210-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
<b>Essigsäureanhydrid</b>	02, 05, 06	226-302- 331-314- 335	210-260-280- 303+361+353- 305+351+338-312

8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Ethanol</b>	02	225	210
<b>Ethylacetat</b>	02, 07	225-319- 336- EUH066	210-240- 305+351+338
<b>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)car- bodiimid*HCl</b>	05	314	280-305+351+338- 310
<b>4-Ethylguajakol</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>9-Fluorenylmethanol</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>1-Heptanol</b>	07	319	280-305+351+338- 337+313
<b>Hexamethyldisilazan</b>	02, 05, 06	225-302- 311+331- 314	210-280- 301+330+331- 302+352-304+340- 305+351+338- 309+310-403+235
<b>Hexamethylphosphorsäuretriamid</b>	08	340-350	201-308+313
<b>n-Hexan</b>	02, 07, 08, 09	225-304- 361-373- 315-336- 411	210-240-273- 301+310-331- 302+352-403+235

8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
Hexansäurechlorid	05, 07	314-335- EUH014	280-310+330+331- 304+340- 305+351+338- 309+310
HF-Pyridin	05, 06	300+310+ 330-314	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
4-Hydroxybenzylalkohol	07	319	305+351+338
Imidazol	05, 07, 08	302-314- 360D	201-280- 305+351+338-310
Imidazolium triflat	07	315-319- 335	261-305+351+338
Iod	07, 08, 09	312+332- 315-319- 335-372- 400	273-302+352- 305+351+338-314
2-Iodbenzoesäure	05, 07	302-315- 318-335	261-280- 305+351+338
Kaliumacetat	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
Kalium <i>tert</i> -butanolat	02, 05, 07	228-252- 302-314 EUH014	210-223-280- 301+330+331- 305+351+338- 309+310-370+378- 402+404
Kaliumcarbonat	07	315-319- 335	302+352- 305+351+338

8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Kaliumhydroxid</b>	05, 07	290-302- 314	280-301+330+331- 305+351+338- 308+310
<b>Kaliumiodid</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Kieselgel</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Kupfer</b>	02, 09	228-410	210-273
<b>Kupfer(II)-sulfat</b>	07, 09	302-315- 319-410	273-302+352- 305+351+338
<b>Lithiumaluminiumhydrid</b>	02, 05	260-314- EUH014	280-301+330+331- 305+351+338- 370+378-308+310- 402+404
<b>2,6-Lutidin</b>	02, 07	226-302- 315-319	210-260-302+352- 305+351+338
<b>Methanol</b>	02, 06, 08	225- 301+311+ 331-370	210-233-240-280- 302+352-304+340- 309+310-403+235
<b>Methansulfonamid</b>	07	319-335- 315	261-280-302+352- 305+351+338
<b>1-Methylimidazol</b>	05, 06	302-311- 314	280-301+312+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
<b>1-Methylimidazolium chlorid</b>	07	302-315- 319-335	261-305+351+338

8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Methyliodid</b>	06, 08, 09	301+331- 312-315- 319-335- 351-410	273-302+352- 304+340- 305+351+338- 308+310
<b>N-Methylmorpholin-N-oxid</b>	07	315-319- 335	261-305+351+338
<b>Methyltrifluormethylsulfonat</b>	02, 05	226-314- 318	210-260-280- 303+361+353- 304+340- 305+351+338-310
<b>Methyltriphenylphosphoniumbromid</b>	07	302+312+ 332	280
<b>Natriumacetat</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Natriumborhydrid</b>	02, 05, 06	260- 301+311- 314	280-301+330+331- 302+352- 305+351+338- 309+310-402+404
<b>Natriumchlorid</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Natriumhydrid</b>	02	260	223-231+232- 370+378
<b>Natriumhydroxid</b>	05	314-290	280-301+330+331- 309+310- 305+351+338

8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Natriumhydrogencarbonat</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Natriummethanolat</b>	02, 05	251-314 EUH014	210-241- 303+361+353- 305+351+338-405- 501
<b>Natriumsulfat</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Nicotinsäure</b>	07	319	305+351+338
<b>Nicotinsäureethylester</b>	07	319	305+351+338
<b>Nitronium tetrafluoroborat</b>	05	314	280i-301+330+331- 305+351+338
<b>p-Nitrophenylphosphat</b>	05, 08	315-318- 373	280-305+351+338
<b>Octansäurechlorid</b>	05, 07	290-302- 314-335 EUH014	280-301+330+331- 304+340- 305+351+338- 308+310
<b>Orthoameisensäuretrimethylester</b>	02, 07	225-319	210-233-260-262- 305+351+338- 403+235
<b>Osmium(VIII)-oxid (4 Gew. % in Was- ser)</b>	05, 06	300+310+ 330-314	280-301+330+331- 302+352-304+340- 305+351+338- 308+310

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Oxone</b>	05, 07	302-314- 412	280-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338-310- 273
	02	228	233
<b>Palladium auf Aktivkohle</b>			
<b>[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II), complex with dichloromethane</b>	07	302+312+ 332-315- 319-335	261-280- 301+312+330- 305+351+338
<b>Paraformaldehyd</b>	02, 05, 07, 08	228- 302+332- 315-317- 318-335- 350	201-210-280- 302+352- 305+351+338
<b>Petrolether 50/70</b>	02, 08	225-304- 340-350- 361-373- 412	201-210-273-281- 301+310-308+313
<b>Phosphortrichlorid</b>	05, 06, 08	300+330- 373-314 EUH014- 029	260-280-301+310- 330-303+361+353- 304+340-310- 305+351+338- 403+233
<b>Phosphorylchlorid</b>	05, 06, 08	302-314- 330-372	260-280-284- 305+351+338-310
<b>iso-Propanol</b>	02, 07	225-319- 336	210-233- 305+351+338

8 Gefahrstoffverzeichnis

<b>Substanz</b>	<b>Gefahren- symbol</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>
<b>Pyridin</b>	02, 07	225-332- 312-302	210-233-302+352
<b>2-Pyridinesulfonylfluorid</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>D-Ribose</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>D-Ribonsäure-1,4-lacton</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Salpetersäure</b>	03, 05	272-290- 314 EUH071	280-301+330+331- 304+340- 305+351+338-310
<b>Salzsäure 1 M</b>	05, 07	314-335- 290	280-301+330+331- 309+310- 305+351+338
<b>Schwefelsäure</b>	05	290-314	280-301+330+331- 305+351+338- 309+310
<b>Seignettesalz</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Silbercarbonat</b>	05	318-410	261-273-280- 305+351+338

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Silbertrifluormethansulfonat</b>	05, 09	314-315- 319-335	305+351+338
<b>Thionylchlorid</b>	05, 06	302-331- 314-335 EUH014- 029	280-301+330+331- 304+340- 305+351+338- 309+310
<b>Tetrabutylammoniumfluorid 1 M in THF</b>	02, 05, 07, 08	225-302- 314-335- 351	210-260-280- 305+351+338- 370+378-403+235
<b>Tetrabutylammoniumiodid</b>	07	302-315- 319-335	261-305+351+338
<b>Tetrabrommethan</b>	05, 07	302-315- 318-335	261-280- 305+351+338
<b>Tetrachlormethan</b>	06, 08	301+311+ 331-317- 351-372- 412-420	261-273-280- 301+310+330- 403+233-502
<b>Tetrahydrofuran</b>	02, 07	225-319- 335- EUH019	210-233-243- 305+351+338
<b>Tetraisopropylorthotitanat</b>	02, 07	226-319- 336	280-305+351+338- 337+313-403+235
<b>Toluol</b>	02, 07, 08	225-304- 315-336- 361d-373	210-240-301+310- 331-302+352- 403+235

## 8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>p-Toluolsulfonsäurechlorid</b>	05, 07	290-315- 317-318	280-302+352- 305+351+338-313
<b>p-Toluolsulfonsäure*monohydrat</b>	07	315-319- 335	302+352-304+340- 305+351+338
<b>1,2,4-Triazol</b>	07, 08	302-319- 361d	280-305+351+338- 308+313
<b>Trichloracetonitril</b>	06, 09	301+311+ 331-411	273-280-302+352- 304+340-308+310- 501
<b>2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid</b>	05	314	280-305+351+338- 310
<b>Tributylamin</b>	06	302- 310+330- 315	260-262-280- 302+352-310- 304+340+310
<b>Triethylamin</b>	02, 05, 07	225-332- 312-302- 314-335	210-280- 301+330+331- 302+352- 305+351+338- 309+310
<b>Triethylamin*trihydrofluorid</b>	05, 06	300+310+ 330-314	260-280- 303+361+353- 301+330+331+310- 304+340+310- 305+351+338
<b>Triethylsilane</b>	02	225-412	210-273
<b>Triethylsilyltrifluormethanesulfonat</b>	05	314	280-305+351+338- 310

8 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Trifluoressigsäure</b>	05, 06	290-331- 314-412- EUH071	260-273-280- 303+361+353- 305+351+338-312
<b>Trimethylsilyltrifluormethansulfonat</b>	02, 05	226-314	280-305+351+338- 310
<b>Triphenylphosphan</b>	07, 08	302-317- 373	280-301+312+330- 333+313
<b>Triphosgen</b>	06	330	304+340-309+310
<b>Tris(dimethylamino)sulfonium difluoro- trimethylsilicat</b>	05	314	280-305+351+338- 310
<b>Tritylchlorid</b>	05, 09	314-410	280-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338-310
<b>Vanillin</b>	07	319	305+351+338
<b>Wasserstoff</b>	02, 04	220-280	210-377-381-403
<b>D-Xylose</b>	Kein Gefahr- stoff nach GHS		
<b>Zinn(IV)-chlorid</b>	05, 07	314-335- 412	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
<b>Zink(II)-chlorid</b>	05, 07, 09	302-314- 410	273-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310

