

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Weiterentwicklung des epigenetischen AML Wirkstoffs cAzadC für die biologische und analytische Anwendung

Corinna Caroline Pleintinger (geb. Sommermann)

aus

Naila, Deutschland

2024

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 25.04.2024

Corinna Caroline Pleintinger

Dissertation eingereicht am: 26.04.2024

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Dr. Pavel Kielkowski

Mündliche Prüfung am: 11.06.2024

This work is licensed under CC BY-SA 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt.

Publikationen

F. R. Traube, N. F. Brás, W. P. Roos, C. C. Sommermann, T. Diehl, R. J. Mayer, A. R. Ofial, M. Müller, H. Zipse, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202200640.

Konferenzbeiträge

C. C. Pleintinger, Poster „New Epigenetic Anti Leukemia Drug Cures Mouse in Xenograft Model“: *Bioinspired Complex Systems from Basic Science to Practical Applications* **11/2022**, Neve Ilan, **Israel**.

THE ROAD GOES EVER ON AND ON
DOWN FROM THE DOOR WHERE IT BEGAN.
NOW FAR AHEAD THE ROAD HAS GONE,
AND I MUST FOLLOW, IF I CAN,
PURSUING IT WITH EAGER FEET,
UNTIL IT JOINS SOME LARGER WAY
WHERE MANY PATHS AND ERRANDS MEET.
AND WHITHER THEN? I CANNOT SAY.

- BILBO BAGGINS -

Danksagungen

In den letzten vier Jahren durfte ich fachlich aber auch persönlich viel wachsen und mich weiterentwickeln. Auf dieser akademischen Reise mit allen ihren Höhen und Tiefen wurde ich von vielen Freunden und Kollegen unterstützt, die ganz entscheidend zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen und nachfolgend genannt werden:

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PROF. DR. THOMAS CARELL bedanken: Du hast mich in eine Linie vieler talentierter Doktoranden gestellt, deren Erbe ich dankbar weiterführen durfte. Die Möglichkeit, unter deiner Anleitung sehr frei zu arbeiten in Kombination mit der außerordentlichen Zusammenarbeit innerhalb der Gruppe haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Deine Motivation und Begeisterung war sehr ansteckend und so konnte ich inspiriert und mit viel Elan das Projekt voranbringen.

DR. PAVEL KIELKOWSKI danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens und den damit verbundenen zeitlichen Aufwand der damit auf sich genommen wurde. Zusätzlich möchte ich auch allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission, JUN.-PROF. DR. FRANZISKA TRAUBE, PROF. DR. FRANZ BRACHER, PROF. DR. OLIVER TRAPP und PROF. DR. ANNE SCHÜTZ, für ihre Zeit, konstruktiven Rückmeldungen und ihre gründliche Prüfung meiner Arbeit danken.

Für all die Hilfe bei biologisch/biochemischen Fragestellungen sowie bei all den großen und kleinen Alltagsproblemen möchte ich mich herzlich bei DR. MARKUS MÜLLER bedanken. Deine Hilfe insbesondere auch bei der Korrekturlesung dieser Arbeit war von unschätzbarem Wert und hat dazu beigetragen, dass die Arbeit höchsten akademischen und wissenschaftlichen Standards entspricht. Ohne Frau SLAVA GÄRTNER und DR. NADA RADDAOUI wäre die Anstellung an der Universität wahrscheinlich nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr euch um den reibungslosen Ablauf jeglicher Bürokratien gekümmert habt. KERSTIN KURZ, unserer Labor- und Pflanzen-Mama danke ich für die große Unterstützung bei Bestellungen jeglicher Art, aber auch für ihre magische Fähigkeit jegliche Ersatzteile auf Vorrat zu haben.

Ein weiteres Team die für die Arbeit im Labor essentiell waren, sind die Mitarbeiter der chemischen Ver- und Entsorgung: MICHAEL GAYER, RONALD SCHÜRER, HEIDI BUCHHOLZ und ROSWITA REINEKE. Ihr habt mich immer mit einem lockeren Spruch begrüßt und habt mir die Beste Handcreme verkauft die super gewirkt hat. Bei CLAUDIA BRACKELMANN konnte ich immer für Bürobedarf und einen kurzen Plausch vorbeikommen. Den Glasbläsern die so oft die Ungeschicklichkeit im Labor ausbaden mussten danke ich, für die schnelle Reparatur jeglicher Scherbenhaufen.

Dank gebührt auch dem cAzadC-Team ohne die dieses feldübergreifende Projekt nicht so reibungslos hätte durchgeführt werden können. Zu Beginn war es vor allem DR. SIMON VETH, der mich bei der chemischen Seite des Projektes unterstützt hat, später auch HANS HURMIZ. Simon, vielen Dank für die aufmunternden Worte, deine ansteckende Motivation und den medizinischen Rat bei kleinen bis mittleren Laborverletzungen. Auf biochemischer Ebene möchte ich mich herzlich bei TINA AUMER und ELSA PEEV bedanken, die jegliche Moleküle sehr behutsam in der Zellkultur getestet haben und mir auch einen Crashkurs in Biochemie gegeben haben. Für die quantitative Analyse und Auswertung von mehreren tausend Proben, danke ich DR. MATTHIAS HEIB. Dein Witz, deine Leichtigkeit und deine Barkeeper-Fähigkeiten

haben zu einem super Arbeitsklima beigetragen. Nicht vergessen werden sollen hier auch JUN.-PROF. DR. FRANZISKA TRAUBE und DR. BINJE VICK die den Überblick über jegliche PDX-Studien gehabt haben. Danke, dass ihr die Arbeit gesehen habt, die in der chemischen Synthese steckt und damit zu einem effektiven Arbeiten beigetragen habt.

Bei meinen Laborkollegen aus Labor F4.004 und L03.022 möchte ich mich herzlich für die gemeinsame Zeit bedanken. Es war mir ein Fest mit euch das Labor zu teilen. Zunächst soll ANNIKA TÖLKE genannt werden, mit der ich nicht nur die Mittagspause sondern auch den gleichen Musikgeschmack geteilt habe. Der Mix aus High School Musical und Deutsch-Rap war sicherlich nicht für alle immer leicht anzuhören, aber beschwert hat sich auch niemand. Bei ANDREAS REICHL als Schreibtisch-Buddy – ähm – Schreibtisch-Kamerad bedanke ich mich für viele lehrreiche Unterhaltungen über deutsche Sprache, die Überdosierung von Anglizismen und die Organisation diverser Ausflüge zu klassisch bayrischen Volksfesten. KATARINA PAPA, unserer Labor-DJane danke ich für die besten Playlists und guten Snacks aus Griechenland die uns den Laboralltag im wahrsten Sinne des Wortes versüßt haben. Auch genannt werden sollen hier JOHANN DE GRAAFF, der mir über die letzten Jahre immer mit einem offenen Ohr und der passenden Menge an Ironie begegnet ist. Auch für das Korrekturlesen und dein konstruktives Feedback möchte ich mich hier bedanken. DR. ANNA-LENA J. HALBRITTER war mir in den letzten Jahren eine sehr große Hilfe. Danke für dein offenes Ohr, viele gute Ideen zur Behebung verschiedenster Probleme im Labor und dein gründliches Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich konnte sehr viel von dir lernen und im Gegenzug dir die deutschen Feste und Traditionen näherbringen. Ich hoffe dass das Leben uns nicht zu weit auseinander treibt und falls schon, sehen wir uns sicher irgendwann in Island.

Dankbar bin ich auch für alle Freundschaften die ich während meines Studiums in Bayreuth schließen durfte und die mich auch während meines PhDs begleitet haben. Danke an NADINE RASSMANN, ANDREAS ERHARDT, SEBASTIAN WEIß und natürlich PAULINA. Wir durften 5 Jahre zusammen im Labor stehen, uns von blutigen Anfängern zu Doktoranden hocharbeiten und uns gegenseitig durch die schönen und schweren Zeiten begleiten. Vielen Dank, dass ihr immer an meiner Seite wart und das auch die räumliche Distanz unseren Freundschaften nicht geschadet hat.

Großer Dank gebührt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern GEORG und REGINE SOMMERMANN, die mich finanziell aber auch emotional während meines Studiums unterstützt haben. Danke, dass ich bei euch immer wieder nach Hause kommen konnte, mit aufmunternden Worten versorgt wurde und immer mit vollen Taschen fahren durfte.

Abschließend danke ich der wichtigsten Person in meinem Leben, meinem Mann DR. MORITZ PLEINTINGER, der mir in den letzten Jahren ein Fels an meiner Seite war und mich in allen Formen unterstützt hat. Du bist mir immer mit Ruhe, Geduld und viel Verständnis begegnet, hast mich zum Lachen aber auch Nachdenken gebracht und warst der perfekte Ausgleich nach einem langen Arbeitstag. Ich durfte mit dir Städte und Länder bereisen, nur um am Ende doch wieder in Bayreuth zu sitzen. Nur mit dir und deiner Hilfe konnte diese Arbeit werden was sie ist. Ich bin stolz dich meinen Mann nennen zu dürfen und freue mich weiter gemeinsam mit dir durch das Leben zu tanzen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	III
Summary	V
1 Einleitung.....	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	2
2.1 Epigenetische Modifikationen.....	2
2.2 DNA-Methylierung und ihr Einfluss auf die Genexpression	5
2.3 AML und die Herausforderungen bei deren Behandlung	10
2.4 Zusammenhang zwischen AML und DNA-Methylierung.....	15
2.5 Hypomethylierende epigenetische Wirkstoffe gegen AML	19
3 Zielsetzung.....	25
4 Ergebnisse und Diskussion	26
4.1 Wirkung von cAzadC auf unterschiedliche Tumorzellen.....	26
4.1.1 Synthese von cAzadC.....	27
4.1.2 Zelllinien Screening und <i>in vivo</i> Studien mit cAzadC.....	30
4.2 Optimierung des therapeutischen Effekts durch Prodrugs.....	36
4.2.1 Synthese der Ester-Prodrugs	37
4.2.2 Untersuchung der Ester-Prodrugs in unterschiedlichen Zelllinien.....	42
4.2.3 Synthese der Phosphat-Derivate.....	44
4.2.4 Untersuchung der Phosphat-Derivate und Primer Extension Studie.....	48
4.3 Notwendigkeit von isopenmarkierten Massestandards.....	51
4.3.1 Synthese der Massestandards.....	51
4.3.2 Quantifizierung der DNA-Inkorporation mittels Triple-Quadrupol-MS	62
4.4 Untersuchung zellulärer Prozesse	66
4.4.1 Synthese der Biotin- und Click-Verbindungen.....	67
4.4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus durch <i>Protein Fishing</i>	74
4.5 Chemischer Einbau von cAzadC in einen DNA-Strang.....	76
4.5.1 Synthese des Phosphoramidits und Einbau via DNA-Festphasensynthese	79
4.5.2 Zukünftige Studien mithilfe des synthetischen DNA-Strangs.....	85
5 Fazit und Ausblick.....	88
6 Experimenteller Teil	89
6.1 Methoden und Materialien	89
6.2 Synthese von cAzadC.....	94
6.3 Synthese der Prodrugs	106

6.4	Synthese der Isotopenstandards.....	118
6.5	Synthese von Derivaten für biochemische Analysen	131
6.6	Synthese des Phosphoramidits	136
7	Publikationen.....	139
8	Literaturverzeichnis.....	159
	Abkürzungsverzeichnis.....	VII

Zusammenfassung

Leukämien zählen zu den am schwierigsten zu behandelnden Krebsarten, da diese nicht wie solide Tumore lokalisiert auftreten und nicht chirurgisch entfernt werden können, sondern das gesamte blutbildende System betreffen. Die Vielzahl der molekularen Mechanismen, die die zugrundeliegenden onkogenetischen Veränderungen hervorruft, erschwert zusätzlich die gezielte Behandlung dieser Krankheit. Da Leukämien häufig erst in einem Alter von > 65 Jahren diagnostiziert werden, sind viele der Patienten nicht für eine intensive toxische Chemotherapie geeignet. Auf der Suche nach alternativen molekularen Zielen für eine ideale Leukämie-Therapie fiel der Fokus der Wissenschaft auf die epigenetische DNA-Methylierung, durch welche die Genexpression gezielt beeinflusst werden kann. Da der Zusammenhang zwischen hypermethylierten Genpromoterregionen und der onkogenen Hämatopoese bereits bekannt war, wurden Wirkstoffe entwickelt, welche diese übermäßige Methylierung durch Inhibieren der Methyltransferasen reduzieren. Dadurch reaktivierte Tumorsuppressorgene und der entstehende DNA-Schaden sorgen zusammen für ein selektives Absterben der Krebszelle. In diesem Kontext werden bisher vor allem die hypomethylierenden Substanzen, bzw. Arzneimittel (HMA) Azacytidin und Decitabin in der klinischen Therapie angewendet. Obwohl diese HMAs gute Erfolge bei der Reduktion der Tumormasse erzielen, bleiben zwei große Nachteile bestehen, welche ihren therapeutischen Einsatz drastisch limitieren: Einerseits sind die bisher eingesetzten Substanzen hydrolytisch sehr instabil und zerfallen sowohl in wässriger Infusionslösung als auch in der physiologischen Umgebung des Blutplasmas zu toxischen Degradierungsprodukten; andererseits konnte über die letzten Jahre immer häufiger die Ausbildung von sowohl primären als auch sekundären Resistenzen beobachtet werden.

Beides konnte mit dem in der Arbeitsgruppe von PROF. CARELL entwickelten carbacyclischen Derivat cAzadC (**1**) eindrucksvoll reduziert werden. Dieses ist, wie die beiden Wirkstoffe Azacytidin und Decitabin auch ein Nukleosid-Analoga, welches sich von dem DNA-Baustein Deoxycytidin ableitet. Die minimale Veränderung durch den Austausch des Riboserings durch einen Cyclopentan-Ring (Carbacyclus) führt dabei zu einer 60-fach erhöhten Stabilität gegenüber hydrolytischem Zerfall, während durch die 5-Aza-Base ein analoger Wirkmechanismus möglich ist. Diese verbesserte Eigenschaft gegenüber den bereits eingesetzten Wirkstoffen macht cAzadC zu einer attraktiven Leitstruktur, welche die Leukämie-Therapie revolutionieren kann.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb das chemische und biochemische Verhalten dieses vielversprechenden carbacyclischen Analogons untersucht. Zunächst wurden die Reaktionsbedingungen der Synthese von cAzadC untersucht und variiert, wodurch eine Verbesserung der Gesamtausbeute von 11 % auf 15 % erzielt werden konnte. Der hypomethylierende Effekt von cAzadC konnte daraufhin in 14 verschiedenen Zelllinien gezeigt und die antitumorale Wirkung in PDX-Studien *in vivo* bestätigt werden. Anschließend wurden verschiedene Prodrug-Derivate synthetisiert, um eine verbesserte Aufnahme ins Zellinnere zu erreichen und zu untersuchen, ob damit auch eine Steigerung der Aktivität einhergeht. Sieben verschiedene Prodrug-Einheiten konnten erfolgreich an die 5'-Position des Carbacyclus angebracht werden, wobei neben klassischen Ester Verknüpfungen auch Prodrug-Einheiten mit maskiertem Monophosphat synthetisiert wurden (**Abbildung I**). Obwohl es sich um kein klassisches Prodrug handelt, wurde zusätzlich auch das Triphosphat hergestellt und ebenfalls auf seine Aktivität hin untersucht. Um anschließend den Einbau von cAzadC in die DNA genau zu quantifizieren, wurden weitere Derivate mit schweren Isotopen für die Verwendung als interner Massenstandard zur anschließenden Analyse mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie synthetisiert. Sieben verschiedene Derivate wurden erfolgreich hergestellt, wobei neben vier cAzadC-Standards auch drei Decitabin-Standards entwickelt wurden. Einzig der ¹⁵N-markierte Standard lag nur als cAzadC-Derivat

vor. Darüber hinaus wurde begonnen durch gezielte Derivatisierung den Wirkmechanismus und die dabei wichtigen Proteininteraktionen zu analysieren, wofür sowohl Decitabin als auch cAzadC an der C5'-Position mit Biotin versehen wurden. Abschließend wurde das cAzadC-Phosphoramidit zur Inkorporation in einen synthetischen DNA-Strang hergestellt. Auf Grund der anfänglich genannten Instabilität von Decitabin ist eine derartige Inkorporation nur mit dem carbacyclischen Analogon möglich. Die Synthese des Phosphoramidits konnte dabei erfolgreich optimiert werden und nach Korrektur verschiedener Parameter war auch der Einbau via Festphasensynthese erfolgreich. Die Entschützung des Strangs stellte eine weitere große Herausforderung dar, welche durch Screening verschiedener Reaktionsbedingungen ebenfalls gelöst werden konnte.

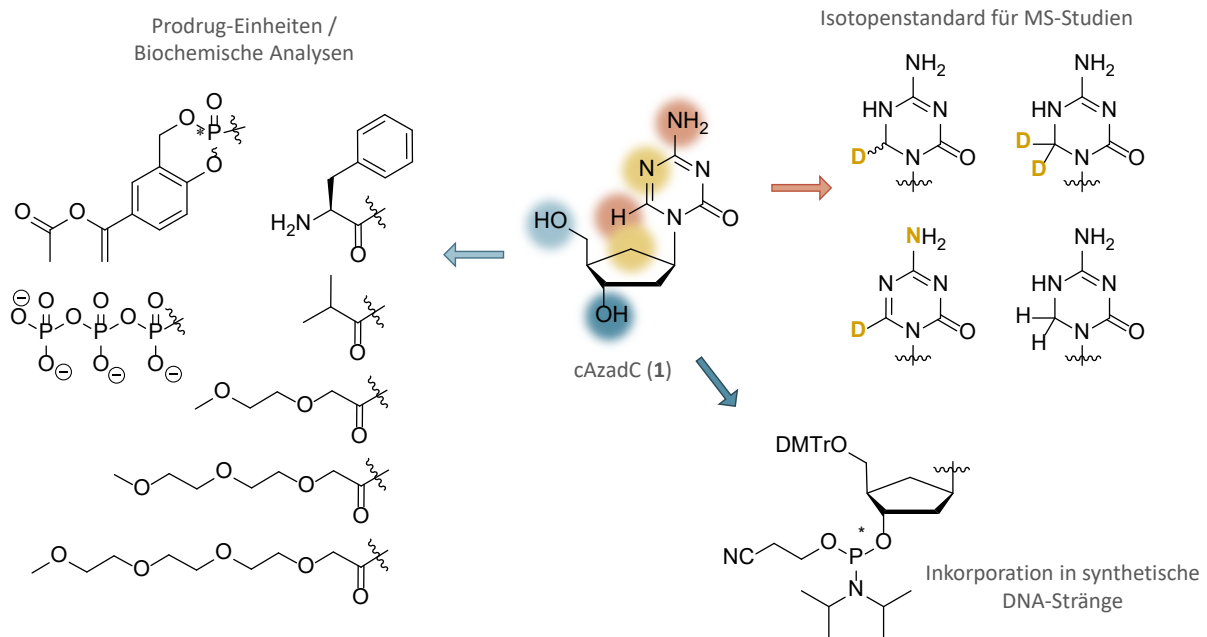


Abbildung 1 Überblick über die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Modifikationen an cAzadC (1). In Rot sind die Modifikationen der Aza-Base dargestellt, deren jeweils schwere Isotope gelb markiert sind. In Blau sind die Modifikationen der Hydroxygruppen hervorgehoben die sowohl mit verschiedenen Prodrug-Einheiten versehen wurden als auch für die Synthese eines Phosphoramidits entsprechend modifiziert wurden. Gelbe Markierungen zeigen die chemischen Unterschiede von cAzadC zum natürlichen Nukleosid Deoxycytidin.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden also insgesamt cAzadC und 13 cAzadC-Derivate sowie 5 Decitabin-Derivate erfolgreich synthetisiert und sowohl in biochemischen Untersuchungen eingesetzt als auch in quantitativer massenspektrometrischer Analyse erfolgreich getestet. Der hypomethylierende und antitumorale Effekt von cAzadC konnte dabei sowohl in Zellstudien als auch in PDX-Mausstudien eindrücklich gezeigt werden. Mit der Herstellung spezieller Derivate sowie eines synthetischen DNA-Strangs wurde darüber hinaus das Fundament für die weiterführende Aufklärung des detaillierten Wirkmechanismus und der dabei stattfindenden Proteinwechselwirkungen gelegt.

Summary

Leukemias are among the most difficult types of cancer to treat, as they are not localized like solid tumours and cannot be surgically removed, but affect the entire hematopoietic system. The large number of molecular mechanisms that cause the underlying oncogenetic changes also makes targeted treatment of this disease more difficult. As leukemias are often diagnosed at an age of > 65 years, many patients are not suitable for intensive toxic chemotherapy. In the search for alternative molecular targets for an ideal leukemia therapy, researchers focused on epigenetic DNA methylation, which can be used to specifically influence gene expression. Since the connection between hypermethylated gene promoter regions and oncogenic haematopoiesis was already known, active substances were developed that reduce this excessive methylation by inhibiting the methyltransferases. The reactivated tumor suppressor genes and the resulting DNA damage together ensure selective death of the cancer cell. In this context, the hypomethylating agents (HMAs) Azacytidine and Decitabine have been used in clinical therapy to date. Although these HMAs achieve good results in reducing the tumor burden, two major disadvantages remain, which drastically limit their therapeutic use: On the one hand, these substances are hydrolytically very unstable and decompose into toxic degradation products both in aqueous infusion solutions and in the physiological environment of blood plasma; on the other hand, the development of primary and secondary resistance has been observed with increasing frequency in recent years.

Both could be impressively reduced with the carbacyclic derivative cAzadC (**1**) developed in PROF. CARELL's research group. Like the two active compounds Azacytidine and Decitabine, this is also a nucleoside analog, which is derived from the DNA building block Deoxycytidine. The minimal modification by replacing the ribose ring with a carbacycle leads to a 60-fold increase in stability against hydrolytic degradation, while the 5-aza base enables an analogous mechanism of action. This improved property compared to the currently used substances makes cAzadC an attractive lead structure that can revolutionize leukaemia therapy.

The chemical and biochemical understanding of this promising carbacyclic analog was therefore investigated as part of this dissertation. First, the reaction conditions for the synthesis of cAzadC were inspected and varied, resulting in an improvement in the overall yield from 11 % to 15 %. The hypomethylating effect of cAzadC was then demonstrated in 14 different cell lines and the antitumor effect was confirmed in PDX studies *in vivo*. Various prodrug derivatives were then synthesized in order to achieve improved uptake into the cell interior and to investigate whether this was also accompanied by an increase in activity. Seven different prodrug units were successfully attached to the 5' position of the carbacycle, whereby in addition to classical ester linkages, a prodrug unit with a masked monophosphate was also synthesized (**Figure I**). Although it is not a classical prodrug, the triphosphate was also produced and its activity was also investigated. In order to subsequently quantify the incorporation of cAzadC into DNA precisely, further derivatives with heavy isotopes were synthesized for use as internal mass standards for subsequent analysis by mass spectrometry. Seven different derivatives were successfully produced, whereby three Decitabine standards were developed in addition to four cAzadC standards. Just the ¹⁵N-labeled standard was only available as a cAzadC derivative. In addition, the mechanism of action and the protein interactions were analyzed by targeted derivatization, for which both Decitabine and cAzadC were provided with biotin at the C5' position. Finally, the cAzadC phosphoramidite was prepared for incorporation into a synthetic DNA strand. Due to the initially mentioned instability of Decitabine, such incorporation is only possible with the carbacyclic analog. The synthesis of the phosphoramidite was successfully optimized and, after correction of various parameters, incorporation via solid-phase synthesis was also successful. The

deprotection of the strand was another major challenge, which was also solved by screening different reaction conditions.

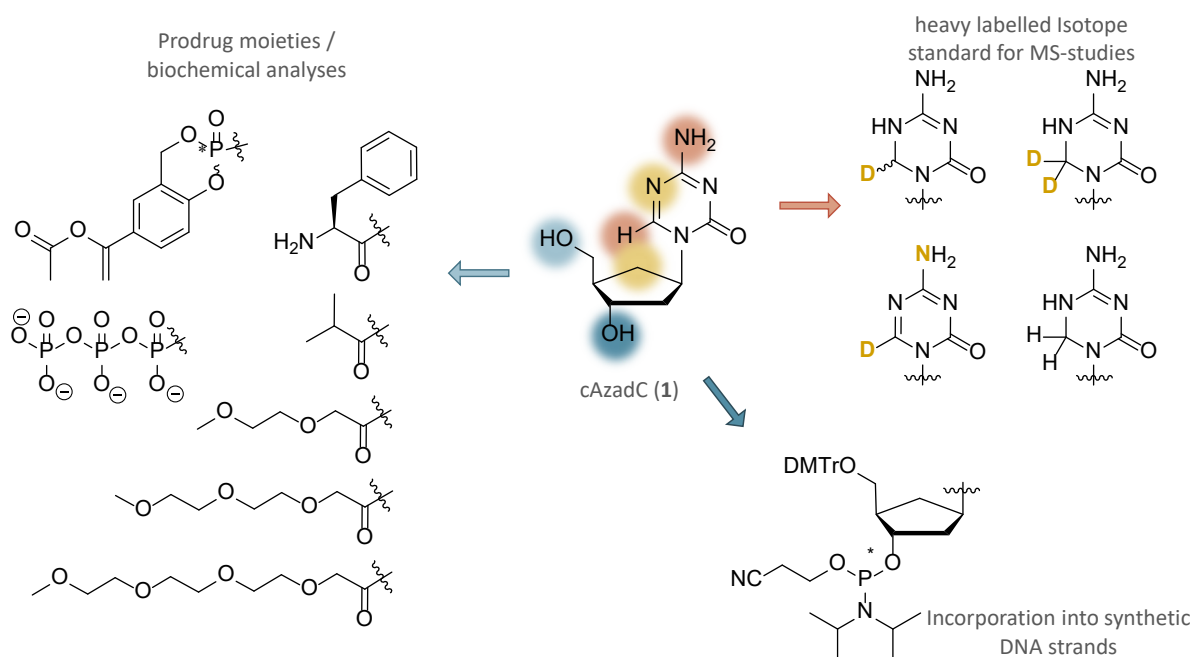


Figure 1 Overview of the modifications to cAzadC (1) carried out as part of this dissertation. The modifications of the aza-base are shown in red, with the respective heavy isotopes marked in yellow. The modifications of the hydroxy groups are highlighted in blue, which were both provided with different prodrug units and modified accordingly for the synthesis of a phosphoramidite. Yellow highlights show the chemical differences between cAzadC and the natural nucleoside deoxycytidine.

A total of cAzadC and 13 derivatives thereof as well as 5 Decitabine derivatives were successfully synthesized and used in biochemical studies as well as successfully tested in quantitative mass spectrometric analysis within the scope of this dissertation. The hypomethylating and antitumor effect of cAzadC was impressively demonstrated in cell studies as well as in PDX mouse studies. In addition, the synthesis of special derivatives and a synthetic DNA strand laid the foundation for further investigations into the detailed mechanism of action and the protein interactions involved.

1 Einleitung

Krebs ist bis heute eine der häufigsten Todesursachen weltweit.^[1] Allein im Jahr 2020 sind ca. 10 Millionen Menschen dieser Krankheit erlegen. Doch Krebs ist nicht gleich Krebs: Zum jetzigen Stand sind mehr als 300^[2] verschiedene Varianten bekannt, wobei die Mortalität 2020 bei Lungen-, Darm- und Leberkrebs am größten war. Neben soliden Tumoren sind auch Leukämien, d.h. nicht-solide Tumore, bekannt, welche das blutbildende System betreffen. Im Unterschied zu invasiven Karzinomen bei welchen die Möglichkeit der chirurgischen Tumorresektion besteht, ist dies bei den ursprünglich im Knochenmark entstehenden Leukämien nicht möglich. Jedes Jahr wird weltweit bei ca. 470 000 Menschen Leukämie diagnostiziert, was 2,5 % aller neuen Krebserkrankungen ausmacht.^[3]

Ein weites Spektrum an Krebsmedikamenten wurde in den letzten Dekaden bereits erforscht, welches inzwischen über 1600 verschiedene Wirkstoffe gegen verschiedene Tumorerkrankungen beinhaltet.^[4] 133 dieser Wirkstoffe sind für den Einsatz bei Leukämien, 77 für hämatologische Malignome und 54 für das myelodysplastische Syndrom (MDS) entwickelt worden. Der Anwendung dieser Medikamente ist es zu verdanken, dass die Zahl der Krebstoten seit dem Maximum 1991 um 33 % reduziert werden konnte. Obwohl diese statistischen Trends den großen Fortschritt der Medizin widerspiegeln, darf nicht vergessen werden, dass bei seltenen oder schwer zu behandelnden Varianten immer noch viele Patienten der Krankheit auf Grund von limitierten Therapiemöglichkeiten erliegen. Die kontinuierliche Forschung und Entwicklung geeigneter Wirkstoffe ist somit ein wichtiger Pfeiler eines proaktiven Gesundheitssystems. Das immer bessere Verständnis der zugrundeliegenden onkologischen Veränderungen, sowie der technologische Fortschritt machten es möglich, neue molekulare Ziele für Medikamente zu identifizieren und die Wirkstoffe für maximale Effizienz zu designen.

Einen vielversprechenden Ansatz eröffnete hierbei in den 1940er Jahren die Entdeckung des Epigenoms, d.h. die vererbliche Abwandlung der Genaktivität ohne Veränderung der DNA-Sequenz selbst. Um den großen Effekt dieses molekularen Mechanismus auf das Tumorwachstum therapeutisch zu nutzen, wurden die DNA-Methylierung, Chromatin-Umstrukturierung und miRNAs in den Fokus der Anti-Krebs Therapie gerückt.^[5] Die technische Möglichkeit durch gezielte Einflussnahme auf die DNA-Aktivität die normale Zellfunktion wieder herzustellen, bereitete den Weg für die Entwicklung vielfältiger epigenetischer Wirkstoffe. Hierbei half insbesondere die technische Umsetzung von DNA-Sequenzierung, durch die das gesamte Genom analysiert werden konnte, um so den Wirkmechanismus neuer Wirkstoffe mit hoher Präzision zu untersuchen. Da die spezifische Ausprägung des Epigenoms allerdings dynamisch ist und sich über den Krankheitsverlauf verändern kann, ist eine flexible Anpassung der Therapie unerlässlich.

Die für die Behandlung von Leukämien eingesetzten epigenetischen Medikamente besitzen trotz guter klinischer Erfolge einige Nachteile, die deren Einsatz limitieren. Deshalb besteht ein grundlegendes Forschungsinteresse darin, diese Wirkstoffe anzupassen und weiterzuentwickeln, um möglichst viele dieser Nachteile zu eliminieren. Dieses Bestreben führte im Jahr 2019 zur Entwicklung von cAzadC, einem carbacyclischen 2'-Deoxy-5-Aza-Cytidin Derivat.^[6] Ähnlich wie dessen Vorläufer Decitabin, zeigt dieser Wirkstoff gute antitumorale Eigenschaften, birgt aber auf Grund seiner erhöhten Stabilität ein weit größeres therapeutisches Potential. Bevor dieses im klinischen Kontext tatsächlich freigesetzt werden kann, ist es notwendig die grundsätzlichen Kernfragen in Bezug auf die Wirkung von cAzadC zu klären. Wie stark wirkt es im Vergleich zu Decitabin? Kann es nur gegen Leukämien oder auch gegen andere Tumorarten eingesetzt werden? Lässt sich seine Potenz durch einen Prodrug-Ansatz verstärken? Was ist der allgemein zugrundeliegende Wirkmechanismus? Um die beschränkten Therapiemöglichkeiten von Leukämien weiterzuentwickeln, werden in dieser Dissertation genau diese Fragen untersucht und weitestgehend beantwortet.

2 Theoretischer Hintergrund

Dieses Kapitel legt sowohl die theoretischen Grundlagen der Epigenetik als auch die aktuellen Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet dar. Dies bildet die Basis für die in Kapitel 4 dargestellten weiterführenden Forschungsarbeiten im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf den epigenetischen Modifikationen und deren Einfluss auf die Genexpression sowie die Hintergründe und Eigenheiten von akuter myeloischer Leukämie (AML). Das Kapitel endet mit der Beschreibung von epigenetischen Wirkstoffen, explizit Decitabin und cAzadC, deren Wirkmechanismen und den damit verbundenen Vorteilen und Herausforderungen.

2.1 Epigenetische Modifikationen

Die Namen WATSON und CRICK sind heute auch außerhalb naturwissenschaftlicher Kreise weithin bekannt. Diese große Bekanntheit geht auf die bahnbrechenden Studien zurück, in denen es ihnen 1953 gelang, aufbauend auf den Arbeiten von AVERY *et al.*^[7] erstmals die Struktur der DNA^[8] zu entschlüsseln. Der Name WADDINGTON ist hingegen trotz ähnlich zukunftsweisender Entdeckungen auf diesem Gebiet allgemein eher unbekannt. Dabei war er es, der bereits 1942 den Begriff Epigenetik ganz entscheidend geprägt und damit den methodischen Blick für die Wichtigkeit chemischer Zusammenhänge jenseits der bloßen DNA-Sequenz geweitet hat.^[9] In seinen frühen Studien an Fruchtfliegen beschäftigte sich der Biologe mit dem Einfluss des Genotypen, also dem Aufbau der DNA, auf den Phänotypen, dem Erscheinungsbild, und fasst diesen unter dem Begriff Epigenotyp mit folgenden Worten zusammen: „*An epigenotype consists of a number of series of developmental processes each of which involves the balanced interaction of several reactants...*“.^[10] Damit hat er die epigenetischen Prozesse als Gegenstand weiterführender biologischer und chemischer Forschung erschlossen, welche im Folgenden genauer betrachtet und erklärt werden.

Der große Einfluss von epigenetischen Prozessen lässt sich am besten am Beispiel der humanen Zelldifferenzierung während der Embryogenese verdeutlichen. Nachdem Oocyte und Spermium sich zur ersten diploiden Zygote zusammengeschlossen haben, bilden sich nach Zellteilung die ersten Blastomere (**Abbildung**).^[11] Ab einer Größe des Embryos von acht Zellen, ungefähr drei Tage nach Befruchtung, setzt schließlich die zygotische Genom-Aktivierung (ZGA) ein, die es dem ersten Zellenkomplex ermöglicht, sich von der mütterlichen Keimzelle zu einem vollständigen Embryo zu entwickeln.^[12]

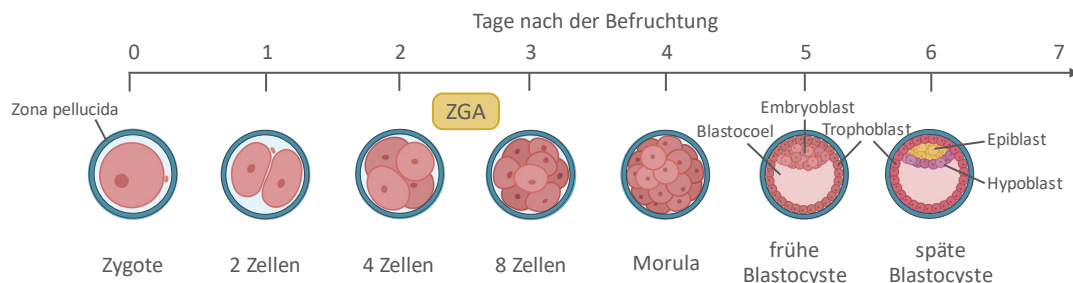


Abbildung 1 Zeitlicher Überblick der verschiedenen Zellstadien und deren Differenzierung innerhalb der ersten Woche, ausgehend von der Befruchtung einer menschlichen Eizelle. Ab einer Größe von acht Zellen setzt die zygotische Genom-Aktivierung (ZGA) ein, welche die vollständige Embryonalentwicklung, ausgehend von der mütterlichen Keimzelle ermöglicht. Abbildung adaptiert von GERRI *et al.*^[11]

Dies ist der Zeitpunkt, an dem sich die bis dahin totipotenten Zellen in verschiedene Zelltypen aufspalten. Bei der ersten Zelldifferenzierung bilden sich drei Zelltypen: Trophoblasten,^[13] Epiblasten und primitives Endoderm.^[14] Die ersten beiden verbinden den Embryo mit der Gebärmutter und tragen zu

Bildung der Plazenta bei. Der dritte Zelltyp trägt als einziger zur tatsächlichen Embryonalentwicklung bei und ist somit eine pluripotente Stammzelle. Hat sich die befruchtete Eizelle nach 6-7 Tagen in der Gebärmutter eingenistet, so beginnt die eigentliche Differenzierung der primordialen Stammzellen und der Embryo kann sich vollständig entwickeln.^[15-16]

All diese Zellentwicklungen und -differenzierungen sind auf Grund hochkomplexer epigenetischer Zellregulatorik möglich.^[17] Darunter zählen neben der ZGA auch die X-Chromosom-Deaktivierung,^[18-19] welche den X-Chromosomenüberschuss durch gezielte Inaktivierung mittels Heterochromatin-Bildung ausgleicht, die autosomale Prägung,^[20] bei der gezielt ein Allel des Elternteils deaktiviert wird und nur das andere aktiv bleibt und die Wiederherstellung der Telomerlänge,^[21] welche stark zwischen männlicher und weiblicher Zelle variiert und so entsprechend bei embryonalen Zellen neu eingestellt werden muss. Auch die Reprogrammierung^[22] für die Herstellung des totipotenten Status der Zelle, das *Gene-Bookmarking*,^[23] das den Erhalt des Phänotypen während der Zellteilung gewährleistet, die Transvektion,^[24-25] also die Beeinflussung eines homologen Chromosoms durch ein Allel, die Paramutation,^[26] d.h. vererbare Veränderungen der Genregulation, und das *Gene Silencing*,^[27] die Deaktivierung bestimmter Gene sind epigenetisch regulierte Mechanismen. Während diese Mechanismen grundsätzlich den Körper in seinem Wachstum und seiner reibungslosen Funktion erhalten, so kann deren Störung ebenso zur Karzinogenese beitragen oder teratogene Reaktionen hervorrufen.^[28]

Diese genannten epigenetischen Mechanismen werden durch drei Faktoren beeinflusst und gesteuert: DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Nukleosom-Positionierung (**Abbildung 2**).^[28]

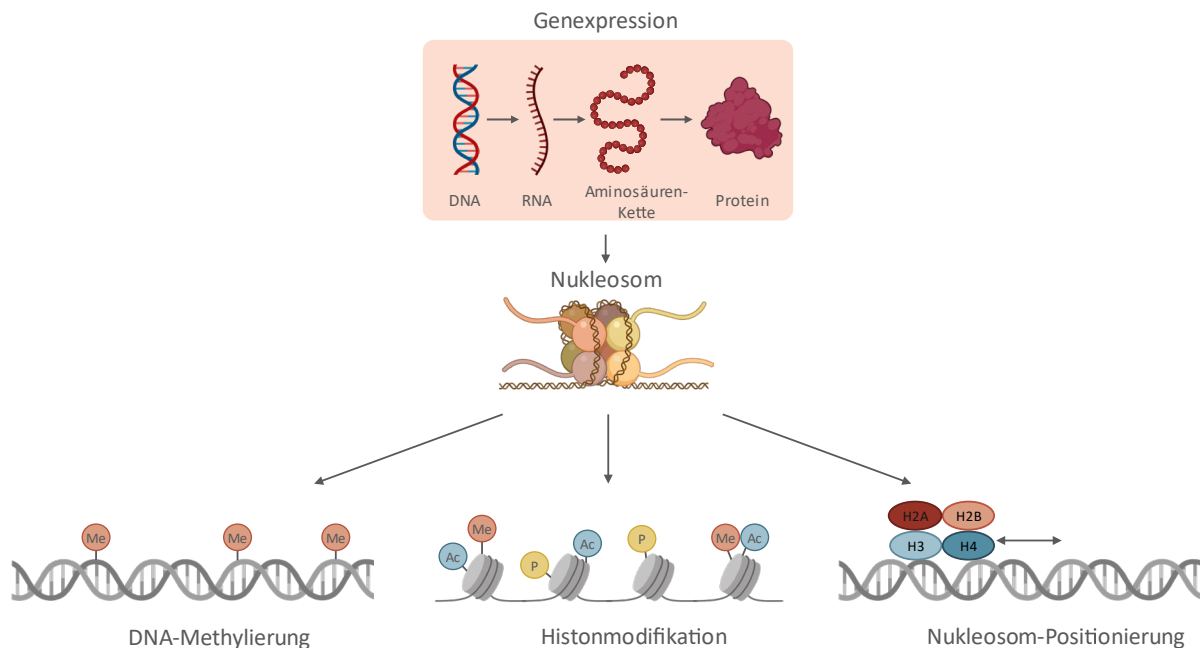


Abbildung 2 Die Steuerung der Genexpression wird direkt durch den Nukleosom-Status beeinflusst. Dieser wiederum kann durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen direkt verändert werden. Zusätzlich kann auch durch die Nukleosom-Positionierung das Ablesen von Genen gesteuert werden. Diese drei Mechanismen bilden somit die Grundlage der epigenetischen Genexpression. Abbildung adaptiert von LODEWIJK *et al.*^[29]

Die als Histone bezeichneten basischen Proteine, auf welche die DNA aufgewickelt wird, können vielen post-transkriptionalen Veränderungen wie Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung unterliegen, um nur einige zu nennen (**Abbildung 3**).^[30] Je nach ihrem transkriptionalen Zustand, welcher direkt von den jeweiligen Modifikationen abhängig ist, kann dieser in zwei Kategorien unterteilt werden. Zum einen kann es sich um aktives Euchromatin handeln, welches häufige Acetylierungen und Trimethylierungen vor allem an H3K4, H3K36 und H3K79 aufweist; zum anderen

kann ein inaktives Heterochromatin vorliegen, welches nur wenige Acetylierungen und dafür mehr Methylierungen an H3K9, H3K27 und H4K20 besitzt.^[28, 31] Die Histone und ihr Aktivitätsstatus spielen so unter anderem bei der DNA-Reparatur,^[32] DNA-Replikation,^[33] transkriptionalen Regulation^[34] und Chromosomen-Kondensation^[33] eine wichtige Rolle.