Tab.9: GHS-Symbole

01	02	03	04	05	06	07	08	09
								

**9 Literaturverzeichnis**

- (1) Löffler G.; Petrides P.E.; H. P. C. *Kommunikation Zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle*; Springer, **2007**.
- (2) Heinrich, Peter C.; Mueller, Matthias; Graeve, L. *Löffler/Petrides Biochemie Und Pathobiochemie*; Springer, **2014**.
- (3) Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1* (1), 11–21.
- (4) Ozil, J. P.; Swann, K. Stimulation of Repetitive Calcium Transients in Mouse Eggs. *J. Physiol.* **1995**, *483* (2), 331–346.
- (5) Berridge, M. J. Calcium Signalling and Cell Proliferation. *BioEssays* **1995**, *17* (6), 491–500.
- (6) MS Perin; VA Fried; GA Mignery; R Jahn, T. S. Phospholipid Binding by a Synaptic Vesicle Protein Homologous to the Regulatory Region of Protein Kinase C. *Nature* **1990**, No. 345, 260.
- (7) Müller-Esterl, W. *Biochemie - Eine Einführung Für Mediziner Und Naturwissenschaftler*; Spektrum Akademischer Verlag, **2011**.
- (8) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Biochemistry 5th Edition*; W. H. Freeman and Company, **2002**.
- (9) Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Roderick, H. L. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (7), 517–529.
- (10) Toyoshima, C.; Nomura, H. Structural Changes in the Calcium Pump Accompanying the Dissociation of Calcium. *Nature* **2002**, *418* (6898), 605–611.
- (11) Hon Cheung Lee; Aarhus, R. A Derivative of NADP Mobilizes Calcium Stores Insensitive to Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-Ribose. *Journal of Biological Chemistry.* **1995**, pp 2152–2157.
- (12) Cancela, J. M.; Gerasimenko, O. V.; Gerasimenko, J. V.; Tepikin, A. V.; Petersen, O. H. Two Different but Converging Messenger Pathways to Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release: The Roles of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate, Cyclic ADP-Ribose and Inositol Trisphosphate. *EMBO J.* **2000**, *19* (11), 2549–2557.
- (13) Guse, A. H.; Da Silva, C. P.; Berg, I.; Skapenko, A. L.; Weber, K.; Heyer, P.; Hohenegger,

- M.; Ashamu, G. A.; Schulze-Koops, H.; Potter, B. V. L.; Mayr, G. W. Regulation of Calcium Signalling in T Lymphocytes by the Second Messenger Cyclic ADP-Ribose. *Nature* **1999**, *398* (6722), 70–73.
- (14) Gasser, A.; Bruhn, S.; Guse, A. H. Second Messenger Function of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Revealed by an Improved Enzymatic Cycling Assay. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (25), 16906–16913.
- (15) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.*; Garland Science: New York, **2002**.
- (16) Alexander, S. P. H.; Mathie, A.; Peters, J. A. Guide to Receptors and Channels, 2nd Edition (2007 Revision). *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150* (SUPPL.1), S1.
- (17) Bjarnadóttir, T. K.; Gloriam, D. E.; Hellstrand, S. H.; Kristiansson, H.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. Comprehensive Repertoire and Phylogenetic Analysis of the G Protein-Coupled Receptors in Human and Mouse. *Genomics* **2006**, *88* (3), 263–273.
- (18) Hilger, D.; Masureel, M.; Kobilka, B. K. Structure and Dynamics of GPCR Signaling Complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25* (1), 4–12.
- (19) Kenzie, A. B. M. A. C.; Surprenant, A.; North, R. A.; Physiology, M.; Building, A. D. Functional and Molecular Diversity Of. *Ann. new york Acad. Sci.* **1999**, 19–25.
- (20) Melzer, N.; Hicking, G.; Göbel, K.; Wiendl, H. TRPM2 Cation Channels Modulate T Cell Effector Functions and Contribute to Autoimmune CNS Inflammation. *PLoS One* **2012**, *7* (10), 1–6.
- (21) Krauss, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2001**.
- (22) Clapham, D. E. Calcium Signaling. *Cell* **2007**, *131* (6), 1047–1058.
- (23) McCleskey, E. W. Calcium Channels: Cellular Roles and Molecular Mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1994**, *4* (3), 304–312.
- (24) Clapham, D. E. Calcium Signaling. *Cell* **1995**, *80* (2), 259–268.
- (25) Randriamampita, C.; Tsien, R. Y. Degradation of a Calcium Influx Factor (CIF) Can Be Blocked by Phosphatase Inhibitors or Chelation of Ca<sup>2+</sup>. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, pp 29–32.
- (26) Clapham, D. E. Intracellular calcium. Replenishing the Stores. *Nature* **1995**, pp 634–635.

- (27) Putney, J. W. A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry. *Cell Calcium* **1986**, 7 (1), 1–12.
- (28) Liou, J.; Kim, M. L.; Won, D. H.; Jones, J. T.; Myers, J. W.; Ferrell, J. E.; Meyer, T. STIM Is a Ca<sup>2+</sup> Sensor Essential for Ca<sup>2+</sup>-Store- Depletion-Triggered Ca<sup>2+</sup> Influx. *Curr. Biol.* **2005**, 15 (13), 1235–1241.
- (29) Prakriya, M.; Feske, S.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Rao, A.; Hogan, P. G. Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the CRAC Channel. *Nature* **2006**, 443 (7108), 230–233.
- (30) Bootman, M. D.; Berridge, M. J. The Elemental Principles of Calcium Signaling. *Cell* **1995**, 83 (5), 675–678.
- (31) Endo, M., Tanaka, M., Ogawa, Y. Calcium Induced Release of Calcium from the Sarcoplasmic Reticulum of Skinned Skeletal Muscle Fibres. *Nat. Publ. Gr.* **1970**, 228, 34–36.
- (32) Gilkey, J. C.; Jaffe, L. F.; Ridgway, E. B.; Reynolds, G. T. A Free Calcium Wave Traverses the Activating Egg of the Medaka, *Oryzias Latipes*. *J. Cell Biol.* **1978**, 76, 448–466.
- (33) Shmigol, A.; Svichar, N.; Kostyuk, P.; Verkhratsky, A. Gradual Caffeine-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons Is Controlled by Cytoplasmic and Luminal Ca<sup>2+</sup>. *Neuroscience* **1996**, 73 (4), 1061–1067.
- (34) Bezprozvanny, I.; Watras, J.; Ehrlich, B. E. Bell-Shaped Calcium-Response Curves of Lns(1,4,5)P<sub>3</sub>- and Calcium-Gated Channels from Endoplasmic Reticulum of Cerebellum. *Nature* **1991**, pp 751–754.
- (35) Guse, A. H.; Roth, E.; Emmrich, F. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Pools in Jurkat T-Lymphocytes. *Biochem. J.* **1993**, 291 (2), 447–451.
- (36) Cancela, J. M.; Churchill, G. C.; Galione, A. Coordination of Agonist-Induced Ca<sup>2+</sup>-Signalling Patterns by NAADP in Pancreatic Acinar Cells. *Nature* **1999**, 398 (6722), 74–76.
- (37) Kim, B. J.; Park, K. H.; Yim, C. Y.; Takasawa, S.; Okamoto, H.; Im, M. J.; Kim, U. H. Generation of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate and Cyclic ADP-Ribose by Glucagon-like Peptide-1 Evokes Ca<sup>2+</sup> Signal That Is Essential for Insulin Secretion in Mouse Pancreatic Islets. *Diabetes* **2008**, 57 (4), 868–878.
- (38) Yamasaki, M.; Thomas, J. M.; Churchill, G. C.; Garnham, C.; Lewis, A. M.; Cancela, J. M.; Patel, S.; Galione, A. Role of NAADP and cADPR in the Induction and Maintenance of

- Agonist-Evoked Ca<sup>2+</sup> Spiking in Mouse Pancreatic Acinar Cells. *Curr. Biol.* **2005**, *15* (9), 874–878.
- (39) Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und Schulz, I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a Nonmitochondrial Intracellular Store in Pancreatic Acinar Cells by Inositol-1,4,5-Trisphosphate. *Nature* **1983**, *306*, 67–69.
- (40) Berridge, M. J. Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling. *Nature* **1993**, *361* (6410), 315–325.
- (41) Kirk, C. J.; Creba, J. A.; Downes, P.; Michell, R. H. Hormone-Stimulated Metabolism of Inositol Lipids and Its Relationship to Hepatic Receptor Function. *Biochem. Soc. Trans.* **1981**, *9*, 377–379.
- (42) Szymańska, E.; Sobota, A.; Czuryło, E.; Kwiatkowska, K. Expression of PI(4,5)P<sub>2</sub>-Binding Proteins Lowers the PI(4,5)P<sub>2</sub> Level and Inhibits FcγRIIA-Mediated Cell Spreading and Phagocytosis. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38* (1), 260–272.
- (43) Feske, S. Calcium Signalling in Lymphocyte Activation and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (9), 690–702.
- (44) Verjans, B.; De Smedt, F.; Lecocq, R.; Vanweyenberg, V.; Moreau, C.; Erneux, C. Cloning and Expression in Escherichia Coli of a Dog Thyroid cDNA Encoding a Novel Inositol 1,4,5-Trisphosphate 5-Phosphatase. *Biochem. J.* **1994**, *300* (1), 85–90.
- (45) Piccolo, E.; Vignati, S.; Maffucci, T.; Innominato, P. F.; Riley, A. M.; Potter, B. V. L.; Pandolfi, P. P.; Brogгинi, M.; Iacobelli, S.; Innocenti, P.; Falasca, M. Inositol Pentakisphosphate Promotes Apoptosis through the PI 3-K/Akt Pathway. *Oncogene* **2004**, *23* (9), 1754–1765.
- (46) Irvine, R. F.; McNulty, T. J.; Schell, M. J. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger—special role in neurones?. *Chemistry and Physics of Lipids* **1999**, *98*, 49–57.
- (47) Lee, H. C.; Walseth, T. F.; Bratt, G. T.; Hayes, R. N.; Clapper, D. L. Structural Determination of a Cyclic Metabolite of NAD<sup>+</sup> with Intracellular Ca<sup>2+</sup>-Mobilizing Activity. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (3), 1608–1615.
- (48) Kolisek, M.; Beck, A.; Fleig, A.; Penner, R. Cyclic ADP-Ribose and Hydrogen Peroxide Synergize with ADP-Ribose in the Activation of TRPM2 Channels. *Mol. Cell* **2005**, *18* (1), 61–69.
- (49) Partida-Sánchez, S.; Cockayne, D. A.; Monard, S.; Jacobson, E. L.; Oppenheimer, N.;

- Garvy, B.; Kusser, K.; Goodrich, S.; Howard, M.; Harmsen, A.; Randall, T. D.; Lund, F. E. Cyclic ADP-Ribose Production by CD38 Regulates Intracellular Calcium Release, Extracellular Calcium Influx and Chemotaxis in Neutrophils and Is Required for Bacterial Clearance in Vivo. *Nat. Med.* **2001**, 7 (11), 1209–1216.
- (50) Schuber, F.; Lund, F. Structure and Enzymology of ADP-Ribosyl Cyclases: Conserved Enzymes That Produce Multiple Calcium Mobilizing Metabolites. *Curr. Mol. Med.* **2005**, 4 (3), 249–261.
- (51) Ceni, C.; Muller-Steffner, H.; Lund, F.; Pochon, N.; Schweitzer, A.; De Waard, M.; Schuber, F.; Villaz, M.; Moutin, M. J. Evidence for an Intracellular ADP-Ribosyl Cyclase/NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase in Brain from CD38-Deficient Mice. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (42), 40670–40678.
- (52) Bruzzone, S.; Guida, L.; Zocchi, E.; Franco, L.; Flora, A. De. Connexin 43 Hemichannels Mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated Transmembrane NAD<sup>+</sup> Fluxes in Intact Cells. *FASEB J.* **2001**, 15 (1), 10–12.
- (53) Franco, L.; Guida, L.; Bruzzone, S.; Zocchi, E.; Usai, C.; De Flora, A. The Transmembrane Glycoprotein CD38 Is a Catalytically Active Transporter Responsible for Generation and Influx of the Second Messenger Cyclic ADP-ribose across Membranes. *FASEB J.* **1998**, 12 (14), 1507–1520.
- (54) Mészáros, L.G., Bak, J. und Chu, A. Cyclic ADP-Ribose as an Endogenous Regulator of the Non-Skeletal Type Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Channel. *Nature* **1993**, 364 (6432), 76–79.
- (55) Tang, W. X.; Chen, Y. F.; Zou, A. P.; Campbell, W. B.; Li, P. L. Role of FKBP12.6 in cADPR-Induced Activation of Reconstituted Ryanodine Receptors from Arterial Smooth Muscle. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2002**, 282 (4 51-4), 1304–1310.
- (56) Higashida, H.; Salmina, A. B.; Olovyannikova, R. Y.; Hashii, M.; Yokoyama, S.; Koizumi, K.; Jin, D.; Liu, H. X.; Lopatina, O.; Amina, S.; Islam, M. S.; Huang, J. J.; Noda, M. Cyclic ADP-Ribose as a Universal Calcium Signal Molecule in the Nervous System. *Neurochem. Int.* **2007**, 51 (2-4 SPEC. ISS.), 192–199.
- (57) Noguchi, N.; Takasawa, S.; Nata, K.; Tohgo, A.; Kato, I.; Ikehata, F.; Yonekura, H.; Okamoto, H. Cyclic ADP-Ribose Binds to Microsomes. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (6), 3133–3136.

- (58) Bootman, M. D.; Collins, T. J.; Peppiatt, C. M.; Prothero, L. S.; MacKenzie, L.; De Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S. C.; Seo, J. T.; Berridge, M. J.; Ciccolini, F.; Lipp, P. Calcium Signalling - An Overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12* (1), 3–10.
- (59) Cancela, J. M.; Petersen, O. H. The Cyclic ADP Ribose Antagonist 8-NH<sub>2</sub>-cADP-Ribose Blocks Cholecystokinin-Evoked Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Spiking in Pancreatic Acinar Cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **1998**, *435* (5), 746–748.
- (60) Galione, A.; Churchill, G. C. Interactions between Calcium Release Pathways: Multiple Messengers and Multiple Stores. *Cell Calcium* **2002**, *32* (5–6), 343–354.
- (61) Guse, A. H., C. P. da Silva, F. Emmrich, G. A. Ashamu, B. V. P. und G. W. M. Characterization of Cyclic Adenosine Diphosphate-Ribose-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in T Lymphocyte Cell Lines. *J Immunol* **1995**, *155*, 3353.
- (62) Guse, A. H.; Cakir-Kiefer, C.; Fukuoka, M.; Shuto, S.; Weber, K.; Bailey, V. C.; Matsuda, A.; Mayr, G. W.; Oppenheimer, N.; Schuber, F.; Potter, B. V. L. Novel Hydrolysis-Resistant Analogues of Cyclic ADP-Ribose: Modification of the “Northern” Ribose and Calcium Release Activity. *Biochemistry* **2002**, *41* (21), 6744–6751.
- (63) Guse, A. H. Cyclic ADP-Ribose. *J. Mol. Med.* **2000**, *78* (1), 26–35.
- (64) Bootman, M. D.; Berridge, M. J.; Roderick, H. L. Calcium Signalling: More Messengers, More Channels, More Complexity. *Curr. Biol.* **2002**, *12* (16), 563–565.
- (65) Clapper, D. L.; Walseth, T. F.; Dargie, P. J.; Hon Cheung Lee. Pyridine Nucleotide Metabolites Stimulate Calcium Release from Sea Urchin Egg Microsomes Desensitized to Inositol Trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (20), 9561–9568.
- (66) Chini, E. N.; Beers, K. W.; Dousa, T. P. Nicotinate Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Triggers a Specific Calcium Release System in Sea Urchin Eggs. *Journal of Biological Chemistry.* **1995**, pp 3216–3223.
- (67) Dammermann, W.; Guse, A. H. Functional Ryanodine Receptor Expression Is Required for NAADP-Mediated Local Ca<sup>2+</sup> Signaling in T-Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (22), 21394–21399.
- (68) Berg, I.; Potter, B. V. L.; Mayr, G. W.; Guse, A. H. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Is an Essential Regulator of T-Lymphocyte Ca<sup>2+</sup>-Signaling. *J. Cell Biol.* **2000**, *150* (3), 581–588.
- (69) Aarhus, R.; Dickey, D. M.; Graeff, R. M.; Gee, K. R.; Walseth, T. F.; Lee, H. C. Activation

- and Inactivation of Ca<sup>2+</sup> Release by NAADP. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (15), 8513–8516.
- (70) Bak, J.; Billington, R. A.; Genazzani, A. A. Effect of Luminal and Extravesicular Ca<sup>2+</sup> on NAADP Binding and Release Properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295* (4), 806–811.
- (71) Guse, A. H.; Lee, H. C. NAADP: A Universal Ca<sup>2+</sup> Trigger. *Sci. Signal.* **2008**, *1* (44), 1–7.
- (72) Yamasaki, M.; Churchill, G. C.; Galione, A. Calcium Signalling by Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP). *FEBS J.* **2005**, *272* (18), 4598–4606.
- (73) Gerasimenko, J. V.; Maruyama, Y.; Yano, K.; Dolman, N. J.; Tepikin, A. V.; Petersen, O. H.; Gerasimenko, O. V. NAADP Mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a Thapsigargin-Sensitive Store in the Nuclear Envelope by Activating Ryanodine Receptors. *J. Cell Biol.* **2003**, *163* (2), 271–282.
- (74) Nakano, T.; Watanabe, H.; Ozeki, M.; Asai, M.; Katoh, H.; Satoh, H.; Hayashi, H. Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Depletion Induces Endothelial Cell Apoptosis Independently of Caspase-12. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69* (4), 908–915.
- (75) Genazzani, A. A.; Mezna, M.; Dickey, D. M.; Michelangeli, F.; Walseth, T. F.; Galione, A. Pharmacological Properties of the Ca<sup>2+</sup>-Release Mechanism Sensitive to NAADP in the Sea Urchin Egg. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *121* (7), 1489–1495.
- (76) Ishibashi, K.; Suzuki, M.; Imai, M. Molecular Cloning of a Novel Form (Two-Repeat) Protein Related to Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *270* (2), 370–376.
- (77) Calcraft, P. J.; Ruas, M.; Pan, Z.; Cheng, X.; Arredouani, A.; Hao, X.; Tang, J.; Rietdorf, K.; Teboul, L.; Chuang, K. T.; Lin, P.; Xiao, R.; Wang, C.; Zhu, Y.; Lin, Y.; Wyatt, C. N.; Parrington, J.; Ma, J.; Evans, A. M.; Galione, A.; Zhu, M. X. NAADP Mobilizes Calcium from Acidic Organelles through Two-Pore Channels. *Nature* **2009**, *459* (7246), 596–600.
- (78) Churchill, G. C.; Okada, Y.; Thomas, J. M.; Genazzani, A. A.; Patel, S.; Galione, A. NAADP Mobilizes Ca<sup>2+</sup> from Reserve Granules, Lysosome-Related Organelles, in Sea Urchin Eggs. *Cell* **2002**, *111* (5), 703–708.
- (79) Moreschi, I.; Bruzzone, S.; Bodrato, N.; Usai, C.; Guida, L.; Nicholas, R. A.; Kassack, M. U.; Zocchi, E.; De Flora, A. NAADP Is an Agonist of the Human P2Y<sub>11</sub> Purinergic Receptor. *Cell Calcium* **2008**, *43* (4), 344–355.
- (80) Moreschi, I.; Bruzzone, S.; Melone, L.; De Flora, A.; Zocchi, E. NAADP Synthesis from

- cADPRP and Nicotinic Acid by ADP-Ribosyl Cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 345 (2), 573–580.
- (81) Billington, R.A., Bruzzone, S., De Flora, A., Genazzani, A.A., Koch-Nolte, F., Ziegler, M.; Al., E. Emerging Functions of Extracellular Pyridine Nucleotides. *Mol. Med.* **2006**, No. 12, 324–327.
- (82) Mojžišová, A.; Križanová, O.; Žáčiková, L.; Komínková, V.; Ondriaš, K. Effect of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate on Ryanodine Calcium Release Channel in Heart. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2001**, 441 (5), 674–677.
- (83) Hohenegger, M.; Suko, J.; Gscheidlinger, R.; Drobny, H.; Zidar, A. Nicotinic Acid-Adenine Dinucleotide Phosphate Activates the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *Biochem. J.* **2002**, 367 (2), 423–431.
- (84) Langhorst, M. F.; Schwarzmann, N.; Guse, A. H. Ca<sup>2+</sup> Release via Ryanodine Receptors and Ca<sup>2+</sup> Entry: Major Mechanisms in NAADP-Mediated Ca<sup>2+</sup> Signaling in T-Lymphocytes. *Cell. Signal.* **2004**, 16 (11), 1283–1289.
- (85) Guse, A. H. Linking NAADP to Ion Channel Activity: A Unifying Hypothesis. *Sci. Signal.* **2012**, 5 (221), pe 18.
- (86) Lee, H. C.; Aarhus, R.; Gee, K. R.; Kestner, T. Caged Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate. Synthesis and Use. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (7), 4172–4178.
- (87) Brailoiu, E.; Churamani, D.; Cai, X.; Schrlau, M. G.; Brailoiu, G. C.; Gao, X.; Hooper, R.; Boulware, M. J.; Dun, N. J.; Marchant, J. S.; Patel, S. Essential Requirement for Two-Pore Channel 1 in NAADP-Mediated Calcium Signaling. *J. Cell Biol.* **2009**, 186 (2), 201–209.
- (88) Kinnear, N. P.; Boittin, F. X.; Thomas, J. M.; Galione, A.; Evans, A. M. Lysosome-Sarcoplasmic Reticulum Junctions: A Trigger Zone for Calcium Signaling by Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate and Endothelin-1. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (52), 54319–54326.
- (89) Zhu, M. X.; Ma, J.; Parrington, J.; Calcraft, P. J.; Galione, A.; Evans, A. M. Calcium Signaling via Two-Pore Channels: Local or Global, That Is the Question. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2010**, 298 (3), 430–441.
- (90) Churamani, D.; Carrey, E. A.; Dickinson, G. D.; Patel, S. Determination of Cellular Nicotinic Acid-Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Levels. *Biochem. J.* **2004**, 380 (2), 449–454.