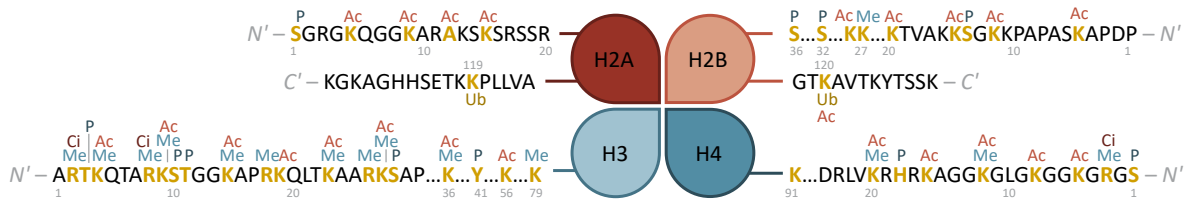


Abbildung 3 Die an den N-terminalen Enden der Histone auftretenden Modifikationen haben einen bedeutenden Einfluss auf die Chromatinstruktur, welche nur in einem offenen Status die Transkription der Gene erlaubt. Die häufigsten Modifikationen und ihre Positionen an den entsprechenden Histon-Proteinen sind hier dargestellt. Abbildung adaptiert von RODRIGUES-PADERES *et al.*^[35] *Abkürzungen:* Me = Methylierung, Ac = Acetylierung, P = Phosphorylierung, Ub = Ubiquinierung, Ci = Citrullinierung.

Die meisten der genannten Modifikationen finden sich an den jeweiligen N-terminalen Histonden und führen letzten Endes entweder zu einer mehr geöffneten, lockeren Form oder zu einer dicht gepackten, geschlossenen Struktur des DNA-Protein-Komplexes.^[35] Je nachdem ist die DNA für die verschiedenen Transkriptions-Enzyme zugänglich oder nicht und entsprechende Gene können so an- und ausgeschaltet werden.^[36]

Neben den Histonmodifikationen ist auch die Position der Nucleosomen, welche als Heterooktamer der einzelnen Histone H2A, H2B, H3 und H4 vorliegen, selbst ausschlaggebend für eine fehlerfreie Transkription.^[28] Typischerweise sitzen an den 5'- und 3'-Ende von Genen keine Nucleosomen, da dieser Platz für den Auf- und Abbau der Transkriptionsmaschine freigehalten wird.^[37] Befinden sich jedoch Nucleosomen um nur 30 Basenpaare (bp) zu nahe an der Transkriptions-Startstelle, so ist die Aktivität der RNA-Polymerase II erheblich eingeschränkt und das folgende Gen kann nicht abgelesen werden.^[38-39] Diese Positionierung wird unter anderem von den DNA-Methylierungsmustern^[40-41] und von besonderen Histon-Varianten gesteuert, welche unabhängig von der DNA-Replikation in das Chromatin eingebaut werden und sich in ihrem Histon-Tail, ihrer Domänen-Struktur und in wenigen zentralen Aminosäuren unterscheiden.^[42] Auch durch miRNA^[43] oder den Chromatin-Remodellierungs-Enzymkomplex^[44] kann die Chromatinstruktur dynamisch angepasst und so die Genexpression gesteuert werden.

Es ist also eindeutig zu erkennen, dass die epigenetische Genregulation in den Zellen ein Zusammenspiel hochkomplexer und sehr präzise Abläufe vieler verschiedener Enzyme beinhaltet, welche die Genexpression synergetisch oder antiszynergetisch steuern. Auf dieser Grundlage kann die anfangs erwähnte Definition von epigenetischen Prozessen noch etwas klarer gefasst werden und wie von EGGER *et al.* als „all meiotically and mitotically heritable changes in gene expression that are not coded in the DNA sequence itself“^[45] oder wie von BIRD *et al.* als „the structural adaptation of chromosomal regions so as to register, signal or perpetuate altered activity states“^[46] beschrieben werden. Unabhängig davon, auf welchem der genannten Eigenschaften der Fokus der Definition liegt, so beschreiben doch alle eine geordnete, von der Basensequenz unabhängige Beeinflussung der genomischen Aktivität. Die letzte genannte epigenetische Steuereinheit, die der DNA-Methylierung wird, da sie im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, im nachfolgenden Kapitel ausführlicher beschrieben.

2.2 DNA-Methylierung und ihr Einfluss auf die Genexpression

Während in Kapitel 2.1 schon die ersten beiden Stellschrauben epigenetischer Regulatorik, Histonmodifikation und Nukleosompositionierung, erklärt wurden, so wird Nachfolgend speziell auf die DNA-Methylierung als eine der fundamentalen Steuerungsmechanismen der Genexpression eingegangen.

Von der enzymatischen DNA-Methylierung sind insbesondere die zwei Basen Adenin und Cytosin betroffen, welche dadurch in N^6 -Methyladenin (**2**),^[47] 5-Methylcytosin (5-mC, **3**) und N^4 -Methylcytosin (**4**) umgewandelt werden können (**Abbildung 4**).^[48] Da N^6 -Methyladenin dabei jedoch hauptsächlich in Bakterien und weniger in Säugetieren auftritt, wird hier der Fokus auf die humanbiologisch relevanteste Cytidin-Modifikation **3** der DNA gelegt.^[49]

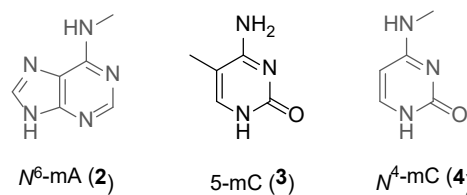


Abbildung 4 Strukturen der natürlichen Derivate der DNA-Basen Adenin und Cytosin nach enzymatischer Methylierung. Während N^6 -mA hauptsächlich in Bakterien vorkommt und N^4 -mC in der Epigenetik keine Rolle spielt, liegt in dieser Arbeit der Fokus auf der für epigenetische Regulierung wichtigsten Modifikation 5-mC (**3**).

Wird die DNA als Ganzes betrachtet, so ist 5-mC (**3**) die mit Abstand am häufigsten natürlich vorkommende Basen-Modifikation, wobei deren Konzentration im Genom über die verschiedenen Körpergewebe nur leicht variiert.^[50] Insgesamt liegt in der globalen DNA etwa 1 mol% des Nukleosids 5-mdC vor,^[50] was einer Methylierung von 4 % aller Cytidine,^[51-52] aber einer Methylierung von 70–80 % aller CpG-Einheiten entspricht.^[53] Das menschliche Genom besitzt etwa 28 Millionen dieser CpG-Einheiten, wobei unterschieden werden muss zwischen stark methylierten einzelnen CpG-Dinukleotiden, welche im ganzen Genom verteilt sind und sehr wenig methylierten CpG-Inseln.^[54] CpG-Inseln sind bis zu mehreren 1000 bp lange Abschnitte der DNA, in denen ein CpG-Anteil von 55–70 % vorliegt^[51] und welche bis zu 70 % der Promoterregionen verschiedener Gene beinhalten.^[55]

Die für die Instandhaltung der Methylierungsmuster verantwortlichen Enzyme können in die drei Klassen *Writers*, *Erasers* und *Readers* eingeteilt werden.^[56] Als *Writer* sind die Enzyme zusammengefasst, welche die Methylgruppen anbringen. Von diesen DNA-Methyltransferasen, kurz DNMT, sind bereits mehrere Varianten, DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L, in Säugetieren entdeckt worden, wovon nur drei, DNMT1, DNMT3A und DNMT3B, enzymatische Aktivität besitzen.^[56] Während DNMT2 auf der tRNA-Ebene aktiv ist und dort Cytosin 38 der tRNA^{Asp} methyliert,^[57] ist DNMT3L selbst katalytisch inaktiv, unterstützt jedoch DNMT3A bei der Methylierung unter Ausbildung von Enzym-Tetrameren.^[58] Diese *Writer*-Enzyme können wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden: Zum einen *de novo*-DNMTs 3A und 3B, welche hauptsächlich in embryonalen Stammzellen vorkommen und für das Einführen neuer Methylymuster verantwortlich sind,^[59] zum anderen *maintenance*-DNMT1, welche nach DNA-Replikation vorherige Methylierungsmuster an hemimethylierten CpG-Stellen vervollständigen.^[60] Die in **Abbildung 5** dargestellten Hauptakteure der entsprechenden Transformation sind jeweils hervorgehoben, während weitere beteiligte Enzyme und deren Isoformen ebenfalls gelistet sind. Die Strukturen beider Enzymklassen unterscheiden sich dabei sehr stark. Während DNMT1 als *maintenance* Methyltransferase neben der *N*-terminalen regulativen Domäne eine DMAP1-, RFTS-, CXXC- und BAH1/2-Domäne besitzt,^[61] weisen DNMT3A und DNMT3B einen variablen *N*-Terminus, PWWP- und ADD-Domänen sowie einen Zink-Finger auf.^[59] Gemeinsam haben beide Klassen, dass die katalytische Einheit am C-Terminus zu finden ist. Während diese bei DNMT1 in die zwei Untereinheiten der eigentlichen Methyltransferase-Einheit sowie in eine *target*

recognition Domäne aufgeteilt ist,^[62] besitzen DNMT3A und 3B sechs aufeinander folgende Methyltransferase-Motive.^[59] Diese bestimmen auch die Präferenz der jeweiligen Enzyme gewisse DNA-Abschnitte zu methylieren.

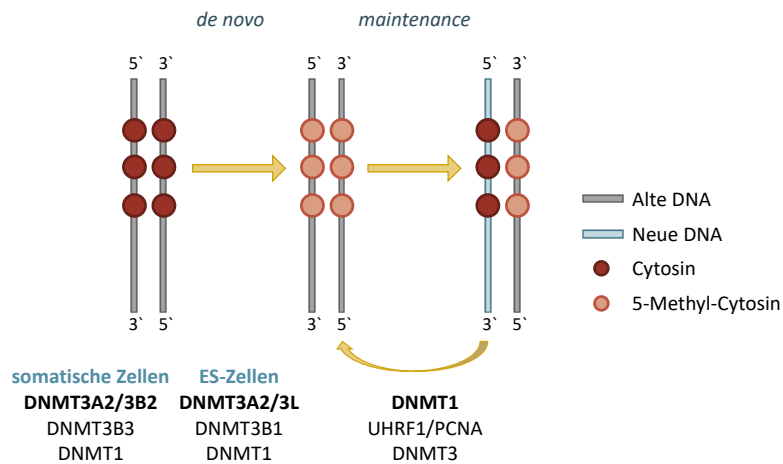
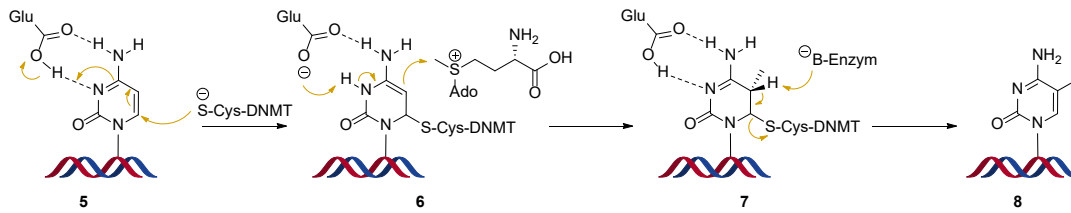


Abbildung 5 Schematischer Überblick über die an *de novo*- und *maintenance*-Methylierung beteiligten Enzyme in embryonalen Stammzellen (ES) und somatischen Zellen. Die Hauptakteure der jeweiligen Reaktionen sind hervorgehoben während die Hilfsenzyme für ein vollständiges Verständnis der Prozesse ebenfalls genannt sind. Abbildung adaptiert von GUJAR *et al.*^[60] Abkürzungen: DNMT = DNA-Methyltransferase, PCNA = *proliferating-cell-nuclear-antigen*, UHRF = *ubiquitin like with phd and ring finger domains*.

Der molekulare Mechanismus der Methylierung selbst unterscheidet sich für die drei DNMTs 1, 3A und 3B nicht. Auffällige Unterschiede betreffen einzig die Enzym-Struktur, welche für die Erkennung von hemi- oder unmethylierten CpG-Einheiten verantwortlich ist.^[63] Die eigentliche Reaktion ähnelt einer MICHAEL-Addition und beginnt, gezeigt in Stufe 5, für DNMT1 mit einem nukleophilen Angriff der Cystein-1229-Seitenkette^[61] an der C6-Position des Cytosin-Rings (**Schema 1**).^[64] Dieser Angriff wird durch den Protonentransfer zu N3 mithilfe einer benachbarten Glutaminsäure, wie in Stufe 6 gezeigt, begünstigt.^[65] Nach anschließender Deprotonierung kann die so aktivierte C5-Position die Methylgruppe vom Kofaktor *S*-Adenosylmethionin (SAM) übernehmen und bildet so die stabile Zwischenstufe 7, bei der das Enzym kovalent mit der DNA verbunden ist.^[66-67] Nach einer finalen β -Eliminierung des Protons an Position C5 wird der Enzym-DNA-Komplex gespalten und die Aromatizität des entstandenen 5-mC-Rings 8 wieder etabliert. Das Besondere bei diesem Mechanismus ist, dass der nukleophile Angriff des DNMT-Enzyms und der Methyltransfer von SAM von unterschiedlichen Seiten des Cytidin-Rings erfolgen. Entsprechend muss, um genügend Platz für die jeweiligen Reaktionen zu haben, die Zielbase komplett aus der DNA-Helix herausgedreht werden.^[68-69] Auf Grund der unterschiedlichen *target recognition* Domäne (TRD), welche zusammen mit dem katalytischen Loop für die Erkennung der zu methylierenden CpG-Einheit verantwortlich sind, ist eine Präferenz von DNMT1 für hemimethylierte^[70] und von DNMT3 für unmethylierte DNA-Stränge vorhanden.^[71] Während dieser TRD-Loop für DNMT1 eine hydrophobe Tasche beinhaltet, in welche die 5-mdC-Einheit des hemimethylierten Strangs perfekt hineinpasst,^[62] ist bei DNMT3A keine explizite Wechselwirkung zu erkennen, welche eine Präferenz für hemi- oder unmethylierter DNA vermuten lässt.^[72] Ganz im Gegenteil zu DNMT3B, wo durch spezifische Wechselwirkungen eine CpGpG-Sequenz eindeutig erkannt und *de novo* methyliert wird.^[73] Die Klassifizierung der Isoformen auf Grund ihrer Aktivität ist somit etwas ungenau, da deren Spezifität nicht immer eindeutig ist. So methyliert beispielsweise die *maintenance*-DNMT1 auch von den *de novo* DNMTs 3A und 3B übersehene unmethylierte Stellen.^[74]



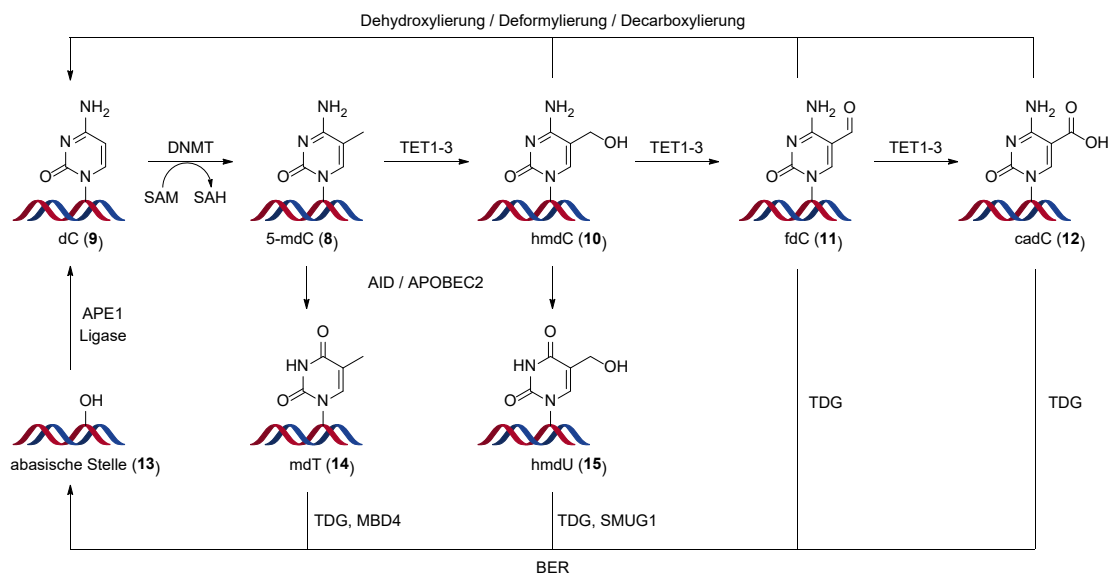
Schema 1 Reaktionsmechanismus der DNMT-vermittelten Cytosin-Methylierung unter Verwendung von SAM als Kofaktor. Nach initialem nukleophilen Angriff und anschließendem Methyl-Transfer kann das während der Reaktion kovalent gebundene DNMT-Enzym im letzten Schritt über eine β -Eliminierung abgespalten werden und 5-mC freigeben. Mechanismus gemäß REITHER *et al.*^[64] Die Position des katalytischen Cysteins variiert je nach hDNMT-Isoform: C1226 bei hDNMT1,^[61] C706 bei hDNMT3A^[58] und C651 bei hDNMT3B.^[73]

Um genauer zu verstehen, wann die Methyltransferasen die Methylgruppen an die DNA anbringen, kann explizit für DNMT1 dessen RFTS-Domäne betrachtet werden. Diese Einheit des Enzyms ist dafür verantwortlich, dass DNMT1 während der S-Phase des Zellzyklus direkt an der Replikationsgabel die neu entstehenden DNA-Stränge vollständig methylieren kann.^[75] Somit wird das Methylierungsmuster direkt nach der Replikation wieder von DNMT1 aufgebaut. Das Enzym kann dabei nicht von einem Strang zum nächsten springen und so verschiedene CpG-Stellen methylieren, sondern sitzt als prozessives Enzym auf einem Strang und fügt richtungsabhängig fehlende Methylierungen ein.^[76] DNMT3A überprüft dies anschließend und kann, wenn nötig, fehlende Methylgruppen mit einem distributiven Mechanismus einfügen.^[53] Möglich ist dies durch die Ausbildung von DNMT3A- und DNMT3L-Tetrameren mit zwei aktiven Zentren, welche die parallele Methylierung von zwei CpG-Einheiten an den gegenüberliegenden Einzelsträngen mit einem Abstand von 14 bp ermöglicht.^[58, 73] Im Gegensatz dazu kann DNMT3B als ebenfalls prozessives Enzym hemimethylierte Stellen, vor allem in minor Satelliten-DNA vollständig methylieren.^[53] Der weniger flexible TRD-Loop hilft dabei, um durch verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen die für den prozessiven Prozess nötige Stabilität zu generieren.^[73]

Um die durch die Methyltransferasen eingeführten Modifikationen und deren entsprechende Auswirkung auf Zellregulatorik zu vermitteln, sind spezielle Enzyme, sogenannte *Reader* nötig.^[56] Unter diesen methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBP) gibt es explizit drei wichtige Klassen: Die methyl-CpG-bindenden Domänen (MBD),^[77] Zinkfinger-Proteine^[78] und schließlich SET und RING-Finger assoziierte (SRA) Protein-Domänen.^[79] Die Struktur der MBD wurde bereits ausführlich erforscht^[80-83] und zeigt klar, dass diese hauptsächlich mit der CpG-Einheit und dem Phosphat-Rückgrat der DNA, aber nur sehr wenig mit den benachbarten Basen wechselwirkt.^[84] Zwischen den bekannten Familien MBD1-4, und MeCP2 gibt es geringe strukturelle Unterschiede, die hauptsächlich für die Präferenz und Selektivität bezüglich 5-mC ausschlaggebend sind.^[80] In der zweiten Klasse der MBP, den Zinkfinger-Proteinen, sind vor allem ZBTB4, 38 und Kaiso zu nennen.^[78] Diese Proteine können 5-mC erkennen und binden an hemimethylierte CpG- bzw. CpG CpG-Einheiten. Diese Zinkfinger-Proteine verhindern die Transkription von Genen unter anderem durch Rekrutieren des *nuclear receptor co-repressor* (NCoR) Proteins, welches die Histon-Deacetylierung und somit ebenfalls die Bildung von Heterochromatin bedingt.^[85] UHRF1 ist das wichtigste Protein der dritten Klasse, der SAR Proteine. Dieses rekrutiert durch Ubiquinierung von Lys18 und Lys23 des Histons H3 DNMT1 und bildet mit diesem während der S-Phase des Zellzyklus einen Komplex.^[86] Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von hemimethylierter DNA, da UHRF1 nicht an unmethylierte DNA bindet.^[87] Durch diese verschiedenen Enzyme wird somit gewährleistet, dass die zuvor eingeführten DNA-Methylierungen die Genexpression entsprechend beeinflussen.

Neben den Methyltransferasen als *Writer* und den MBP als *Reader* sind auch *Eraser* wichtig, um schnell das Chromatin je nach Differenzierungsstatus oder äußeren Stimuli zu verändern. Im Gegensatz zu den *Writern* besteht die Aufgabe der *Eraser* darin, epigenetische DNA-Markierungen zu entfernen. Durchgeführt wird dies von *ten-eleven translocation* Enzymen (TET), welche oxidativ die zuvor an dC

(9) eingeführte Methylgruppe entfernen können.^[88] Diese Oxidationskaskade hat dabei mehrere Stufen (**Schema 2**): Zunächst wird 5-mdC (8) in Hydroxymethyl-Deoxycytidin (hmdC, 10) überführt,^[89] anschließend zum Aldehyd 11 (fdC) und schließlich zur Säure 12 (cadC) oxidiert.^[88, 90] Die bei diesen Transformationen entstehenden Zwischenprodukte können auch von verschiedenen Enzymen erkannt und zu dC abgebaut werden. Während dies bei hmdC, fdC und cadC direkt über einen C-C-Bindungsbruch geschehen kann,^[91-92] so kann alternativ auch durch die *base excision repair* (BER) Maschinerie die gesamte modifizierte Base entfernt werden, was zu einer abasischen Stelle (13) in der DNA führt, welche von der *apurinic/aprimidinic endonuclease* (APE) entfernt wird. Schlussendlich wird ligasevermittelt ein kanonisches Cytidin eingebaut.^[93] Das Herausschneiden von fdC und cadC erfolgt durch die Thymin-DNA-Glycosylase (TDG). mdC und hmdC hingegen werden zunächst durch die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) und das APOBEC-Protein in geringen Mengen in Thymin (14) bzw. das entsprechende Uridin-Derivat 15 überführt, bevor diese durch TDG, MDB4 und SMUG1 ebenfalls herausgeschnitten werden können.^[94-95]



Schema 2 Überblick über den oxidativen Abbau von 5-mdC und die verschiedenen Wegen des BER, diese Modifikationen zu entfernen. Während einerseits die Kaskade dargestellt ist, welche 5-mdC (8) über hmdC (10) und fdC (11) bis zu cadC (12) oxidiert, sind andererseits Abbauwege der verschiedenen Zwischenstufen und dabei entstehende Derivate 13, 14 und 15 dargestellt. Abbildung adaptiert von DENIZIO *et al.*^[96] Abkürzungen: AID = *activation-induced cytidine deaminase*, APE = *apurinic/aprimidinic endonuclease*, APOBEC = *apolipoprotein B RNA editing enzyme catalytic polypeptide*, BER = *base excision repair*, DNMT = DNA-Methyltransferase, MBD = methyl-CpG bindende Domäne, SAH = S-Adenosyl-L-homocystein, SAM = S-Adosylmethionin, SMUG = *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*, TDG = Thymin-DNA-Glycosylase, TET = *Ten-eleven translocation*.

Die Domänenstruktur der drei Formen TET1-3 ist im Aufbau sehr ähnlich und besteht im katalytischem Zentrum am C-Terminus aus einer doppelsträngigen β -Helix-Domäne, einer cystein-reichen Domäne und Bindungsstellen für die benötigten Kofaktoren Fe(II) und α -Ketoglutarat (α -KG).^[97-98] Zusätzlich zu diesem für die Reaktion benötigten katalytischen Zentrum besitzen TET1 und TET3 am N-Terminus noch eine *Reader*-Domäne, um direkt an die DNA zu binden.^[98] Für die eigentliche Oxidation verwenden die TET-Enzyme molekularen Sauerstoff, welcher durch die Decarboxylierung von α -KG erzeugt wird und so aus der Fe(II)-Spezies eine hochreaktive Fe(IV)-Oxo-Spezies generiert.^[99]

Obwohl der Mechanismus der TET-Enzyme der gleiche ist, unterscheiden sie sich in ihrer primären Funktion: Während TET1 hauptsächlich für die Entfernung der genomischen Prägung verantwortlich ist,^[100] spielt TET2 bei der Blutbildung eine entscheidende Rolle.^[101] TET3 wiederum löscht die väterlichen Methylierungsmuster in der Zygote kurz nach Befruchtung der mütterlichen Eizelle.^[102] Obwohl diese Aufgabenfelder so unterteilt werden können, ist für einen gesunden Entwicklungs-

prozess ein feines Zusammenspiel aller TET-Enzyme nötig. Durch die dadurch entstandenen hmdC-Nukleoside wird der DNA Strang von DNMT1 nicht mehr als hemimethyliert erkannt und entsprechende Methylierungsmuster nach der Replikation nicht auf den neuen Strang übertragen.^[98] Diese initial aktive und anschließende passive Demethylierung findet entsprechend bei sich teilenden Zellen statt, während bei Neuronen ausschließlich die aktive TET-vermittelten Demethylierung abläuft.

Die korrekte Steuerung der DNA-Methylierung, sowohl die Einführung, das Ablesen als auch die Entfernung, ist ein fein abgestimmtes System mit vielen beteiligten Enzymen. Wird dieser Mechanismus gestört, kann dies weitreichende Folgen haben. So konnten viele Krankheiten wie Autoimmunstörungen,^[103] verschiedene körperliche oder geistige Behinderungen,^[104] neurologische Störungen^[105] und Tumorerkrankungen^[106] auf eine veränderte epigenetische Regulierung zurückgeführt werden. Neben soliden Tumoren sind auch Leukämien durch Veränderungen des Epigenoms charakterisiert. Im folgenden Kapitel wird diesbezüglich die spezielle Form der AML mitsamt ihrer biologischen Kennzeichen und epigenetischen Abnormalitäten detailliert beschrieben.

2.3 AML und die Herausforderungen bei deren Behandlung

Akute myeloische Leukämie (AML) ist eine seltene Störung des blutbildenden Systems und macht alleine in den USA mit etwas über 20300 Fällen pro Jahr 1 % aller Krebsdiagnosen aus.^[107] Die Krankheit betrifft häufig ältere Menschen und wird bei den meisten Patienten ab einem Alter von 65 Jahren prognostiziert. Obwohl die Krankheit nicht sehr häufig ist, so ist doch auffällig, dass im Vergleich zu anderen Krebsarten wie Brust-, Prostata- und Schilddrüsenkrebs, welche heutzutage gut behandelbar sind,^[108] die Todesrate der von AML betroffenen Patienten über die letzten Jahre nur minimal reduziert werden konnte.^[107] Entsprechend bleibt immer noch ein großer Optimierungsbedarf bei der Behandlung dieser Krankheit bestehen.

Um die Entwicklung von AML zu verstehen, ist es zunächst nötig, einen Blick auf die Hämatopoese eines gesunden Menschen zu werfen (**Abbildung 6**). Die sich im Knochenmark befindenden hämatopoetischen Stammzellen können sich in alle anderen Blutzellen entwickeln, während zusätzlich eine Selbsterneuerung stattfindet, um so den Stammzellenpool nicht zu erschöpfen.^[109] Die Tochterzellen, aufgeteilt in myeloide und lymphoide Zellen, entwickeln sich zu den verschiedenen reifen Blutzellen.^[110] Dieser Reifungsprozess wird von einer speziell veränderten Genexpression begleitet, die den Zellen die Differenzierung zu den spezifischen Zelltypen ermöglicht und oft die Ausbildung spezifischer Oberflächenproteine beinhaltet.^[111-112] Gesteuert wird dieser Prozess von einer Vielzahl an Wachstums-^[113-115] und Transkriptionsfaktoren,^[116-117] welche gut aufeinander abgestimmt, je nach äußeren Einflüssen wie beispielsweise einer Infektion, die Produktion der verschiedenen Blutzellen anpassen und regulieren.

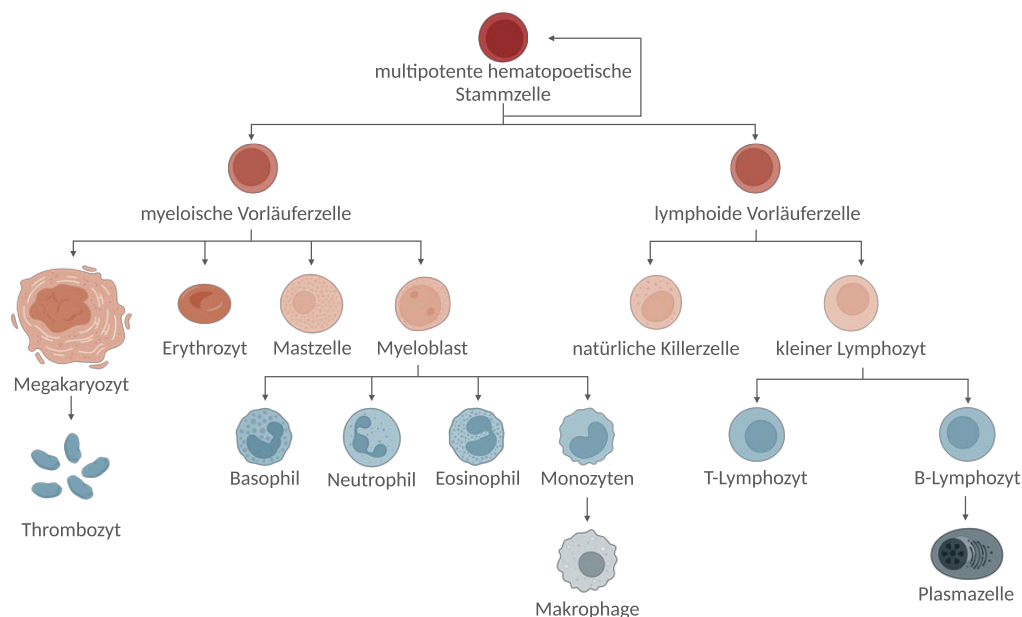


Abbildung 6 Überblick über die Zelldifferenzierung einer hämatopoetischen Stammzelle in die verschiedenen reifen Blutzellen bei einem gesunden Menschen. Abbildung adaptiert von BAMASHMOS *et al.*^[118]

Wird dieser komplizierte Reifungsprozess durch eine Leukämieerkrankung gestört, so liegt das an mehreren sich akkumulierenden Mutationen, bei denen manche entstehende Zell-Klone überleben und andere nicht.^[119] Die Mutation von Stammzellen ist ein natürlicher Prozess, bei welchem sich im Laufe des Lebens bis zu mehreren 100 Mutationen ansammeln,^[120] bis sich möglicherweise eine Leukämiezelle bildet.^[121] Verschiedene onkogene Mutationen tragen dabei synergetisch zum Überleben der Tumorzellen bei, welche so perfekt auf ihre Mikroumgebung angepasst ist.^[122] Bei der Entwicklung von AML resultiert dies in der Akkumulation von myeloischen Vorläuferzellen in Knochenmark und Blut, bei denen die Differenzierung in reife Blutzellen gehemmt ist.^[123] Die

ausschlaggebende Todesursache ist die dadurch entstehende Reduktion normaler Blutzellen wie roter Blutkörperchen, Blutplättchen und Granulozyten.^[124]

Damit die genetisch veränderten unreifen Zellen als Leukämiezelle eingestuft werden können, müssen diese die *Hallmarks of Cancer*, d.h. bestimmte zelluläre und funktionale Merkmale erfüllen. Diese wurden erstmals im Jahr 2000 von HANAHAN *et al.*^[125] definiert und schließlich 2011^[126] um weitere Eigenschaften erweitert. Diese Merkmale beschreiben all die Veränderungen der Zelle, welche für das Überleben von mutierten Tumorzellen entscheidend sind (**Abbildung 7**). Die insgesamt 10 Merkmale beinhalten die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen und die gleichzeitige Unterdrückung von Wachstumssuppressoren. Diese Wachstumsstörung kann in leukämischen Zellen zellautonom ausgelöst werden und äußert sich in dauerhaft aktivierten Kinasen^[127] und unterdrückten Tumorsuppressorgenen.^[128-129] Die Tumorzellpopulation kann jedoch nicht nur durch die Proliferationsgeschwindigkeit, sondern auch durch die Zellabnutzung beeinflusst werden. Somit ist es für die Tumorzelle ebenfalls wichtig, resistent gegenüber Apoptose, unter anderem durch eine p53-Mutation^[130] oder, explizit bei Leukämien, durch die dauerhafte Aktivierung des Apoptoseinhibitors BCL2, zu sein und den Energiestoffwechsel anzupassen.^[131] Um das Überleben der Tumorzelle zu gewährleisten muss zusätzlich das Immunsystem unterdrückt werden, da dieses für die Überwachung und Beseitigung von Zellen im frühen Krebsstadium verantwortlich ist.^[132] Neben der Unterdrückung kann es dabei auch vorkommen, dass Immunzellen die Krebszellen erreichen und statt der gewünschten tumorunterdrückenden genau gegenteilige, tumorfördernde Effekte auf die einzelnen Zellen haben.^[133-134]

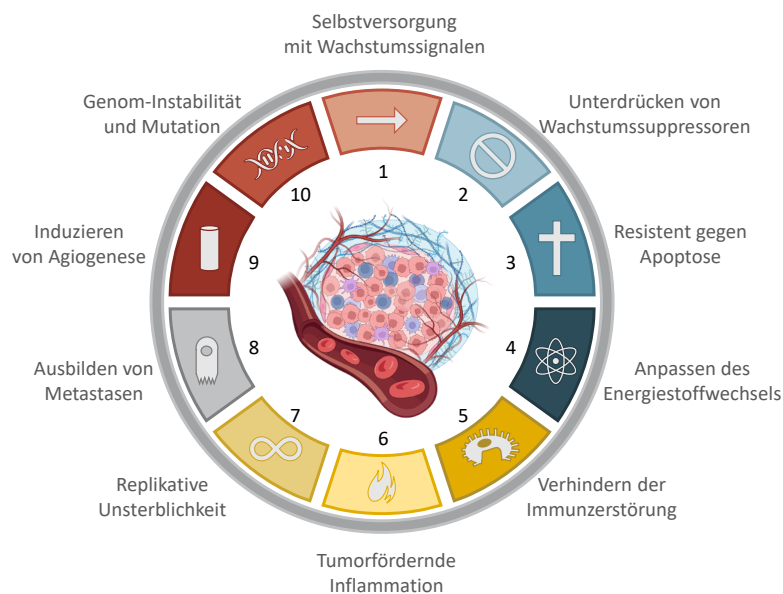


Abbildung 7 Überblick über die *Hallmarks of Cancer*. Diese beinhalten 10 zellulären Eigenschaften, die Tumorzellen erfüllen und gemeinsam haben um zu proliferieren. Abbildung adaptiert von HANAHAN *et al.*^[126]

Gesunde somatische Zellen besitzen nahezu keine Telomeraseaktivität, ein Enzym, welches die Enden der Chromosomen nach der Zellteilung wieder verlängert.^[135] Somit ist bei gesunden Zellen nur eine bestimmte Anzahl an Zellteilungen möglich, bevor die Zelle in eine Ruhephase eintritt. In den meisten Tumorzellen sind jedoch die Telomerasen sehr aktiv, was den Zellen replikative Unsterblichkeit und Proliferation ermöglicht.^[136] Neben der eigenen kontinuierlichen Zellteilungsfähigkeit besitzen Tumorzellen, explizit die der soliden Tumore, auch die Fähigkeit, neue Kolonien in abgelegenen Gewebe aufzubauen und sich über den gesamten Körper zu verteilen.^[137-138] Die so entstehenden Metastasen sind für 90 % aller Krebssterbefälle verantwortlich.^[125] Um sowohl den ursprünglichen soliden Tumor als auch dessen Metastasen ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen, ist die Ausbildung neuer Blutgefäße unumgänglich. Die Angiogenese im und außerhalb des Knochenmarks ist

somit ein weiteres Kennzeichen von soliden Tumoren.^[139] All diese zellulären Veränderungen sind durch Aktivierung und Deaktivierung bestimmter Gene bedingt und nur durch Mutationsfähigkeit möglich, welche innerhalb der Krebszelle deutlich erhöht ist.^[140-141]