- (91) Lerner, F.; Niere, M.; Ludwig, A.; Ziegler, M. Structural and Functional Characterization of Human NAD Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288* (1), 69–74.
- (92) Pollak, N.; Niere, M.; Ziegler, M. NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (46), 33562–33571.
- (93) Aarhus, R.; Graeff, R. M.; Dickey, D. M.; Walseth, T. F.; Lee, H. C. ADP-Ribosyl Cyclase and CD38 Catalyze the Synthesis of a Calcium-Mobilizing Metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (51), 30327–30333.
- (94) Howard, M.; Grimaldi, J. C.; Bazan, J. F.; Lund, F. E.; Santos-Argumedo, L.; Parkhouse, R. M. E.; Walseth, T. F.; Lee, H. C. Formation and Hydrolysis of Cyclic ADP-Ribose Catalyzed by Lymphocyte Antigen CD38. *Science* (80-. ). **1993**, *262* (5136), 1056–1059.
- (95) Guse, A.; Ernst, I.; Fliegert, R. NAADP Signaling Revisited. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *13* (23), 2978–2990.
- (96) Lee, H. C. Structure and Enzymatic Functions of Human CD38. *Mol. Med.* **2006**, *12*, 317–323.
- (97) De Flora, A.; Guida, L.; Franco, L.; Zocchi, E.; Bruzzone, S.; Benatti, U.; Damonte, G.; Lee, H. C. CD38 and ADP-Ribosyl Cyclase Catalyze the Synthesis of a Dimeric ADP- Ribose That Potentiates the Calcium-Mobilizing Activity of Cyclic ADP-Ribose. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (20), 12945–12951.
- (98) Zocchi, E.; Usai, C.; Guida, L.; Franco, L.; Bruzzone, S.; Passalacqua, M.; De Flora, A. Ligand-induced Internalization of CD38 Results in Intracellular Ca<sup>2+</sup> Mobilization: Role of NAD<sup>+</sup> Transport across Cell Membranes. *FASEB J.* **1999**, *13* (2), 273–283.
- (99) Lee, H. C. Cyclic ADP-Ribose and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) as Messengers for Calcium Mobilization. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (38), 31633–31640.
- (100) Soares, S.; Thompson, M.; White, T.; Isbell, A.; Yamasaki, M.; Prakash, Y.; Lund, F. E.; Galione, A.; Chini, E. N. NAADP as a Second Messenger: Neither CD38 nor Base-Exchange Reaction Are Necessary for in Vivo Generation of NAADP in Myometrial Cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2007**, *292* (1), 1–44.
- (101) Graeff, R.; Liu, Q.; Kriksunov, I. A.; Hao, Q.; Hon, C. L. Acidic Residues at the Active Sites of CD38 and ADP-Ribosyl Cyclase Determine Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Synthesis and Hydrolysis Activities. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (39),

- 28951–28957.
- (102) Berridge, G.; Cramer, R.; Galione, A.; Patel, S. Metabolism of the Novel Ca<sup>2+</sup>-Mobilizing Messenger Nicotinic Acid–Adenine Dinucleotide Phosphate via a 2'-Specific Ca<sup>2+</sup>-Dependent Phosphatase. *Biochem J* **2002**, *365* (1), 295–301.
- (103) Schmid, F.; Fliegert, R.; Westphal, T.; Bauche, A.; Guse, A. H. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Degradation by Alkaline Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (39), 32525–32534.
- (104) Billington, R. A.; Thuring, J. W.; Conway, S. J.; Packman, L.; Holmes, A. B.; Genazzani, A. A. Production and Characterization of Reduced NAADP (Nicotinic Acid-Adenine Dinucleotide Phosphate). *Biochem. J.* **2004**, *378* (1), 275–280.
- (105) Lee, H. C.; Aarhus, R. Structural Determinants of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Important for Its Calcium-Mobilizing Activity. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (33), 20378–20383.
- (106) Ramadan Ali, *Dissertation* **2014**, University of Toledo.
- (107) Lee, H. C.; Aarhus, R. Fluorescent Analogs of NAADP with Calcium Mobilizing Activity. *Biochem. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1998**, *1425* (1), 263–271.
- (108) Billington, R. A.; Tron, G. C.; Reichenbach, S.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Role of the Nicotinic Acid Group in NAADP Receptor Selectivity. *Cell Calcium* **2005**, *37* (1), 81–86.
- (109) Jain, P.; Slama, J. T.; Perez-Haddock, L. A.; Walseth, T. F. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Analogues Containing Substituted Nicotinic Acid: Effect of Modification on Ca<sup>2+</sup> Release. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (21), 7599–7612.
- (110) Parkesh, R.; Lewis, A. M.; Aley, P. K.; Arredouani, A.; Rossi, S.; Tavares, R.; Vasudevan, S. R.; Rosen, D.; Galione, A.; Dowden, J.; Churchill, G. C. Cell-Permeant NAADP: A Novel Chemical Tool Enabling the Study of Ca<sup>2+</sup> Signalling in Intact Cells. *Cell Calcium* **2008**, *43* (6), 531–538.
- (111) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191.
- (112) Thomson, W.; Nicholls, D.; Irwin, W. J.; Al-Mushadani, J. S.; Freeman, S.; Karpas, A.; Petrik, J.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of the Bis(4-Acyloxybenzyl) and Mono(4-Acyloxybenzyl) Esters of the 5'-Monophosphate of

- AZT. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, No. 11, 1239–1245.
- (113) Freeman, S.; Irwin, W. J.; Mitchell, A. G.; Nicholls, D.; Thomson, W. Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di (4-acetoxybenzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase. *J. Chem. Soc.* **1991**, 01, 875–877.
- (114) Anthony G. Mitchell; William Thornson; Dave Nicholls; W. J. I. and S. F. Bioreversible Protection for the Phospho Group: Bioactivation of the Di (4-Acyloxybenzyl) and Mono(4-Acyloxybenzyl) Phosphoesters of Methylphosphonate and Phosphonoacetate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, 01 (03), 2345–2353.
- (115) Gollnest, T.; De Oliveira, T. D.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Lipophilic Prodrugs of Nucleoside Triphosphates as Biochemical Probes and Potential Antivirals. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8716.
- (116) Gollnest, T.; De Oliveira, T. D.; Rath, A.; Hauber, I.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Membrane-Permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, 55 (17), 5255–5258.
- (117) Jessen, H. J.; Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C. Bioreversible protection of nucleoside diphosphates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, 47 (45), 8719–8722.
- (118) Meier, C.; Jessen, H.; Schulz, T.; Weinschenk, L.; Pertenbreiter, F.; Balzarini, J. Rational Development of Nucleoside Diphosphate Prodrugs: DiPPro-Compounds. *Curr. Med. Chem.* **2015**, 22 (34), 3933–3950.
- (119) Meier, C. Nucleoside Diphosphate and Triphosphate Prodrugs – An Unsolvable Task? *Antivir. Chem. Chemother.* **2017**, 25 (3), 69–82.
- (120) Gollnest, T. *Dissertation* **2015**, Universität Hamburg.
- (121) Reimer, I. S. *Dissertation* **2017**, Universität Hamburg.
- (122) Jessen, H. J. *Dissertation* **2008**, Universität Hamburg.
- (123) Pahnke, K.; Meier, C. Synthesis of a Bioreversibly Masked Lipophilic Adenosine Diphosphate Ribose Derivative. *ChemBioChem* **2017**, 18 (16), 1616–1626.
- (124) Bonnaffé, D.; Dupraz, B.; Ughetto-Monfrin, J.; Namane, A.; Henin, Y.; Dinh, T. H. Potential Lipophilic Nucleotide Prodrugs: Synthesis, Hydrolysis, and Antiretroviral Activity of AZT and D4T Acyl Nucleotides. *J. Org. Chem.* **1996**, 61 (3), 895–902.
- (125) Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C. The DiPPro Approach: Synthesis, Hydrolysis, and

- Antiviral Activity of Lipophilic D4T Diphosphate Prodrugs. *ChemMedChem* **2014**, *9* (4), 762–775.
- (126) Kaplan, J. H.; Forbush, B.; Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analogue: Utilization by the Na:K Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17* (10), 1929–1935.
- (127) Pelliccioli, A. P.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups: Reaction Mechanisms and Applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (7), 441–458.
- (128) Mayer, G.; Heckel, A. Biologisch Aktive Moleküle Mit "Lichtschalter." *Angew. Chemie* **2006**, *118* (30), 5020–5042.
- (129) R. Givens. "Photoremovable Protecting Groups" in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; CRC Press: Boca Raton, **2004**.
- (130) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (34), 8446–8476.
- (131) Barltrop, J. A.; Schofield, P. Photosensitive Protecting Groups. *Tetrahedron Lett.* **1962**, No. 16, 697–699.
- (132) Alonso, J. M.; Reichel, A.; Piehler, J.; Del Campo, A. Photopatterned Surfaces for Site-Specific and Functional Immobilization of Proteins. *Langmuir* **2008**, *24* (2), 448–457.
- (133) Zscherp, C.; Barth, A. Reaction-Induced Infrared Difference Spectroscopy for the Study of Protein Reaction Mechanisms. *Biochemistry* **2001**, *40* (7), 1875–1883.
- (134) Wöll, D. F. *Dissertation* **2006**, Universität Konstanz.
- (135) Corrie, J. E. T. *Photoremovable Protecting Groups Used for the Caging of Biomolecules, in Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules (Eds M. Goeldner and R. S. Givens)*. Wiley-VCH, **1999**.
- (136) Barltrop, J. A.; Plant, P. J.; P, S. Photosensitive Protective Groups. *Chem. Commun.* **1966**, No. 22, 822–823.
- (137) Engels, J.; Ernst-Jürgen, S. Synthesis, Structure and Reactivity of Adenosine Cyclic. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (7), 7–11.
- (138) Kaplan, J. H.; Hollis, R. J. External Na Dependence of Ouabain-Sensitive ATP: ADP Exchange Initiated by Photolysis of Intracellular Caged-ATP in Human Red Cell Ghosts. *Nature* **1980**, *288* (5791), 587–589.
- (139) McCray, J. A.; Herbette, L.; Kihara, T.; Trentham, D. R. A New Approach to Time-

- Resolved Studies of ATP-Requiring Biological Systems: Laser Flash Photolysis of Caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77 (12 II), 7237–7241.
- (140) Chang, C. yu; Niblack, B.; Walker, B.; Bayley, H. A Photogenerated Pore-Forming Protein. *Chem. Biol.* **1995**, 2 (6), 391–400.
- (141) Specht, A.; Goeldner, M. 1-(o-Nitrophenyl)-2,2,2-Trifluoroethyl Ether Derivatives as Stable and Efficient Photoremovable Alcohol-Protecting Groups. *Angew. Chemie - Int. Ed* **2004**, 116 (15), 2042–2046.
- (142) Kantevari, S.; Gordon, G. R. J.; MacVicar, B. A.; Ellis-Davies, G. C. R. A Practical Guide to the Synthesis and Use of Membrane-Permeant Acetoxymethyl Esters of Caged Inositol Polyphosphates. *Nat. Protoc.* **2011**, 6 (3), 327–337.
- (143) Bochet, C. G. Photolabile Protecting Groups and Linkers. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2002**, 2 (2), 125–142.
- (144) Klán, Petr, W. J. Photochemistry of Organic Compounds. Wiley-VCH, **2009**.
- (145) Schmierer, T.; Bley, F.; Schaper, K.; Gilch, P. The Early Processes in the Photochemistry of Ortho-Nitrobenzyl Acetate. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2011**, 217 (2–3), 363–368.
- (146) Il'ichev Y. V.; Schwörer M. A.; Wirz J. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4581-4595.
- (147) Bley, F.; Schaper, K.; Görner, H. Photoprocesses of Molecules with 2-Nitrobenzyl Protecting Groups and Caged Organic Acids. *Photochem. Photobiol.* **2008**, 84 (1), 162–171.
- (148) Görner, H. Effects of 4,5-Dimethoxy Groups on the Time-Resolved Photoconversion of 2-Nitrobenzyl Alcohols and 2-Nitrobenzaldehyde into Nitroso Derivatives. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4 (10), 822–828.
- (149) Niu, L.; Gee, K. R.; Schaper, K.; Hess, G. P. Synthesis and Photochemical Properties of a Kainate Precursor and Activation of Kainate and AMPA Receptor Channels on a Microsecond Time Scale. *Biochemistry* **1996**, 35 (6), 2030–2036.
- (150) Gee, K. R.; Niu, L.; Schaper, K.; Jayaraman, V.; Hess, G. P. Synthesis and Photochemistry of a Photolabile Precursor of N-Methyl-D- Aspartate (NMDA) That Is Photolyzed in the Microsecond Time Region and Is Suitable for Chemical Kinetic Investigations of the

- NMDA Receptor. *Biochemistry* **1999**, 38 (10), 3140–3147.
- (151) Schaper, K.; Abdollah Madani Mobarekeh, S.; Grewer, C. Synthesis and Photophysical Characterization of a New, Highly Hydrophilic Caging Group. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, No. 6, 1037–1046.
- (152) Sheehan, J. C.; Wilson, R. M. Photolysis of Desyl Compounds. A New Photolytic Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86 (23), 5277–5281.
- (153) Sheehan, J. C.; Umezawa, K. Phenacyl Photosensitive Blocking Groups. *J. Org. Chem.* **1973**, 38 (21), 3771–3774.
- (154) Givens, R. S.; Matuszewski, B. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, No. 106, 6860–6861.
- (155) Ruthenbeck, A. *Dissertation* **2018**, Universität Hamburg.
- (156) Pahnke, K. *Dissertation* **2017**, Universität Hamburg.
- (157) Zhao, C. *Dissertation* **2019**, Universität Hamburg.
- (158) Bundgaard, H. Design of Prodrugs, Elsevier, **1985**.
- (159) Wolf, S.; Berrio, R. M.; Meier, C. Synthesis of Nonnatural Nucleoside Diphosphate Sugars. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, No. 31, 6304–6313.
- (160) Warnecke, S.; Meier, C. Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with Cyclosal-Nucleotides. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (8), 3024–3030.
- (161) Warnecke, S. *Dissertation* **2010**, Universität Hamburg.
- (162) Wagner, G. K.; Pesnot, T.; Field, R. A. A Survey of Chemical Methods for Sugar-Nucleotide Synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26 (9), 1172–1194.
- (163) Shigematsu, M.; Kawamura, T.; Kirino, Y. Generation of 2',3'-Cyclic Phosphate-Containing RNAs as a Hidden Layer of the Transcriptome. *Front. Genet.* **2018**, 9 (November), 1–13.
- (164) Schwartz, A. W. Specific Phosphorylation of the 2'- and 3'- Positions in Ribonucleosides. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1969**, No. 23, 3850.
- (165) Rajanbabu T. V. Dibutyltin Oxide. *Hawley's Condens. Chem. Dict.* **2007**, No. 3.
- (166) Angyal S. J.; Melrose G. J. H. Cyclitols. Acetyl Migration: Equilibrium between Axial and Equatorial Acetates., *J. Chem. Soc.* **1965**, 0 (1965), 6494-6500.
- (167) Dowden, J.; Moreau, C.; Brown, R. S.; Berridge, G.; Galione, A.; Potter, B. V. L. Chemical Synthesis of the Second Messenger Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate by

- Total Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, 43 (35), 4637–4640.
- (168) W. T. Markiewicz, M. W. A New Type of Silyl Protecting Groups in Nucleoside Chemistry. *Nucleic Acids Res.* **1976**, No. 1, 185–190.
- (169) Schulz, T. *Dissertation* **2011**, Universität Hamburg.
- (170) E. Uhlmann, J. E. Chemical 5'-Phosphorylation of Oligonucleotides Valuable in Automated DNA Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1023–1026.
- (171) Weinschenk, L. *Dissertation* **2015**, Universität Hamburg.
- (172) Zhu, X. F.; Williams, H. J.; Scott, A. I. Aqueous Trifluoroacetic Acid - An Efficient Reagent for Exclusively Cleaving the 5'-End of 3',5'-TIPDS Protected Ribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (49), 9541–9545.
- (173) Murphy *Organophosphorus Reagents*. Oxford University Press, **2004**.
- (174) Wada, T.; Mochizuki, A.; Sato, Y.; Sekine, M. A Convenient Method for Phosphorylation Involving a Facile Oxidation of H-Phosphonate Monoesters via Bis(Trimethylsilyl) Phosphites. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (39), 7123–7126.
- (175) Šolomek, T.; Mercier, S.; Bally, T.; Bochet, C. G. Photolysis of Ortho-Nitrobenzylic Derivatives: The Importance of the Leaving Group. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11 (3), 548–555.
- (176) Jeschik, N. *Dissertation* **2021**, Universität Hamburg.
- (177) Foote, R. S.; Cornwell, P.; Isham, K. R.; Gigerich, H.; Stengele, K.-P.; Pfeleiderer, W.; Sachleben, R. A. Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Synthesis and Photodeprotection Rates. *Tetrahedron* **1997**, 53 (12), 4247–4264.
- (178) Bühler, S.; Lagoja, I.; Giegrich, H.; Stengele, K. P.; Pfeleiderer, W. New Types of Very Efficient Photolabile Protecting Groups Based upon the [2-(2-Nitrophenyl)Propoxy]Carbonyl (NPPOC) Moiety. *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87 (3), 620–659.
- (179) Giegrich, H.; Eisele-Bühler, S.; Hermann, C.; Kvasnyuk, E.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. New Photolabile Protecting Groups in Nucleoside and Nucleotide Chemistry - Synthesis, Cleavage Mechanisms and Applications. *Nucleosides and Nucleotides* **1998**, 17 (9–11), 1987–1996.
- (180) Specht, A.; Thomann, J. S.; Alarcon, K.; Wittayanan, W.; Ogden, D.; Furuta, T.; Kurakawa,

- Y.; Goeldner, M. New Photoremovable Protecting Groups for Carboxylic Acids with High Photolytic Efficiencies at Near-UV Irradiation. Application to the Photocontrolled Release of L-Glutamate. *ChemBioChem* **2006**, *7* (11), 1690–1695.
- (181) Ducho, C. *Dissertation* **2005**, Universität Hamburg.
- (182) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591.
- (183) Thalladi, V. R.; Weiss, H. C.; Bläser, D.; Boese, R.; Nangia, A.; Desiraju, G. R. C-H...F Interactions in the Crystal Structures of Some Fluorobenzenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (34), 8702–8710.
- (184) Wu, J. Review of Recent Advances in Nucleophilic C-F Bond-Forming Reactions at Sp<sup>3</sup> Centers. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (31), 4289–4294.
- (185) Egami, H.; Hamashima, Y. *Frontiers of Organofluorine Chemistry*, University of Shizuoka, **2020**.
- (186) Ren, H.; An, H.; Hatala, P. J.; Stevens, W. C.; Tao, J.; He, B. Versatile Synthesis and Biological Evaluation of Novel 3'-Fluorinated Purine Nucleosides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2509–2520.
- (187) Nielsen, M. K.; Ugaz, C. R.; Li, W.; Doyle, A. G. PyFluor: A Low-Cost, Stable, and Selective Deoxyfluorination Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (30), 9571–9574.
- (188) Goldberg, N. W.; Shen, X.; Li, J.; Ritter, T. AlkylFluor: Deoxyfluorination of Alcohols. *Org. Lett.* **2016**, *18* (23), 6102–6104.
- (189) Dong, W. K.; Jeong, H. J.; Seok, T. L.; Sohn, M. H.; Katzenellenbogen, J. A.; Dae, Y. C. Facile Nucleophilic Fluorination Reactions Using Tert-Alcohols as a Reaction Medium: Significantly Enhanced Reactivity of Alkali Metal Fluorides and Improved Selectivity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 957–962.
- (190) Pankiewicz, K. W.; Krzeminski, J.; Watanabe, K. A. Synthesis of 2'-β-Fluoro- and 3'-α-Fluoro-Substituted Guanine Nucleosides. Effects of Sugar Conformational Shifts on Nucleophilic Displacement of the 2'-Hydroxy and 3'-Hydroxy Group with DAST. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (26), 7315–7321.
- (191) Liu, Z.; Jenkinson, S. F.; Vermaas, T.; Adachi, I.; Wormald, M. R.; Hata, Y.; Kurashima, Y.; Kaji, A.; Yu, C. Y.; Kato, A.; Fleet, G. W. J. 3-Fluoroazetidincarboxylic Acids and Trans,Trans- 3,4-Difluoroproline as Peptide Scaffolds: Inhibition of Pancreatic Cancer