Alle diese Eigenschaften konnten bereits bei Leukämien im Allgemeinen und AML im Speziellen entdeckt werden. Dabei macht die Vielzahl der molekularen Mechanismen, die diese onkogenetischen Ereignisse hervorrufen, die Behandlung von AML auch sehr schwierig.^[142] Das Zusammenspiel zwischen Änderungen von Transkriptionsfaktoren und der Signalübertragung, welches schließlich zur sich gegenseitig bedingenden gestörten Genexpression und damit weiteren störrhaften Signalübermittlungen führt, ist hoch komplex und wurde, obwohl in den letzten Jahren viel daran geforscht wurde, noch nicht abschließend erklärt.^[143-146] Die Behandlung wird außerdem zusätzlich dadurch erschwert, dass AML als heterogene Erkrankung mehrere Subtypen mit unterschiedlichen pathophysiologischen, klinischen, zytogenetischen und molekularen Profilen besitzt, welche jeweils individuelle Therapien benötigen und sehr unterschiedliche Verläufe haben können.^[147] So ist es nicht verwunderlich, dass Patienten < 60 Jahre, welche ausschließlich mit Chemotherapie behandelt wurden, eine Überlebenschance von 45–50 % haben, während ältere, im Bereich 60–70 Jahre, nur noch eine Überlebensrate von 15–20 % haben.^[148] In der nächsthöheren Altersklasse, > 70 Jahre, sinkt dieser Wert weiter auf nur 10 %. Ein Grund für diesen Trend ist, dass ältere Patienten oft eine nachteiligere Krankheitsbiologie aufweisen oder körperlich die hoch toxische, intensive Chemotherapie nicht verkraften. Die größte Frage, die sich entsprechend bei der Behandlung von AML Patienten stellt, ist die Zuordnung, welche Patienten von einer intensiven oder weniger intensiven Therapie profitieren.^[148]

Aktuell gibt es 43 für die Behandlung von AML zugelassene Medikamente mit 25 verschiedenen Wirkstoffen sowie einer Kombinationstherapie.^[149] Diese Cytostatika, welchen unter anderem Alkylantien, Platin-Verbindungen, Interkalatoren, Nukleotid-Analoga und Topoisomeraseinhibitoren beinhalten, stören Stoffwechselforgänge die das Zellwachstum und die -teilung regulieren.^[150] Entsprechend wird der gesamte Körper von diesen toxischen Substanzen angegriffen. Einzig die Unterscheidung, dass Tumorzellen eine erhöhte Zellteilungsrate haben dirigiert den gewünschten Effekt stärker auf Seiten der Tumorzellen.^[151] Seit den 1970er Jahren ist der Goldstandard für die Behandlung von AML die 7+3 Einheit von sieben Tagen Cytarabin (Ara-C, **16**) und drei Tagen Daunorubicin (**17**, **Abbildung 8**).^[152]

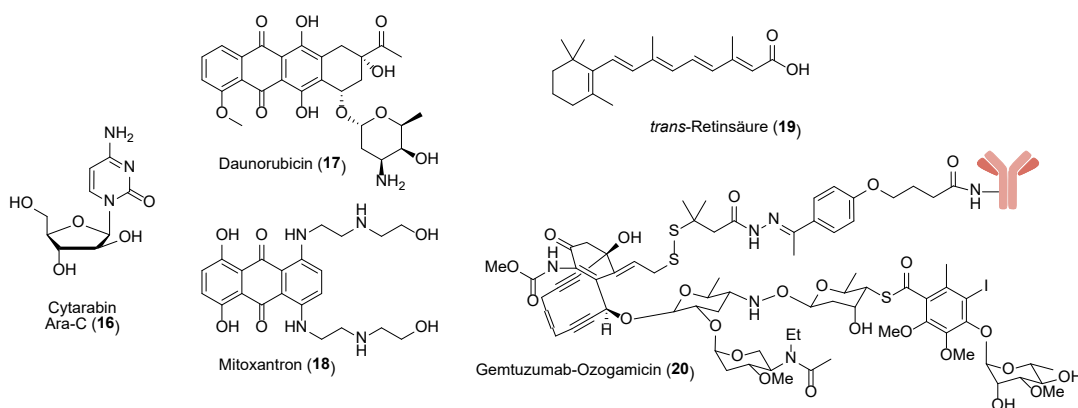


Abbildung 8 Strukturen verschiedener für AML entwickelte Medikamente. Neben dem Nucleosid-Analogen **16** werden häufig auch Interkalatoren **17** und **18** sowie nicht-chemotherapeutische Substanzen wie **19** in der Krebstherapie eingesetzt. Auch Wirkstoff-Antikörper-Konjugate wie **20** bieten vielversprechende Therapiemöglichkeiten.^[153]

Diese Behandlung konnte eine Heilung von 30–40 % bei jüngeren Patienten, 40–45 % in der Gruppe 50–55 Jahre und 10–15 % bei Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren erzielen.^[154-155] Die 7+3 Therapie stellte einen Meilenstein in der Behandlung von AML dar. Während das Cytidin Analogon **16**

als Antagonist des natürlichen Substrates dC-TP kompetitiv die DNA-Polymerase hemmt,^[156] kann Daunorubicin als Interkalator mit der DNA wechselwirken und so Topoisomerase II hemmen.^[157] Bei beiden Wirkstoffen ist somit die DNA-Replikation unterbunden, was schließlich zum Zelltod führt. Als Alternative zum kardiotoxischen Daunorubicin wurde häufig auch das etwas mildere Mitoxantron (**18**) als DNA-Interkalator eingesetzt.^[158-159] Da diese 7+3 Therapie jedoch nicht immer ausreicht, um die Krankheit vollständig zu bekämpfen, wurde nach weiteren Wirkstoffen gesucht. So konnte bereits Ende der 1980er Jahre *trans*-Retinsäure (**19**) als eine weitere Substanz entdeckt werden.^[160-161] Obwohl dies kein klassisches Chemotherapeutikum ist, da es die Zellen zur Differenzierung anregt statt cytotoxische Effekte zu haben, konnten in Kombination mit Arsen(III)-Oxid gute Ergebnisse bei der Behandlung von akuter promyeloischer Leukämie (APL), einem Subtyp von AML, erzielt werden.^[162-163] Anfang der 2000er Jahre wurde schließlich das erste Immunkonjugat, Gemtuzumab-Ozogamicin (**20**) zugelassen.^[164] Durch das immer detailliertere Verständnis von AML und deren pathogenen genetischen Veränderungen, konnte eine auf bestimmte Biomarker ausgerichtete Therapie entwickelt werden, welche sehr selektiv entsprechende Tumorzellen ansteuert. Da bei 90 % der Patienten das CD33-Antigen auf AML-Zellen vorhanden ist, welches bei gesunden Zellen fehlt, bot es sich an, ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat zu entwickeln, das genau diese Eigenschaft ausnutzt.^[165] Dieser CD33-gerichtete monoklonale Antikörper mit seinem angebrachten Calicheamicin-Derivat wurde in Kombination mit Cytarabin verabreicht, wodurch die Überlebensrate auf bis zu 75 % erhöht werden konnte.^[166-167] Seine Wirksamkeit beruht dabei auf der Fähigkeit des gekoppelten Endiibakterientoxins, den DNA-Doppelstrang radikal zu spalten und dadurch den Zelltod zu induzieren.^[168]

Obwohl bei vielen der AML-Patienten nach intensiver Chemotherapie eine komplette Remission der Krankheit erreicht werden kann, so ist es doch häufig nötig, zusätzlich eine Stammzelltransplantation durchzuführen, um so einem möglichen Rückfall vorzubeugen.^[169] Trotz dieser zusätzlichen Möglichkeit bleibt die gesamte Überlebenschance nach der Diagnose von AML bei nur 30–60 %.

Neben der Auswahl einer passenden Chemotherapie, sind die auftretenden Resistenzen gegenüber den eingesetzten Medikamenten eine weitere Herausforderung bei der Behandlung von AML.^[170] Grundsätzlich kann dabei zwischen primärer Resistenz, bei der das Medikament auch nach 4–6 Behandlungszyklen nicht wirkt, und sekundärer Resistenz, bei der nach einer Rückkehr der Krankheit die Medikamente nicht mehr wirken, unterschieden werden.^[171] Dabei gibt es verschiedene zellextrinsische und -intrinsische Vorgänge, die diese Resistenzen begünstigen (**Abbildung 9**). Ausschlaggebend für primäre Resistenzen ist beispielsweise ein langsamerer Zellzyklus. So wurden bei Patienten mit chronischer myelomonozytäre Leukämie (CMML) und einer Resistenz viel mehr ruhende hämatopoetische Vorläuferzellen gefunden als bei Patienten, die auf das Medikament ansprachen.^[172] Ein möglicher Grund für eine sekundäre Resistenz nach einer Behandlung mit einem Pyrimidin-Analogon kann der veränderte Pyrimidin-Metabolismus sein.^[173] Dieser zeigt sich durch veränderte Expression verschiedener metabolischer Enzyme, welche die Aktivierung, also die Umwandlung in das entsprechende Triphosphat der Wirkstoffe verhindern. Eine Deaktivierung des Wirkstoffs kann auch durch erhöhte Cytidin-Deaminase (CDA) Aktivität^[174] oder Abspaltung des Triphosphates durch SAMHD1^[175-176] erfolgen und durch den reduzierten Wirkstoffgehalt in der Zelle eine Resistenz auslösen. Es kann bereits die Aufnahme des Wirkstoffs durch eine veränderte Expression der *human membrane nucleoside transporters* (hNTs) eingeschränkt sein^[177] oder der Zelltod durch eine veränderte Aktivität von BCL2, einem Apoptoseinhibierendem Protein, unterbunden werden.

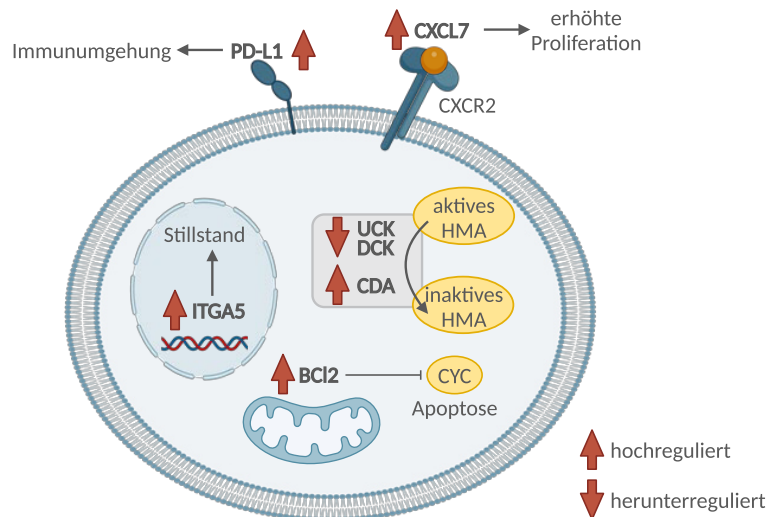


Abbildung 9 Zellintrinsic und -extrinsic Faktoren für die Ausbildung einer Resistenz gegenüber AML-Medikation. Vor allem die unnatürlich hohe Aktivität von ITGA5, BCI2 und CDA stellen mögliche Wege der Resistenz-Bildung dar. Extrazellulär kann dies durch die hohe Aktivität von PD-L1 und CXCL7 geschehen. Abbildung adaptiert von STOMPER *et al.*^[171] **Abkürzungen:** BCI2 = *B-cell lymphoma*, CDA = Cytidin-Deaminase, CXCL = CXC-Motiv-Chemokinligand, CXCR = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor, CYC = Cytochrom C, DCK = Deoxycytidin-Kinase, HMA = hypomethylierende Arzneimittel, ITGA = *Integrin Subunit Alpha*, PD-L = *programmed cell death ligand*, UCK = Uridin-Cytidin-Kinase.

Auch zellextrinsic Faktoren, die für die Ausbildung einer Resistenz ausschlaggebend sind, sind bekannt. Darunter zählen die veränderte Leistung des Immunsystems durch verminderte T-Zellen-Funktion oder die Aktivierung von NK-Zellen nach Behandlung mit Decitabin.^[171]

Die Heilung von AML und Leukämien im Allgemeinen stellt so immer noch eine große Herausforderung dar. Das erweiterte Verständnis der Pathogenese von AML ermöglicht allerdings vielversprechende Ansätze zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, welche im nachfolgenden Kapitel erläutert werden sollen.

2.4 Zusammenhang zwischen AML und DNA-Methylierung

Um die Behandlung von AML für alle Altersgruppen so effektiv wie möglich zu gestalten, wurden in den vergangenen Jahren viele Medikamente erforscht und von der *food and drug administration* (FDA) für den Einsatz in Kliniken genehmigt.^[149] Der Fokus lag dabei besonders darauf, mutierte Proteine, wie beispielsweise *fms related receptor tyrosine kinase 3* (FLT3) als häufigstes mutiertes Protein, Isocitrat-Dehydrogenase IDH1/IDH2 oder Tumorprotein 53 (TP53) zu adressieren oder bei der Immuntherapie die T-Zellen-Toxizität gezielt auf Krebszellen zu konzentrieren.^[178] Aber auch epigenetische Mechanismen, insbesondere die DNA-Methylierung, wurden untersucht und auf Grund ihrer guten Reversibilität als geeignetes Ziel für neue Wirkstoffe identifiziert.^[179-180] Veränderte DNA-Methylierungsmuster sind bei vielen Leukämien und auch bei AML im Speziellen ein auffälliges Merkmal, das durch verschiedene Wirkstoffe gezielt beeinflusst werden kann.^[181] Das Auftreten dieser Abnormalität kann verschiedene Ursachen haben: Einerseits kann die DNA-Methylierung durch Überexpression von DNA-Methyltransferasen, hauptsächlich DNMT3A,^[182-183] aber auch durch die Deaktivierung von TET2^[101] durch Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)^[184] überdurchschnittlich hoch sein. Andererseits kann die Mikroumgebung im Knochenmark die Methylierungsmuster der Leukämiezellen beeinflussen^[185] oder der Alterungsprozess die Veränderung von Methylierungsmustern begünstigen.^[186-187]

Die Position der Hypomethylierung und die dadurch betroffenen Gene an sind höchst interessant für das Verständnis der Zusammenhänge zwischen den verschiedenen AML-Subtypen.^[188] Um dies zu untersuchen wurden bereits viele Proben von AML-Patienten einer genomweiten DNA-Sequenzierung unterzogen, die genetischen Veränderungen analysiert und in verschiedene Epitypen einordnet.^[142, 189-191] Dabei fällt zunächst auf, dass bei vielen der Proben Translokation, also ein Austausch zweier Gene unterschiedlicher Chromosomen stattfand.^[192-193] Die WHO bestimmte daraufhin zunächst drei Subtypen von AML mit den häufigsten Translokationen: ein Austausch zwischen Chromosomen 8 und 21, zwischen Chromosomen 15 und 17 und die Inversion des Chromosoms 16. Inzwischen sind bis zu 16 AML-Subtypen bekannt.^[142] Dieser Positionswechsel von Genen und mögliche entstehende Fusionsgene sind ein wichtiges Merkmal von AML und helfen bei der Klassifizierung der einzelnen Subtypen. Zwei große Klassen mit auffällig veränderten und vor allem unterschiedlichen Methylierungsmustern sind dabei einerseits die *mixed lineage leukemia* (MLL) und andererseits AML, welche eine IDH-Mutation aufweist (**Abbildung 10**).

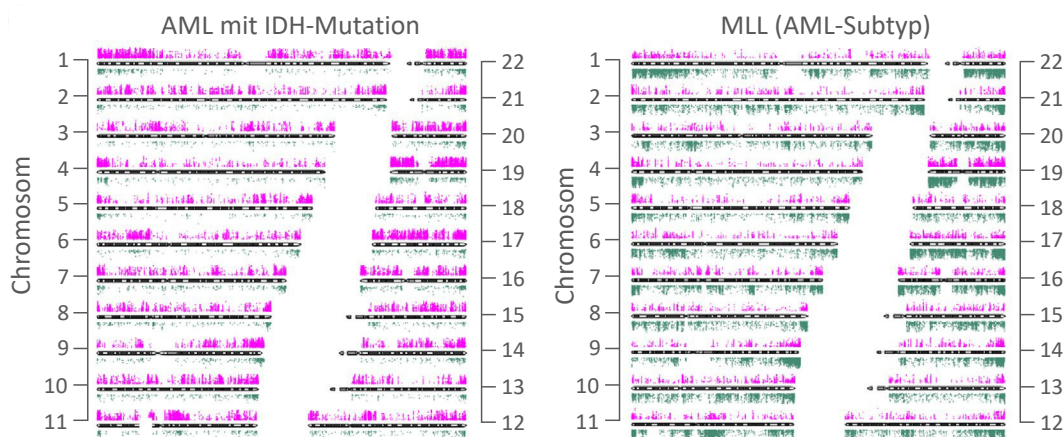


Abbildung 10 Positionen der hypo- (grün) und hypermethylierten (pink) Cytidine der einzelnen Chromosomen bei AML Patienten mit einer IDH-Mutation (links) und einem MLL-Subtyp (rechts). Durch die Lokalisierung dieser genauen Positionen können die entsprechend deaktivierten und aktivierten Gene bestimmt werden. Abbildung adaptiert von AKALIN *et al.*^[190]

Über das ganze Genom verteilt, nicht nur auf CpG-Inseln beschränkt, lagen bei der IDH-mutierten AML 90 % der Cytidine hyper- und nur 10 % hypomethyliert vor, während bei MLL-AML der gegenteilige Effekt mit 29 % hyper- und 71 % hypomethylierten Cytidinen beobachtet werden konnte.^[190] Nicht nur der prozentuale Anteil der Methylierung unterscheidet sich hier erheblich, auch die Position der Methylierungen variiert. Während Introns und sich wiederholende Einheiten bei hämatologischen Malignomen oft hypomethyliert vorliegen, so sind CpG-Inseln in Genpromoterregionen häufig hypermethyliert.^[194-195] Explizit bei AML zeigen sich weitere Unterschiede bei den einzelnen Subtypen. Bei IDH-mutierter AML häufen sich die Methylierungen hauptsächlich innerhalb von CpG-Inseln, während sich im Gegensatz dazu bei MLL-AML die Methylierung außerhalb dieser befindet.^[190] Die spannende Frage, die bleibt, ist also, ob es spezielle Gene gibt, die über alle AML-Klassen eine anormale Methylierung aufweisen. FIGUEROA *et al.*^[142] ermittelten 45 verschiedene Gene, wobei die meisten von ihnen hypermethyliert und damit deaktiviert vorlagen. Die identifizierten Gene spielen dabei alle eine Rolle bei der leukämischen Transformation von Stammzellen und beinhalten Tumorsuppressorgene, Transkriptionsregulatoren, Kernimportrezeptoren und Immunsuppressoren.^[142, 196] Kürzlich wurde in der Literatur^[197] auch der direkte Zusammenhang zwischen Histon- und DNA-Methylierung beschrieben, welcher erste Einblicke in die dadurch präferiert methylierten CpG-Positionen liefert.

Eine gestörte DNA-Methylierung kann somit weitreichende Auswirkungen auf die Transkription und Zellproliferation haben (**Abbildung 11**). Dabei kann die Transkription entweder direkt verhindert werden indem durch die vorhandenen Methylgruppen das Binden verschiedener Transkriptionsfaktoren verunmöglicht wird, oder indirekt, indem MBPs binden und so das Chromatin deaktivieren.^[104] Da die methylierten CpG-Inseln häufig in der Promoterregion der Gene vorhanden sind, kann dadurch das folgende Gen nicht abgelesen werden. Es ist somit deaktiviert.^[106, 194, 198] Besonders problematisch ist dies, wenn Tumorsuppressorgene oder apoptoseregulierende Gene betroffen sind. Dadurch wird zusätzlich die Zelldifferenzierung gestört, was sich, wie bei AML nachweisbar, in der Akkumulation undifferenzierter Vorläuferzellen zeigt. Auch die genomische Stabilität wird durch veränderte Methylierungsmuster reduziert, wodurch neue potenziell karzinogene Mutationen hinzukommen können.^[181] Zusätzlich entsteht durch die veränderte DNA-Methylierung auch eine Dysregulation der miRNA-Expression, welche als Onkogen und Regulator der Hämatopoese die Genexpression bedeutend beeinflusst.^[199-200]

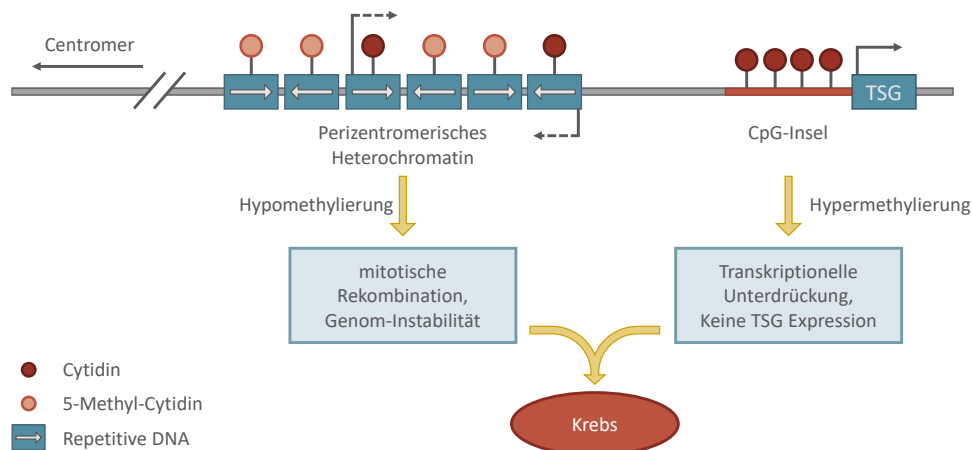


Abbildung 11 Auswirkungen der veränderten DNA-Methylierung in unterschiedlichen genomischen Regionen. Wird normalerweise methyliert vorliegendes Heterochromatin hypomethyliert oder normalerweise unmethylierte CpG-Inseln hypermethyliert so kann dies, bedingt durch die damit einhergehenden biologischen Veränderungen bezogen auf Stabilität und Genexpression, zu einer Krebserkrankung führen. Abbildung adaptiert von ROBERTSON *et al.*^[104] Abkürzungen: TSG = Tumorsuppressorgene.

Die DNA-Methylierung stellt somit insgesamt das ideale Ziel für eine effektive Therapie dar, da sie nicht nur ein wichtiger Knotenpunkt bei der Entstehung von Krebs allgemein ist, sondern auch als häufigste

genomische Veränderung bei AML auftritt, welche den Zellen Stammzell-Charakter gibt und ihnen somit unkontrolliertes Wachstum und Selbsterneuerung erlaubt. Auf Grundlage des bekannten Methylierungsmechanismus der DNMT-Enzyme und dem präzisen Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Chromatin-Aktivierung^[201] konnten verschiedene Wirkstoffe entwickelt werden, deren Ziel es ist, die ursprüngliche Zellaktivität wieder herzustellen und Tumorsuppressorgene zu reaktivieren.

Der wechselseitige Zusammenhang von DNA-Methylierung und Chromatinaktivierung^[181] führte zur Entwicklung zweier unterschiedlicher Wirkstoffklassen: Einerseits Wirkstoffe, deren Ziel der Histon-Code ist, andererseits Wirkstoffe, die direkt mit dem DNA-Methylierungsmechanismus in der DNA interferieren.^[202] Aktives und deaktiviertes Chromatin unterscheiden sich durch ihre geöffnete bzw. geschlossene Struktur, die das Ablesen der DNA an den entsprechenden Stellen möglich oder unmöglich machen und dadurch die Genregulation beeinflussen.^[203] Dabei ist auffällig, dass aktives Chromatin hauptsächlich unmethylierte CpG-Inseln aufweist, während bei deaktiviertem Chromatin diese Inseln methyliert vorliegen (**Abbildung 12**).^[201] Der Aktivierungszustand des Chromatins ist allerdings nicht nur durch die DNA-Methylierung beeinflusst, sondern auch durch Histonmodifikationen. Liegen viele der Histonenden acetyliert vor, so kommt es zu einer offenen und damit aktiven Chromatinstruktur, während deacetylierte Histone zu einem geschlossenen, inaktiven Chromatin führen.^[204-205] Dies kommt durch die ionischen Wechselwirkungen des negativ geladenen Phosphatrückens der DNA mit den positiv geladenen Seitenketten des Lysins der Histone zustande.^[206] Der Acetylierungsprozess wird von Histon Acetyltransferasen (HAT) gesteuert, welche selektiv die Amin-Funktion der Lysinseitenketten an den Histonenden modifizieren.^[207] Um die bei AML deaktivierten Tumorsuppressorgene wieder zu aktivieren, können somit Histon Deacetylase (HDAC) Inhibitoren eingesetzt werden, welche die Entfernung von Acetylierung verhindern und durch die dadurch entstehende offene Euchromatin-Struktur das Ablesen von zuvor stillgelegten Genen wieder ermöglichen.^[208]

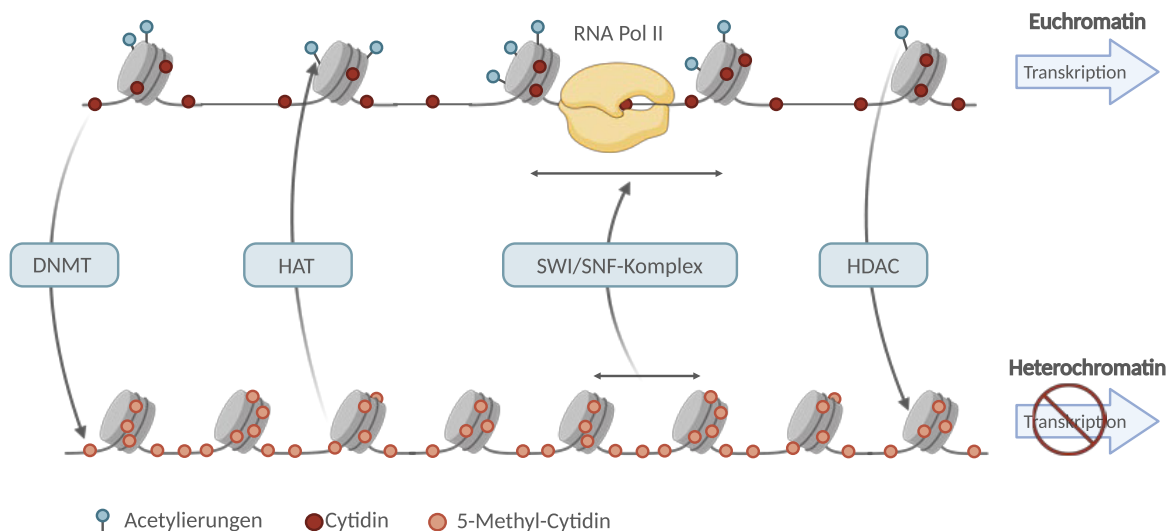


Abbildung 12 Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Chromatinstatus, sowie den dabei beteiligten Enzymen. Neben der DNA-Methylierung, welche von DNMT-Enzymen eingeführt wird, sind die Histonmodifikationen, insbesondere Histon-Acetylierungen entscheidend. Diese können von HAT-Enzymen angebracht und von HDAC-Enzymen entfernt werden. Auch der SWI/SNF-Komplex, welcher die Abstände der einzelnen Nucleosomen verändern kann beeinflusst den Chromatinstatus erheblich. Abbildung adaptiert von *My Cancer Genome*.^[209] *Abkürzungen:* DNMT = DNA-Methyltransferase, HAT = Histon-Acetyltransferase, HDAC = Histon-Deacetylase, Pol = Polymerase, SNF = *sucrose non-fermentable*, SWI = *switching defective*.

Die Struktur vieler HDAC-Inhibitoren wie beispielsweise Vorinostat (**21**) und Panobinostat (**22**) ähnelt sich sehr stark, weshalb auch der Wirkmechanismus der gleiche ist (**Abbildung 13**). HAT-Enzyme besitzen im Inneren ihrer katalytischen Tasche ein Zinkion, welches normalerweise für die DNA-Protein

Interaktion verantwortlich ist.^[210] Wird dieses Zinkion von einem Wirkstoff chelatisiert wodurch die katalytische Tasche verschlossen wird, so ist dieses Enzym deaktiviert. Hydroxamsäuren wie sie in vielen der HDAC-Inhibitoren eingesetzt werden, sind durch ihre bidentate Chelatisierungsstruktur ideale Liganden für das in der katalytischen Tasche pentakoordinierte Zn^{2+} -Ion.^[211] Der nachfolgende aliphatische oder aromatische Linker besetzt die hydrophobe Tasche während die aromatische Einheit die Öffnung dieser Tasche verschließt.

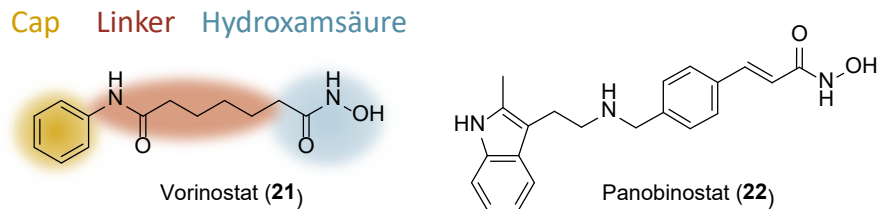


Abbildung 13 Chemische Strukturen zweier HDAC-Inhibitoren. Hervorgehoben sind die jeweils gleichen Strukturelemente der Capping-Einheit (gelb), des Linker (rot) und der Hydroxamsäure als Chelator (blau).

Die HDAC-Inhibitoren sind somit Wirkstoffe, welche die entsprechenden Enzyme der MICHAELIS-MENTEN Kinetik folgend ausschalten und somit zum Tod der Zellen entscheidend beitragen. Da die HAT-Enzyme nicht nur Histone modifizieren, sondern zu ihren Targets auch andere Proteine wie Transkriptionsfaktoren und -regulatoren, DNA-Reparaturenzyme, Chaperone und Kernimportregulatoren zählen, wird vermutet, dass es neben der epigenetischen Reprogrammierung weitere Mechanismen und Wege gibt, wie genau HDAC-Inhibitoren schließlich Apoptose initiieren können.^[212]

Die andere Wirkstoffklasse, die der hypomethylierenden Arzneimittel (HMA), wird, auf Grund ihrer großen Bedeutung im Feld der epigenetische Wirkstoffe im nächsten Kapitel ausführlich besprochen.

2.5 Hypomethylierende epigenetische Wirkstoffe gegen AML

Eine weitere Möglichkeit, die Genexpression mit Wirkstoffen zu beeinflussen, stellen die hypomethylierenden Arzneimittel (HMA) dar. Im Gegensatz zu den HDAC-Inhibitoren können diese direkt die DNA-Methylierung beeinflussen und somit das Epigenom verändern. Diese neue Klasse von epigenetischen Wirkstoffen eröffnet dadurch die Möglichkeit einer Therapie, in welcher molekulare Veränderungen im Genom von Tumorzellen, direkt adressiert werden können.

Für die Behandlung von AML werden die beiden hypomethylierenden Wirkstoffe Azacytidin (**23**) und Decitabin (**24**) eingesetzt, welche auf epigenetischer Ebene agieren (**Abbildung 14**). Die beiden Cytidin-Analoga unterscheiden sich nur durch einen zusätzlichen Stickstoff an der 5-Position der Base von ihrem natürlichen RNA- bzw. DNA-Baustein **25** und **26**. Ein weiteres, bisher nur in der akademischen Forschung eingesetztes, Derivat **1**, welches statt eines Riboserings einen Cyclopentan-Ring besitzt, zeigt durch die Aza-Base analoge Wirkung. Ebenfalls ausschließlich im akademischen Umfeld bekannt ist ein Derivat von Decitabin bei dem der Ribose-Ring-Sauerstoff durch ein Schwefel-Atom ausgetauscht wurde. Da jedoch bei Verwendung dieses Schwefel-Derivats in Tiermodellen bereits bei sehr niedrigen Dosen von 1,5–2 mg/kg die beobachtete Toxizität die therapeutische Wirksamkeit überschattete wird im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter auf dieses Derivat eingegangen.^[213]

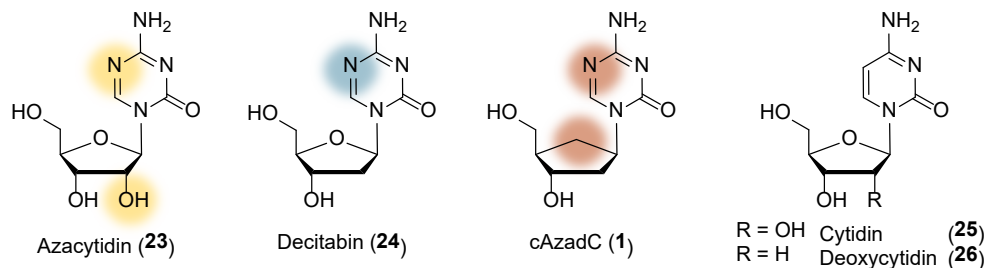


Abbildung 14 Chemische Strukturen epigenetischer AML-Wirkstoffe und ihrer natürlichen Nucleosid-Analoga. Azacytidin (**23**) und Decitabin (**24**), welche sich als RNA- bzw. DNA-Aza-Nucleoside durch einen zusätzlichen Stickstoff an der 5-Position auszeichnen sind bereits als Medikamente unter den Handelsnamen Vidaza und Dacogen zugelassen. Das dritte Derivat cAzadC (**1**), welches Gegenstand akademischer Forschung ist, besitzt neben der Aza-Base statt eines Ribose-Rings einen Carbacyclus.

Decitabin wurde das erste Mal bereits 1964 synthetisiert^[214] und schnell dessen Potential als Anti-Leukämie-Wirkstoff erkannt.^[215] Daraufhin folgte die Optimierung von dessen Synthese, so dass heute mehrere Wege für die Herstellung des Wirkstoffs bekannt sind.^[216-217] Neben dem DNA-Derivat wurde zeitgleich auch an dem RNA-Äquivalent Azacytidin^[218] und dessen antitumoraler Wirkung^[219] geforscht. Somit war der Grundstein der epigenetischen Behandlung von Leukämien gelegt und der Wirkmechanismus der Nucleosid-Analoga wurde genauer untersucht. Schnell stellte sich heraus, dass es nach Inkorporation in die DNA zu Inhibierung der Methyltransferasen kommt und dadurch eine Hypomethylierung induziert wird.^[220-221]

Damit das möglich ist, müssen die Nucleosid-Analoga nach Zellpenetration in ihre jeweiligen Triphosphate umgewandelt werden (**Abbildung 15**).^[222] Bei den Wirkstoffen handelt es sich somit um Prodrugs, welche erst im Zellinneren in ihre aktive Form überführt werden. Die dafür nötige Aufnahme der Substanzen ins Zellinnere erfolgt durch humane Nucleosid-Transporter (hNT).^[223-224] Die dabei zu unterscheidenden Klassen, *human concentrative* NT (hCNT) und *human equilibrate* NT (hENT) weisen eine unterschiedliche Präferenz für die beiden Substrate auf.^[225] Während Decitabin als DNA-Baustein bevorzugt von hENT transportiert wird,^[226] zeigt sich für den RNA-Baustein Azacytidin eine Präferenz für die hCNTs. Die Aufnahme der Wirkstoffe in unreife, leukämische Blasten ist, da viele Membrantransportprozesse bei sich teilenden Zellen aktiver sind als bei ihren ruhenden Pendanten, deutlich höher als in bereits differenzierte Zellen.^[227] Somit ergibt sich eine gewisse Selektivität der

Wirkstoffaufnahme in Tumorzellen. Nach einer erfolgreichen Lokalisation ins Zellinnere beginnt die Umwandlung der Prodrugs in ihre aktive Spezies. Die erste Monophosphorylierung wird bei Decitabin von Deoxycytidin-Kinasen (DCK) durchgeführt, während anschließend von Nucleosid Monophosphat-Kinasen (NMPK) und Nucleosid Diphosphat-Kinasen (NDPK) die finalen Konversionen bis hin zum Triphosphat durchgeführt werden.^[228-229] Da Azacytidin ein RNA-Baustein ist, wird dabei die erste Phosphorylierung von Uridin-Cytidin-Kinasen (UCK) durchgeführt. Die dann folgenden Reaktionen geschehen analog zu Decitabin.^[230] Diese erste Monophosphorylierung der Derivate stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und läuft entsprechend langsamer ab als die nachfolgenden Phosphorylierungen.^[231] Das final gebildete Triphosphat kann schließlich im Zellkern in die DNA eingebaut werden.