- Cell Growth by a Fluoroazetidine Iminosugar. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (9), 4244–4258.
- (192) Stanislaw F. Wnuka, Jenay Roberta, Adam J. Sobczaka, Brandon P. Meyersa, Venkata L. A. Malladia, Jinge Zhub, Bhaskar Gopishettyb, D. P. Inhibition of S-Ribosylhomocysteinase (LuxS) by Substrateanalogues Modified at the Ribosyl C-3 Position. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (18), 6699–6706.
- (193) Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; Janssen, G.; Cools, M.; De Clercq, E. Synthesis and Antiviral Activity Evaluation of 3'-Fluoro-3'-Deoxyribonucleosides: Broad-Spectrum Antiviral Activity of 3'-Fluoro-3'-Deoxyadenosine. *Antiviral Res.* **1989**, *12* (3), 133–150.
- (194) Mikhailopulo, I. A.; Poopeiko, N. E.; Pricota, T. I.; Sivets, G. G.; Kvasyuk, E. I.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis and Antiviral and Cytostatic Properties of 3'-Deoxy-3'-Fluoro- and 2'-Azido-3'-Fluoro-2',3'-Dideoxy-D-Ribofuranosides of Natural Heterocyclic Bases. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 2195–2202.
- (195) Surendra Dawadi, Kishore Viswanathan, Helena I. Boshoff, Clifton E. Barry III, C. C. A. Investigation and Conformational Analysis of Fluorinated Nucleoside Antibiotics Targeting Siderophore Biosynthesis. *J Org Chem.* **2015**, *80* (10), 4835–4850.
- (196) Iannazzo, L.; Laisné, G.; Fonvielle, M.; Braud, E.; Herbeuval, J. P.; Arthur, M.; Etheve-Quellejeu, M. Synthesis of 3'-Fluoro-tRNA Analogues for Exploring Nonribosomal Peptide Synthesis in Bacteria. *ChemBioChem* **2015**, *16* (3), 477–486.
- (197) Klinchan, C.; Hsu, Y. L.; Lo, L. C.; Pluempanupat, W.; Chuawong, P. Synthesis of Non-Hydrolyzable Substrate Analogs for Asp-TRNAAsn/Glu-TRNAGln Amidotransferase. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (45), 6204–6207.
- (198) Yoshikawa, M., Kato, T., & Takenishi, T. A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8* (50), 5065–5068.
- (199) Kusashio, K.; Yoshikawa, M. Studies of Phosphorylation. II. Reaction of 2',3'-O-Isopropylideneinosine and -Guanosine with Phosphoryl Chloride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, *41* (1), 142–149.
- (200) Kretschy, N.; Holik, A. K.; Somoza, V.; Stengele, K. P.; Somoza, M. M. Next-Generation o-Nitrobenzyl Photolabile Groups for Light-Directed Chemistry and Microarray Synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (29), 8555–8559.
- (201) Bolze, F.; Nicoud, J. F.; Bourgogne, C.; Gug, S.; Sun, X. H.; Goeldner, M.; Specht, A.; Donato, L.; Warther, D.; Turi, G. F.; Losonczy, A. Two-Photon Uncaging: The Chemist

- Point of View. *Opt. Mater. (Amst)*. **2012**, *34* (10), 1664–1669.
- (202) Jeck R.; Heik P.; Woenckhaus C. Simple Methods of Preparing Nicotinamide Mononucleotide. *FEBS Lett.* **1974**, *42* (2), 161–164.
- (203) Takeji, S. Studies on Metabolic Pathway of NAD in Yeast Cells: Part VI. A New Method for Preparation of NMN by an Enzyme from Yeast. *Agric. Biol. Chem.* **1970**, *34* (1), 23–27.
- (204) Mikhailopulo, I. A.; Pricota, T. I.; Timoshchuk, V. A.; Akhrem, A. A. Synthesis of Glycosides of Nicotinamide and Nicotinamide Mononucleotide. *Synth.* **1981**, *1981* (5), 388–389.
- (205) Lee, J.; Churchil, H.; Choi, W. B.; Lynch, J. E.; Roberts, F. E.; Volante, R. P.; Reider, P. J. A Chemical Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD<sup>+</sup>). *Chem. Commun.* **1999**, *1* (8), 729–730.
- (206) Tanimori, S.; Ohta, T.; Kirihata, M. An Efficient Chemical Synthesis of Nicotinamide Riboside (NAR) and Analogues. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (8), 1135–1137.
- (207) Yang, T.; Chan, N. Y. K.; Sauve, A. A. Syntheses of Nicotinamide Riboside and Derivatives: Effective Agents for Increasing Nicotinamide Adenine Dinucleotide Concentrations in Mammalian Cells. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6458–6461.
- (208) Kraszewski, A.; Stawiński, J. Phosphoryl Tris-Triazole - a New Phosphorylating Reagent. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21* (30), 2935–2936.
- (209) Ghosh, A. K.; Liu, W. Total Synthesis of (+)-Sinefungin. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (18), 6175–6182.
- (210) Nukada, T.; Berces, A.; Zgierski, M. Z.; Whitfield, D. M. Exploring the Mechanism of Neighboring Group Assisted Glycosylation Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (51), 13291–13295.
- (211) Franchetti, P.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Ricciutelli, M.; Vita, P.; Cappellacci, L. Stereoselective Synthesis of Nicotinamide  $\beta$ -Riboside and Nucleoside Analogs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (18), 4655–4658.
- (212) Baldoni, L.; Marino, C. Facile Synthesis of Per-O-Tert-Butyldimethylsilyl- $\beta$ -D-Galactofuranose and Efficient Glycosylation via the Galactofuranosyl Iodide. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (5), 1994–2003.
- (213) Jia, X. *Dissertation* **2020**, Universität Hamburg.

- (214) Yang, Y.; Zhang, X.; Yu, B. O-Glycosylation Methods in the Total Synthesis of Complex Natural Glycosides. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (9), 1331–1355.
- (215) Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. Mechanism of Chemical O-Glycosylation: From Early Studies to Recent Discoveries. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 497–510.
- (216) Ionescu, A. R.; Whitfield, D. M.; Zgierski, M. Z.; Nukada, T. Investigations into the Role of Oxacarbenium Ions in Glycosylation Reactions by Ab Initio Molecular Dynamics. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341* (18), 2912–2920.
- (217) Paulsen, H., Trautwein, W.-P., Espinosa, F. G., & Heyns, K. Darstellung Stabiler 1,2-Acetonium-Salze Acetylierter Hexosen Und Pentosen. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7* (34), 4131–4135.
- (218) Lemieux, R. U. Effects of Unshared Pairs of Electrons and Their Solvation on Conformational Equilibria. *Pure Appl. Chem.* **1971**, *25* (3), 527–548.
- (219) Bert Fraser-Reid, J. C. L. *Armed–Disarmed Effects in Carbohydrate Chemistry: History, Synthetic and Mechanistic Studies*; Springer, **2010**.
- (220) Bandara, M. D.; Yasomanee, J. P.; Demchenko, A. V. Application of Armed, Disarmed, Superarmed, and Superdisarmed Building Blocks in Stereocontrolled Glycosylation and Expedient Oligosaccharide Synthesis. *Sel. Glycosylation Synth. Methods Catal.* **2017**, 29–58.
- (221) Bols, M.; Pedersen, C. M. Silyl-Protective Groups Influencing the Reactivity and Selectivity in Glycosylations. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 93–105.
- (222) Schmidt, R. R.; Michel, J. Facile Synthesis of A- and B-O-Glycosyl Imidates; Preparation of Glycosides and Disaccharides. *Angew. Chemie - Int. Ed. Eng.* **1980**, *19* (9), 731–732.
- (223) Schmidt, R. R.; Stumpp, M. Glycosylimidate, 10. Glycosylphosphate Aus Glycosyl(Trichloroacetimidaten). *Liebigs Ann. der Chemie* **1984**, *1984* (4), 680–691.
- (224) Lambrecht, M. J.; Brichacek, M.; Barkauskaite, E.; Ariza, A.; Ahel, I.; Hergenrother, P. J. Synthesis of Dimeric ADP-Ribose and Its Structure with Human Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (10), 3558–3564.
- (225) Urban, F. J., Moore, B. S., & Breitenbach, R. Synthesis of Tigogenyl  $\beta$ -O-Cellobioside Heptaacetate and Glycoside Tetraacetate via Schmidt's Trichloroacetimidate Method; Some New Observations. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (31), 4421–4424.
- (226) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, **1999**.

- (227) Wei, G., Gu, G., & Du, Y. Silver Triflate. A Mild Alternative Catalyst for Glycosylation Conditions Using Trichloroacetimidates as Glycosyl Donors. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, 22 (6), 385–393.
- (228) Yamada, H.; Hayashi, T. A Substrate-Unspecified Glycosylation Reaction Promoted by Copper(II) Trifluoromethanesulfonate in Benzotrifluoride. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337 (7), 581–585.
- (229) Geng, Y.; Kumar, A.; Faidallah, H. M.; Albar, H. A.; Mhkalid, I. A.; Schmidt, R. R. Kooperative Katalyse bei der Glycosidierung mit O-Glycosyltrichloracetimidaten als Glycosyldonoren. *Angew. Chemie* **2013**, 125 (38), 10273–10277.
- (230) Galan, M. C.; Jones, R. A.; Tran, A. T. Recent Developments of Ionic Liquids in Oligosaccharide Synthesis: The Sweet Side of Ionic Liquids. *Carbohydr. Res.* **2013**, 375, 35–46.
- (231) Schmidt, R. R.; Kinzy, W. Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis: The Trichloroacetimidate Method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50 (C), 21–123.
- (232) Schneider, F. Histidin Im aktiven Zentrum von Enzymen. *Angew. Chemie* **1978**, 90 (8), 616–625.
- (233) Mason, T. J. Ultrasound in Synthetic Organic Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26 (6), 443–451.
- (234) Christie, S. M. H.; Elmore, D. T.; Kenner, G. W.; Todd, A. R.; Weymouth, F. J. 587. Nucleotides. Part XXII. Syntheses of P1P2-Diadenosine-5' and P1P2-Diuridine-5' Pyrophosphates. *J. Chem. Soc.* **1953**, 0, 2947–2953.
- (235) Khorana, H. G. Carbodiimides. Part V. A Novel Synthesis of Adenosine Di- and Triphosphate and P1P2 Diadenosine-5'-Pyrophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76 (13), 3517–3522.
- (236) Smith, M.; Khorana, H. G.; Drummond, G. I. Cyclic Phosphates. IV. Ribonucleoside-3',5' Cyclic Phosphates. A General Method of Synthesis and Some Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83 (3), 698–706.
- (237) Moffatt, J. G.; Khorana, H. G. Nucleoside Polyphosphates. VIII. New and Improved Syntheses of Uridine Diphosphate Glucose and Flavin Adenine Dinucleotide Using Nucleoside-5' Phosphoramidates. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80 (14), 3756–3761.
- (238) Millo, E.; Zocchi, E.; Galatini, A.; Benatti, U.; Damonte, G. Simple Synthesis of P1P2-

- Diadenosine 5'-Pyrophosphate. *Synth. Commun.* **2008**, *38* (19), 3260–3269.
- (239) Wittmann, V.; Wong, C. H. 1H-Tetrazole as Catalyst in Phosphomorpholidate Coupling Reactions: Efficient Synthesis of GDP-Fucose, GDP-Mannose, and UDP-Galactose. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (7), 2144–2147.
- (240) Tsukamoto, H.; Kahne, D. N-Methylimidazolium Chloride-Catalyzed Pyrophosphate Formation: Application to the Synthesis of Lipid i and NDP-Sugar Donors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (17), 5050–5053.
- (241) Meier, C. CycloSal Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery - Chemistry Meets Biology. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, No. 5, 1081–1102.
- (242) Wolf, S., Zismann, T., Lunau, N., Warnecke, S., Wendicke, S., & Meier, C. A Convenient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses and Other Polyphosphorylated Bioconjugates. *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89* (1), 63–75.
- (243) Gold, H.; Van Delft, P.; Meeuwenoord, N.; Codée, J. D. C.; Filippov, D. V.; Eggink, G.; Overkleeft, H. S.; Van Der Marel, G. A. Synthesis of Sugar Nucleotides by Application of Phosphoramidites. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (23), 9458–9460.
- (244) Kistemaker, H. A. V.; Nardoza, A. P.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Ladurner, A. G.; Filippov, D. V. Synthesis and Macrodomein Binding of Mono-ADP-Ribosylated Peptides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (36), 10634–10638.
- (245) Cramer, F., Schaller, H., & Staab, H. A. Zur Chemie der „energiereichen Phosphate“, XI. Darstellung von Imidazoliden Der Phosphorsäure. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (6), 1612–1621.
- (246) Cramer, F.; Neunhoeffer, H. Zur Chemie Der „energiereichen Phosphate“, XV1) Reaktionen von Adenosin-5'-Phosphorsäure-Imidazolid—Eine Neue Synthese von Adenosindiphosphat Und Flavin-Adenin-Dinucleotid. *Chem. Ber.* **1962**, *95* (7), 1664–1669.
- (247) Mukaiyama, T., & Hashimoto, M. Phosphorylation by Oxidation-Reduction Condensation. Preparation of Active Phosphorylating Reagents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44* (8), 2284–2284.
- (248) Shimazu, M., Shinozuka, K., & Sawai, H. Facile Synthesis of Nucleotides Containing Polyphosphates by Mn(II) and Cd(II) Ion-Catalyzed Pyrophosphate Bond Formation in Aqueous Solution. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (2), 235–238.

- (249) Sawai, H., Wakai, H., & Nakamura-Ozaki, A. Synthesis and Reactions of Nucleoside 5'-Diphosphate Imidazolidine. A Nonenzymatic Capping Agent for 5'-Monophosphorylated Oligoribonucleotides in Aqueous Solution. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (16), 5836–5840.
- (250) Mohamady, S.; Taylor, S. D. General Procedure for the Synthesis of Dinucleoside Polyphosphates. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (15), 6344–6349.
- (251) Bogachev, V. S. Study of the Reaction of Trifluoroacetic-anhydride with Thymidine-5'-Phosphate. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1995**, *21*, 212-217.
- (252) Sun, Q.; Liu, S.; Sun, J.; Gong, S. S. An H-Phosphonate Strategy for the Synthesis of 2',3'-Dideoxynucleoside Triphosphates and Homodinucleotides. *Chinese Chem. Lett.* **2014**, *25* (3), 427–430.
- (253) S. Mohamady, D. L. J. An Improved Method for the Synthesis of Nucleoside Triphosphate Analogues. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10588-10591.
- (254) Kanavarioti, A.; Lu, J.; Rosenbach, M. T.; Brian Hurley, T. Unexpectedly Facile Synthesis of Symmetrical P1,P2-Dinucleoside-5'pyrophosphates. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (43), 6065–6068.
- (255) Tawarada, R.; Seio, K.; Sekine, M. Mechanistic Studies on Oxidative Condensation of a Thymidine 3'-H-Phosphonate Derivative with 3'-O-Acetylthymidine. *Arkivoc* **2009**, *2009* (3), 264–273.
- (256) Dabrowski-Tumanski, P.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Efficient and Rapid Synthesis of Nucleoside Diphosphate Sugars from Nucleoside Phosphorimidazolides. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (11), 2147–2154.
- (257) Mohamady, S.; Taylor, S. D. Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside Polyphosphates and Their Conjugates Using Sulfonyl Imidazolium Salts. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2012**, *14*, 402-405.
- (258) Thilgen, C. *pkA-Werte Ausgewählter Vertreter Verschiedener Verbindungsklassen*. *Org. Chemie I*, ETH Zürich, **2009**.
- (259) Lin, H. Nicotinamide Adenine Dinucleotide: Beyond a Redox Coenzyme. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (16), 2541–2554.
- (260) Kulikova, V. A.; Gromyko, D. V.; Nikiforov, A. A. The Regulatory Role of NAD in Human and Animal Cells. *Biochem.* **2018**, *83* (7), 800–812.
- (261) Hentall, P. L.; Flowers, N.; Bugg, T. D. H. Enhanced Acid Stability of a Reduced

- Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) Analogue. *Chem. Commun.* **2001**, 1 (20), 2098–2099.
- (262) Berti, P. J., & McCann, J. A. B. Toward a Detailed Understanding of Base Excision Repair Enzymes: Transition State and Mechanistic Analyses of N-Glycoside Hydrolysis And N-Glycoside Transfer. *Chem. Rev.* **2006**, 106 (2), 506–555.
- (263) Hoenes, J.; Heindl, D.; Horn, C.; Gaessler-Dietsche, C. *Stabile NAD/NADH-Derivate*, **2011**.
- (264) Slama, J. T.; Simmons, A. M. Carbanicotinamide Adenine Dinucleotide: Synthesis and Enzymological Properties of a Carbocyclic Analogue of Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Biochemistry* **1988**, 27 (1), 183–193.
- (265) Zhao, K.; Harshaw, R.; Chai, X.; Marmorstein, R. Structural Basis for Nicotinamide Cleavage and ADP-Ribose Transfer by NAD<sup>+</sup>-Dependent Sir2 Histone/Protein Deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (23), 8563–8568.
- (266) Szczepankiewicz, B. G.; Dai, H.; Koppetsch, K. J.; Qian, D.; Jiang, F.; Mao, C.; Perni, R. B. Synthesis of Carba-NAD and the Structures of Its Ternary Complexes with SIRT3 and SIRT5. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (17), 7319–7329.
- (267) Madern, J. M.; Kim, R. Q.; Misra, M.; Dikic, I.; Zhang, Y.; Ovaa, H.; Codée, J. D. C.; Filippov, D. V.; van der Heden van Noort, G. J. Synthesis of Stable NAD<sup>+</sup> Mimics as Inhibitors for the Legionella Pneumophila Phosphoribosyl Ubiquitylating Enzyme SdeC. *ChemBioChem* **2020**, 21 (20), 2903–2907.
- (268) Pankiewicz, K. W.; Felczak, K. From Ribavirin to NAD Analogues and Back to Ribavirin in Search for Anticancer Agents. *Heterocycl. Commun.* **2015**, 21 (5), 249–257.
- (269) Langelier, M. F.; Zandarashvili, L.; Aguiar, P. M.; Black, B. E.; Pascal, J. M. NAD<sup>+</sup> Analog Reveals PARP-1 Substrate-Blocking Mechanism and Allosteric Communication from Catalytic Center to DNA-Binding Domains. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1).
- (270) Pankiewicz, K.; Watanabe, K.; Lesiak-Watanabe, K.; Goldstein, B.; Jayaram, H. The Chemistry of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Analogues Containing C-Nucleosides Related to Nicotinamide Riboside. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 9 (7), 733–741.
- (271) Jayaram, H. N.; Gharehbaghi, K.; Jayaram, N. H.; Rieser, J.; Krohn, K.; Paull, K. D. Cytotoxicity of a New IMP Dehydrogenase Inhibitor, Benzamide Riboside, to Human Myelogenous Leukemia K562 Cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 186 (3),