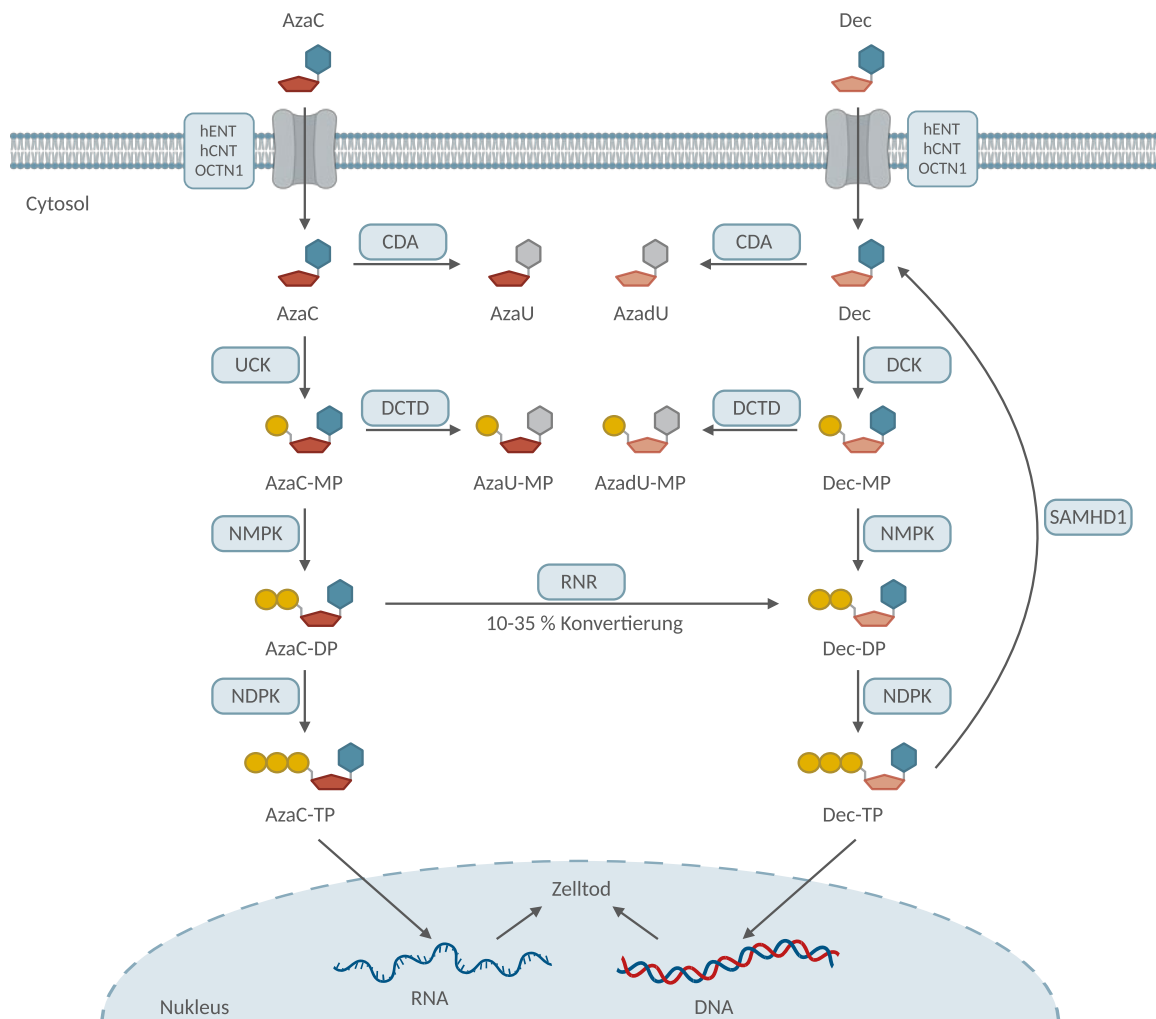
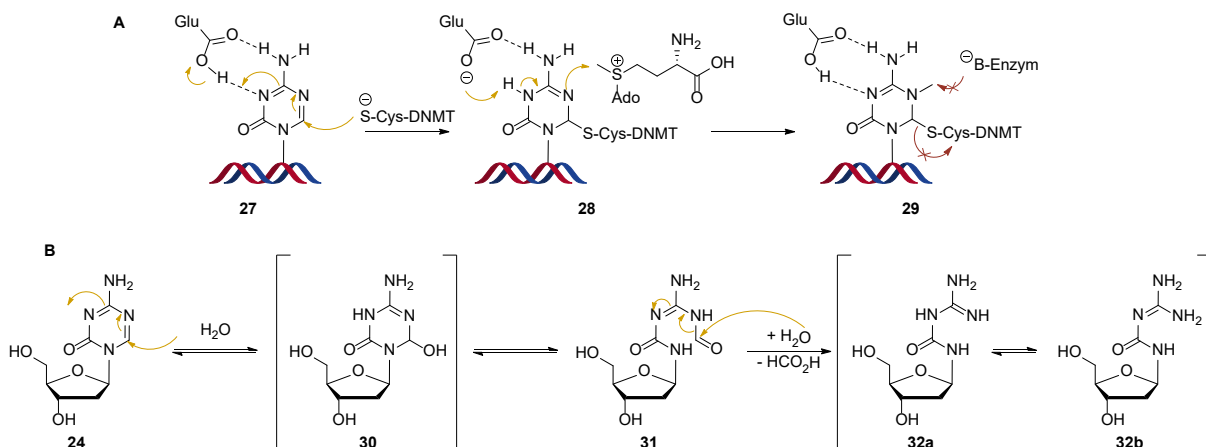


Abbildung 15 Überblick über die verschiedenen Biotransformationen, welche die Aktivierung und Deaktivierung der epigenetischen Wirkstoffe **23** und **24** bedingen. Nachdem der RNA-Wirkstoff AzaC und der DNA-Wirkstoff Decitabin durch Transporter in die Zelle aufgenommen werden, folgen verschiedene enzymatische Konversionen um die jeweils biologisch aktiven Triphosphate zu generieren. Zusätzlich können verschiedene Enzyme auch die Deaktivierung der Substanzen verursachen oder den RNA- in den DNA-Wirkstoff überführen. Abbildung adaptiert von OELLERICH *et al.*^[175] **Abkürzungen:** CDA = Cytidin-Deaminase, DCK = Deoxycytidin-Kinase, DCTD = Deoxycytidylat-Deaminase, Dec = Decitabin, hCNT = *human concentrative* Nucleosid-Transporter, hENT = *human equilibrative* Nucleosid-Transporter, NDPK = Nucleosid Diphosphat-Kinase, NMPK = Nucleosid Monophosphat-Kinase, OCTN1 = *novel organic cation transporter*, RNR = Ribonucleotidreduktase, SAMHD1 = Triphosphat-Hydrolase, UCK = Uridin-Cytidin-Kinase.

Es gibt innerhalb der Zelle jedoch auch einige katabolische Mechanismen, die genau dies verhindern wollen. Direkt nachdem die Derivate das Zellinnere erreicht haben, können diese durch Cytidin-Deaminase (CDA) in ihre Uridin-Analoga umgewandelt werden.^[231-232] Analog ist dies auch, durchge-

führt von einer Deoxycytidylat-Deaminase (DCDA), für die entsprechenden Monophosphate möglich.^[233] Neben der Umwandlung von Cytidin zu Uridin durch die Entfernung des exocyclischen Amins ist auch die RNA-DNA-Umwandlung möglich. Etwa 10–35 % des Azacytidin-Diphosphates werden von Ribonukleotidreduktasen (RNR) deoxygeniert und somit in ihr DNA-Äquivalent transformiert.^[175] Ein letzter Deaktivierungsmechanismus, welcher in den letzten Jahren entdeckt wurde, beinhaltet die Abspaltung der Decitabin Triphosphateinheit als anorganisches Triphosphat von der Triphosphorylase SAMHD1.^[234] Dabei ist auffällig, dass nur Decitabin, nicht aber Azacytidin von diesem Deaktivierungsmechanismus betroffen ist.^[175] Die verbleibenden Triphosphate können schließlich im Nukleus während der S-Phase des Zellzyklus in den neu hergestellten DNA- bzw. RNA-Strang eingebaut werden.^[235] Der Anteil der eingebauten Aza-Analoga in den neuen DNA-Strang beträgt je nach Konzentration und Inkubationszeit etwa 5 % aller Cytidine.^[236] Als optimale Inkubationszeit haben sich *in vitro* zwei Zellzyklen bewährt.^[222] Dabei ist erstaunlich, dass bereits der Einbau von nur 0,3 % Azacytidin-Derivaten ausreicht, um mehr als 95 % der DNMTs zu inhibieren.^[237] Auch der Wirkmechanismus der beiden Derivate unterscheidet sich leicht. Während Azacytidin nach Einbau in die RNA unter anderem die Proteinbiosynthese inhibiert, besitzt Decitabin die Fähigkeit DNMT-Enzyme zu deaktivieren und somit zuvor stillgelegte Gene zu reaktivieren.^[235]

Der Austausch des Kohlenstoffs durch ein Stickstoff-Atom an der 5-Position der Base ist ausschlaggebend für die große Wirkung, die diese Stoffe besitzen. Bei der Methylübertragung von SAM kommt es zu einem kovalenten Komplex zwischen DNA und Protein, welcher erst im letzten Schritt durch eine β -Eliminierung wieder gelöst wird (**Schema 1**).^[64] Trotz des an der 5-Position eingeführten Stickstoffs, wird das Aza-Substrat von den DNMT-Enzymen erkannt und die Methylierungsreaktion wie in Stufe **27** und **28** gezeigt, initiiert.^[238] Die Abspaltung des Enzyms durch eine β -Eliminierungsreaktion in Stufe **29** kann allerdings nicht mehr stattfinden und die DNMT ist kovalent gefangen (**Schema 3 A**).^[66]



Schema 3 **A:** Reaktionsmechanismus der Inhibierung von DNMTs. Nach initialem nukleophilen Angriff der Cystein-Seitenkette und anschließendem Methyltransfer kann das dabei kovalent gebundene DNMT-Enzym auf Grund des bei Aza-Basen an 5-Position eingeführten Stickstoffs nicht über eine β -Elimination abgespalten werden. Durch den dabei entstehenden DNA-Protein-Crosslink wird die Aktivität der DNMT blockiert. **B:** Hydrolytischer Zerfall von Decitabin. Auch Wasser kann nukleophil die 6-Position der Aza-Base angreifen, was über Intermediat **30** zur geöffneten Struktur **31** und schließlich dem finalen Degradierungsprodukt **32** führt.

Das DNMT-Enzym bleibt somit auf Grund des DNA-Protein-Crosslinks (DPC) an dieser Stelle der DNA lokalisiert und kann sich nicht weiter den Strang entlang bewegen, um so weitere Cytidine zu methylieren.^[239] Durch diese Inhibition und dem dadurch entstehenden Mangel aktiver DNMTs bei geringeren Decitabin-Dosen von 20 mg/m² als klinischer Goldstandard^[240-241] kommt es somit zu einer globalen Reduktion des 5-mdC-Niveaus von 4 % auf 2 % bei MDS-Patienten^[242] und zuvor stillgelegte Gene werden wieder aktiviert.^[243-244] Die zu verabreichende Dosis wird dabei wie bei Cytostatika üblich, auf die Körperoberfläche des Patienten, welche anhand der Größe und des Gewichts bestimmt werden

kann, bezogen.^[245] Das kovalent gebundene Enzym wird, da die entstehenden DPCs auf Grund ihrer Größe Chromatintransaktionen behindern und dadurch sehr toxisch sind, von SPRTN oder der SPRTN-ähnlichen Protease ACRC (*acidic repeat-containing protein*) proteolytisch entfernt.^[246] Wird Decitabin mit 50–300 mg/m² höher dosiert,^[228] so ist weniger der hypomethylierende Effekt ausschlaggebend für das Absterben der Leukämiezelle, sondern viel mehr der cytotoxische Effekt, den dieser Wirkstoff besitzt. Im Gegensatz zu Decitabin wird Azacytidin als RNA-Analogen hauptsächlich in die RNA eingebaut, wo es mit der RNA-Verarbeitung und Proteintranslation interferiert.^[247] Dabei konnte es bereits in transfer,^[248] ribosomaler,^[249] messenger^[247] und micro^[250] RNA nachgewiesen werden. Neben der Inhibierung der RNA-Synthese durch Verhindern der Pyrimidinsynthese^[251] ist auch die irreguläre Verarbeitung von rRNA-Vorläufern^[252-253] und der Abbau von Polyribosomen^[254-255] eine Möglichkeit, wie Azacytidin auf RNA-Ebene seine Wirkung entfaltet. Es ist ein komplexes Zusammenspiel der Effekte auf RNA-Ebene, welches schließlich zum Absterben der Tumorzellen führt.

Ein großes Problem beim Einsatz von diesen Aza-Cytidin-Derivaten ist, dass nicht nur der nukleophile Angriff des DNMT-Thiols an der 6-Position möglich ist, sondern, dass auch die hydrolytische Ringöffnung der Aza-Base **24** begünstigt wird (**Schema 3 B**). Diese Degradierung beginnt mit der Addition von Wasser, wodurch das Intermediat **30** entsteht, welches direkt in das Formyl-Derivat **31** umlagert.^[256] Nach einer weiteren Wasseranlagerung und Abspaltung von Ameisensäure liegt das finale Guanylurea-Degradierungsprodukt **32** vor, welches als Tautomer in den zwei Formen **32a** und **32b** vorkommt.^[257] Dieser Mechanismus, welcher bereits 1965 entdeckt wurde,^[258] läuft bevorzugt in basischem Milieu ab,^[259] da in saurer Umgebung die glycosidische Bindung extrem labil ist^[260] und somit die Base leicht von der Riboseinheit abspaltbar ist.^[217] Diese hydrolytische Degradierung läuft unter physiologischen Bedingungen so schnell ab, dass die Halbwertszeit von Decitabin nur 9–13 h beträgt.^[256] Neben der Ringöffnung als Hauptdegradierungsweg ist nach initialer Ringöffnung auch die Anomerisierung des Nucleosid-Analogons möglich.^[261] Das geöffnete Intermediat **31** kann zusätzlich während der Epimerisierung die zwei unterschiedlichen Zuckerkonformationen eines Furanosyl- oder Pyranosylrings annehmen, welche jeweils wieder deformylieren können.^[256] Das Problem, welches durch diese rapide Degradierung^[262] auftritt, ist nicht nur die Reduktion der Wirkstoffkonzentration im Blutplasma,^[263] sondern auch eine zusätzliche Belastung der Patienten durch die toxischen Abbauprodukte.^[256] Obwohl Azacytidin in wässriger Lösung deutlich stabiler ist als Decitabin, kann auch dieses im sauren Milieu zu Azauridin und weiteren Abbauprodukten zerfallen.^[264] Das final erhaltene Guanylurea-Derivat **32** kann anschließend von der BER-Maschinerie aus dem DNA-Strang entfernt werden.^[265]

Diese hydrolytische Degradierung der Wirkstoffe macht die präzise Dosierung der Medikamente als Infusionslösung nahezu unmöglich. Um deren Stabilität und damit auch deren Wirkung bestmöglich zu steigern, wurden im Lauf der Jahre verschiedene Derivate und Prodrugs entwickelt.^[266] Zunächst konnte durch die Reduktion der Doppelbindung Dihydrodecitabin (**33**) synthetisiert werden, welches bei besserer Stabilität seine antitumorale Wirkung behielt.^[267] Der Verlust der Aromatizität lässt dabei einen veränderten Wirkmechanismus vermuten, bei welchem der Methyltransfer von SAM nicht nötig ist um die DNMTs zu inhibieren.^[268] Da die Decitabin-Infusionslösungen über einen Zeitraum von mehreren Stunden^[269] oder sogar Tagen^[270] gegeben werden, wurden auf Grund der Stabilitätsprobleme ebenfalls Ester-Prodrugs **34** und **35** sowie Formulierungen entwickelt, welche alternative Aufnahmewege nutzen.^[271-274] Schließlich wurde im Jahr 2019 das carbacyclische Derivat cAzadC (**1**) synthetisiert,^[6] welches eine 60-fach höhere Stabilität gegenüber hydrolytischem Zerfall aufweist als Decitabin und in ersten *in vitro* Studien hervorragende Ergebnisse zeigte.^[275] Aber nicht nur der hydrolytische Zerfall, sondern auch der oben beschriebene Katabolismus macht den Einsatz und die Dosierung schwierig. Die Halbwertszeit von Decitabin im Blutplasma beträgt beispielsweise auf Grund der großen CDA-Aktivität nur 12–35 min.^[276-277] Dieser Abbau konnte durch die Synthese verschiedener

Prodrugs wie dem Dinukleotid Guadecitabin (**36**)^[278-279] oder dem Silylether OR-2100 (**37**)^[266] adressiert werden (**Abbildung 16**).

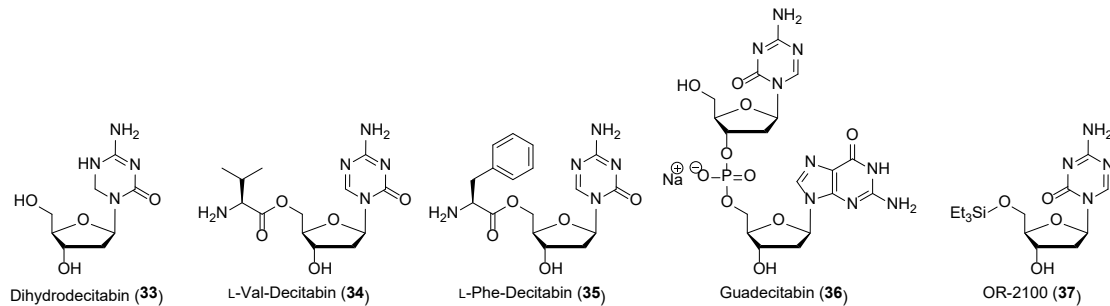


Abbildung 16 Chemische Strukturen des stabilen Decitabin-Derivats Dihydrodecitabin (**33**), sowie der beiden Aminosäure-Ester-Prodrugs **34** und **35** welche hauptsächlich für die orale Gabe des Medikaments entwickelt wurden. Die Prodrugs Guadecitabin (**36**) und Silylether OR-2100 (**37**) besitzen eine erhöhte Stabilität gegenüber Deaminasen und werden somit weniger deaktiviert.

Trotz all dieser Weiterentwicklungen und Optimierungen der Wirkstoffe, fällt ein großer Nachteil immer mehr ins Auge: Das Auftreten von Resistenzen gegen die eingesetzten Azacytidin-Derivate konnte über die letzten Jahre immer häufiger beobachtet werden.^[280] Die Hauptursache für die Resistenzen *in vitro*^[174] und *in vivo*^[281] sind die ungenügende Inkorporation des Wirkstoffs in die DNA auf Grund von reduzierter hENT- und Phosphorylase-Aktivität, sowie gesteigerter CDA-Aktivität. Ein entsprechend großes Problem der HMA ist, dass diese alleine nicht ausreichen, um Leukämien wie AML zu heilen.^[181] Ca. 36 % der MDS-Patienten zeigen nach Behandlung mit Decitabin einen Rückfall der Krankheit, während 55 % schon zu Beginn nicht auf das Medikament ansprechen.^[282] Obwohl zunächst vermutet wurde, dass ein Wechsel von Decitabin zu Azacytidin auf Grund der unterschiedlichen Wirkmechanismen die Medikamentenempfindlichkeit der Patienten wieder erhöht, wurde dieser Ansatz auf Grund der geringen Erfolgsrate nicht weiter verfolgt.^[283]

Der große Fortschritt bei der Genomanalyse machte es möglich, AML in verschiedene Subtypen zu kategorisieren, je nachdem welche Genmutationen die einzelnen Patienten aufweisen.^[142] Dabei fielen bestimmte Genprofile auf, welche die verschiedenen Gruppen gemeinsam haben. Das gezielte Einsetzen bestimmter Wirkstoffe in Kombination mit Decitabin, machte so die Behandlung von AML effektiver als je zuvor.^[144] Die molekularen Ziele und die Wirkstoffe, mit denen diese gezielt angesteuert werden können, sind in **Abbildung 17** dargestellt. Die Deaktivierung des Wirkstoffs durch zellinterne Prozesse kann so maximal unterbunden werden, was die Bioverfügbarkeit und somit dessen Wirkung drastisch erhöht. Das Ziel einer Behandlung ist, möglichst alle leukämischen Stammzellen zu entfernen, so dass diese sich nicht nach anfänglicher Ruhephase wieder vermehren. Der Einsatz eines BCL2-Inhibitors konnte dies durch die Unterdrückung oxidativer Phosphorylierung gut erreichen, wodurch zuvor blockierte Apoptosemechanismen wieder reaktiviert wurden.^[284] Eine der am häufigsten auftretenden Genmutationen bei AML, welche bei einem Drittel der Patienten festgestellt wird, ist die Hyperaktivierung von FLT3, einem Tyrosin-Kinase-Rezeptor, welcher für das Initiieren der RAS-Kaskade und somit für die Übertragung von Wachstumssignalen verantwortlich ist.^[170] Wird diese Mutation bei der Diagnose festgestellt, so kann direkt ein Tyrosin-Kinase-Hemmer zugegeben werden, um die Behandlung so effektiv wie möglich zu gestalten.^[285] Auch das Auftreten von IDH-Mutationen kann bei 20 % der AML-Patienten beobachtet werden.^[184] Hierbei wird die natürliche Funktion des IDH-Enzyms auf mehrere Wege verändert. Einerseits wird die Oxidation und Decarboxylierung von Isocitronensäure verhindert, wodurch die Synthese von α -Ketoglutarat (α -KG) unterbunden wird, andererseits steigt die Aktivität α -KG zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG) zu reduzieren, wodurch viele α -KG-abhängige Dioxygenasen wie TET gehemmt werden. Das dadurch vorliegende Ungleichgewicht dieser Enzyme kann durch den Einsatz weiterer Kinasehemmer ausgeglichen werden.^[286] Diese sind allosterische Inhibitoren die entweder die offene Enzymkonformation stabilisieren um so die Produktion von 2-HG

zu verhindern oder durch Binden des für die IDH-Aktivität nötigen Magnesium-Ions die Ausbildung des katalytischen Zentrums zu verhindern. Durch die dadurch steigende Konzentration an α -KG kann die TET-Aktivität wieder hergestellt werden. Neben diese zellintrinsischen molekularen Zielen wird auch der Einsatz von zellextrinsischen Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie PD und CTLA gerade klinisch untersucht.^[287]

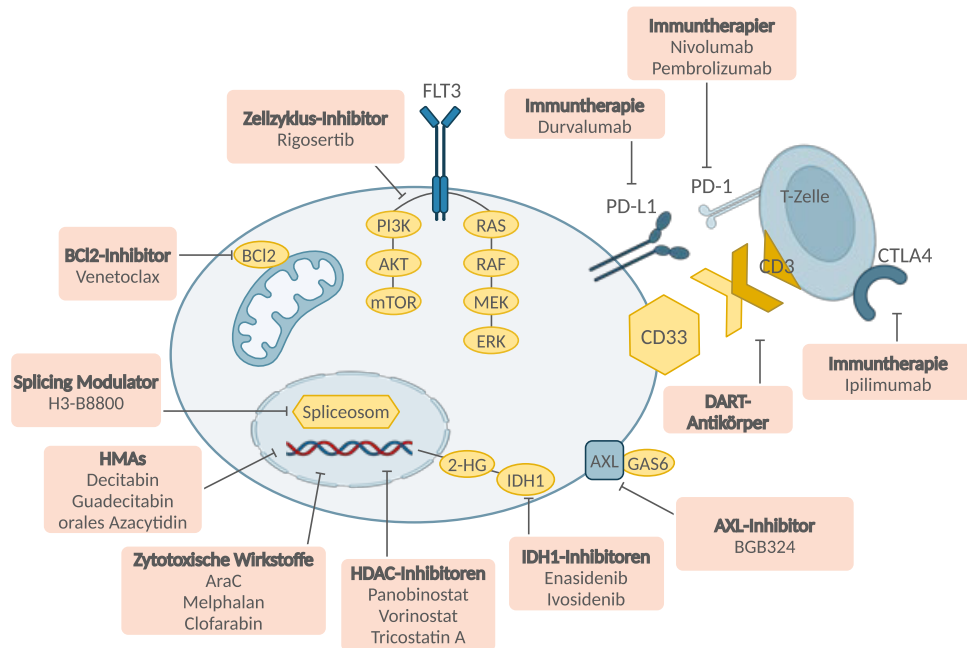


Abbildung 17 Überblick über die intra- und extrazellulären molekularen Ziele für die Behandlung von Leukämien und deren entsprechende Wirkstoffklassen. Abbildung adaptiert von SOCKEL *et al.*^[288] Abkürzungen: 2-HG = 2-Hydroxyglutarsäure, AKT = Protein-Kinase B, AXL = Rezeptor Tyrosin-Kinase, Bcl2 = *B-cell lymphoma*, CD = *cluster of differentiation*, CTLA4 = *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*, DART = *dual affinity retargeting*, ERK = *extracellular signal-regulated kinase*, GAS = *growth arrest specific*, HDAC = Histon-Deacetylase, HMA = hypomethylierende Arzneimittel, IDH1 = Isocitrat-Dehydrogenase, MEK = *mitogen-activated protein kinase*, mTOR = *mechanistic target of rapamycin*, PD1 = *programmed cell death receptor*, PD-L1 = *programmed cell death ligand*, PI3K = *phosphoinositide kinase*, RAF = *rapidly accelerated fibrosarcoma*, RAS = *rat sarcoma virus*.

Diese Kombinationstherapien ermöglichte es, die Probleme der AML Behandlung zu adressieren und zusätzlich individuell auf die Bedürfnisse des einzelnen Patienten einzugehen. Dennoch bleibt das Restrisiko an Resistenzen, nicht nur gegen Decitabin, sondern auch gegen die jeweils zusätzlichen anderen Inhibitoren und Wirkstoffe bestehen. Das Optimum wäre entsprechend eine Therapie zu entwickeln, die mit nur einem Wirkstoff auskommt, welcher eine antitumorale Wirkung ohne bzw. mit nur wenigen Nebenwirkungen aufweist, keine Resistenzen ausbildet und leicht dosierbar ist. Der in der Arbeitsgruppe von PROF. CARELL entwickelte Wirkstoff cAzadC bietet dafür eine vielversprechende Grundlage.

3 Zielsetzung

Die effektive Behandlung von Leukämien im Allgemeinen und AML im Speziellen stellt im klinischen Alltag immer noch eine große Herausforderung dar. Neben den vielen verschiedenen molekularen Mechanismen, die für die Entstehung der Krankheit und deren Verlauf verantwortlich sind, sind vor allem primäre und sekundäre Resistenzen und die darauf folgende Anpassung der Medikamenten-Dosierung Probleme, die in der aktuellen Forschung adressiert werden. Durch die Entwicklung von Kombinationstherapien, d.h. durch Zugabe spezieller Inhibitoren, konnte die Aktivität der eingesetzten hypomethylierenden Wirkstoffe schon deutlich verbessert werden. Dennoch bleibt die Suche nach der „Zauberkugel“^[289] offen, d.h. nach einem einzelnen Wirkstoff, welcher gezielt die Tumorzellen angreift, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. Decitabin und AzaC, die beiden klinisch zur Bekämpfung diverser Leukämie-Subtypen eingesetzten HMAs, besitzen neben dem oben genannten Problem einen weiteren großen Nachteil: Ihre Instabilität sowohl in wässriger Infusionslösung, als auch im Blutplasma. Die dadurch entstehenden toxischen Degradierungsprodukte stellen eine weitere Belastung für die bereits geschwächten Patienten dar.

Dieser Nachteil konnte jedoch mit einem 2019 in der Arbeitsgruppe von PROF. CARELL entwickeltem carbacyclischen Decitabin-Analogon behoben werden.^[6] Durch den fehlenden Elektronenzug, den der Ribose-Sauerstoff normalerweise auf die glycosidische Bindung ausübt und der fehlenden Möglichkeit H-Brücken auszubilden kann eine 60-fach erhöhte Stabilität des Wirkstoffs gegenüber Decitabin erzielt werden.^[275] Auch zeigen erste Studien, dass das entwickelte Derivat cAzadC größere toxische Effekte auf Leukämiezellen hat als Decitabin. Diese Ergebnisse veranschaulichen das große Potential, das dieses Derivat besitzt und machen es somit zu einer idealen Leitstruktur, welche durch gezielte Modifikation möglicherweise in ihrer Wirkung noch weiter verbessert und bezüglich ihres genauen biochemisch-biologischen Wirkmechanismus detailliert untersucht werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Weiterentwicklung des Nukleosid-Analogons cAzadC (**1**) und die biochemische und analytische Untersuchung des Wirkmechanismus (**Abbildung 18**). Dabei sollten zunächst verschiedene Prodrug-Einheiten an der 5'-Position des Carbacyclus angebracht werden, um dessen Aufnahme und Wirkung zu verbessern. Alternativ sollten auch biochemische Marker wie Biotin angebracht werden, um den biologischen Mechanismus des Wirkstoffs aufklären zu können. Um die Translokation ins Zellinnere und den Einbau des epigenetischen Derivates in die DNA genau per Massenspektrometrie zu quantifizieren, sollten verschiedene Isotopenstandards synthetisiert werden, bei denen einzelne Atome der Aza-Base durch ihre stabilen schweren Isotope ausgetauscht sind. Um den Abbau des Protein-DNA-Komplexes zu untersuchen sollte das entsprechende Phosphoramidit hergestellt und per Festphasensynthese in einen synthetischen DNA-Strang integriert werden.

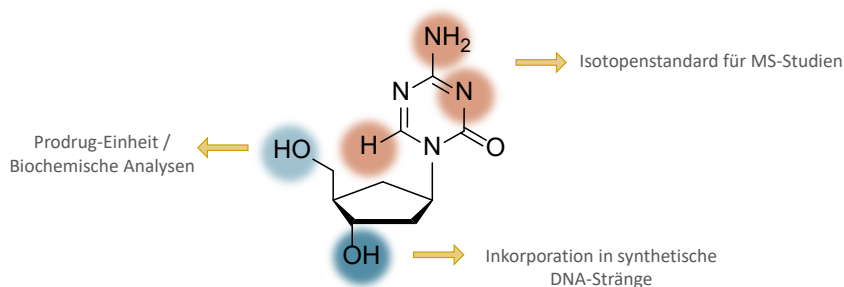


Abbildung 18 Überblick über die chemische Struktur des Zielmoleküls cAzadC (**1**). Hervorgehoben sind die verschiedenen Stellen, welche im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit modifiziert wurden.

Die Ergebnisse und Resultate der einzelnen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind im nachfolgenden Kapitel detailliert beschrieben.

4 Ergebnisse und Diskussion

Aufbauend auf den theoretischen Grundlagen, werden in den nächsten Kapiteln **4.2–4.5** die eigens erarbeiteten Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Dabei werden sowohl die chemische Synthese der verschiedenen Moleküle als auch die biochemischen Experimente und deren Interpretation ausführlich geschildert. Zu Beginn wird die Synthese des cAzadCs als Grundlage aller Modifikationen, im Anschluss die der verschiedenen Prodrugs und weiterer Derivate gezeigt.

4.1 Wirkung von cAzadC auf unterschiedliche Tumorzellen

Die Entdeckung von Decitabin im Jahr 1964 und dessen antitumoraler Wirkung 1968 war ein Meilenstein in der Entwicklung epigenetischer Wirkstoffe.^[214] Schnell wurde das Potential des Cytidin-Derivats entdeckt und erste klinische Studien an Patienten mit akuter Leukämie wurden durchgeführt.^[276, 290] Dabei zeigte sich eine hervorragende Wirkung des Nukleosid-Analogons, welches nach Optimierung der einzusetzenden Dosis 2006 von der FDA als Wirkstoff gegen chronische myelomonozytäre Leukämie genehmigt wurde.^[269] Während Dacogen, wie Decitabin handelsüblich genannt wird, hervorragende Ergebnisse bei der Bekämpfung von Leukämien wie AML, MDS oder CML erzielte, konnte diese Wirkung bei der Bekämpfung von soliden Tumoren nicht beobachtet werden.^[291]

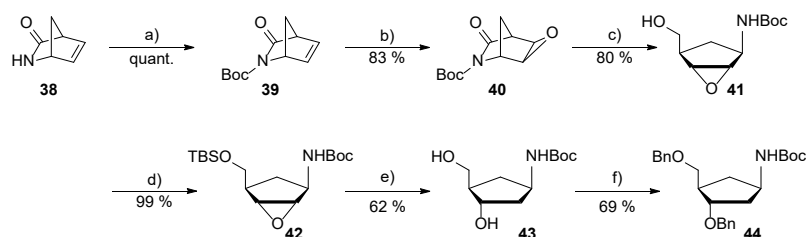
An diesem Punkt zeigt sich sehr eindrucksvoll das große Potential des carbacyclischen 5-Aza-2'-deoxycytidin Derivates, kurz cAzadC (**1**), das in der Arbeitsgruppe von PROF. CARELL entwickelt wurde. Das carbacyclische Decitabin-Derivat ist dem *orphan drug* Decitabin, d.h. einem für seltene Krankheiten entwickeltem Wirkstoff, welcher sich unter anderem durch ein vereinfachtes Zulassungsverfahren auszeichnet in mehreren Punkten eindeutig überlegen: Einerseits konnte die Stabilität des Derivats durch den Austausch des Ribose-Rings zum Carbacyclus deutlich erhöht und damit die Entstehung toxischer Nebenprodukte vermieden werden, andererseits eröffnet sich dadurch ein größerer Spielraum der Dosierung des Medikamentes, da der cytotoxische Effekt *in vivo* erst bei sehr hohen Dosen zu erkennen ist.^[292] Auch der Wirkmechanismus der beiden Substanzen unterscheidet sich leicht, da cAzadC in Krebszellen beispielsweise mehr DNA-Schäden hervorruft und somit grundsätzlich potenter ist als Decitabin.^[275] Zusätzlich konnte in noch unveröffentlichten Studien gezeigt werden, dass cAzadC nicht durch SAMHD1^[176] dephosphoryliert wird und somit die Bildung von Resistenzen gegenüber diesem Derivat deutlich geringer sein sollten. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass cAzadC im Gegensatz zu Decitabin auch auf eine Vielzahl von soliden Tumorarten in Zellexperimenten anspricht. Während Decitabin somit nur bei Leukämien und dabei auf Grund erhöhter Nebenwirkungen auch nur als *orphan drug* zur Behandlung älterer Patienten, welche kaum auf andere Therapien ansprechen, eingesetzt wird, zeigt cAzadC zusätzlich bei Lungen-, Brust- und Leberkarzinomzellen deutliche Wirkung. Dieser letzte Punkt, zusammen mit der höheren Dosierungsmöglichkeit und geringeren Resistenzen, kann die Behandlung von Leukämien sowie invasiven Karzinomen revolutionieren.

Die breite Anwendbarkeit in Verbindung mit den verbesserten Eigenschaften des Wirkstoffs im Vergleich zu Decitabin ergeben vielseitige Einsatzmöglichkeiten, aber auch die Notwendigkeit, dieses Molekül genauer zu erforschen. Die Evaluierung des biochemischen Effektes auf verschiedene Zelltypen soll in dem nachfolgenden Kapitel, zusammen mit der chemischen Synthese von cAzadC, ausführlich beschrieben werden. Während bei der Betrachtung der Totalsynthese der Fokus vor allem auf der korrekten Einführung der Stereozentren liegt, wird dieser bei der biochemischen Untersuchung auf der Änderung der Methylierungsniveaus der DNA liegen.

4.1.1 Synthese von cAzadC

In der Literatur sind mehrere Möglichkeiten für die Totalsynthese carbacyclischer Nucleoside bekannt.^[293-294] Neben der Route, die den carbacyclischen Ring via *Ring Closing Metathesis* (RCM) aufbaut,^[295] kann das Grundgerüst leichter über eine selektive Ringöffnung des VINCE-Lactams^[6, 296] hergestellt werden. Dieser Bicyclus spielt eine große Rolle bei der Synthese carbacyclischer Nucleosid-Analoga und wurde auch in diesem Fall als das beste Startmaterial gewählt.^[297] Wie beim Aufbau des Carbacyclus selbst gibt es auch für den Aufbau bzw. die Verknüpfung des Zuckers oder Carbacyclus mit der entsprechenden DNA-Base verschiedene Möglichkeiten. Grundsätzlich kann zwischen der linearen Route, bei der die Base schrittweise von geeigneten Vorläufermolekülen aufgebaut wird und der konvergenten Route, bei der eine intakte Base an einen aktivierten Carbacyclus angebracht wird, unterschieden werden.^[295, 298] Bei letzterer treten häufig Probleme auf, da die Selektivität der Base nicht optimal ist und somit falsche Verknüpfungen auftreten können.^[299] Da sich das cAzadC Molekül nicht nur durch das Fehlen eines Riboserings, sondern zusätzlich auch durch die nicht-kanonische Aza-Base auszeichnet, wurde entschieden, den Triazinring ausgehend von *O*-Methylisoureahydrochlorid linear aufzubauen. Die dabei gewählte Synthesestrategie basiert auf der Vorschrift von LIM *et al.*,^[300] bei der zunächst ein linearer Vorläufer an den Carbacyclus addiert und der Ring der Base erst im Anschluss unter Verwendung von Triethylorthoformiat geschlossen wird.^[214, 301-302] Die durchgeführte Synthese des cAzadCs entspricht der in der Literatur von OBER *et al.*^[296] und WILDENHOF *et al.*^[6] bereits publizierten Route, welche im Nachfolgenden erläutert und dabei speziell auf die verschiedenen Optimierungsversuche eingegangen wird.

Der erste Schritt der insgesamt 13-stufigen Synthese ist die Boc-Schutzung des enantiomerenreinen (1*R*, 4*S*)-VINCE-Lactams (**38**), welche unter Verwendung von Boc-Anhydrid und katalytischen Mengen DMAP in trockenem THF mit einer quantitativen Ausbeute in nur 2 h erhalten wurde (**Schema 4**).^[303] Die Einführung dieser sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe ist als dirigierende Einheit der nachfolgenden Epoxidierungsreaktion entscheidend, welche bereits 1909 das erste Mal von PRILESCHAJEW *et al.*^[304] unter Verwendung von „super Oxyden“ erwähnt wurde.^[305-306] Als Reagenz für die Epoxidierung wurde *m*-CPBA gewählt, welche sich als bestes Epoxidierungsmittel für das Boc-geschützte VINCE-Lactam **39** bewährt hat.^[302] Die Umsetzung erfolgte in DCM über Nacht und lieferte mit 83 % das Epoxid **40** in sehr guter Ausbeute. Bei der Aufarbeitung wurde besonders darauf geachtet, die als Nebenprodukt entstehende *meta*-Chlorbenzoesäure durch Waschen mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung und anschließender Säulenchromatographie vollständig zu entfernen.



Schema 4 Überblick über die ersten sechs Schritte der Syntheseroute zum Aufbau des geschützten Carbacyclus **44** ausgehend von VINCE-Lactam **38**. *Reagenzien und Bedingungen*: a) Boc₂O, DMAP, abs. THF, RT, 2 h; b) *m*-CPBA, DCM, RT, 24 h; c) NaBH₄, abs. MeOH, 0 °C → RT, 1 h; d) TBSCl, Imidazol, abs. DMF, RT, 1,5 h; e) Red-Al, abs. Toluol, 0 °C → RT, 1,5 h; f) NaH, BnBr, abs. DMF, 0 °C → RT, 4 h.

Obwohl die Literatur^[302, 307] die Entstehung des *exo*-Produktes **40** eindeutig vorhersagt, wurden die Kopplungskonstanten des Zwischenproduktes **40** mit den neu aufgebauten Stereozentren auf die korrekte Stereochemie via NMR-Spektroskopie untersucht. Beschrieben wird dieser Zusammenhang mit der KARPLUS-Gleichung welche besagt, dass die ³J_{H-H}-Kopplungskonstante abhängig vom Diederwinkel Φ der betrachteten vicinalen Protonen ist.^[308-309] Bereits 1981 wurde bei einem

bishydroxylierten ungeschützten VINCE-Lactam beschrieben, dass das *endo*-Produkt mit seinen *cis*-stehenden Protonen einen Diederwinkel $\Phi = 0$ und somit Kopplungskonstanten von ca. 5–6 Hz für alle Kopplungen zwischen den 1-, 6-, 4- und 5-ständigen Protonen aufweisen muss (**Abbildung 19**).^[310] Im Vergleich dazu hat das *exo*-Produkt sowohl *cis*- als auch *trans*-ständige Protonen, weshalb Kopplungskonstanten $J_{5-6} = 4$ Hz für *cis*-Protonen und $J_{1-6/4-5} < 2$ Hz im NMR-Spektrum sichtbar sein sollten.^[310]

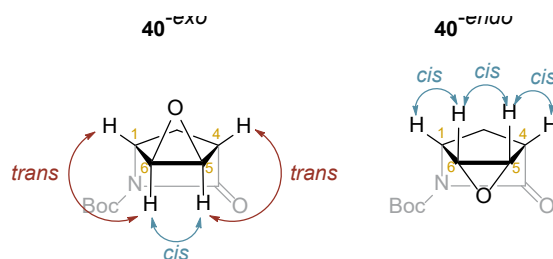


Abbildung 19 Chemische Strukturen der zwei möglichen *exo*- und *endo*-Produkte **40** nach der Epoxidierung. Auf Grund von sterischer Hinderung durch die zuvor eingeführte Boc-Gruppe wird bei der Einführung des Epoxids nur das gewünschte **40-exo** Produkt erhalten.