- 1600–1606.
- (272) van Rijssel, E. R.; van Delft, P.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V.; Codée, J. D. C. Furanosyl Oxocarbenium Ion Stability and Stereoselectivity. *Angew. Chemie - Int. Ed* **2014**, *126* (39), 10549–10553.
- (273) Van Rijssel, E. R.; Van Delft, P.; Van Marle, D. V.; Bijvoets, S. M.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Van Der Marel, G. A.; Filippov, D. V.; Codée, J. D. C. Stereoselectivity in the Lewis Acid Mediated Reduction of Ketofuranoses. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (9), 4553–4565.
- (274) Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily Accessible 12-I-51 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (22), 4155–4156.
- (275) Karsten Krohn, Heidi Heins, and K. W. Synthesis and Cytotoxic Activity of C-Glycosidic Nicotinamide Riboside Analogs. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (3), 511–517.
- (276) Brückner, C.; Holzinger, H.; Reissig, H. U. Diastereoselective Syntheses of Highly Substituted Methyl Tetrahydrofuran-3-Carboxylates by Reactions of  $\gamma$ -Lactols with Silylated Nucleophiles. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (11), 2450–2456.
- (277) Larsen, C. H.; Ridgway, B. H.; Shaw, J. T.; Woerpel, K. A. A Stereoelectronic Model to Explain the Highly Stereoselective Reactions of Nucleophiles with Five-Membered-Ring Oxocarbenium Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (51), 12208–12209.
- (278) Larsen, C. H.; Ridgway, B. H.; Shaw, J. T.; Smith, D. M.; Woerpel, K. A. Stereoselective C-Glycosylation Reactions of Ribose Derivatives: Electronic Effects of Five-Membered Ring Oxocarbenium Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (31), 10879–10884.
- (279) Sousa, C.; Silva, P. J.  $\text{BBr}_3$ -Assisted Cleavage of Most Ethers Does Not Follow the Commonly Assumed Mechanism. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 23, 5195–5199.
- (280) Tomomi Ikemoto, Akira Haze, Hiroyuki Hatano, Yoshifumi Kitamoto, Masato Ishida, K. N. Phosphorylation of Nucleosides with Phosphorus Oxychloride in Trialkyl Phosphate. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43* (2), 210–215.
- (281) Borthwick, A. D., & Biggadike, K. Synthesis of Chiral Carbocyclic Nucleosides. *Tetrahedron* **1992**, *48* (4), 571–623.
- (282) Desgranges, C.; Razaka, G.; Rabaud, M.; Bricaud, H.; Balzarini, J.; de Clercq, E. Phosphorolysis of (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine (BVDU) and Other 5-Substituted-2'-Deoxyuridines by Purified Human Thymidine Phosphorylase and Intact

- Blood Platelets. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32* (23), 3583–3590.
- (283) Zincke, T.; Heuser, G.; Möller, W. I. Ueber Dinitrophenylpyridiniumchlorid Und Dessen Umwandlungsproducte. *J. Lieb. Ann. Chem.* **1904**, *333* (2–3), 296–345.
- (284) Singh, U. S.; Mishra, R. C.; Shankar, R.; Chu, C. K. Stereoselective Synthesis of 2'-Fluoro-6'-Methylene Carbocyclic Adenosine via Vince Lactam. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (9), 3917–3923.
- (285) Meizenheimer, J. Mitteilung Aus dem chemischen Laboratorium der königlichen Akademie der Wissenschaften zu München. *Journ. chem. SOC* **1902**, *3567* (1900), 205–245.
- (286) Cheng W.-C., K. M. J. The Zincke Reaction. A Review. *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, *34* (6), 585–608.
- (287) Mahajani, N. S.; Meador, R. I. L.; Smith, T. J.; Canarelli, S. E.; Adhikari, A. A.; Shah, J. P.; Russo, C. M.; Wallach, D. R.; Howard, K. T.; Millimaci, A. M.; Chisholm, J. D. Ester Formation via Symbiotic Activation Utilizing Trichloroacetimidate Electrophiles. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (12), 7871–7882.
- (288) Wender, P. A.; Badham, N. F.; Conway, S. P.; Floreancig, P. E.; Glass, T. E.; Houze, J. B.; Krauss, N. E.; Lee, D.; Marquess, D. G.; Mcgrane, P. L.; Meng, W.; Natchus, M. G.; Shuker, A. J.; Sutton, J. C.; Taylor, R. E.; V, S. U.; October, R. V; Martin, D.; Chem, J. A. The Pinene Path to Taxanes . 6 . A Concise Stereocontrolled Synthesis of Taxol In the Preceding Communication , 1 We Described the Synthesis Its Analogues . Our Strategy for the Elaboration of This AB- Bicyclic Precursor into the ABC- Tricyclic Core of Th. *J. A. Chem.* **1997**, *7863* (14), 2757–2758.
- (289) Fuchs, P. L. *Reagent for Silicon-Mediated Organic Synthesis*, Wiley, **2013**.
- (290) Roggenkamp, H. G.; Khansahib, I.; Hernandez C., L. C.; Zhang, Y.; Lodygin, D.; Krüger, A.; Gu, F.; Möckl, F.; Löhndorf, A.; Wolters, V.; Woike, D.; Rosche, A.; Bauche, A.; Schetelig, D.; Werner, R.; Schlüter, H.; Failla, A. V.; Meier, C.; Fliegert, R.; Walseth, T. F.; Flügel, A.; Diercks, B.-P.; Guse, A. H. HN1L/JPT2: A Signaling Protein That Connects NAADP Generation to Ca<sup>2+</sup> Microdomain Formation. *Sci. Signal.* **2021**, *14* (675).
- (291) Dammermann, W.; Zhang, B.; Nebel, M.; Cordiglieri, C.; Odoardi, F.; Kirchberger, T.; Guse, A. H.; Potter, B. V. L.. NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist. *PNAS* **2009**, *106* (26).

- (292) Wolf, I. M. A.; Diercks, B. P.; Gattkowski, E.; Czarniak, F.; Kempinski, J.; Werner, R.; Schetelig, D.; Mittrücker, H. W.; Schumacher, V.; Von Osten, M.; Lodygin, D.; Flügel, A.; Fliegert, R.; Guse, A. H. Frontrunners of T Cell Activation: Initial, Localized Ca<sup>2+</sup> Signals Mediated by NAADP and the Type 1 Ryanodine Receptor. *Sci. Signal.* **2015**, *8* (398), 1–13.
- (293) Oivanen M.; Schnell R.; Pflaiderer W.; Lonnberg H. Interconversion and hydrolysis of monomethyl and monoisopropyl esters of adenosine 2'- and 3'-monophosphates: kinetics and mechanisms. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (11), 3623-3628.
- (294) Wang, A.; Rodríguez, J. C.; Han, H.; Schönbrunn, E.; Rivera, M. X-Ray Crystallographic and Solution State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Investigations of NADP<sup>+</sup> Binding to Ferredoxin NADP Reductase from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biochemistry* **2008**, *47* (31), 8080–8093.
- (295) Bortolotti, A.; Pérez-Dorado, I.; Goñi, G.; Medina, M.; Hermoso, J. A.; Carrillo, N.; Cortez, N. Coenzyme Binding and Hydride Transfer in *Rhodobacter Capsulatus* Ferredoxin/Flavodoxin NADP(H) Oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2009**, *1794* (2), 199–210.
- (296) Jahnz-Wechmann, Z.; Framski, G. R.; Januszczak, P. A.; Boryski, J. Base-Modified Nucleosides: Etheno Derivatives. *Front. Chem.* **2016**, *4* (APR), 1–10.
- (297) Hayakawa, Y.; Kataoka, M. Facile Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides via the Phosphoramidite Method without Nucleoside Base Protection. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (48), 12395–12401.
- (298) Frigerio, M.; Santagostino, M. A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid ( IBX ) Iodoxybenzoic Acid 1 ), Has Been Known for More than a Century , Although Its Presence on the Scene of Organic Synthesis Has Remained Limited Primarily Due to Its In 1983 , Dess and Martin Reported Tha. *J. Org. Chem* **1999**, *64*, 4537–4538.
- (299) Mohamady, S.; Desoky, A.; Taylor, S. D. Sulfonyl Imidazolium Salts as Reagents for the Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside Polyphosphates and Their Conjugates. *Org. Lett.* **2012**, *14* (1), 402–405.
- (300) Sarac, I.; Meier, C. Efficient Automated Solid-Phase Synthesis of DNA and RNA 5'-Triphosphates. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (46), 16421–16426.
- (301) <http://www.sigmaaldrich.de>, **17.03.2021**.

(302) <http://www.merck-chemicals.de>, **17.03.2021**.

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die interessante, herausfordernde Themenstellung, sowie den zur Bearbeitung gewährten wissenschaftlichen Freiraum.

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Guse danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison und Herrn Dr. Thomas Hackl für die Teilnahme am Dissertationskolloquium bedanken.

Allen Mitgliedern der MS- und NMR-Abteilung unter der Leitung von Frau Dr. Maria Riedner, sowie Herrn Dr. Thomas Hackl danke ich darüberhinaus für die Messung von zahlreichen Spektren und die dabei gewährten Extrawünsche. Desweiteren gilt mein Dank dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. A. Guse für die Durchführung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging und des regen, unbeschwertem wissenschaftlichen Austausches.

Außerdem sei den Studenten, die experimentelle Arbeiten für mich durchgeführt haben, für die tatkräftige Unterstützung und der feuchtfröhlichen, sozialen Interaktion gedankt. Hervorzuheben sind an dieser Stelle Giuliano, Timo, Anton, Djawid und Elmar.

Dem gesamten Arbeitskreis gilt mein besonderer Dank, nicht nur für ein exzellentes Arbeitsklima, sondern auch für zahlreiche legendäre Abende, wobei jeder der aktuellen oder auch ehemaligen Mitglieder des AckerMeier eine persönliche, unverwechselbare Note für eine besondere unvergleichlich positive Arbeits- und Freizeitatmosphäre beigetragen hat.

Für die kritische und zügige Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich bei Tobias Schneider, Julian Witt und Dr. Denise Oetzmann bedanken.

Insbesondere bei meinem langjährigen Laborpartner und Dauerbegleiter im Studium Alexander Laubach möchte ich mich für eine unvergessene Zeit auch neben der Universität bedanken.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Freundin Tascha, welche mir seit dem 3.Semester des Studiums eine gewisse Leichtigkeit verliehen hat und zudem motivierend zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich natürlich bei meiner Familie bedanken, welche mich bedingungslos während des gesamten Studiums unterstützt hat. An dieser Stelle nochmal **Vielen Dank** an alle....!



## 11 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