KATAGIRI *et al.* berichteten 1997 bei der Epoxidierung des Acetyl-geschützten VINCE-Lactams von Kopplungskonstanten von $J_{5-6} = 4,0$ Hz und $J_{1-6/4-5} = 1,5$ Hz für das erhaltene *exo*-Produkt.^[307] Für das Epoxid **40** konnten im NMR-Spektrum die Aufspaltung der Protonen 5 und 6 eindeutig erkannt und die Kopplungskonstanten mit $J_{6-5} = 3,6$ Hz, $J_{5-6} = 3,7$ Hz, $J_{6-1} = 1,3$ Hz sowie $J_{5-4} = 1,6$ Hz exakt ermittelt werden (**Abbildung 20**). Somit wurde das Vorliegen des *exo*-Produktes zweifellos bestätigt.

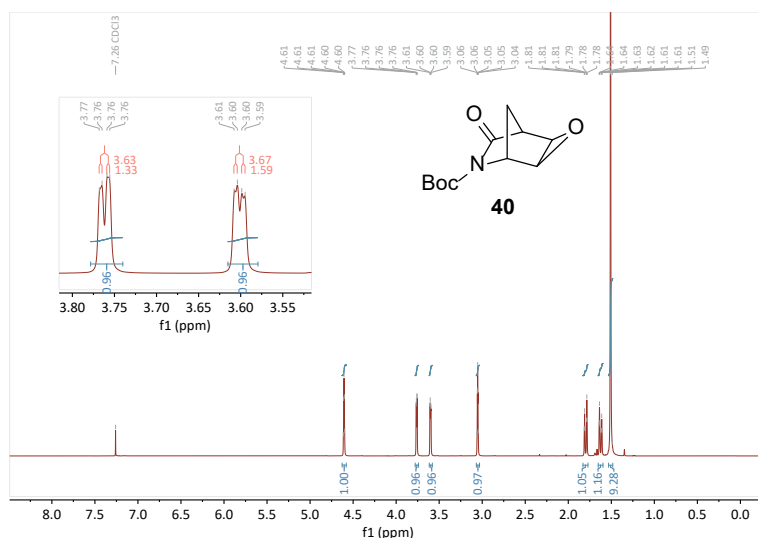
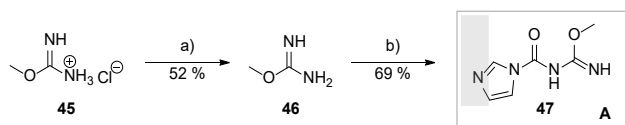


Abbildung 20 ^1H -NMR-Spektrum des Epoxids **40** mit detaillierter Betrachtung der Protonen 5 und 6 sowie deren Kopplungskonstanten.

Der Bicyclus des Epoxides **40** wurde im Anschluss unter Verwendung von NaBH_4 zur Zwischenstufe **41** geöffnet.^[311] Die Reaktion erfolgte in trockenem Methanol bei 0°C und konnte unter Verwendung katalytischer Mengen NaOMe , welches NaBH_4 in Lösung stabilisiert, wider Erwarten nicht optimiert werden.^[312] Die Ausbeute der Reaktion lag bei 80 %. Nach der TBS-Schätzung der 5'-Hydroxygruppe, welche mit fast quantitativer Ausbeute erfolgte, konnte das erhaltene Epoxid **42** regioselektiv geöffnet werden, um die gewünschte 3'-Hydroxygruppe einzuführen.^[313] Die gezielte Öffnung erfolgte mit dem Reduktionsmittel Red-Al , welches für seine Selektivität bekannt ist und dank der guten Stabilität gegenüber Luft entsprechend in verschiedenen Synthesen erfolgreich eingesetzt wurde.^[314-315] Die Ringöffnung erfolgte unter Abspaltung der TBS-Gruppe mit einer Ausbeute von 62 %. Das so erhaltene Zwischenprodukt **43** wurde im Anschluss mit Benzylschutzgruppen versehen, wobei die

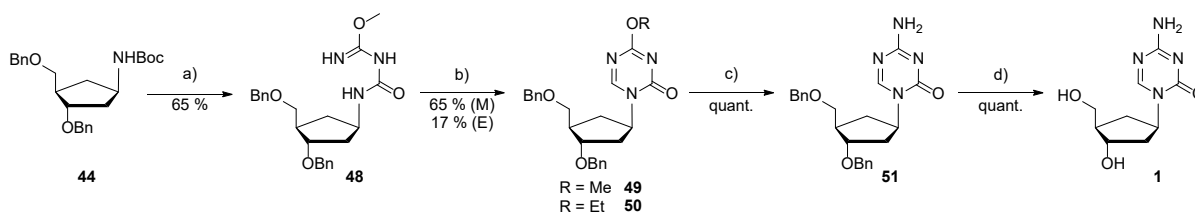
Reaktionsbedingungen einer WILLIAMSCHEM Ethersynthese genutzt wurden.^[316] Die vergleichsweise schlechte Ausbeute von 69 % kann mit der Entstehung von DMF-Benzyl Dimeren erklärt werden.^[317] Auch Änderungen der Reaktionsbedingungen konnten dies nicht vermeiden und die Ausbeute nicht weiter optimiert werden. Mit dem so erhaltenen Produkt **44** war der Aufbau des Carbacyclus beendet und es konnte schrittweise daran die modifizierte Cytidin-Base aufgebaut werden.

Für die Synthese des Triazinrings der Base wurde zunächst der Carbamyl-Baustein **A**, ausgehend von *O*-Methylisoureahydrochlorid (**45**) hergestellt (**Schema 5**). Die Synthesevorschrift basiert dabei auf Arbeiten von STIEGLITZ *et al.*, bei denen zunächst das Hydrochlorid **45** in einem Et₂O/H₂O Gemisch gelöst und mit KOH versetzt wurde um so den freien *O*-Methylisoharnstoff (**46**) mit einer mäßigen Ausbeute von 52 % zu erhalten.^[318] Dieser wurde anschließend, der Originalliteratur^[300] folgend, unter Verwendung von CDI mit einer guten Ausbeute von 69 % zum Basenbaustein **47** umgesetzt.



Schema 5 Überblick über die zweistufige Synthese des Bausteins **A**, ausgehend von *O*-Methylisoureahydrochlorid (**45**).
Reagenzien und Bedingungen: a) KOH, Et₂O/H₂O, -15 °C, 30 min; b) CDI, THF, RT, 3 h.

Mit beiden Molekülen, dem Basenvorläufer **47**, sowie dem carbacyclischen Baustein **44** zur Hand konnten diese anschließend miteinander verknüpft werden (**Schema 6**). Die zweistufige Synthese beinhaltete zunächst die Entfernung der Boc-Gruppe von Vorläufer **44** mit TFA und die anschließende Kupplung des Carbonylimidazols **47** an das so entstandene freie Amin. Auf Grund der Oxidationsempfindlichkeit desamins wurde dieses ohne weitere Aufreinigung oder Analyse direkt zum linearen Vorläufer **48** umgesetzt. Diese Oxidationsempfindlichkeit ist es auch, die entscheidend die Gesamtausbeute dieser Reaktionen von 65 % über zwei Stufen beeinflusst. Da diese Reaktion bzw. die Aufarbeitung nach der Boc-Entschützung im Abzug unter SCHLENK-Bedingungen, nicht jedoch in einer *glovebox* durchgeführt wurde, war eine Teiloxidation desamins nicht zu vermeiden. Der 1, 3, 5-Triazinring der Base konnte säurekatalysiert mittels Triethylorthoformiat geschlossen werden. Bei dieser Reaktion wurden zwei Derivate, der Methoxy- sowie der Ethoxyether **49** und **50**, erhalten und mittels Säulenchromatographie getrennt. Die angegebene Ausbeute von 65 % bezieht sich hierbei auf das Methoxy-Derivat **49**, wobei auch 17 % des Ethoxy-Derivats **50** erhalten wurden. Für die Folgereaktion konnten beide Derivate eingesetzt und unter Verwendung von methanolischem Ammoniak zum geschützten Azacytosin **51** mit quantitativer Ausbeute umgesetzt werden. Der letzte Schritt der Synthese von cAzadC (**1**) war die Entfernung der Benzylschutzgruppen mit BCl₃, ebenfalls in quantitativer Ausbeute.



Schema 6 Überblick über die letzten Stufen der Synthese von cAzadC (**1**), beginnend mit der Glykosylierungsreaktion des Carbacyclus **44**. Reagenzien und Bedingungen: a) 1. TFA, abs. DCM, RT, 1 h; 2. **A**, abs. MeCN, 85 °C, 2 h; b) Triethylorthoformiat, TFA, 90 °C, 3 h; c) NH₃ in MeOH, RT, 3 h; d) BCl₃, abs. DCM, -78 °C → RT, 3 h.

Entgegen der Literatur^[6] wurde zur Aufreinigung des Produktes **1** nur eine Säulenchromatographie durchgeführt. Die anschließende Analyse via analytischer HPLC mit einem Gradienten von 0 % → 1 % MeCN in 45 min zeigte einen sauberen Peak mit einer Retentionszeit von 10,98 min. Auch im NMR-

Spektrum waren keine Verunreinigungen sichtbar, weshalb auf eine Umkristallisation verzichtet werden konnte (**Abbildung 21**).

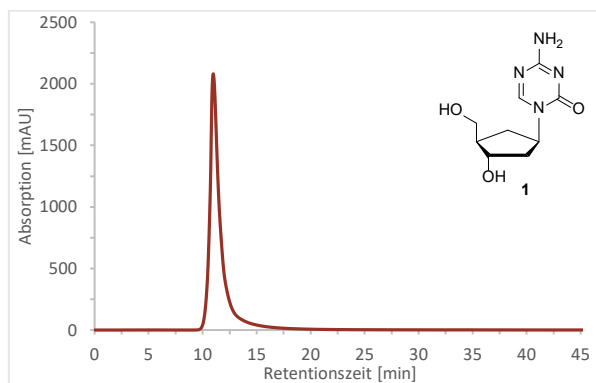


Abbildung 21 UV-Chromatogramm von cAzadC (**1**) bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC (0 % → 1 % MeCN in 45 min.) zur Überprüfung der Reinheit. Das saubere Produkt zeigte keine Verunreinigungen.

Damit cAzadC (**1**) seine epigenetische Wirksamkeit entfalten kann, muss es in die genomische DNA (gDNA) eingebaut werden. Entscheidend für den Einbau ist dabei die Konformation, die der Zucker in diesem Fall der Carbacyclus einnimmt.^[319] Der Zuckerpucker von Deoxynucleosiden innerhalb der (B)-DNA ist bevorzugt die C2'-*endo* Konformation, welche im Optimalfall auch der Carbacyclus des cAzadCs einnehmen sollte.^[320] Die Kristallstrukturanalyse zeigt, dass Nucleosid **1** zwei unterschiedliche pucker Konformationen annimmt: C6'-*endo* und C2'-*endo*-C3'-*exo*.^[6] Da letztere die für den Einbau in die DNA präferierte Anordnung ist, sollte das cAzadC bei Vergabe auf Zellen in deren DNA eingebaut werden und dort seine Wirkung entfalten können.

Mit der in diesem Kapitel beschriebenen Synthese konnte cAzadC (**1**) über 13 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 15 % hergestellt werden. Um dessen Effekt auf verschiedene Tumorarten zu untersuchen, wurden im Anschluss verschiedenen Zelllinien mit der Verbindung behandelt und die Änderungen der Methylierungsgrad der DNA als Marker des erfolgreichen Einbaus ins Genom sowie der damit verbundenen Entfaltung der Wirkung massenspektroskopisch untersucht.

4.1.2 Zelllinien Screening und *in vivo* Studien mit cAzadC

Das zuvor hergestellte Nucleosid-Analogon, wurde in Zellstudien auf seine biologische Wirkung hin untersucht. Die dafür im Rahmen ihrer Doktorarbeiten in der Zellbiologie von ELSA PEEV und TINA AUMER durchgeführten Experimente werden hier, um den eindrücklichen Effekt dieser Substanz zu zeigen, ebenfalls erwähnt und die Auswertung der Daten diskutiert.

Da die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen der gDNA eines der Kennzeichen einer AML-Erkrankung ist, ist dies gleichzeitig ein guter Marker, um die Wirksamkeit der hypomethylierenden epigenetischen Wirkstoffen wie Decitabin und cAzadC zu untersuchen.^[179] Um die Reduktion von Methyldeoxycytidin (5-mdC) bei unterschiedlichen Tumoren zu untersuchen, wurde cAzadC (**1**) in 14 verschiedenen Tumorzelllinien getestet. Das Ziel war dabei einerseits die Wirkung der Substanz in verschiedenen Leukämiezellen zu untersuchen, andererseits auch weitere Einsatzmöglichkeiten des Wirkstoffs weit über Leukämien hinaus zu identifizieren und damit dessen potentielles Anwendungsgebiet zu vergrößern. Die Vorgehensweise basierte dabei auf einem von TRAUBE *et al.*^[321] entwickelten Protokoll zur Quantifizierung von Nucleosiden. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit cAzadC, bzw. Decitabin oder DMSO als Negativkontrolle für 72 h bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert.^[322] Nach diesem Zeitraum wurde die gDNA isoliert und mittels NEB-Digestion-Mix bei 37 °C

für 2 h enzymatisch verdaut und so in ihre einzelnen Nukleoside aufgespalten.^[95, 322] Diese wurden anschließend mittels UHPLC-HRMS quantifiziert und die erhaltenen Werte auf 5-mdC pro dG normiert.

Neben den klassischen Leukämie Zelllinien MOLM-13,^[323] HL60^[324-325] und Kasumi-1^[326-327] wurden auch Zelllinien solider Tumore wie Leberkarzinom, HepG2,^[328] HuH7,^[329] Lungenkarzinom, A549,^[330-331] H3122,^[332] Calu-3,^[333] Bauchspeicheldrüsenkarzinom, AsPC1,^[334] und Dickdarmkarzinom, HCT116 untersucht. Zusätzlich wurde, obwohl es keine klassische Krebszelllinie ist, auch modifizierte Nierenzellen HEK293T^[335] untersucht. Auch der Effekt auf Nervenzellen, Neuro2A,^[336] SHSY^[337-338] und induzierte pluripotente Stammzellen iPSC^[339] wurde in den zellbiologischen Studien beurteilt. In **Abbildung 22** sind die in Kooperation mit ELSA PEEV, TINA AUMER und JUN.-PROF. FRANZISKA TRAUBE erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt. Die ermittelten 5-mdC-Niveaus sind pro dG in Promille angegeben und, für die bessere Vergleichbarkeit, auf DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Vehikel) normiert. Die Balken representieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Messungen während der Fehlerbalken die Standardabweichung darstellt. Die Daten der Zelllinien MOLM-13, HL60, Kasumi1, HepG2, A549, H3122, Calu3, Neuro2A und SHSY wurden als unabhängige Triplikate aufgenommen, während die der Zelllinien HEK293, HuH7, AsPC1, HCT116 und iPSC unabhängige Dublikate beschreiben. Die Zellen wurden bei 50 % Konfluenz bzw. einer Konzentration von 100 000 Zellen/mL mit Konzentrationen von 0,5–15 μM der verschiedenen Substanzen für 72 h inkubiert.

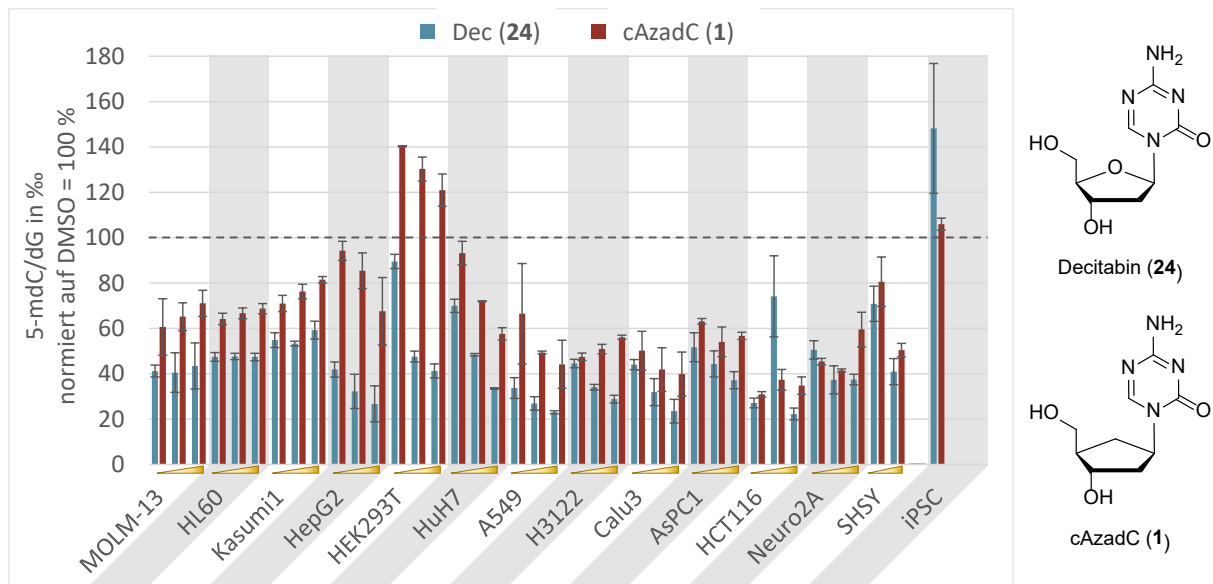


Abbildung 22 Änderung der 5-mdC-Niveaus der gDNA von verschiedenen Zelllinien nach Inkubation der unterschiedlichen Azacytidin-Derivate Decitabin(**24**, blau) und cAzadC (**1**, rot). Die Balken einer Farbe repräsentieren jeweils den Mittelwert mehrerer Messungen einer Konzentration der Aza-Derivate, welche in aufsteigenden Konzentrationen (gelber Gradient) auf die Zellen gegeben wurde. Bei den Zelllinien MOLM-13, HL60, HepG2, A549, H3122, Neuro2A wurden die Konzentrationen 1, 5 und 15 μM und bei Zelllinien Kasumi1, HuH7, Calu3, AsPC1 die Konzentrationen 0,5, 1 und 3 μM untersucht. Bei HEK293T- und HCT116-Zellen wurden die Konzentrationen von 1, 5 und 10 μM zugegeben. SHSY-Zellen wurden bei Konzentrationen von 1 und 3 μM und iPSC-Zellen bei 10 μM untersucht. Dargestellt ist das auf DMSO normierte Verhältnis 5-mdC/dG in Promille mit der jeweiligen Standardabweichung nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt. Die Daten wurden in Kooperation mit ELSA PEEV, TINA AUMER und JUN.-PROF. FRANZISKA TRAUBE erhoben.

Bei der Betrachtung der 5-mdC-Niveaus fällt auf, dass sowohl cAzadC als auch Decitabin diese im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO in den meisten Fällen deutlich senken können. Einzig die Zelllinien HEK293T und iPSC reagieren nicht auf die Behandlung mit den Azacytidin-Derivaten. Bestenfalls sollten die Experimente mit diesen Zelllinien nochmals wiederholt werden, um so Fehler bei der Handhabung dieser empfindlichen Zelllinien auszuschließen. Zusätzlich ist auffällig, dass, mit Ausnahme der HepG2- und HuH7-Zellen, mit steigender Konzentration wider Erwarten keine weitere Reduktion des 5-mdC-Niveaus zu beobachten ist, sondern genau das Gegenteil. Dieser Effekt konnte

bereits vor einigen Jahren, bei der Untersuchung von THP- und HL60-Zellen ebenfalls beobachtet werden.^[250] Ein Jahr später lieferte HAGEMANN *et al.*^[340] die Erklärung: Decitabin hat einen größeren Effekt auf CpG-Motive, welche außerhalb einer CpG-Insel^[341-342] vorliegen, da diese meist eine größere Konzentration von 5-mdC aufweisen. Diese Präferenz der Demethylierung zusammen mit der rapiden Remethylierung bestimmter Loci nach der DNA-Replikation kann so zu den beobachteten steigenden 5-mdC-Niveaus bei höheren Konzentrationen führen.^[343] Die Reduktion des 5-mdC-Gehalts bei 12 von den untersuchten 14 Zelllinien ist dennoch ein beeindruckendes Ergebnis, dass das große therapeutische Potential des carbacyclischen Derivates deutlich widerspiegelt.

Für die Reduktion der 5-mdC-Niveaus ist der Einbau der Substanzen in die DNA Voraussetzung. Um diese zu überprüfen, wurden von ELSA PEEV und DR. MATTHIAS HEIß neben 5-mdC auch die jeweiligen 5-Aza-Basen in der gDNA quantifiziert. Hier zeigt sich ein möglicher Grund für die durchschnittlich etwas bessere Leistung von Decitabin: Dieses ist deutlich mehr in der gDNA vorhanden als die carbacyclische Variante. Selbst bei der höchsten Konzentration ist in der gDNA ungefähr 50-mal so viel Decitabin zu erkennen wie cAzadC. Möglicherweise liegt das daran, dass die Kinasen, welche für die Triphosphorylierung der Substrate verantwortlich sind, durch den Carbacyclus in ihrer Funktion eingeschränkt werden.^[344-345] Der geringe Einbau von cAzadC in die DNA lässt die zuvor erhaltenen Ergebnisse der Reduktion des 5-mdC-Gehalts in etwas anderem Licht erscheinen, denn obwohl nur maximal zwei cAzadC-Moleküle auf 1000 dG kommen, ist dennoch ein deutlicher Effekt in der Reduktion der 5-mdC-Niveaus erkennbar. Eine Verlängerung der Inkubationszeiten kann dies möglicherweise verändern. Bei der Anwendung von Decitabin ist bekannt, dass der optimale Effekt nach zwei Zellteilungen zu erkennen ist.^[222] In den hier betrachteten 72 h ist jedoch nur eine Zellteilung möglich. Eine längere Inkubationszeit der Zellen mit den jeweiligen Derivaten könnte entsprechend ein besseres Bild über die Wirksamkeit der untersuchten Moleküle geben.

Um die Theorie zu überprüfen, dass cAzadC sehr viel langsamer in das entsprechende Triphosphat umgewandelt und damit auch langsamer in die DNA eingebaut wird, wurde von ELSA PEEV und DR. MATTHIAS HEIß die Menge der zwei 5-Aza-Basen im Metabolit-Pool (MP) untersucht. Dieser beinhaltet alle im Cytoplasma vorhandenen Metabolite und wurde ebenfalls mittels UHPLC-HRMS untersucht. Wie erwartet konnte im MP eine große Menge cAzadC nachgewiesen werden, während Decitabin nur noch in Spuren vorhanden war. Auf Grund der großen Herausforderungen welche sich bei der Analyse von mono-, di- oder triphosphorylierten Spezies in der massenspektrometrischen Analyse ergeben, wurden im MP jeweils die freien Nukleosid-Analoga identifiziert. Obwohl der große Anteil von cAzadC im MP nicht wünschenswert ist, so zeigt dies doch eindeutig auf, dass cAzadC in der Lage ist die Zellmembran zu passieren und ins Zellinnere aufgenommen zu werden. Einzig die langsame Phosphorylierung und der damit verbundene geringe Einbau in die DNA führen so zu den unterschiedlichen Ergebnissen in den Zellstudien.

Wie in Kapitel 2.5 erwähnt, führt der hypomethylierende Effekt der 5-Aza-Cytidin-Derivate zur Reaktivierung stillgelegter Gene und damit zur Induktion von Apoptose.^[346-348] Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die behandelten Zellen von ELSA PEEV im Rahmen ihrer Dissertation und JUN.-PROF. FRANZISKA TRAUBE mittels Durchflusszytometrie in PBS untersucht. Bei dieser Analysemethode wird der Fluss einer Zellsuspension in *phosphate buffered saline* (PBS) so fokussiert, dass die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl geleitet werden und entsprechend separat auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden können.^[349] Die Anwendungen dieser Methode sind vielfältig und beinhalten Zellsortierer, bildgebende Zytometer oder Massenzytometer, welche in der Immunologie oder molekularen Biologie verschiedene Zellcharakteristika bestimmen können.^[350] Unter anderem kann, wie hier angewendet, die induzierte Apoptose mittels Annexin-V-Färbung untersucht werden. Dieses phospholipidbindende Protein kann an Phosphatidylserin binden, welches während der Apoptose vom inneren zum äußeren Monolayer der Zellmembran verlagert wird.^[351-352] Wird mit Fluorescein-

Isothiocyanat modifiziertes Annexin V verwendet, können nach anschließendem Einfärben mit Propidiumiodid die Daten eindeutig durch die entstehenden Fluoreszenzsignale ausgewertet werden.^[351] Dies erfolgt mit einer Auftragung in vier Quadranten (**Abbildung 23**): Datenpunkte oben links zeigen nekrotische Zellen, welche zunächst anschwellen und schließlich platzen.^[353-354] Diese Größenänderung kann, ebenso wie bei frühen apoptotischen Zellen, welche zunächst dehydrieren und dadurch schrumpfen, durch die Intensität der Lichtstreuung nachgewiesen werden.^[355-356] Neben der Größe werden auch oben beschriebenes Annexin V und Sytox eingesetzt, um zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen zu unterscheiden, welche in den beiden rechten Quadranten unten bzw. oben aufgetragen werden.^[357-358] Sytox ist ein grün fluoreszierender Nukleinsäure-Färbemittel, welches gezielt Zellkerne und Chromosomen anfärbt sofern die Zellmembran geschädigt ist.^[359] Entsprechend ist es ein gutes Färbemittel um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden.

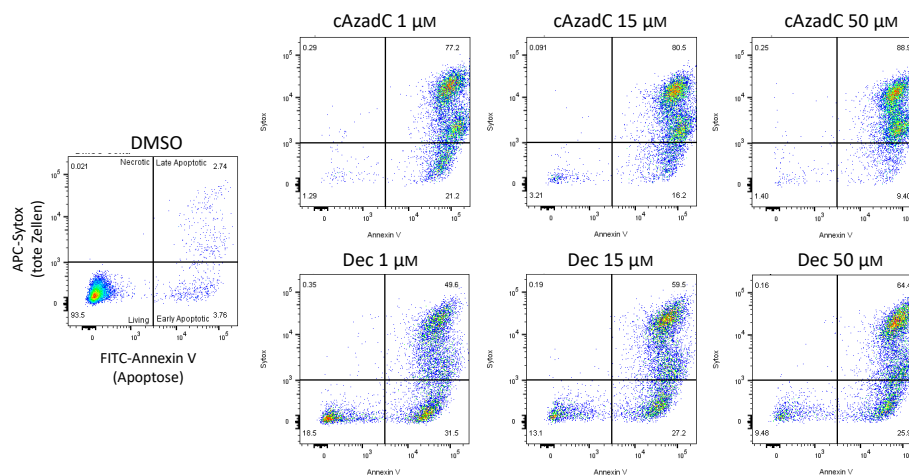


Abbildung 23 Auswertung der Durchflusszytometrie von MOLM-13 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit cAzadC (**1**, oben) und Decitabin (**24**, unten) bei Konzentrationen von 1, 15 und 50 µM. DMSO (links) dient als Negativkontrolle. Aufgetragen sind die mit Allophycocyanin (APC) Sytox eingefärbten toten Zellen gegen die durch Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Annexin V Färbung ermittelten apoptotischen Zellen. Bei den mit cAzadC bzw. Decitabin behandelten Zellen ist eindeutig der Trend zu erkennen, dass die Zellen in einem spät apoptotischen Stadium vorliegen. Dieser gewünschte Trend ist bei dem Einsatz von cAzadC stärker zu beobachten als bei der Vergleichssubstanz Decitabin. Die Daten wurden in Kooperation mit ELSA PEEV und JUN.-PROF. FRANZISKA TRAUBE erhalten.

Beim nekrotischen Zelltod verliert die Zellmembran ihre Integrität wodurch viele Abbauprodukte in den extrazellulären Raum kommen und diverse Entzündungsreaktionen verursachen. Da dies für die Patienten eine zusätzliche Belastung darstellt, ist das Ziel vieler Cytostatika selektiv Apoptose in den geschädigten Zellen hervorzurufen.^[360] Die mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Daten, dargestellt in **Abbildung 23**, zeigen eindrucksvoll, durch Konzentration der Datenpunkte in dem rechten oberen Quadranten, dass beide Azacytidin-Derivate, im Vergleich zu DMSO, die Zellen in den apoptotischen Zelltod führen. Während bei der Negativkontrolle die meisten Zellen lebend und nur sehr wenige in einem apoptotischen Stadium vorliegen, ist nach Behandlung der Zellen mit den Wirkstoffen eindeutig ein konzentrationsabhängiger Trend zum Auslösen des programmierten Zelltodes zu erkennen. Obwohl bei keiner der Proben eine Tendenz zur Nekrose vorliegt, so ist doch zu erkennen, dass cAzadC die Zellen stärker in das späte apoptotische Stadium lenkt als Decitabin. Nach der Behandlung der Zellen mit Decitabin sind viele nach 72 h immer noch im früh apoptotischen Stadium, ein Trend, welcher scheinbar konzentrationsunabhängig ist. Im Gegensatz dazu ist für cAzadC eine signifikante Proportionalität zwischen Konzentration und spät-apoptotischen Zellen zu erkennen. Obwohl die beiden untersuchten Moleküle sich in ihrer Struktur sehr stark ähneln, so deutet diese Experimente doch auf einen Unterschied in der biologischen Aktivität dieser beiden Substanzen hin. Weitere Experimente, welche explizit einen unterschiedlichen Wirkmechanismus bzw. veränderte Effektivität dieser Derivate untersuchen befinden sich derzeit in der Durchführung.

Da bisher erfolgreich gezeigt werden konnte, dass cAzadC in allen Zelllinien eine Reduktion des 5-mdC-Gehalts herbeiführt und auch gezielt Apoptose induziert, wurde als nächster Schritt die Wirksamkeit der Substanz in einem *patient-derived xenograft* Maus Modell (PDX), in Kollaboration mit DR. BINJE VICK des Helmholtz Zentrums München, untersucht. Dabei werden menschliche Krebszellen einer immundefizienten Maus zugeführt, an welcher schließlich das Verhalten des menschlichen Tumors selbst oder in Kombination mit einer Chemotherapie untersucht werden kann.^[361] In dieser Studie wurde den 9–16 Wochen alten Mäusen modifizierte AML491-Zellen über die Schwanzvene zugeführt und das Tumorwachstum über Biolumineszenz-Bildgebung beobachtet (**Abbildung 24** links).^[362-363] Die Therapie wurde nach initialen *in vitro* Tests, um zu bestätigen, dass diese Zelllinie grundsätzlich auf eine Behandlung mit cAzadC anspricht, 21 d nach Gabe der AML-Zellen begonnen, nachdem nachgewiesen wurde, dass zu diesem Zeitpunkt die Tumorlast ausreichend war. Die Therapie bestand aus einer Dosis pro Tag, ebenfalls intravenös über die Schwanzvene gegeben, über einen Zeitraum von 5 d; Angeschlossen wurden zwei Ruhetage. Dieser Zyklus wurde für vier Wochen wiederholt. Auf Grundlage vorangegangener Studien, bei denen nachgewiesen wurde, dass cAzadC weniger toxisch ist und somit höher dosiert werden kann, konnte dieses bei der Therapie mit einer Dosis von 10 und 40 mg/kg eingesetzt werden, während Decitabin auf eine Dosis von 0,125 und 0,25 mg/kg beschränkt wurde.^[275] Diese höhere Dosierung von cAzadC im Vergleich zu Decitabin hat sich in vorliegender PDX-Studie auch als notwendig erwiesen, um einen vergleichbaren bzw. besseren Effekt in der Reduktion der Tumorlast zu erzielen. Die Ursachen dieses Phänomens werden aktuell durch massenspektroskopische Analyse der einzelnen Tierorgane von ELSA PEEV und DR. MATTHIAS HEIß untersucht, um entscheidend daran beteiligte metabolische Prozesse oder mögliche Wirkstoffdepots aufzudecken. Trotz der deutlich höheren Dosis von cAzadC zeigten die Mäuse keine bedenklichen Nebenwirkungen und verkräfteten die Substanz im Vergleich zu Decitabin deutlich besser.

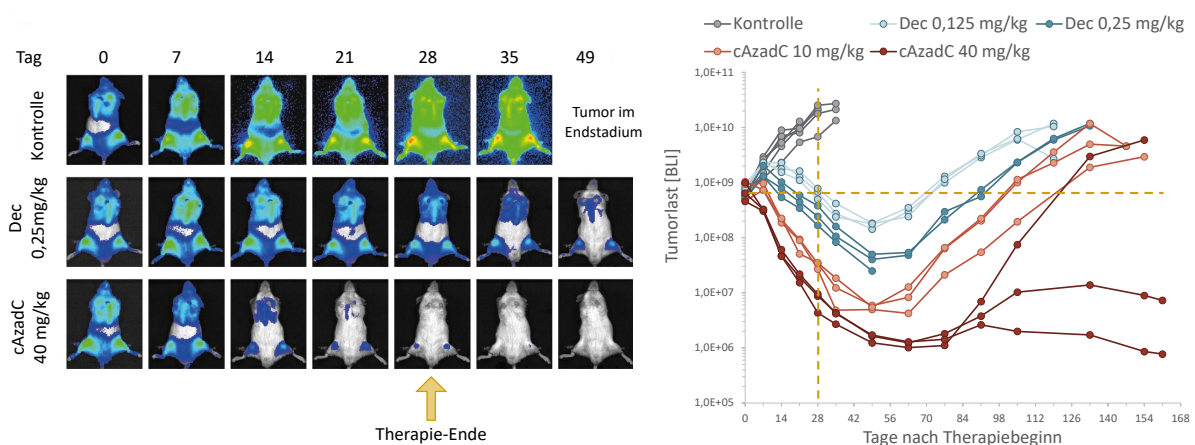


Abbildung 24 Biolumineszenz-Imaging der AML491-PDX-Mäuse nach verschiedenen Zeitintervallen (links) sowie die logarithmische Auftragung der Tumorlast, gemessen über Biolumineszenz *in vivo* Imaging (BLI) der verschiedenen Mäuse, über den beobachteten Zeitraum (rechts). Die gelben Markierungen zeigen einerseits das Ende der Therapie an (vertikale Markierung), andererseits die durchschnittliche Tumorlast bei Therapiebeginn (horizontale Markierung). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit DR. BINJE VICK des Helmholtz Zentrums München erhoben.

Neben der AML-Zelllinie 491 welche eine DNMT3A-Mutation aufweist, wurde in einer weiteren PDX-Studie, ebenfalls durchgeführt von DR. BINJE VICK des Helmholtz Zentrums München, den Mäusen die AML-Zelllinie 372, welche eine p53-Mutation besitzt verabreicht. Auch hier wurden die Tumorzellen über die Schwanzvene zugeführt und die Therapie mit cAzadC und Decitabin mit Dosen von 10 und 40 mg/kg sowie 0,125 und 0,25 mg/kg nach 34 Tagen, als die Tumorlast ausreichend groß war, begonnen. Diese konnte, auf Grund der modifizierten AML-Zellen erneut mittels Biolumineszenz-Bildgebung beobachtet werden (**Abbildung 25**). Bei der logarithmischen Auftragung der Tumorlast über den beobachteten Zeitraum fällt zunächst ein ähnlicher Trend auf wie bei der AML491 Zelllinie:

Nach Beenden der Therapie (gelbe vertikale Markierung) wird die Tumorlast noch etwa zwei Wochen reduziert und steigt anschließend weit über die zu Beginn der Therapie vorliegende Tumorlast (gelbe horizontale Markierung) an. Ein großer Unterschied zur ersten PDX-Studie ist, dass das Tumorwachstum nach erster Reduktion wieder rapide ansteigt. Bei keiner Dosis der eingesetzten Azad-Derivate konnte dies verhindert werden. Dies zeigt eindrucksvoll wie die große Heterogenität der AML-Erkrankungen die Auswahl einer geeigneten Therapie und Medikamentendosis erschwert. Möglicherweise hätte eine längere Therapie mit den jeweils hohen Dosen Decitabin oder cAzadC die Tumorlast stärker und länger reduzieren können.

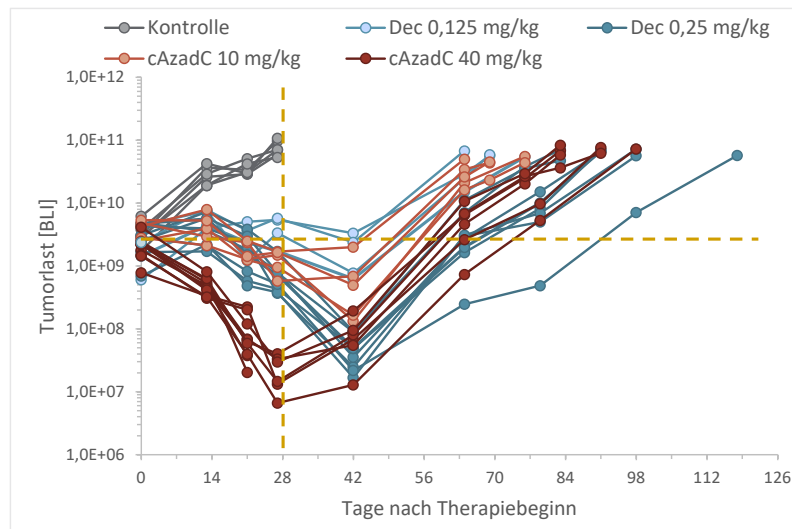


Abbildung 25 Logarithmische Auftragung der Tumorlast, gemessen über Biolumineszenz *in vivo* Imaging (BLI) der verschiedenen AML372-PDX-Mäuse, über den beobachteten Zeitraum. Die gelben Markierungen zeigen einerseits das Ende der Therapie an (vertikale Markierung), andererseits die durchschnittliche Tumorlast bei Therapiebeginn (horizontale Markierung). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit DR. BINJE VICK des Helmholtz Zentrums München erhoben

Die durch fachübergreifende Kooperation erhaltenen Daten zeigen sehr eindrucksvoll, dass cAzadC nicht nur in der Zellkultur den 5-mdC-Gehalt deutlich reduzieren kann, sondern dass es *in vivo* dem *orphan drug* Decitabin bei der Reduktion der Tumorlast von AML491-Zellen überlegen ist. Grundsätzlich konnten alle Therapieansätze die Tumorlast im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stark reduzieren. Auch konnte dieser Effekt auch nach Beenden der Therapie für alle Konzentrationen für einen Zeitraum von 2–4 Wochen beobachtet werden. Dennoch fällt auf, dass bei der Behandlung im AML372 PDX-Modell anschließend für Decitabin und auch cAzadC die Tumorlast wieder steigt. Der Unterschied in der Metabolisierung der zwei Substanzen, welcher sich deutlich dadurch zeigte, dass cAzadC sehr viel höher konzentriert eingesetzt werden musste, um vergleichbare bzw. bessere Resultate zu erzielen, ist Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise kann cAzadC in Gewebe eingelagert werden, von dem aus es langsam nach und nach ausströmt und aktiviert wird. Dies kann auch die stetige Tumorreduktion bei der AML491 PDX-Studie erklären, die auch nach Beenden der Therapie voranschreitet. Um diesen möglichen Depot-Effekt und die Verteilung des Wirkstoffs innerhalb des Körpers zu verändern, wurden verschiedene Prodrugs von cAzadC synthetisiert welche im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben werden.

4.2 Optimierung des therapeutischen Effekts durch Prodrugs

In den letzten 20 Jahren wurden pro Jahr ca. 30–50 neue Medikamente von der FDA für die klinische Anwendung zugelassen.^[364] In den Jahren 2008–2017 waren dabei 12 % dieser *new chemical entities* Prodrugs.^[365] Dieses Feld der Forschung ist entsprechend, auch wenn sich heute der Fokus etwas zu therapeutischen Oligonukleotiden und Peptiden hin verschiebt, immer noch ein bedeutendes Segment in der therapeutischen Chemie.

Der Einsatz vieler (Chemo-)Therapeutika hat erhebliche Einschränkungen auf Grund von Löslichkeit, chemischer Stabilität, Permeabilität, Toxizität oder präsystemischer Metabolisierung und damit lokaler Verfügbarkeit dieser Medikamente.^[366] Um diese pharmakokinetischen Eigenschaften der aktiven Wirkstoffe zu verbessern, kann bei einem Prodrug, wie in **Abbildung 26** gezeigt, eine Trägergruppe an einen Wirkstoff gekoppelt werden, um genau diese Limitationen zu überwinden. Der Begriff Prodrug wurde dabei in den späten 1950er Jahren von A. ALBERT bedeutend geprägt und bezeichnet eine nicht toxische und pharmakodynamisch inerte chemische Verbindung, welche *in vivo* zu einem aktiven Wirkstoff umgewandelt wird.^[367-368] Ausschlaggebend ist hier die geringe bis nicht vorhandene Toxizität der abspaltbaren Trägergruppe und ihrer Degradierungsprodukte.

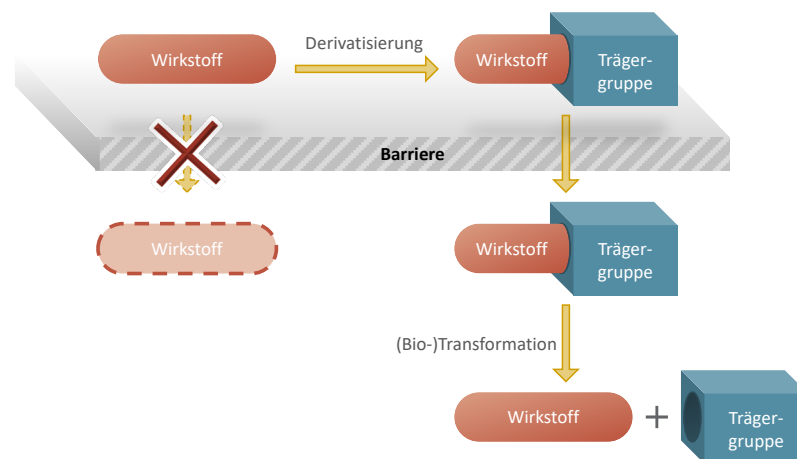


Abbildung 26 Schematische Darstellung des Prodrug-Konzepts. Während manche Wirkstoffe körperlinterne Barrieren nicht alleine überwinden können, helfen angebrachte Trägergruppen die chemischen Eigenschaften eines Wirkstoffes so zu verändern, dass dies möglich ist. Nach Überwinden der Barriere kann diese Trägergruppe enzymatisch oder chemisch abgespalten werden, um so den aktiven Wirkstoff freizusetzen. Auch grundsätzliche chemische Eigenschaften wie die Löslichkeit der Substanzen kann so angepasst werden um den optimalen Aufnahmeweg des Wirkstoffs zu gewährleisten. Abbildung adaptiert von STELLA *et al.* 2004.^[366]

Grundsätzlich können dabei zwei Gruppen unterschieden werden: Einerseits Prodrugs, welche die allgemeine Bioverfügbarkeit durch Überwinden verschiedener Barrieren verbessern, andererseits Prodrugs, welche das lokale Targeting des Wirkstoffs erlauben.^[369] Die Bioverfügbarkeit ist grundsätzlich durch die *first-pass*-Metabolisierung, einem pharmakologischen Phänomen bei dem die Wirkstoffkonzentration durch Verstoffwechslung innerhalb des Körpers reduziert wird,^[370] erheblich eingeschränkt.^[368] Jene kann durch Prodrugs, welche langsam in die entsprechenden aktiven Wirkstoffe umgewandelt werden, umgangen werden. Durch die langsame Freisetzung kann zusätzlich ein schnelles Ansteigen der lokalen Wirkstoffkonzentration und die damit möglicherweise verbundene Toxizität eingeschränkt werden.^[368] Nachteile dieser Prodrug-Varianten sind jedoch die unselektive Verteilung des Wirkstoffs sowie die mögliche Umwandlung in inaktive Metaboliten auf Grund konkurrierender Enzymreaktionen.^[371] Beim Einsatz von Prodrugs, die die lokale Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs verbessern, liegt der Fokus auf der organ- oder tumorspezifischen Zustellung des Zytotoxins, um damit Nebenwirkungen oder Resistenzen, die auf Grund des Angriffs gesunder Zellen bzw. der Dosislimitation entstehen, zu vermeiden.^[372] Um dies zu erreichen, ist es nötig, dass entweder die

Enzyme, die für die Biotransformation verantwortlich sind, ausschließlich in dem Zielorgan vorhanden sind, oder dass das Zielorgan speziell für die Aufnahme des Prodrugs, explizit der Prodrug-Trägergruppe, ausgelegt ist. Hierfür sind Enzyme mit einem hohen *turnover* optimal, um eine schnelle Freisetzung des Wirkstoffs zu erreichen.^[369] Dazu kann auch die hypoxische und saure Tumorumgebung explizit bei soliden Tumoren zur Freisetzung des aktiven Wirkstoffs genutzt werden.^[373-374] Auch die Konjugation von Biomolekülen wie Antikörper oder die Lektin-gesteuerte enzymatische Prodrug-Aktivierung sind Möglichkeiten den gewünschten Wirkort selektiv anzu-steuern.^[374]

4.2.1 Synthese der Ester-Prodrugs

Aus vorhergehenden Studien ist bereits die sehr gute Wirksamkeit von cAzadC gegen verschiedene Tumorzellen bestätigt. Auffällig bei diesen Experimenten war jedoch, dass cAzadC im Vergleich zu Decitabin deutlich höher dosiert werden musste, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Da beide Verbindungen zunächst in die Zelle aufgenommen werden müssen, um dort ihre Wirkung freizusetzen, wurde nachfolgend untersucht, ob die zelluläre Aufnahme von cAzadC als Prodrug mit verschiedenen Trägergruppen verbessert und damit auch dessen Wirkung verstärkt werden kann.

Explizit für Nukleosid-Therapeutika haben sich zwei Prodrug-Klassen über die Jahre hinweg etabliert: Ester- und Phosphat-Prodrugs.^[375-376] Ester-Prodrugs sind dabei die größte Klasse von Prodrug-Wirkstoffen überhaupt und werden hauptsächlich eingesetzt um durch die Maskierung polarer Gruppen die orale Aufnahme von Wirkstoffen zu verbessern. Diese Prodrugs haben den Vorteil, dass die Ester-Bindung, mit der die Trägergruppe an den Wirkstoff gebunden ist, schnell von Carboxylesterasen hydrolytisch gespalten werden kann.^[377] Da dieses Konzept bei der Erarbeitung von Prodrug-Strukturen für cAzadC ebenfalls zum Tragen kommen sollte, wurde eine Auswahl von Ester-Prodrugs synthetisiert, deren Synthese im nachfolgenden Kapitel ausführlich dargestellt wird.

Während die Corona-Pandemie 2020 die Welt lahmlegte und die meisten Menschen ins Homeoffice drängte, zog es Wissenschaftler während dieser Zeit in die Labore und Forschungseinrichtungen, um dem Virus den Kampf anzusagen. Es wurde unter Hochdruck nach einem geeignetem Medikament gesucht und so schnell wie nie zuvor die RNA-Oligonukleotid Impfstoffe entwickelt und deren Einsatz freigegeben.^[378-379] Neben den makromolekularen Impfstoffen wurde auch weiterhin nach anderen, *small molecule* Therapeutika gesucht, welchen allen eine ähnliche Struktur gemeinsam war: ein Nukleosid-Analoga mit einem Isobutyryl-Ester.^[380-383] Obwohl Esterasen gleichmäßig über den Körper verteilt sind und die unterschiedlichen Varianten spezielle Substratpräferenzen haben, unterscheidet sich die Aktivität der Enzyme, je nachdem wie groß die Ester-Einheit eines Prodrugs ist, deutlich.^[384-386] Der Isobutyryl-Ester hat sich dabei in der Prodrug-Forschung auf Grund seiner Größe als optimale Prodrug-Trägergruppe etabliert und wurde entsprechend auch an cAzadC gekoppelt.

Für die Synthese des Isobutyryl-Esters wurden zunächst die klassischen Reaktionsbedingungen der 1978 entdeckten STEGLICH-Veresterung getestet.^[387] Einer Vorschrift von VIG *et al.* folgend, wurde cAzadC (**1**), zusammen mit DCC und DMAP in abs. DMF für 24 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt.^[388] Da nach der Aufarbeitung jedoch kein Produkt per MS detektiert werden konnte, wurden die Bedingungen leicht abgeändert. Statt der Isobuttersäure wurde dessen Anhydrid, zusammen mit DBU und katalytischen Mengen DMAP verwendet.^[389] Um die Bildung des zweifachen Esters zu vermeiden, wurde hier neben dem Einsatz der sterisch anspruchsvollen Base auch darauf geachtet nur 1,10 Äq. des Anhydrids zu verwenden. Nach Aufarbeitung war das Produkt **52a** eindeutig per MS nachweisbar. Das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch und anschließend per semipräparativer HPLC (10 % → 60 % MeCN + 0,01 % FA in 45 min) gereinigt werden (**Schema 7**). Die gleichen Reaktions-

bedingungen konnten auch bei der Synthese des Decitabin-Derivates angewendet werden. Bei der Betrachtung der Ausbeuten fällt dabei der Stabilitätsunterschied der beiden Nukleosid-Analoga deutlich auf. Während der cAzadC-Ester **52a** mit einer Gesamtausbeute von 15 % eine moderate Ausbeute aufweist, konnte der Decitabin-Ester **52b** mit nur 7 % Ausbeute gewonnen werden. Die leicht sauren Bedingungen bei der Säulenchromatographie und HPLC-Methode können hier ausschlaggebend sein. Die Beurteilung der Reinheit der Substanzen erfolgte via analytischer HPLC (10 % → 60 % MeCN + 0,01 % FA in 45 min). Die Reinheit der Substanzen betrug 98 % für das cAzadC-Derivat **52a** und 85 % für das Decitabin-Derivat **52b** (**Abbildung 27**). Da sowohl das NMR-Spektrum als auch das HPLC-Chromatogramm keine groben Verunreinigungen aufwiesen, konnten die Substanzen problemlos in der Zellkultur auf ihre Aktivität untersucht werden.

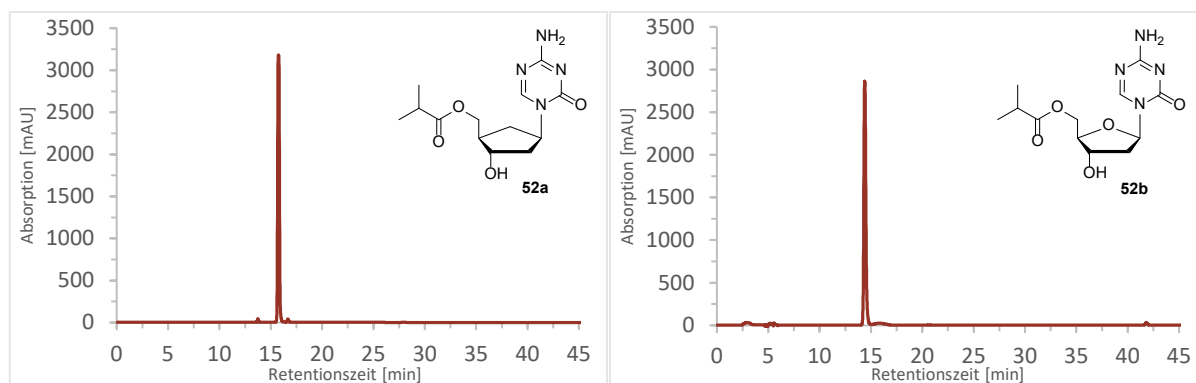
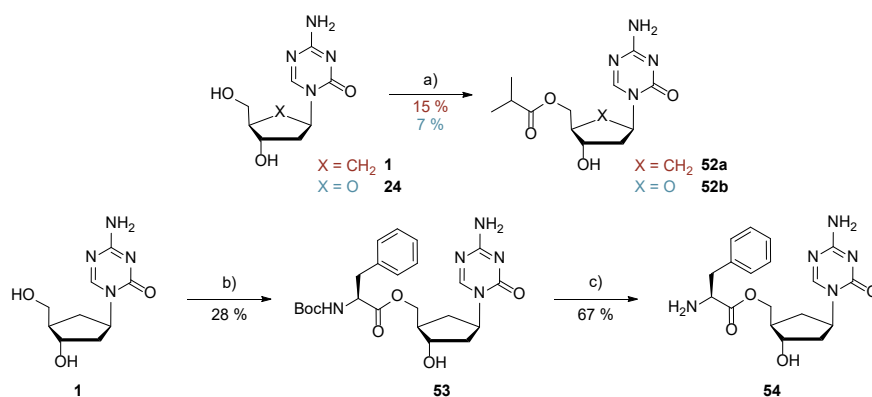


Abbildung 27 UV-Chromatogramm des cAzadC- **52a** (links) und Decitabin-Isobutyryl-Esters **52b** (rechts) bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von 10 % → 60 % MeCN + 0,01 % FA in 45 min. Die sehr gute Reinheit der Verbindungen **52a** und **52b** betrug 98 % bzw. 85 %.

Auf der Suche nach weiteren Prodrug-Einheiten zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit fielen immer wieder Aminosäure-Ester ins Auge.^[390] Diese helfen besonders bei der Verbesserung der Wasserlöslichkeit, welche gerade für die intravenöse Vergabe von Medikamenten entscheidend ist. Bei Nukleosid-Prodrugs können Aminosäure Ester zusätzlich auch die metabolische Stabilität verbessern, wie es beispielsweise beim Anti-Krebs Medikament Gemcitabin gezeigt wurde.^[391] Auch für das Orphan-Drug Decitabin wurden bereits verschiedene Aminosäure-Ester synthetisiert und ihre Stabilität, Bindung und Hydrolyse untersucht.^[272-273] Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziell nach einem Molekül gesucht wurde, welches in Lebertumoren aktiv ist, legten bisherige Forschungsergebnisse auf diesem Feld die Synthese eines Phenylalanin-Esters nahe.^[392] Vig *et al.*^[388] folgend, konnte in zwei Schritten nach initialer Kopplung der geschützten Aminosäure zu Zwischenstufe **53** und anschließender Entfernung der Boc-Gruppe der Phenylalanin-Ester **54** in guter Ausbeute synthetisiert werden (**Schema 7**). Im ersten Schritt wurde die Boc-geschützte Aminosäure unter Verwendung von STEGLICH-Bedingungen an cAzadC gekoppelt. Die Ausbeute der Zwischenstufe **53** war dabei mit nur 28 % nicht optimal. Auch der Einsatz von DCC statt EDC konnte dies nicht steigern. Problematisch war hier vor allem die zweifache Veresterung an der 5'- und auch an der 3'-Hydroxygruppe. Diese Nebenreaktion konnte durch die Anpassung der Äquivalente sowohl der Aminosäure als auch des Kopplungsreagenzes nur leicht eingeschränkt werden. Im zweiten Schritt der Synthese musste die Boc-Schutzgruppe des *N*-Terminus entfernt werden. Wieder analog zu Vig *et al.*^[388] konnte diese mit 30 vol.% TFA in DCM mit einer guten Ausbeute von 67 % abgespalten werden.



Schema 7 Schematischer Überblick über die Synthese-Route der Ester-Prodrugs **52a**, **52b** und **54**. *Reagenzien und Bedingungen*: a) Isobuttersäureanhydrid, DBU, DMAP, abs. MeCN, 0 °C → RT, 2 h; b) Boc-Phe-OH, DMAP, EDC · HCl, abs. DMF, RT, 24 h; c) TFA, DCM, RT, 4 h.

Da auch diese Verbindung für den Einsatz in der Biochemie gedacht war, wurde sie mittels semipräparativer HPLC (0 % → 30 % MeCN in 45 min) gereinigt. Die Überprüfung der Reinheit an der analytischen HPLC (0 % → 30 % MeCN in 45 min) lieferte einen Hauptpeak (**Abbildung 28**). Die Reinheit des Produktes betrug 92,4 %, was für die geplanten biochemischen Experimente ausreichend war. Da der Fokus dieser Arbeit die Derivatisierung von cAzadC beinhaltet, wurde auf die Synthese des entsprechenden Decitabin-Analogons verzichtet.

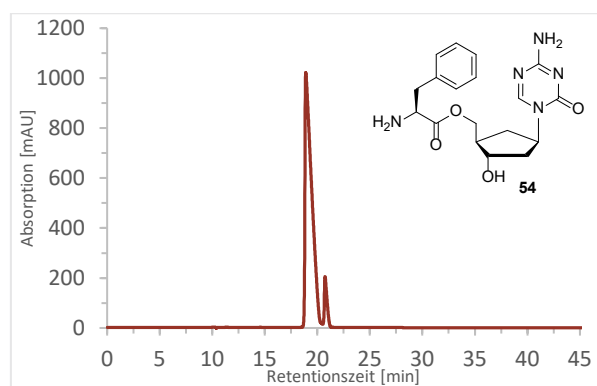
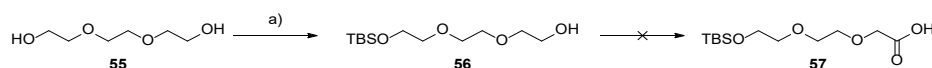


Abbildung 28 UV-Chromatogramm des Phenylalanin-Esters **54** bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von 0 % → 30 % MeCN in 45 min. Die Reinheit des Aminosäure-Esters **54** betrug 92 %.

Um die Wirkstoffdistribution und -aufnahme durch alternative Prodrug-Modifikationen auf eine möglichst breite Basis zu stellen, wurden zusätzlich noch weitere Prodrug-Motive synthetisiert. Eine der vielversprechendsten Prodrug-Modifikationen, eingesetzt bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen, ist die PEGylierung.^[393-394] Dieser Ausdruck bezeichnet die kovalente Verknüpfung des Wirkstoffs, sei es ein Protein, Makromoleküle oder *small molecule*, mit einem Polyethylenglycol (PEG) bzw. Oligoethylenglycol (OEG) Polymer.^[395-396] Die gebundene PEG-Einheit kann dabei einerseits gemäß ihres Aufbaus als linear oder verzweigt oder andererseits gemäß ihrer Größe und dem damit verbundenen Molekulargewicht unterschieden werden.^[397] Grundsätzlich werden dabei nieder-, < 20 000 Dalton von hochmolekularen, > 20 000 Dalton, PEG-Ketten abgegrenzt.^[398] Die Größe der PEG-Einheit hat direkten Einfluss auf die Metabolisierung, renale Ausscheidung und Verteilung des Wirkstoffs im Körper.^[399] Explizit ist die Ausscheidung des Wirkstoffs, bevor er seine Wirkung entfalten konnte, zu vermeiden. Die dabei wichtigsten Wege des Körpers sind die Ausscheidung über den Urin oder der Abbau in der Leber. Durch die Verknüpfung mit einer oder mehreren PEG-Einheiten vergrößert sich der hydrodynamische Radius der Substanz durch die hydrophilen PEG-Ketten deutlich, wodurch die glomeruläre Filtration über die Niere nicht mehr möglich ist und somit der Abbau über die Leber, ab einem Molekulargewicht von 50 000 Dalton, bevorzugt wird.^[399] Neben dieser

reduzierten Ausscheidung gibt es noch viele weitere Eigenschaften die mithilfe der PEGylierung verbessert werden können: Passives Tumor Targeting, längere Halbwertszeiten bei der Zirkulation und dadurch kleinere Fluktuationen der Plasmakonzentration sowie geringere Toxizität.^[397] Um zu überprüfen, ob all diese Vorteile auch bei einem cAzadC-PEG-Konjugat zu beobachten sind, wurden drei PEG-Derivate bzw. OEG-Derivate verschiedener Kettenlänge synthetisiert. Dabei wurde die minimalste Kettenlänge sowie zwei jeweils um eine weitere Ethylenglycol-Einheit verlängerten Kettenlängen als Prodrug-Trägergruppen ausgewählt.

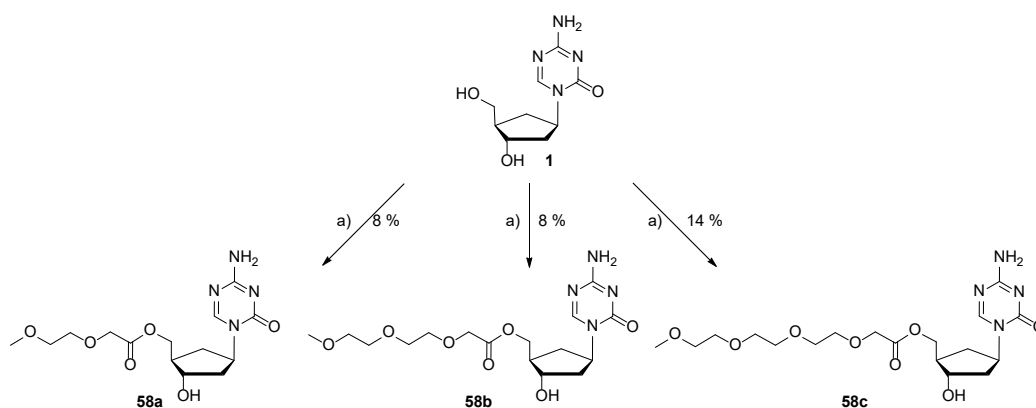
Für die Synthese der OEG-Derivate sollte zunächst die Säure **57** ausgehend von Triethylglycol hergestellt werden (**Schema 8**). Die TBS-Schätzung des ersten Schrittes konnte gemäß der Literatur unter Einsatz von TBSCl und DMAP in Pyridin gut durchgeführt werden.^[400] Eine doppelte TBS-Schätzung konnte durch Einstellen der Äquivalente vermieden werden. Eine andere Methode von Lai *et al.*,^[401] bei der die Reaktion in DCM durchgeführt wurde und zusätzlich katalytische Mengen Et₃N verwendet wurden, lieferte keine Verbesserung der Reaktion. Auffällig war zusätzlich, dass das Produkt nie als Reinstoff isoliert werden konnte, sondern immer Reste des hochsiedenden Lösungsmittels Pyridin im NMR-Spektrum zu erkennen waren. Da das Produkt **56** jedoch am Hochvakuum leicht flüchtig ist, konnte weder bei der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer noch später am Hochvakuum die Probe lange getrocknet werden, ohne nicht ebenfalls einen hohen Verlust des Produktes in Kauf zu nehmen. Entsprechend wurde die Oxidation des Alkohols mit dem Lösungsmittelreste enthaltenden Produkt **56** durchgeführt.



Schema 8 Reaktionsübersicht der zweistufigen Synthese der Säure **57**, ausgehend von Triethylglycol **55**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) TBSCl, DMAP, abs. Pyridin, RT, ü. N.

Die im zweiten Schritt durchzuführende Oxidation des Alkohols **56** zur Säure **57** wurde unter JONES-Bedingungen nach LABELL *et al.*^[402] durchgeführt. Als JONES-Reagenz wurde eine 2,67 M Lösung aus CrO₃ und H₂SO₄ hergestellt und diese zu dem in Aceton gelösten Startmaterial gegeben. Nach 30 min Rühren bei RT wurde die Reaktion mit IPA beendet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und schließlich eine wässrige Aufarbeitung angeschlossen. In dem so erhaltenen Rohproduktgemisch konnte jedoch kein Produkt detektiert werden. Das NMR-Spektrum zeigte den Verlust der TBS-Gruppe, wobei in der MS-Analyse weder Edukt noch Produkt nachgewiesen werden konnte. Die bei der JONES-Oxidation stark sauren Bedingungen können diese Abspaltung der TBS-Gruppe begünstigt haben. Auch Änderungen der Reaktionsbedingungen, bezogen auf Äquivalente und Reaktionszeiten lieferten nicht das gewünschte Produkt. Möglicherweise lag hier statt des JONES-Reagenzes das COLLINS-Reagenz vor, in welchem CrO₃ von zwei Pyridin-Molekülen komplexiert wird.^[403] Damit wäre nur noch die Oxidation zum Aldehyd statt zur Säure möglich, wobei auch dieser nicht mit den angewendeten analytischen Methoden detektiert werden konnte. Da sich die Oxidation sehr schwierig gestaltete, wurden die benötigten OEG-Säuren unterschiedlicher Kettenlänge kommerziell erworben und auf weitere Oxidations-Test verzichtet.

Die Synthese der PEGylierten cAzadC-Derivate konnte schließlich in nur einem Schritt durch Kupplung der OEG-Säuren unter STEGLICH-Bedingungen erreicht werden (**Schema 9**). Analog zur Synthese des Aminosäure-Esters **54** wurde hier EDC · HCl als Kupplungsreagenz eingesetzt und das Gemisch für 1 h bei 0 °C gerührt. Durch die Anpassung der jeweiligen Äquivalente auf 1,10 Äq. Säure und 1,00 Äq. cAzadC konnte die Reaktion der 3'-Hydroxygruppe und damit die doppelte Veresterung weitestgehend vermieden werden. Die Synthese der drei Verbindungen **58a**, **58b** und **58c** konnte grundsätzlich gut durchgeführt werden, problematisch war hier jedoch die Aufreinigung der Substanzen, da eine hohe Reinheit für die biochemischen Experimente von Nöten war. Die Probleme bei der Aufreinigung zeigten sich zunächst bei Verbindung **58b**, welche die mittellange OEG-Kette trägt.



Schema 9 Reaktionsübersicht der synthetisierten Prodrugs **58** mit ihren verschiedenen Kettenlängen. *Reagenzien und Bedingungen:* a) OEG-COOH, DMAP, EDC · HCl, abs. DMF, 0 °C, 1 h.

Nach dem Beenden der Reaktion konnten Nebenprodukte nicht durch klassische wässrige Aufarbeitung entfernt werden, da sowohl das Edukt als auch das Produkt sehr wasserlöslich sind. Um einen großen Produktverlust bei der Aufarbeitung zu vermeiden, wurde nur das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Die dabei erhaltene Auftrennung der Substanzen war nicht so präzise wie erforderlich. Die Problematik der Reinigung von PEG-Derivaten ist bereits in der Literatur^[404] bekannt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden anschließend an einem semipräparativen HPLC-System weiter gereinigt. Verschiedene Laufmittelzusammensetzungen und -gradienten konnten dabei keine saubere Trennung der verschiedenen Produkte liefern. Getestet wurde unter anderem der Zusatz von 0,01 % FA, 0,001 % FA oder ein TEAA Puffer bei pH 7. Abgetrennt werden musste vor allem das bei der Reaktion entstandene *N*-Acylurea, das nach einem Acylshift ausgehend von *O*-Acylisourea, welches bei der Aktivierung der PEG-Säure mit EDC entsteht, gebildet wird. Die charakteristische Masse dieses Nebenproduktes konnte in mehreren Ansätzen eindeutig erkannt werden. Der Polaritätsunterschied dieses Nebenproduktes und des Produktes ist damit so gering, dass eine Auftrennung nur schwer möglich ist. Es wurde schließlich ein weiterer Puffer-Gradient an der HPLC zur Reinigung der Substanzen getestet (2 % → 80 % TEAA Puffer B bei pH 7 in 45 min). Produktenthaltende Fraktionen wurden per präparativer DC (16 % und 20 % MeOH in DCM) weiter aufgetrennt und Verunreinigungen erfolgreich abgetrennt. Die Reinheit des Esters **58b** betrug so am Ende 88 % (**Abbildung 30**).

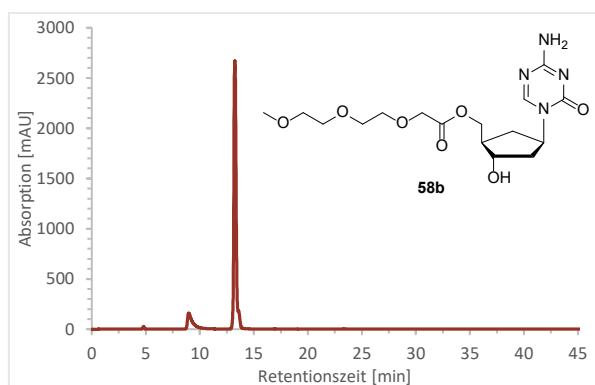


Abbildung 29 UV-Chromatogramme des Esters **58b** bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von 10 % → 60 % TEAA Puffer B pH 7 in 45 min. Die Reinheit der Substanz betrug auf Grund des komplizierten Reinigungsprozesses 88 %.

Mit dem etablierten Reinigungsprozedere konnten auch die Ester **58a** und **58c** gut gereinigt werden. Da die händische Säulenchromatographie nur mäßig gute Ergebnisse erzielte wurde diese durch eine präparative DC ersetzt, womit die Reinheit der Ester gut gelang (**Abbildung 30**).

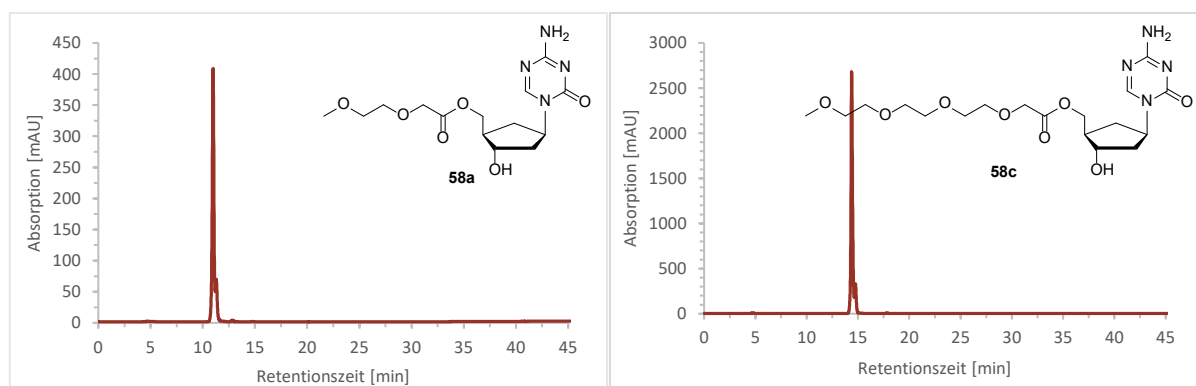


Abbildung 30 UV-Chromatogramme der Ester **58a–c** bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von 10 % → 60 % TEAA Puffer B pH 7 in 45 min. Die Reinheit der Substanzen betrug auf Grund des komplizierten Reinigungsprozesses 88 % (**58b**, oben), 88 % (**58a**, links) und 89 % (**58c**, rechts).

Die Reinheit des kurzkettingen **58a** und langkettingen Derivats **58c** betrug dabei 88 % bzw. 89 %. Dieser aufwändige Prozess spiegelt sich eindeutig in der Ausbeute von 8 % bzw. 14 % der Verbindungen wieder. Durch weitere Optimierung und Anpassung des Gradienten könnte in Zukunft eine bessere Trennung an der HPLC und damit möglicherweise bessere Ausbeute der Substanzen realisiert werden.

4.2.2 Untersuchung der Ester-Prodrugs in unterschiedlichen Zelllinien

Nachdem die verschiedenen Prodrugs erfolgreich und mit einer ausreichenden Reinheit synthetisiert wurden, wurden diese in Zellstudien auf ihre biologische Wirkung hin untersucht. Die dafür von ELSA PEEV und TINA AUMER im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführten Experimente werden hier, um den eindrücklichen Effekt dieser Substanzen zu zeigen, ebenfalls erwähnt und die Auswertung der Daten diskutiert.

Neben dem freien Nukleosid wurden auch die verschiedenen Ester-Prodrugs **49** und **50** für die Untersuchung der Änderung des 5-mdC-Niveaus für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Nach Isolieren der gDNA wurde diese enzymatisch verdaut und mittels UHPLC-MS auf ihre Bestandteile hin untersucht. Die Ergebnisse von ELSA PEEV und TINA AUMER sind in **Abbildung 31** graphisch dargestellt. Die Balken representieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Messungen während der Fehlerbalken die Standardabweichung darstellt. Die untersuchten Zelllinien waren Leukämiezelllinie MOLM-13 sowie Zellen solider Tumore wie Leber- HepG2, Bauchspeicheldrüsen- AsPC1 und Lungenkarzinom A549. Auch die Wirkung auf die Nervenzellen Neuro2A wurde untersucht. Die Daten der MOLM-13 und Neuro2A-Zelllinien stellen unabhängige Triplikate dar, während die der anderen Zelllinien unabhängige Duplikate beinhalten.

Die untersuchten Prodrugs weisen alle unterschiedliche Eigenschaften auf. Während dem Phenylalanin-Ester **52** eine schnelle Aktivierung in Leberzellen zugesprochen wird, hat die Trägergruppe des Isobutyryl-Ester **49** die ideale Größe, um in allen Zellen schnell gespalten zu werden. Sowohl bei den freien Nukleosiden als auch bei den Ester-Prodrugs fällt ein hypomethylierender Effekt direkt ins Auge. Während dieser bei Decitabin bei allen untersuchten Konzentrationen und Zellen sehr stark ist, ist dieser bei cAzadC etwas geringer, aber immer noch deutlich zu erkennen. Auch die untersuchten Prodrugs können alle die 5-mdC-Niveaus im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle senken, wobei auffällt, dass die erhoffte Verbesserung und damit noch stärkere Reduktion der 5-mdC-Niveaus im Vergleich zum freien Nukleosid **1** nicht eintrat. Auch eine Erhöhung der Konzentration konnte die Leistung der Prodrugs nicht stark verändern. Während in der AML-Zelllinie MOLM-13 die Leistung des Isobutyryl-Esters **49** mit steigender Konzentration etwas zunimmt, fällt die des Phenyl-

alanin-Esters ab. Gegenteiliger Effekt ist bei der Leberzelllinie HepG2 zu beobachten. Während die Konzentrationssteigerung des Phenylalanin-Esters **52** eindeutig mit einer größeren Effizienz der Verbindung einhergeht, so ist bei dem Isobutyryl-Ester **49** keine Änderung des 5-mdC-Niveaus zu erkennen. Da der Phenylalanin-Ester **52** explizit für den Einsatz in Leberzellen entwickelt wurde, ist es nicht verwunderlich, dass dieser schon bei einer Konzentration von 1 μM sogar cAzadC (**1**) an Wirksamkeit übertrifft. Die Behandlung der anderen Zelllinien AsPC1, Neuro2A und A549 profitiert nicht von der Behandlung mit dem untersuchten Prodrug **49**. Hier ist das 5-mdC-Niveau bei niedrigen Konzentrationen annähernd gleich während es bei hohen Konzentrationen sogar weit über dem von cAzadC als Vergleichssubstanz liegt.

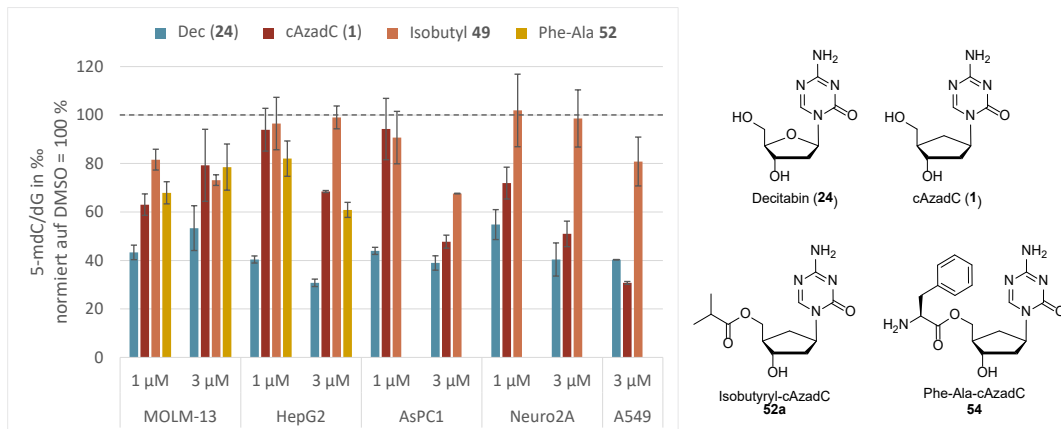


Abbildung 31 Änderung des 5-mdC-Gehalts der gDNA von fünf verschiedenen Zelllinien nach Zugabe der Ester-Prodrugs **49** und **52**, sowie der Nucleosid-Analoga **1** und **24**. Dargestellt ist das auf DMSO normierte Verhältnis von 5-mdC/dG in Promille nach 72 h Inkubationszeit bei 5 % CO_2 -Gehalt. Die Daten wurden in Kooperation mit TINA AUMER erhoben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der als Dublikate (HepG2, AsPC1, A549) bzw. Triplikate (MOLM-13, Neuro2A) durchgeführten Messungen sowie die Standardabweichung.

Neben diesen Ester-Prodrugs wurden auch die OEG-Derivate **58a–c** unterschiedlicher Kettenlänge in der Leukämie-Zelllinie MOLM-13 als unabhängige Triplikate nach Inkubation für 72 h bei 5 % CO_2 -Gehalt von ELSA PEEV untersucht. Die Balken representieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Messungen während der Fehlerbalken die Standardabweichung darstellt. Auch hier wurde die gDNA durch enzymatischen Verdau in ihre einzelnen Nucleoside aufgespalten und der 5-mdC-Gehalt der isolierten DNA analysiert. Deutlich zu erkennen ist der hypomethylierende Effekt den die OEG-Derivate auf die Zellen ausüben (**Abbildung 32**).

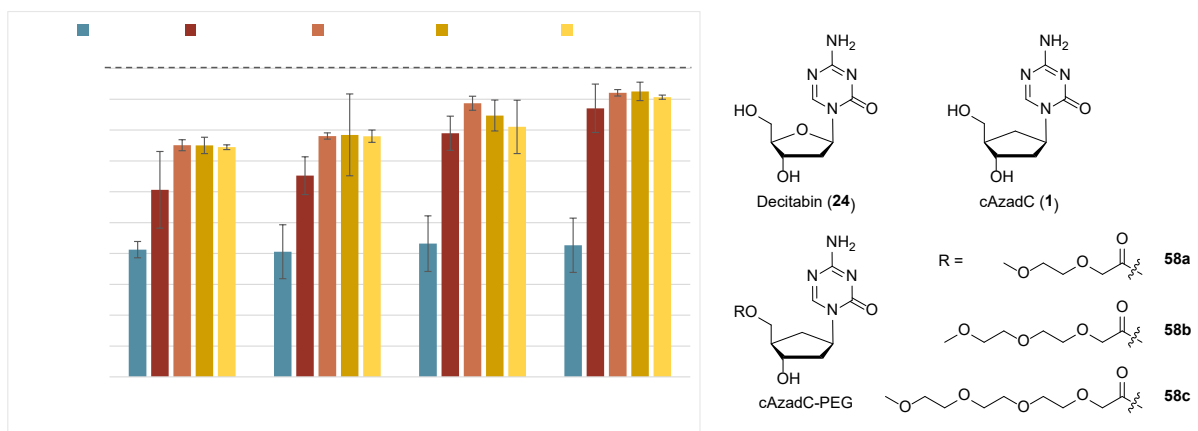


Abbildung 32 Änderung des 5-mdC-Gehalts der gDNA von MOLM-13 Zellen nach Zugabe der OEG-Derivate **58a–c**, sowie der Nucleosid-Analoga **1** und **24**. Dargestellt ist das auf DMSO normierte Verhältnis 5-mdC/dG in Promille nach 72 h Inkubationszeit bei 5 % CO_2 -Gehalt. Die Daten wurden in Kooperation mit ELSA PEEV erhoben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der als Triplikate durchgeführten Messungen sowie die Standardabweichung.

Während bei einer niedrigen Konzentration von 1–5 μM cAzadC den OEG-Derivaten deutlich überlegen ist, kann ab einer Konzentration von 25 μM beobachtet werden, dass die OEG-Derivate einen ähnlichen Effekt haben als ihr freies Nukleosid. Die Kettenlänge beeinflusst dieses Ergebnis nur marginal.

Da die OEG-Derivate hauptsächlich die Verteilung des Wirkstoffs im Körper verändern, soll OEG-2 **58b**, repräsentativ für alle Kettenlängen, zukünftig in einem PDX-Modell untersucht werden. Die dafür notwendige Toxizitätsstudie wurde von der präklinischen Auftragsforschungseinrichtung Pharmacelcus GmbH bereits durchgeführt. Dabei wurde sechs Mäusen eine aufsteigende Konzentration OEG-cAzadC **58b**, intraperitoneal verabreicht und sowohl ihre Hämatologie und Wirkstoffkonzentration im Blut als auch ihre Futtereinnahme, Gewichtsänderung und weitere klinischen Symptome beobachtet. Analog zur Therapie im PDX-Modell wurde den Mäusen fünf Tagen der Wirkstoff mit einer Dosis von 1 mg/kg verabreicht, bevor nach zwei Ruhetagen die nächst höhere Dosis gegeben wurde. Die so untersuchten Dosen waren 1, 5, 10 und 50 mg/kg. Die Tiere zeigten dabei über den gesamten Verlauf der Studie keine klinischen Auffälligkeiten weshalb von einer sehr guten Verträglichkeit des Prodrugs ausgegangen werden kann. Weiterführenden Studien zur Untersuchung der Wirkung des OEG-Derivats in einem AML-PDX-Mausmodell sind aktuell in Planung können somit in naher Zukunft durchgeführt werden.

Obwohl die Prodrugs je nach Konzentration den 5-mdC-Gehalt in Zellstudien im direkten Vergleich zu ihrem freien Nukleosid-Analogen cAzadC nicht drastisch reduziert haben, ist davon auszugehen, dass die Trägergruppen gut gewählt wurden. Ein wichtiger Punkt bei dem Design von Prodrug-Konjugaten ist, dass die abzusplittende Einheit selbst nicht toxisch ist, um so unnötige Nebenwirkungen zu umgehen.^[405] Da sowohl die behandelten Zellen als auch die Tiere in der durchgeführten Toxizitätsstudie keine Anzeichen toxischer Begleiterscheinungen zeigten, kann auf eine nebenwirkungsarme Prodrug-Auswahl geschlossen werden. Auch zeigten alle Prodrugs im Vergleich zur Referenz eine Reduktion der 5-mdC-Niveaus was darüber hinaus ein eindeutiges Zeichen für ihre gute Aktivität ist.

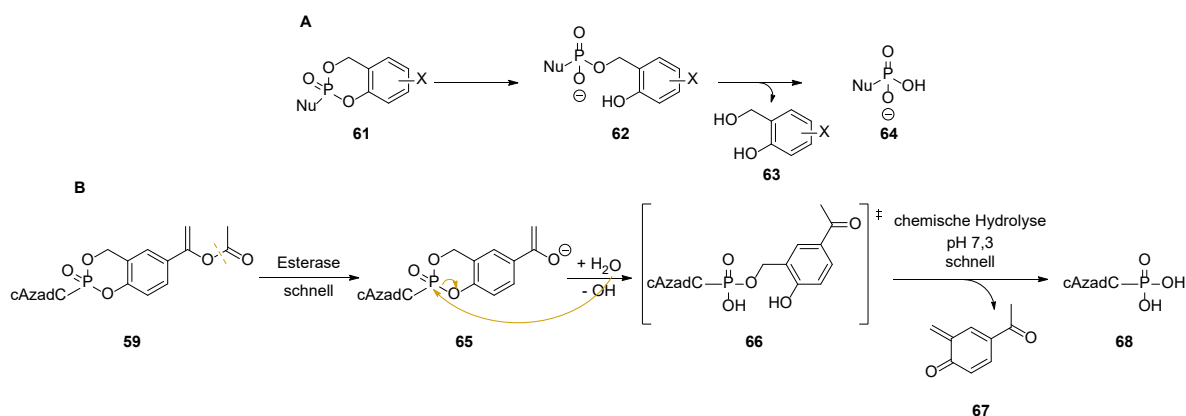
4.2.3 Synthese der Phosphat-Derivate

Nukleosid-Phosphate sind eine bedeutende Klasse von Wirkstoffen in der Krebs- und Virenthherapie. Ihre Anwendung wird jedoch durch die große Polarität bzw. Ladung und damit reduzierte Zellpermeabilität deutlich eingeschränkt. Um die zelluläre Aufnahme und damit Bioverfügbarkeit dieser Wirkstoffe zu steigern, wurde eine Vielzahl von Prodrug-Derivaten etabliert.^[406-407] Der Wirkmechanismus vieler Nukleosid-Therapeutika hängt davon ab, nach der Zellpenetration mono-, di- oder triphosphoryliert und so in die pharmakologisch aktive Form umgewandelt und in die DNA inkorporiert zu werden.^[408-409] Sie stellen somit selbst Prodrugs dar, welche erst nach der Triphosphat-Bildung ihr Wirkpotential entfalten können. Da dabei der erste Phosphorylierungsschritt der geschwindigkeitsbestimmende Faktor ist, bietet sich der Einsatz eines 5'-Monophosphat-Analogons an, um die verbleibende biologische Transformation so effektiv wie möglich zu gestalten.^[410] Aus diesem Grund wurden auch von cAzadC zwei verschiedene Phosphat-Derivate synthetisiert: Das *lock-in* Cyclosaligenyl-Analogen (CycloSal) **59** und das Triphosphat (TP) **60**. Obwohl letzteres kein klassisches Prodrug darstellt, sollte nach Überführung ins Zellinnere mithilfe eines Transporters die Interaktion des bioaktiven Substrats mit Polymerasen untersucht werden. Die Synthese dieser Moleküle wird im nachfolgenden Kapitel ausführlich beschrieben.

Wie bei den Ester-Prodrugs auch, spielt der optimale Abspaltungszeitraum eine große Rolle bei dem Einsatz einer Prodrug-Einheit. Obwohl es viele verschiedene Monophosphat-Trägergruppen in der Literatur gibt, fiel die Wahl auf eine *lock-in* CycloSal-Gruppe.^[411] Die meisten Prodrugs machen sich

spezielle Enzyme im Körper zu Nutze, welche die Trägergruppe enzymatisch am gewünschten Wirkort abspalten und somit den aktiven Wirkstoff freisetzen. Es gibt allerdings auch Prodrugs, deren Abspaltung rein chemisch, beispielsweise auf Grund einer pH-Wert-Änderung abläuft oder welche, bei denen eine Kombination aus chemischen und enzymatischen Reaktionen für die Spaltung verantwortlich sind.^[407, 412] In die erste Kategorie fällt das CycloSal Motiv **61**, bei dem die Abspaltung auf einer rein chemisch induzierten Reaktionskaskade basiert (**Schema 10 A**).^[413] Die Verwendung von Salicylalkohol als maskierende Gruppe erlaubt die Bildung von 3 verschiedenen Ester-Bindungen. Der Phenyl- und Benzylester, mit dem die Trägergruppe verknüpft ist und der Alkylester, mit dem das Nucleosid verbunden ist, erlauben eine differenzierte Spaltung der verschiedenen Bindungen. Auf Grund der Delokalisation der negativen Ladung im aromatischen System wird im ersten Schritt der Abspaltung bevorzugt der Phenylester gespalten, was zu einem 2-Hydroxybenzylphosphat-Diester **62** führt.^[414] Die verbleibende Schutzgruppe wird anschließend spontan unter Bildung von Salicylalkohol (**63**) abgespalten, was zu dem entsprechenden Nucleosid-Monophosphat **64** führt.

Die reine pH-abhängige Abspaltung hat auch erhebliche Nachteile, so kann beispielsweise auf Grund der ähnlichen pH-Werte im Inneren und außerhalb der Zellmembran die Abspaltung bereits vor dem Eintritt ins Zellinnere erfolgen. Zusätzlich kann der lipophile Triester auch aus der Zelle ausgeschleust werden, was das intra- und extrazelluläre Gleichgewicht der Prodrugs zusätzlich verstärkt.^[415] Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde eine zweite Generation der CycloSal-Triester, das *lock-in* CycloSal **59** entwickelt (**Schema 10 B**).^[416]

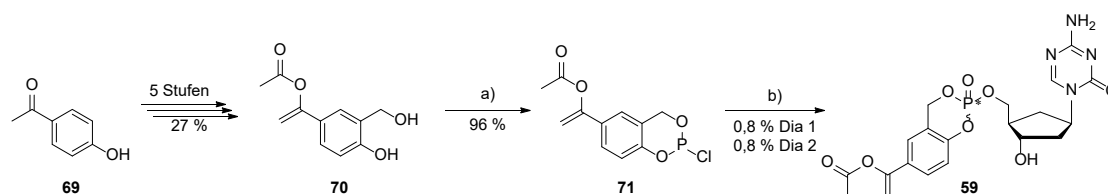


Schema 10 Chemisch induzierter Abspaltungsmechanismus der **A**) CycloSal-Prodrug-Einheit **61** unter Freisetzung von Salicylalkohol (**63**) zum freien Monophosphat **64**.^[414] **B**) Enzymatisch induzierte Abspaltung der *Lock-In*-CycloSal-Prodrug-Einheit **59** mit nachfolgender hydrolytischer Reaktionskaskade, welche unter Freisetzung von **67** das Monophosphat **68** preisgibt.^[417] Nu = Nucleosid.

Dabei wird eine von Esterasen abspaltbare Gruppe an den Aromaten angebracht, um durch das nach Abspaltung entstehende polarere Molekül **65** ein Ausschleusen zu verhindern und damit die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration zu erhöhen. Da Carboxylesterasen im Inneren der Zelle eine höhere Konzentration aufweisen als außerhalb, kann sich das polarere Prodrug **65** im Zellinneren akkumulieren und schließlich durch chemischen Zerfall unter Ausbildung des Intermediats **66** und anschließender Abspaltung von **67** den aktiven Wirkstoff **68** preisgeben.^[418] Der Vorteil dieser Trägergruppe besteht darin, dass die nur schwach elektronenziehende Gruppe des Acyl-Esters nach Transport ins Zellinnere und enzymatischer Spaltung in eine stark elektronenziehende Gruppe überführt wird. Die dadurch reduzierte Stabilität gegenüber Hydrolyse führt zu einer schnelleren Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs.^[417] Da die 5-(1-Acetoxyvinyl)-Trägergruppe in der Literatur sehr gute Ergebnisse bezüglich Abspaltungskinetik zeigt, wurde diese Prodrug-Einheit auch für cAzadC getestet.

Die Synthese des *lock-in* CycloSal-Prodrugs **59**, welches zur begrifflichen Vereinfachung im Folgenden nur noch als CycloSal-Prodrug bezeichnet wird, startete mit 4-Hydroxybenzoesäure (**69**) (**Schema 11**).

Nach 5 Syntheseschritten, welche von DR. SIMON VETH übernommen wurden, konnte das Diol **70** mit einer Gesamtausbeute von 27 % erhalten werden. Die anschließende Umwandlung in das Chlorophosphin **71** konnte gemäß der Literatur^[419] unter Einsatz von PCl_3 mit einer nahezu quantitativen Ausbeute von 96 % erreicht werden. Auf Grund der Luft- und Feuchtigkeitsinstabilität des Produktes wurde auf Analytik weitestgehend verzichtet. Einzig ein ^1H - und ^{31}P -NMR zur Überprüfung der P(III)-Spezies wurde aufgenommen. Die anschließende Kopplung des Prodrug Motivs an das Nukleosid erfolgte ebenfalls gemäß der Literatur.^[417] Die P(III)-Spezies konnte anschließend mit $t\text{BuOOH}$ zu P(V)-Verbindung oxidiert werden und somit das Prodrug **59** als Gemisch zweier Stereoisomere liefern.



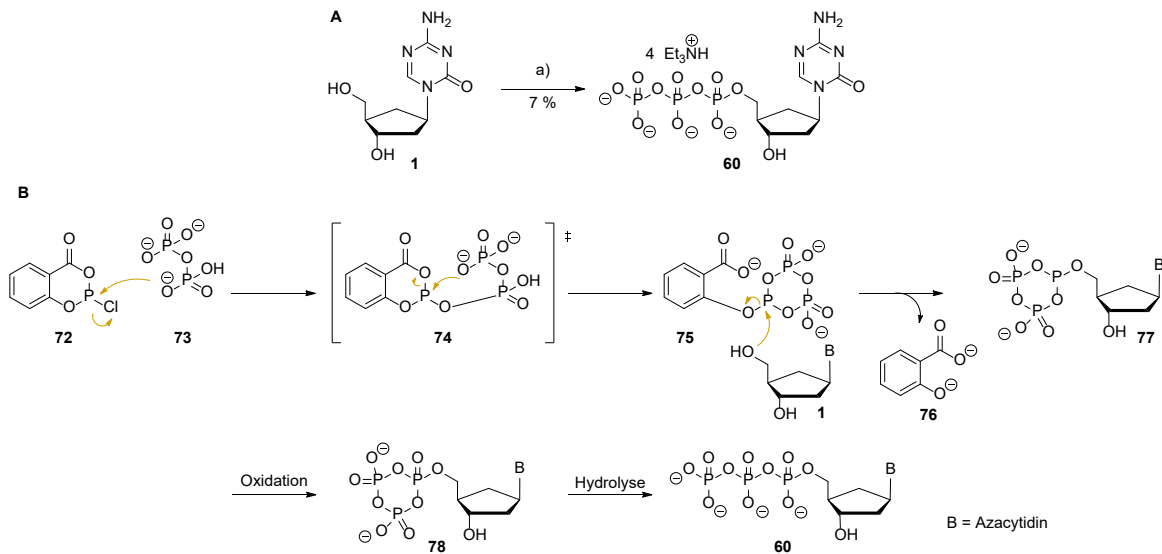
Schema 11 Reaktionsüberblick über die letzten Syntheseschritte der Herstellung des CycloSal-Prodrugs **59**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) PCl_3 , abs. Pyridin, abs. THF, $-20\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3h; b) 1. cAzadC (**1**), DIPEA, abs. DMF, $-40\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 h; 2. $t\text{BuOOH}$, abs. DMF, $-20\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1h.

Das Produktgemisch wurde zunächst via Säulenchromatographie und anschließende per HPLC (10 % \rightarrow 25 % MeCN in 45 min), welche die Trennung der Stereoisomere ermöglichte, gereinigt. Die Ausbeute beider Diastereomere betrug jeweils 0,8 %. Auf Grund der sehr geringen Ausbeute wurde auf die Analyse via analytischer HPLC verzichtet und die Struktur und Reinheit nur über NMR-Spektroskopie bewertet. Die Synthese eines speziellen Diastereomers wäre über den Einsatz chiraler Auxiliare möglich gewesen, erschien für diese Anwendung auf Grund des erhöhten Syntheseaufwandes jedoch nicht nötig.^[420-421] Die getrennten Isomere wurden einzeln auf ihre Struktur hin analysiert und separat auf ihre biochemische Aktivität hin untersucht, wobei keine absolute Zuordnung der *R*- und *S*-Isomere getroffen wurde.

Jegliche Monophosphat-Prodrugs von Nukleotid-Wirkstoffen müssen in der Zelle in ihr entsprechendes aktives Triphosphat umgewandelt werden. Obwohl das Vorhandensein des ersten Phosphats in Form des Prodrugs diese Biokonversion deutlich beschleunigt, müssen von den entsprechenden Kinasen immer noch zwei weitere Transformationen durchgeführt werden. Dies kann gerade bei unnatürlichen Substraten erhebliche Schwierigkeiten mit sich bringen und möglicherweise nur in sehr geringem Umfang passieren.^[422] Um dies zu vermeiden, kann der Zelle direkt das Triphosphat zugeführt werden. Da Triphosphate jedoch eine hohe Ladungsdichte aufweisen, ist deren Einsatz als Prodrugs eher unüblich. Diese Substanzen können nicht in die Zelle diffundieren, sondern müssen aktiv von der Zelle aufgenommen werden. Die Zellpermeabilität von Ionen, explizit Anionen, zu optimieren, welche nicht aktiv von Transporter Proteinen erkannt werden, ist immer noch eine große Herausforderung in der chemischen Biologie und Medizin.^[423] Häufig dafür eingesetzte organischen Transportersysteme sind Liposome, cyclische Polymere und Oligosaccharide oder Dendrimere.^[424-427] Ihnen ist gemein, dass diese Strukturen einen Hohlraum bilden, in den das entsprechende Anion eingelagert und schließlich über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann.^[428-429]

Es sind verschiedene Synthesemethoden für die Herstellung von Nukleotid-TPen in der Literatur bekannt.^[430-432] Die große Anzahl an unterschiedlichen Methoden kommt aus der Komplexität der Synthese. Es gibt viele Methoden, die sehr gut für einzelne Substrate funktionieren und ein paar wenige Methoden, die mäßig gut für eine Vielzahl von Substraten verwendet werden können.^[433] Somit stellt die Herstellung eines jeden Nukleotid-TPs eine eigene Herausforderung dar. Eine von LUDWIG *et al.* etablierte Methode nutzt aktivierte Phosphite unter Einsatz von Salicylchlorophosphit (**Schema 12 B**).^[434] Die Reaktion des Chlorids **72** mit Pyrophosphat **73** liefert in einem ersten Schritt

über Intermediat **74** das milde Phosphorylierungsreagenz **75**, welches selektiv von der 5'-Hydroxygruppe des Nucleosides **1** angegriffen wird.^[432] Nach Abspaltung des Salicylsäure-Anions **76** kann das erhaltene cyclische Intermediat **77** mit I₂ zur P(V)-Spezies **78** oxidiert werden. Die anschließende ringöffnende Hydrolyse liefert das lineare Triphosphat **60**.



Schema 12 Reaktionsschema (A) und -mechanismus (B) der Triphosphorylierung von cAzadC (**1**) mit Salicylchlorophosphit (**72**).^[432] Reagenzien und Bedingungen: a) 1. Salicylchlorophosphit, (Bu₃NH)₂PPi, abs. DMF, RT, 4 h; 2. I₂, Pyridin, H₂O, RT, 15 min; 3. H₂O, RT, 1 h.

Da diese Methode für viele Substrate eine gute Ausbeute lieferte, wurde sie auch auf cAzadC angewandt (**Schema 12 A**). Gemäß der Literatur konnte die Reaktion in DMF durchgeführt werden.^[434] Es war darauf zu achten, dass jegliche Reagenzien und Edukte so trocken wie möglich waren, um eine vorzeitige Hydrolyse zu vermeiden. Bei der Oxidation mit I₂ wurde solange die Oxidationslösung zugegeben bis die orange Farbe für mindesten 10 min stabil blieb. Die finale Hydrolyse unter Verwendung von ddH₂O konnte ohne Probleme durchgeführt werden. Die Aufreinigung von TPe ist ebenfalls eine Herausforderung. Hierfür muss das anionische, wasserlösliche Produkt von hydrophilen und hydrophoben Verunreinigungen getrennt werden. Dabei ist zusätzlich auf die Bedingungen während der Aufreinigung zu achten, da TPe je nach Gegenion, Ladungszustand und Temperatur nicht sehr stabil sind.^[433] Vor der Aufreinigung des TPs via HPLC wurde das Rohprodukt **60** zuvor in 3 mM NaCl und EtOH bei -80 °C zweimal ausgefällt. Nach Dekantieren des Überstandes blieb das Produkt dabei als farbloser Feststoff im Reaktionsgefäß zurück. Bei der nachfolgenden HPLC (0 % → 20 % TEAA Puffer B in 45 min) konnte das Produkt **60** weitestgehend von Di- und Monophosphat getrennt werden und lag mit einer Reinheit von 87,3 % vor (**Abbildung 33**).

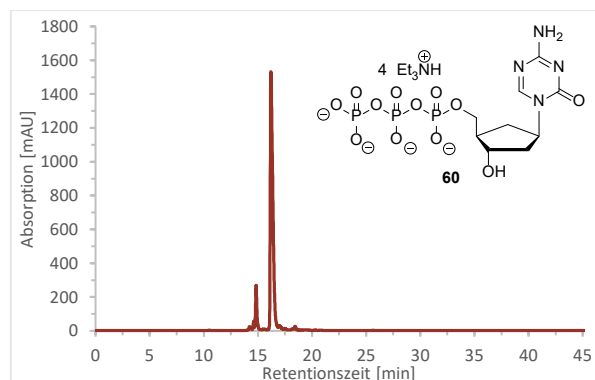


Abbildung 33 UV-Chromatogramm des Triphosphates **60** bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von 0 % → 20 % TEAA Puffer B in 45 min. Die Reinheit der Verbindung **60** betrug 87 %.

Das finale Produkt konnte mit einer Ausbeute von 7 % erhalten werden. Der durch den Einsatz von TEAA-Puffer bei der HPLC entstandene Überschuss an Triethylammonium-Kationen konnte auch nach mehreren Waschschritten nicht entfernt werden. Für die zügige Durchführung erster Zellexperimente und auf Grund der geringen Ausbeute wurde jedoch auf weitere Aufreinigungen verzichtet.

4.2.4 Untersuchung der Phosphat-Derivate und Primer Extension Studie

Nachdem die verschiedenen Phosphat-Derivate erfolgreich und mit einer ausreichenden Reinheit synthetisiert wurden, wurden diese in Zellstudien auf ihre biologische Wirkung hin untersucht. Die dafür von ELSA PEEV und TINA AUMER im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführten Experimente werden hier ebenfalls erwähnt und die Auswertung der Daten diskutiert.

Neben den freien Nukleosiden cAzadC (**1**) und Decitabin (**24**) wurden auch die beiden Diastereomere des CycloSal-Prodrugs **59** für die Untersuchung der Änderung der 5-mdC-Niveaus in MOLM-13-Zellen für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Nach Isolieren der gDNA wurde diese enzymatisch verdaut und mittels UHPLC-MS auf ihre einzelnen Nukleoside hin untersucht. Die in Kooperation mit TINA AUMER erhaltenen Ergebnisse sind in **Abbildung 34**, als unabhängige Duplikate graphisch dargestellt. Die Balken representieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Messungen während der Fehlerbalken die Standardabweichung darstellt. Es ist zu erkennen, dass alle untersuchten Derivate die 5-mdC-Niveaus im Vergleich zur unbehandelten Probe deutlich senken. So wie Decitabin bei einer Konzentration von 2,5 µM den größten Effekt auf den 5-mdC-Gehalt hat, kann dieses Verhalten bei cAzadC ebenfalls beobachtet werden. Dennoch ist ein großer Unterschied bei der Reduktion dieser beiden Nukleosid-Analoga zu erkennen: Der Effekt von Decitabin ist, wie zuvor bereits beobachtet, grundsätzlich größer als der von cAzadC und auch die CycloSal-Prodrugs können dies nicht ändern.

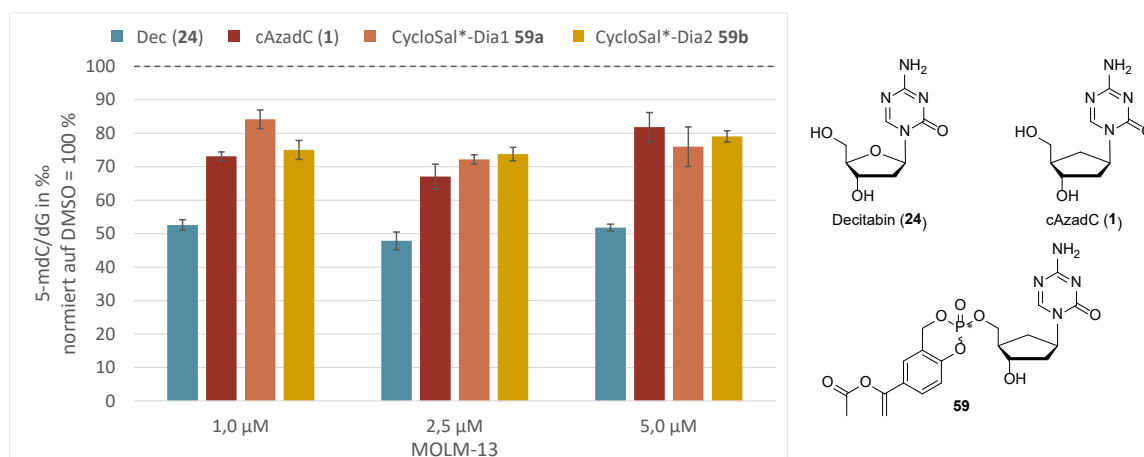


Abbildung 34 Überblick über die Änderung des 5-mdC-Gehalts bei MOLM-13 Zellen nach Zugabe der CycloSal-Prodrugs **59** und einer Inkubation von 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Dargestellt ist das auf DMSO normierte Verhältnis von 5-mdC/dG in Promille als unabhängiges Duplikat. Die Daten wurden in Kooperation mit TINA AUMER erhalten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der als Dublikate durchgeführten Messungen sowie die Standardabweichung.

Da bei der Synthese der CycloSal-Derivates zwei Diastereomere entstanden sind und diese gut via HPLC getrennt werden konnten, wurden diese auch separat untersucht. Das CycloSal-Prodrug weist keine definierte Konzentration auf, bei welcher der hypomethylierende Effekt signifikant am stärksten zu erkennen ist. Während bei der 1,0 µM konzentrierten Probe der 5-mdC-Gehalt durch Diastereomer 1 stärker reduziert werden als von Diastereomer 2, ist diese Unterscheidung bei den anderen

Konzentrationen nicht mehr zu erkennen. Es lässt sich jedoch mit Blick auf die reine Reduktion der 5-mdC-Niveaus erkennen, dass dem erhöhten Syntheseaufwand keine Verbesserung der Wirksamkeit gegenübersteht, da selbst cAzadC einen stärkeren Effekt zeigt als das Prodrug. Mögliche Ursachen für die nur leichte Reduktion der 5-mdC-Niveaus kann einerseits sein, dass das Prodrug unzureichend gespalten und entsprechend auch nur minimal in das entsprechende Triphosphat umgewandelt wurde. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass nicht wie erwartet die Monophosphorylierung, sondern wie bei anderen Nukleosid-Analoga auch, doch die Di- oder Triphosphorylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.^[435]

Um die Möglichkeit einer nicht ausreichenden Umwandlung in das Triphosphat zu minimieren, wurde zusätzlich zu dem maskierten Monophosphat **59** auch das Triphosphat **60** eingesetzt. Dieses wurde zur Maskierung der Ladung von ELSA PEEV in ein Cyclodextrin Gerüst eingelagert. Das hier verwendete γ -Cyclodextrin^[426] ist ein in der Pharmazie häufig eingesetztes cyclisches Oligosaccharid,^[436-437] welches die Zellpenetration durch ein gebundenes Peptid zusätzlich erleichtert. Im Zellinneren wird schließlich das TP durch abundantes ATP verdrängt und so der Wirkstoff freigesetzt. Das eingelagerte TP wurde ebenso wie die anderen Prodrugs auf die Zellen gegeben, nach 72 h die gDNA isoliert und verdaut und anschließend deren Bestandteile per UHPLC-MS analysiert. Bei der Untersuchung der gDNA konnte kein inkorporiertes cAzadC festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob der Transport mittels Cyclodextrin funktionierte, wurde ebenfalls der Metaboliten-Pool untersucht. Viel des zugegebenen cAzadCs konnte dabei erfolgreich nachgewiesen werden. Der Transport in die Zelle hat somit gut funktioniert, nur der Einbau in die DNA scheiterte. Da die nicht-kovalente Bindung eines Wirkstoff-Cyclodextrin-Komplexes ein dynamisches System ist, bei dem immer ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form vorliegt, sollte hier nicht der Hauptgrund für den mangelnden Einbau liegen.^[438] Wahrscheinlicher ist, dass das unnatürliche Cytidin-Derivat schlecht von den Polymerasen erkannt und deshalb nicht eingebaut wurde. Um diese Hypothese zu testen, wurde mit dem synthetisierten TP von ELSA PEEV eine Primer-Extension-Studie (PES) durchgeführt.

Bei der PES wurde ein Primer, welcher an einem Templat-DNA-Strang vorlag, einzeln mit den jeweiligen TPen inkubiert, um durch die im Gemisch vorhandene Polymerase diesen Primer an dessen 3'-Ende zu verlängern.^[439-440] Während der Templat-Strang an einem Ende eine Biotin-Markierung aufzeigte, war in der Mitte des Strangs eine methylierte CpG-Einheit eingebaut. Zusätzlich zu diesen Modifikationen war an dem Primer 6-Carboxyfluorescein angebracht um so die Auswertung der anschließenden Urea-PAGE-Gelelektrophorese zu erleichtern (**Abbildung 35**).^[441] Neben der nur aus dem Primer bestehenden Kontrolle (1) ist nach Einbau der ersten Base, dC (2) bzw. cAzadC (3) ein eindeutiger Shift der Banden zu erkennen. Auch die weitere Verlängerung mit mehreren cAzadC-Molekülen (4) und dC (5), sowie die vollständigen Verlängerungen (6 und 7) konnte gut durchgeführt und mittels Urea-Gel nachgewiesen werden.

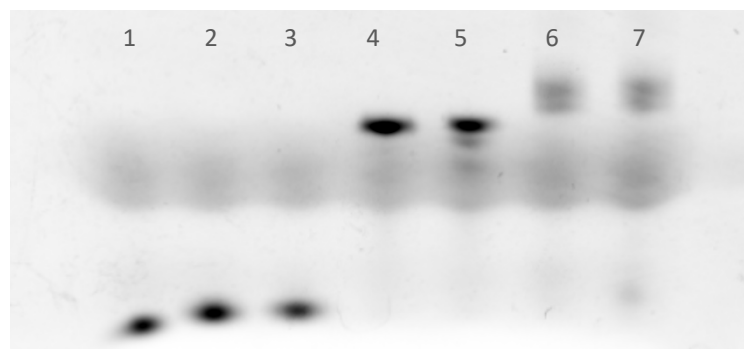


Abbildung 35 Nachweis der PES mittels Urea-PAGE-Gelelektrophorese. 1. Primer; 2. Primer + dC; 3. Primer + cAzadC; 4. und 5. Mit weiteren cAzadC- bzw. dC-TP verlängerte Stränge; 6. und 7. Vollständig verlängerte Sträng. Die Daten wurden in Kooperation mit ELSA PEEV erhoben.

Die erfolgreiche Inkorporation des cAzadC-TPs in die DNA konnte so durch die PES eindeutig nachgewiesen werden. Somit wurde auch bestätigt, dass Polymerasen cAzadC-TP erkennen und effektiv einbauen können. Der beobachtete schlechte Einbau des cAzadC-TPs beim Zellexperiment mittels Cyclodextrin-Transporter sollte entsprechend ebenfalls nicht auf Grund der Nicht-Erkennung der Polymerasen gescheitert sein. Dennoch sollte dieses erste Ergebnis kritisch interpretiert werden. Ein großer Unterschied zwischen der PES und dem Zellinneren besteht in den definierten Bedingungen, die bei der PES generiert werden können. Bei der PES wird eine bestimmte Polymerase eingesetzt und auch die Konzentrationen der Nucleosidtriphosphate kann gezielt eingestellt werden, während in der Zelle verschiedene Polymerasen und variierende Konzentrationen der Triphosphate vorliegen. Diverse Korrekturmechanismen wie das *proofreading*^[442-443] und die *mismatch-Reparatur*^[444] erschweren zusätzlich die dauerhafte Inkorporation unnatürlicher Nucleosid-Analoga.

4.3 Notwendigkeit von isotopenmarkierten Massestandards

Um die Wirksamkeit von Azacytidin-Derivaten beurteilen zu können, muss deren Gehalt in der DNA bestimmt werden. Die quantitative und parallele Analyse aller enthaltenen kanonischen und modifizierten Basen kann so tiefere Einblicke in die intrazellulären Mechanismen und damit in die Wirkstoffaufnahme liefern. Grundsätzlich stehen für die Quantifizierung, insbesondere von Methylcytidin als die häufigste Modifikation in der genomischen DNA und Marker diverser Krankheiten, verschiedene Methoden zur Verfügung.^[321-322, 445-448]

Die natürliche Häufigkeit modifizierter DNA-Basen im menschlichen Genom ist sehr gering und variiert sehr stark während der DNA-Replikation.^[449] Es sind beispielsweise je nach Zelltyp und Alter^[450] 0,76–1,0 mol% Methylcytosin,^[50] in der DNA vorhanden. Entsprechend ist es wichtig eine Quantifizierungsmethode zu finden, die höchstmögliche Sensitivität gegenüber den zu untersuchenden Modifikationen verspricht. Eine Methode die hierfür bekannt ist und auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde ist die Untersuchung via UHPLC, gekoppelt an ein Triple Quadrupol Massenspektrometer (UHPLC-QQQ-MS). Als sanfte Ionisierungsmethode, die auch gut mit UHPLC vereinbar ist, wird meist Elektrosprayionisation (ESI) verwendet während in den anschließenden Quadrupolen die Selektion der gewünschten Analyten stattfindet: Im ersten Quadrupol wird nach dem gewünschten Nucleosid gefiltert, welches im nächsten Quadrupol, der Kollisionszelle, fragmentiert wird.^[451] Im dritten Quadrupol werden die entstandenen Tochterionen analysiert womit eine eindeutige Identifikation der untersuchten Modifikation erreicht werden kann.

Da die Analyse via MS von vielen Faktoren wie der Probenmatrix, dem Puffersystem und dem zu untersuchenden Analyten abhängt und daher grundsätzlich nicht quantitativ ist, wird für die eigentliche Datenauswertung eine Kalibrierungskurve mit einem internen Standard eingesetzt.^[321, 452] Bei der meistverwendeten Methode wird auf die *isotope dilution* Technik zurückgegriffen. Dabei wird als Referenz das mit schweren Atomen markierte Zielmolekül, *stable isotope heavy labelled internal standard* (SILIS), zu jeder Probe zugegeben (*spiking*).^[453] Um dabei die gleiche Retentionszeit wie das zu untersuchende Molekül zu haben, sollten hauptsächlich ¹⁴N/¹⁵N- oder ¹²C/¹³C-Austausche vorgenommen werden. Ein H/D-Austausch ist nicht optimal, da dadurch das Säure-Basen-Verhalten der Moleküle leicht verändert und somit auch die Retentionszeit in der UHPLC und damit die Datenauswertung negativ beeinflusst werden können.^[454-456] Auch sollte der SILIS mindestens eine Masse von [M+3] aufweisen, um Verfälschungen durch die natürliche Häufigkeit von ¹³C-Isotopen und damit eine Verminderung der Sensitivität zu vermeiden.^[457] Für die Aufnahme der Kalibrierungskurve wird dann eine Verdünnungsreihe des unmarkierten Analyten hergestellt, die jeweils die gleiche Menge des SILIS beinhaltet. Durch diese lineare Konzentrationsabhängigkeit kann final die Menge des zu untersuchenden Analyten berechnet werden.

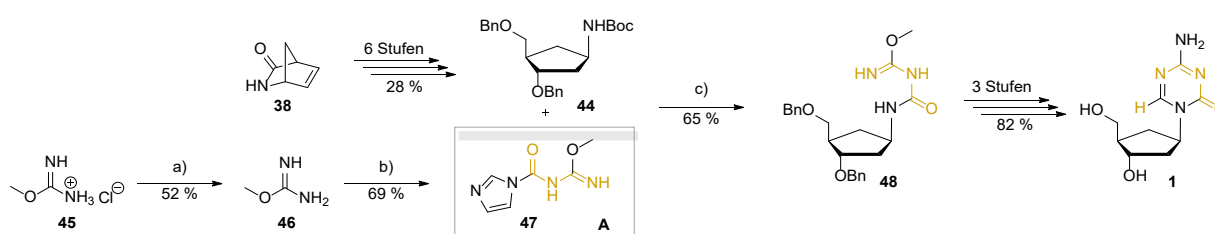
Neben der eindeutigen Zuordnung durch Fragmentierung und internem isotopenmarkierten Standard, der sehr kurzen Analysezeit von ca. 12–15 min pro Probe und hohen Sensitivität bis in den Femtomol- bzw. Attomol-Bereich, die mit dieser UHPLC-QQQ-MS Analyse erreicht wird, ist diese Methode auch sehr gut reproduzierbar und bietet damit das optimale Werkzeug zur Untersuchung der Inkorporation der Aza-Basen in die DNA sowie der Änderung des 5-mdC-Gehalts.^[321]

4.3.1 Synthese der Massestandards

Aus den vorangegangenen biochemischen Untersuchungen in Kapitel **4.1.2**, **4.2.2** und **4.2.4** konnte gezeigt werden, dass sowohl cAzadC als auch Decitabin die 5-mdC-Niveaus der DNA deutlich

reduzieren. Um zu ermitteln, wie viel dieser Wirkstoffe in die DNA eingebaut wird und entsprechend für den hypomethylierenden Effekt verantwortlich ist, müssen diese exakt quantifiziert werden. Durch enzymatischen Verdau kann die aus Zellen isolierte gDNA in ihre einzelnen Nukleoside gespalten werden und diese wiederum mittels UHPLC-QQQ-MS-Analyse untersucht werden. Durch Einsatz eines SILIS können so quantitative Aussagen über den Einbau getroffen werden. Verschiedene Ansätze zur Synthese eines dafür geeigneten SILIS werden im nachfolgenden Kapitel ausführlich diskutiert.

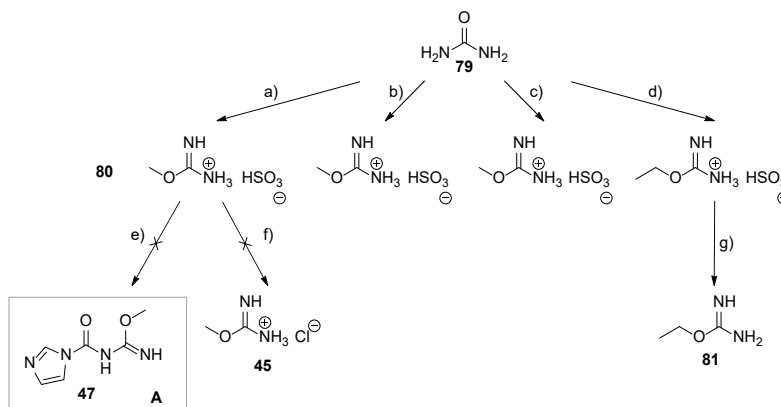
Da die glycosidische Bindung bei der Fragmentierung der DNA-Basen in der Kollisionszelle gespalten wird und meist nur das Basenfragment detektierbar ist, ist es ideal, die schweren Atome des SILIS im Triazinring des cAzadCs anzubringen.^[458-459] Obwohl grundsätzlich auch die Markierung des Riboserings bzw. Carbacyclus möglich ist um bereits im ersten Quadrupol die Vorläuferionen zu differenzieren, so wird doch eine zusätzliche Abgrenzung der SILIS-Tochterionen im dritten Quadrupol präferiert. Entsprechend bietet es sich an, ausgehend von schwerem Harnstoff, welcher in verschiedenen Varianten mit geringem finanziellen Aufwand kommerziell erwerbbar ist, den Baustein **A** zu synthetisieren (**Schema 13**).



Schema 13 Reaktionsübersicht des Aufbaus des Triazinrings von cAzadC (**1**), ausgehend von *O*-Methylisourea-hydrochlorid (**45**). In Gelb sind die Atome gezeigt die von Baustein **A** ausgehend den Heterocyclus aufbauen und für einen SILIS modifiziert werden können. *Reagenzien und Bedingungen*: a) KOH, Et₂O/H₂O, -15 °C, 30 min; b) CDI, THF, RT, 3 h; c) 1. TFA, abs. DCM, RT, 1 h; 2. **A**, abs. MeCN, 85 °C, 2 h.

Die Synthese des Hydrochlorids **45** bzw. Bausteins **A** wurde zunächst mit unmarkiertem Harnstoff (**79**) getestet (**Schema 14**). Die erste getestete Vorschrift stammte von einem Patent von GREINDL *et al.*,^[460] dessen Synthese im Vergleich zum Hydrochlorid kein Chlor- sondern ein Sulfat-Anion als Gegenion des Isoureas besitzt (**Schema 14 a**). Da das Gegenion jedoch hier keinen Einfluss auf den anschließenden Reaktionsmechanismus hat, wurde dennoch dieser Ansatz verfolgt. Die Synthese begann mit dem Lösen von Dimethylsulfat (DMS) in 50 %iger H₂SO₄ bei 70 °C. Anschließend wurde portionsweise Harnstoff zugegeben und nach vollständigem Lösen das Gemisch auf 60 °C gekühlt, um erneut Harnstoff und DMS zuzugeben. Dieser Zyklus wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Nach Ende der Reaktion und Abkühlen des Reaktionsgemisches auf RT blieb ein farbloses Öl zurück. Die Analyse des Salzes per NMR zeigte keine Harnstoff- oder DMS-Signale, weshalb mit dem erhaltenen Produkt die Synthese des Bausteins **A**, gemäß der Literatur,^[6] getestet wurde (**Schema 14 e**). Dabei konnte jedoch bereits das freie *O*-Methylisourea **46** nicht wie sonst üblich durch Auskristallisation gewonnen werden. Die Kopplungsreaktion mit CDI wurde dennoch mit dem erhaltenen Öl getestet, lieferte jedoch nicht das gewünschte Produkt. Um zu testen, ob es möglich ist, das Sulfat-Gegenion durch ein Chlorid-Ion auszutauschen, wurde das Salz in Wasser gelöst und mit BaCl₂ versetzt, um so Bariumsulfat auszufällen (**Schema 14 f**).^[461] Auch dieser Ansatz lieferte nicht das gewünschte Ergebnis. Alternativ wurde eine ähnliche Synthesevorschrift, ebenfalls von GREINDL *et al.*,^[460] getestet (**Schema 14 b**). Diesmal wurde Harnstoff in 50 %iger H₂SO₄ gelöst, auf 40 °C erwärmt und langsam DMS zugegeben. Nach vollständigem Zugeben wurde das Gemisch auf 70 °C erwärmt und für 2 h gerührt. Nach Abkühlen blieb wieder ein farbloses Öl zurück. Hier konnten mittels NMR-Referenzspektren eindeutig Harnstoff und DMS nachgewiesen werden, was auf einen unvollständigen Reaktionsumsatz hinweist. Eine letzte Synthesevorschrift, wieder von GREINDL *et al.*,^[460] wurde ebenfalls getestet (**Schema 14 c**). Hierbei wurde Harnstoff in trockenem MeOH gelöst, MeSO₃H zugegeben und das Gemisch auf 40 °C erwärmt.

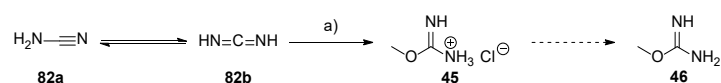
Nach vollständiger Zugabe von DMS wurde das Gemisch für 2 h bei 70 °C gerührt. Ähnlich wie bei der Reaktion zuvor war auch hier mittels NMR-Spektroskopie zu erkennen, dass die Reaktion nicht vollständig ablief.



Schema 14 Reaktionsübersicht über die getesteten Reaktionsbedingungen zur Synthese eines Vorläufers des Bausteins **A**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) Me_2SO_4 , H_2SO_4 (50 % ig), Harnstoff, 70 °C → 60 °C, 2 h; b) Harnstoff, H_2SO_4 (50 % ig), Me_2SO_4 , 40 °C → 70 °C, 2 h; c) Harnstoff, MeSO_3H , Me_2SO_4 , abs. MeOH, 40 °C → 70 °C, 2 h; d) Harnstoff, $(\text{EtO})_3\text{BF}_4$, RT, ü. N.; e) KOH, CDI, abs. THF, RT, 3 h; f) BaCl_2 , -5 °C, ü. N.; g) KOH, wässrige Extraktion.^[460, 462]

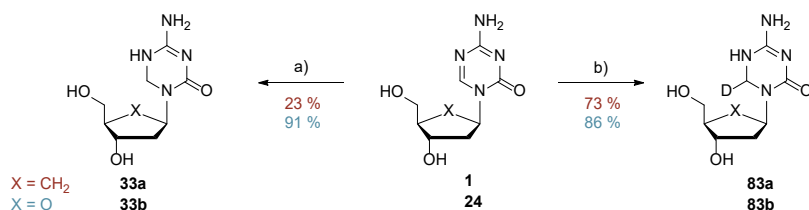
Da die getesteten Reaktionsbedingungen nicht das gewünschte Ergebnis lieferten, wurde eine weiteren Methoden zur Synthese des Bausteins **A** von MEERWEIN *et al.*^[462] untersucht (**Schema 14 d**). Dieser vermischte Harnstoff mit Trimethyloxonium-tetrafluorborat ohne Einsatz eines Lösungsmittels wobei eine klare Flüssigkeit mit Phasentrennung entstand. Bei der Durchführung der Reaktion konnte die Verflüssigung der beiden Feststoffe beobachtet, jedoch keine Phasentrennung erkannt werden. Dennoch wurde im Anschluss analog zur Literatur^[462] das Salz in Wasser gelöst, mit KOH versetzt und mit Diethylether extrahiert, um so das Isoureaderivat **81** zu erhalten (**Schema 14 f**). Obwohl das Produkt per MS nachgewiesen werden konnte, war die Ausbeute marginal. Zur Überprüfung, ob die schlechte Ausbeute nur mit der vorherigen Reaktion zusammenhängt, wurde auch das kommerziell erworbene Hydrochlorid **45** gemäß MEERWEIN *et al.*^[462] wässrig extrahiert. Auch hier war die Ausbeute im Vergleich zur Methode von WILDENHOF *et al.*^[6] sehr viel schlechter. Da das Produkt nur in geringen Spuren erhalten werden konnte wurde dieser Syntheseweg verworfen.

Eine andere Herangehensweise ist die Synthese von *O*-Methylisourea ausgehend von Cyanamid (**82**) welches ebenfalls kostengünstig als *heavy labelled* Derivat kommerziell zu erhalten ist (**Schema 15**). Die von STIEGLITZ *et al.*^[318, 463] etablierte Methode zur Synthese von Alkylisoureaderivaten verwendet dabei MeOH oder MeONa und HCl. Gemäß der Literatur^[463] wurde Cyanamid in abs. MeOH gelöst, HCl (3 N in MeOH) zugegeben und bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion konnten die Hydrochlorid-Kristalle am Boden des Kolbens entdeckt werden, auf Grund der geringen Menge wurden diese jedoch nicht isoliert. Möglicherweise war die verwendete HCl-Lösung nicht ausreichend trocken. Auf den Einsatz von gasförmigem HCl, wie es bei STIEGLITZ *et al.*^[463] eingesetzt wurde, sollte hier auf Grund der schwierigen Handhabung dennoch verzichtet werden. Auch dieser Ansatz zur Synthese eines SILIS wurde entsprechend verworfen.



Schema 15 Reaktionsüberblick über die geplante Synthese von *O*-Methylisourea (**46**) ausgehen von Cyanamid (**82**). *Reagenzien und Bedingungen:* a) abs. MeOH, HCl in MeOH (3 N), RT, 5 d.

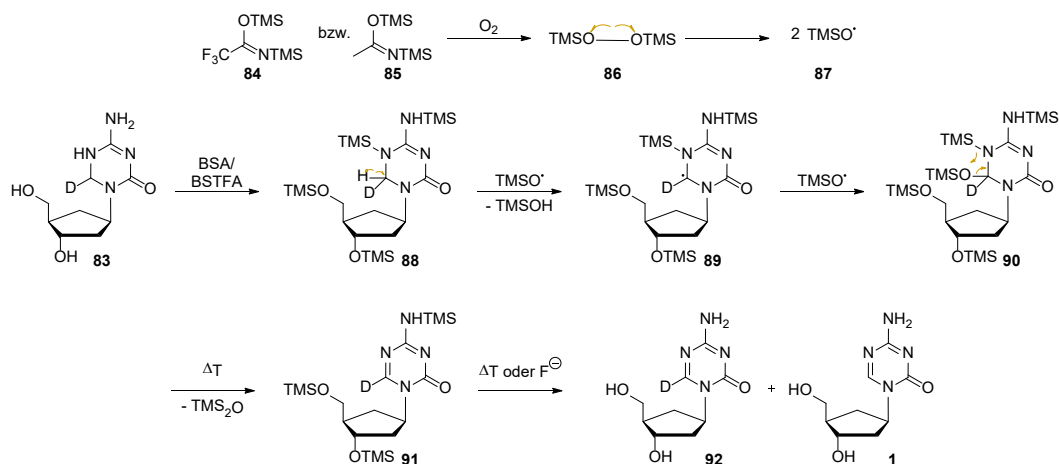
Die alternative Synthese eines [M+2]-Massestandards basierte auf einem bekannten Prinzip: die selektive Reduktion der Doppelbindung von Cytidin zum Dihydrocytidin (**Schema 16**).^[446, 464-465] Dihydrocytidin bzw. Dihydroazacytidin **33** kann, wie bereits in der Literatur^[464] bekannt, durch Einsatz von NaBH₄ hergestellt werden. Wird an dieser Stelle statt NaBH₄ eine schwere Version dieses Reduktionsmittels, NaBD₄, verwendet, ermöglicht dies die Herstellung von **83** durch Einführung eines Deuteriumatoms an der C6-Position der Base.^[464] Um die Massendifferenz des internen Standards im Vergleich zum unmarkierten Analyten so groß wie möglich zu gestalten, sollten zwei statt nur einem Deuteriumatom eingeführt werden. Dafür musste nach der ersten Reduktion der Doppelbindung diese wieder oxidiert und anschließend erneut mit NaBD₄ reduziert werden.



Schema 16 Reaktionsschema zur Reduktion des Triazinrings der Aza-Base **1** und **24** unter Verwendung von NaBH₄ bzw. NaBD₄. *Reagenzien und Bedingungen:* a) NaBH₄, H₂O, RT, 1 h; b) NaBD₄, H₂O, RT, 1 h. In rot sind die Ausbeuten der Reaktion der cAzadC-Derivate dargestellt, während blau die der Decitabin-Derivate sind.

Für die (Re-)Aromatisierung verschiedener Ringsysteme gibt es in der synthetischen Chemie viele unterschiedliche Methoden.^[466] Im Zuge dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Reaktionsbedingungen bezüglich der Oxidation des Triazinrings mit vier verschiedenen Oxidationsmitteln getestet. Obwohl das Ziel war für beide, die Decitabin- und cAzadC-Derivate, eine geeignete Oxidationsmethode zu finden, wurden die initialen Test auf Grund der erhöhten Stabilität nur mit dem reduzierten cAzadC durchgeführt.

Zunächst wurde versucht die Doppelbindung unter Verwendung von BSTFA einzuführen. Diese silyl-vermittelte Oxidation wurde schon früh in der Literatur^[464, 467] beschrieben und liefert dort, soweit angegeben, gute Ausbeuten. Zuerst soll kurz ein Blick auf den ablaufenden Reaktionsmechanismus geworfen werden. Wie KELLEY *et al.*^[468] und BEISLER *et al.*^[464] beschreiben, wird bei der silyl-vermittelten Oxidation zunächst aus einem starken Silylierungsmittel wie BSTFA (**84**) oder BSA (**85**) unter Anwesenheit eines Radikals, wie elementarem Sauerstoff, über das Intermediat **86** die reaktive Spezies **87** gebildet (**Schema 17**).

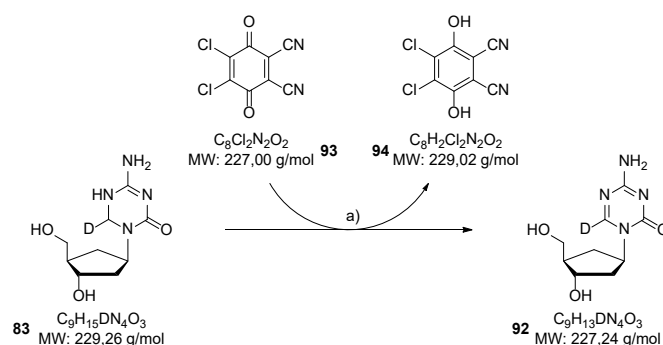


Schema 17 Überblick über den radikalischen Reaktionsmechanismus bei der silyl-vermittelten Oxidation. Die reaktive Spezies **87** spaltet auf Grund des *kinetic isotope effects* bevorzugt die C-H-Bindung, wobei das tertiäre Radikal **89** gebildet wird. In einer konzertierten Reaktion kann dies, unter Abspaltung von TMS, das oxidierte Produkt **92** ergeben. Abbildung adaptiert von KELLY *et al.*^[468]

Das im Überschuss eingesetzte Silylierungsmittel schützt im ersten Schritt alle reaktiven Stellen des reduzierten cAzadCs **83**, OH- und NH-Gruppen als Trimethylsilylether **88**. Anschließend wird die C-H-Bindung der C6-Position homolytisch gespalten, was zur tertiären radikalischen Spezies **89** führt. Durch den Angriff eines weiteren TMS-Radikals wird auch die C6-Position silyliert, was die Zwischenstufe **90** liefert. In einem konzertierten Mechanismus kann nun TMS₂O abgespalten und die Doppelbindung zu **91** wieder eingeführt werden. Die Entschützung der Hydroxy- und Aminogruppen erfolgt im finalen Schritt entweder thermisch oder unter Verwendung eines Fluorid-Donors, um so das gewünschte oxidierte Produkt **92** freizugeben. Entscheidender Faktor dieser Oxidationsmethoden ist der Einsatz starker Silylierungsmittel, welche sowohl NH- als auch OH-Funktionalitäten schützen können. Auch das Vorhandensein molekularen Sauerstoffs und erhöhter Temperaturen ist bei dieser Reaktion Voraussetzung. Die Temperatur beeinflusst den Reaktionsmechanismus dabei an zwei Schritten erheblich. Einerseits wird die Bildung freier Radikale, andererseits die Abspaltung der OTMS-Einheit bei Intermediat **90** beschleunigt. Da bei der Rearomatisierung entweder das Proton oder das Deuteriumion abgespalten werden kann entstehen bei dieser Reaktion, auf Grund des geringen Massenunterschiedes beider Atome, wie bei KELLEY *et al.*^[468] berichtet die Produkte **92** und **1** in einem Verhältnis von 3:1.

Für die Oxidation des reduzierten cAzadC-Derivates **83** wurde zunächst eine Versuchsvorschrift von ABBASI *et al.*^[469] verwendet. Das Startmaterial wurde dafür in MeCN vorgelegt und ein großer Überschuss von 32 Äq. BSTFA zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 h bei 90 °C unter Sauerstoffatmosphäre (Sauerstoff-Ballon) gerührt. Nach anschließendem Lösungsmittelaustausch von MeCN zu THF wurden 0,25 Äq. TBAF zugegeben, das Gemisch *in vacuo* getrocknet und direkt per semipräparativer HPLC (0 % → 2 % MeCN in 45 min) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **92** konnte in Spuren via MS nachgewiesen werden, jedoch war die Synthese für diese Anwendung nicht effektiv genug. Eine weitere Variante lieferte ABBASI *et al.*^[467] selbst: Neben einer verlängerten Reaktionszeit von 53 statt 30 h, sollen dabei die TMS-Gruppen durch mehrfache Destillation mit Methanol abgespalten werden. Leider konnten nach der Durchführung dieser Reaktion ebenfalls nur analytische Mengen des gewünschten Produktes nachgewiesen werden. Die Letzte Variante einer silylvermittelten Oxidation lieferte GODDARD *et al.*^[470] Ähnlich wie bei ABBASI *et al.*^[467] sollen hier auch die TMS-Gruppen im letzten Schritt destillativ entfernt werden. Obwohl bei dieser Reaktion ebenfalls mit einem Sauerstoffballon gearbeitet wurde und BSTFA mit einem sehr großen Überschuss von 250 Äq. eingesetzt wurde, konnte nach Beenden der Reaktion nur Startmaterial isoliert werden. Da die silylvermittelte Oxidation an dem cAzadC-Substrat der Analytik zufolge eher mäßig funktionierte, wurden weitere Oxidationsmittel getestet.

CONVERSO *et al.*^[471] nennt in ihrem Patent DDQ (**93**) als geeignetes Oxidationsmittel zum Einführen einer Doppelbindung im Pyrimidin-Heterocyclus. Grundsätzlich hat DDQ ein weites Anwendungsspektrum in der organisch chemischen Synthese und kann unter anderem für die Oxidation von Alkoholen und Ethern, Einführung von C-C Bindungen, Entschützung der PMB-Gruppe und, wie in diesem Fall, für die Dehydrogenierung eingesetzt werden.^[472] Gemäß der Literatur^[471] wurde das Startmaterial **83** in abs. THF gelöst und DDQ zugegeben (**Schema 18**). Nach 1, 5 und 24 h wurden Proben genommen und diese mittels MS analysiert. Die Analyse via normal Phasen DC war auf Grund der hohen Polarität des Eduktes und Produktes nicht optimal, weshalb auf MS zurückgegriffen wurde. Die Proben wiesen in der direkt MS-Messung zwei Peaks auf: +230 und +228 m/z. Als klassisches Addukt-Ion in der MS wird der [M+H]⁺-Peak beobachtet welcher in diesem Fall für +230 m/z sowohl das Edukt **83** als auch das reduzierte Oxidationsmittel **94** beinhalten kann. Ähnlich kann der Peak bei +228 m/z sowohl DDQ (**93**) als auch das Produkt **92** enthalten. Da das Massenspektrometer mit dem der Reaktionsverlauf untersucht wurde, keine hohe Auflösung besitzt, kann dieser kleine Massenunterschied der an der Reaktion beteiligten Moleküle nicht detektiert werden und eine Auswertung der Massespektren keine Aussage über den Reaktionsverlauf liefern.



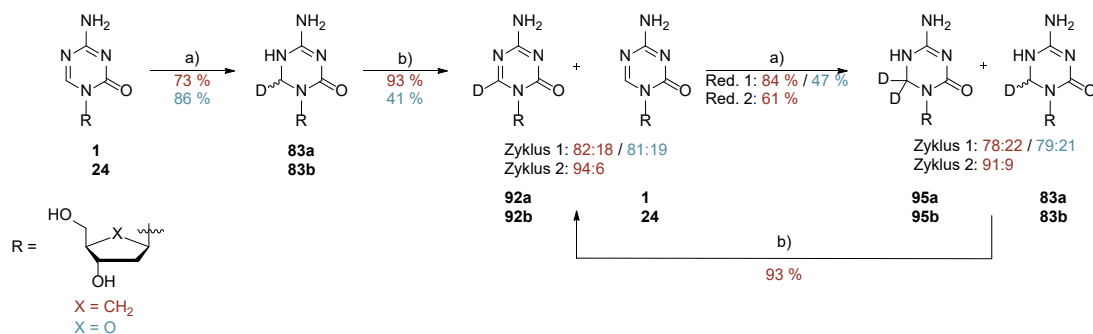
Schema 18 Reaktionsgleichung der Dehydrogenierung des reduzierten cAzadCs **83** mit DDQ (**93**). Die sehr ähnlichen Molekulargewichte machen eine Reaktionskontrolle mittels MS nahezu unmöglich. *Reagenzien und Bedingungen*: a) DDQ, abs. THF, RT, 24 h.

Auffällig war ein Farbumschlag der Reaktion von gelb nach rot. Diese rote Farbe ist für Reaktionen mit DDQ charakteristisch und kann von *charge-transfer* Komplexen oder radikalischen Intermediaten gebildet werden.^[473-474] Mit diesem Wissen wurde die Reaktion vor der Aufarbeitung für 12 h gerührt. Unter der Annahme, dass DDQ in dieser Zeit vollständig abreagiert und das reduzierte Nebenprodukt Hydrochinon **94** sehr schlecht in organischen Lösungsmitteln löslich ist, sollte eine weitere MS Analyse nach wässriger Aufarbeitung eine deutlichere Aussage über den Reaktionsverlauf liefern. Auch dabei konnte weder Edukt noch Produkt nachgewiesen werden. Auf Grund dieser ernüchternden Ergebnisse wurde dieser Ansatz ebenfalls verworfen und ein weiteres Oxidationsmittel getestet.

Als drittes Oxidationsmittel wurde MnO_2 verwendet. Ebenfalls in einem Patent^[475] wurde MnO_2 eingesetzt, um ein Dihydropyrimidon zu einem Pyrimidon zu oxidieren. Gemäß der Literatur^[475] wurde das Startmaterial in Chloroform gelöst, MnO_2 zugegeben und bei 70 °C gerührt. Nach 3 h und nach 16 h wurde das Reaktionsgemisch via MS analysiert und jeweils kein Umsatz der Reaktion beobachtet. Ein möglicher Grund für das Fehlschlagen der Reaktion kann die fehlende Aktivierung des MnO_2 gewesen sein. In der Literatur sind einige Stellschrauben bekannt, die die Reaktionen mit MnO_2 beeinflussen.^[476] Neben dem gewählten Lösungsmittel, der Temperatur und der Zeit, spielt auch die Struktur des eingesetzten Mangandioxids eine entscheidende Rolle. YANG *et al.*^[477] untersuchten 2020 die Reaktivität vier verschiedener MnO_2 Verbindungen und fanden heraus, dass γ - MnO_2 die reaktivste Spezies ist. Möglicherweise hätte die Aktivierung mittels Trocknung, wie in der Literatur^[478] genannt, den Umsatz und die Reaktivität dieser Reaktion deutlich verbessern können.

Das vierte Oxidationsmittel, welches in der Literatur^[479] ebenfalls zur Synthese von Pyrimidon ausgehend von Dihydropyrimidon verwendet wird, ist I_2 . Iod ist bekannt für seinen facettenreichen Einsatz in der organischen Chemie. Eigenschaften wie seine geringe Toxizität, erschwinglichen Preise, gute Löslichkeit und einfache Handhabung machten es zu einem beliebten Katalysator bei einer Vielzahl von chemischen Reaktionen.^[480-481] Auch ist die Katalyse oxidativer Dehydrogenierungen unter Verwendung von Iod bereits literaturbekannt.^[482-484] Unter diesen Umständen schien I_2 das ideale Oxidationsmittel. Gemäß dem Patent von STAMMERS *et al.*^[479] wurde somit in einer ersten Testreaktion das reduzierte cAzadC **83** in abs. MeOH gelöst, Na_2CO_3 sowie I_2 zugegeben und das Gemisch über Nacht gerührt. Am nächsten Tag erfolgte die wässrige Aufarbeitung mit 20 %iger $Na_2S_2O_3$ -Lösung. Im Anschluss an die Aufarbeitung konnte kein Produkt in der organischen Phase festgestellt werden. Ein möglicher Grund hierfür ist die große Wasserlöslichkeit der cAzadC-Derivate. Entsprechend wurde die Reaktion, ohne wässrige Aufarbeitung wiederholt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in ddH_2O aufgenommen und direkt via HPLC mit einem sehr flachen Gradienten von 0 % → 2 % MeCN in 45 min, aufgereinigt. Der Hauptpeak bei 11 min enthielt das Produktgemisch aus deuteriertem cAzadC **92** und cAzadC (**1**) mit hoher Reinheit und einer sehr guten Gesamtausbeute von 93 % (**Schema 19**). Bei der Oxidation der Einfach- zur Doppelbindung gibt es zwei Möglichkeiten den Triazinring

wieder zu aromatisieren: Die Abspaltung des Protons und die Abspaltung des Deuteriums. Die präferierte radikalische Abspaltung des Protons der C6-Position im Vergleich zum Deuterium kann auf den geringen Massenunterschied dieser Isotope zurückgeführt werden. Ein Effekt, welcher als *kinetic isotope effect* bereits 1947 von BIGEISEN *et al.*^[485] beschrieben wurde, besagt, dass die Nullpunktsenergie einer C-D-Bindung etwas niedriger ist als die einer C-H-Bindung. Die damit einhergehende größere Aktivierungsenergie eines C-D-Bindungsbruchs ist ausschlaggebend für die leicht bevorzugte Abspaltung des Protons. Auf Grund der geringen Massenunterschiede ist jedoch die Abspaltung des Deuteriums zu einem nicht vernachlässigbaren Anteil ebenfalls möglich. Entsprechend wird bei der Oxidation zur Doppelbindung ein nicht trennbares Produktgemisch von deuteriertem cAzadC **92a** und cAzadC (**1**) erhalten.



Schema 19 Reaktionsüberblick über den Reduktions- und Oxidationszyklus zur Synthese eines [M+2]-SILIS. Nach erster Reduktion der Aza-Basen **1** und **24** zu **83** mit NaBD₄ kann die Doppelbindung mit I₂ wieder eingeführt werden und Produkt **92** freigeben. Auf Grund des nur schwachen *kinetic isotope effects* und der für die Quantifizierung benötigten hohen Reinheit des SILIS wurde dieser Zyklus mehrfach wiederholt um den Anteil des doppelt deuterierten SILIS **95** zu erhöhen. *Reagenzien und Bedingungen*: a) NaBD₄, H₂O, RT, 1 h; b) I₂, Na₂CO₃, MeOH, RT, 18 h. In Rot sind die Ausbeuten der Reaktionen mit dem cAzadC-Derivaten dargestellt, während Blau die der Decitabin-Derivate sind.

Das Verhältnis zwischen diesen beiden Produkten kann über eine quantitative NMR-Analyse bestimmt werden. Betrachtet man das NMR-Signal des H-6 des Triazinrings, so kann ein starker Shiftwechsel zwischen oxidierter und reduzierter Spezies erkannt werden, die als Signale bei ~8,2 ppm bzw. ~4,4 ppm detektiert werden (**Abbildung 36**).

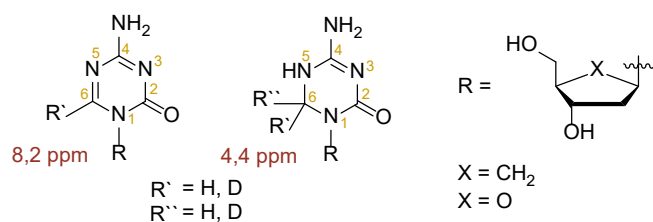


Abbildung 36 Überblick über die Änderung der chemischen Verschiebung des 6-Protons je nach Oxidationszustand. Durch die dadurch bedingte große Verschiebung der Signale im NMR-Spektrum konnte die Reinheit der deuterierten Substanzen bestimmt werden.

Diese Signale werden jedoch nur von den protonierten Spezies erzeugt, da Deuterium, obwohl es mit Spin +1 ein NMR-aktiver Kern ist, eine zu Protonen sehr unterschiedliche Resonanzfrequenz hat und somit im klassischen ¹H-NMR-Spektrum praktisch nicht detektierbar ist.^[486-488] Das bedeutet, dass nach der ersten Reduktion ein eindeutiges Signal bei 4,4 ppm mit einem Integral von 0,97 zu erkennen ist, da nun ein Deuterium und ein Proton an Position 6 sind (**Abbildung 37**). Bereits nach dem ersten Oxidationsschritt liegt nun allerdings ein Gemisch zweier Produkte vor. Das zu betrachtete Signal bei 4,4 ppm besitzt nun kein Integral von 1,00 mehr, sondern von 0,10. Über Signale bekannter Integralgröße konnte anschließend das Stoffmengen-, sowie Masseverhältnis der einzelnen Produkte ermittelt werden.^[489]

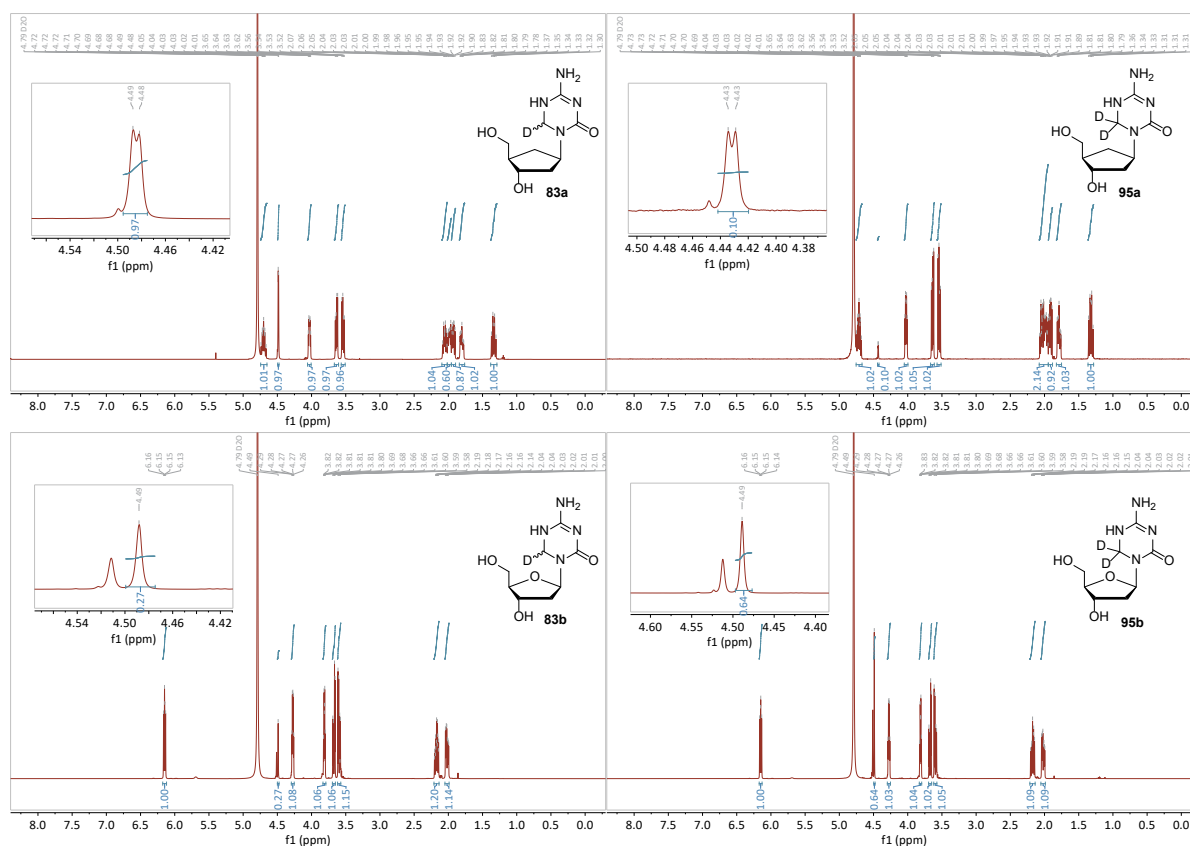


Abbildung 37 NMR-Spektren der durch den Redox-Zyklus erhaltenen Produkte **83** und **95**. Die für die Berechnung der Reinheit herangezogenen Signale der reduzierten Spezies sind jeweils vergrößert dargestellt. Das Verhältnis der im Produktgemisch vorhandenen Modifikationen **83** und **95** konnte damit eindeutig bestimmt werden.

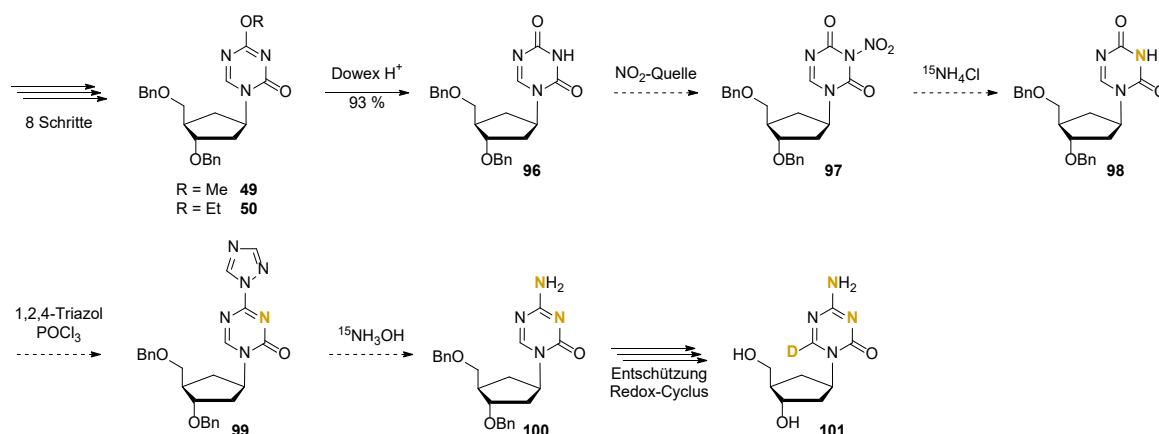
Mit diesen optimierten Reaktionsbedingungen konnte die eigentliche Synthese des [M+2]-Massestandards begonnen werden. Die erste Reduktion der jeweiligen Startmaterialien Decitabin und cAzadC erfolgte mit NaBD₄ innerhalb 1 h bei RT. Die Reaktion wurde unter Zugabe einer 700 mM NaOAc-Lösung mit pH 5 beendet. Die Boratsalze wurden durch Filtration entfernt und das Gemisch direkt an der semipräparativen HPLC (ddH₂O isokratisch in 45 min) gereinigt. Das deuterierte Produkt **83** konnte mit den jeweils guten Ausbeuten von 73 % bei cAzadC und 86 % bei Decitabin isoliert werden. Bei der ersten Oxidation mit I₂/Na₂CO₃ über Nacht, zeigten sich in der Ausbeute deutliche Unterschiede. Während das deuterierte Decitabin **92b** mit nur 41 % erhalten wurde, konnte D-cAzadC **92a** mit einer sehr guten Ausbeute von 93 % erhalten werden. Dies zeigt die von WILDENHOF *et al.*^[6] bestätigte unterschiedliche Stabilität der zwei Verbindungen in wässriger Umgebung. Die erhaltenen D:H-Verhältnisse von ca. 80:20 konnten bei beiden Reaktionen beobachtet werden. Es folgte eine zweite Reduktion mit NaBD₄, welche bei cAzadC mit 84 %, bei Decitabin mit 47 % Ausbeute erfolgte. Die DD:HD-Verhältnisse der beiden Produkte **95** und **83** waren mit 80:20 wieder annähernd gleich.

Um in der Analyse mit hochaufgelöster Massenspektrometrie eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Analyten zu gewährleisten, sollte die Reinheit des SILIS >95 % betragen. Wird ein SILIS mit [M+1] verwendet, ist die Reinheit um so wichtiger, da ein Ausbluten des natürlichen ¹³C-Peaks des Analyten in den SILIS-Peak weitestgehend vermieden werden soll. Entsprechend wurde für cAzadC der Oxidationsschritt mit einer Ausbeute von diesmal 93 % wiederholt, und lieferte D-cAzadC **92a** mit einer Reinheit von 94 %. Da dies nicht die gewünschte Mindestreinheit von 95 % und nur eine um +1 erhöhte Masse aufwies, wurde ein letzter Reduktionsschritt mit einer Ausbeute von 61 % durchgeführt. Das erhaltene DD:HD-Verhältnis 91:9 erfüllt zwar ebenfalls nicht die >95 % Reinheitsanforderung, eine Verwendung als SILIS ist auf Grund des [M+2]-Gewichts dennoch möglich. Mit diesem Hintergrund ist zu erklären, weshalb der 91%ige DD-cAzadC SILIS **95** dennoch verwendet werden konnte. Aufbauend

auf diesen ersten Studien unter Verwendung des DD-cAzadC-SILIS, konnte auf eine zweite Oxidation und dritte Reduktion des Decitabin-SILIS verzichtet werden.

Um die Quantifizierung der Aza-Basen **1** und **24** mit diesen SILIS **95** exakt durchführen zu können war die Aufnahme einer Kalibriergerade von Nöten. Dafür wurden die jeweils reduzierten unmarkierten Derivate **33** synthetisiert (**Schema 16**). Die Reaktion erfolgte, ähnlich zu der der schweren Derivate unter Einsatz von NaBH_4 mit Ausbeuten von 23 % bzw. 91 % des cAzadC- bzw. Decitabin-Derivats.

Mithilfe des Masteranden HANS HURMIZ wurde eine alternative Syntheseroute für einen [M+3]-SILIS erarbeitet. Die Idee bestand darin, die N3-Position, sowie den exocyclischen Stickstoff in der Base durch ein ^{15}N -Atom auszutauschen und anschließend mithilfe des Redox-Zyklus einen [M+3]-Standard zu generieren, bei dem keine reduktive Behandlung der biologischen Proben notwendig ist (**Schema 20**). Während das Einführen des schweren exocyclischen Amins keine Herausforderung darstellt, ist der N3-Austausch hier der kritische Punkt. Dafür hat sich bei Pyrimidin Basen die ringöffnende Substitution an einem imidischen Stickstoff etabliert.^[490] Voraussetzung ist das Anbringen einer starken elektronenziehenden Gruppe (EWG) am auszutauschenden Stickstoff, um den Angriff von $^{15}\text{NH}_3$ an einem elektrophilen Kohlenstoff auch bei milden Bedingungen zu ermöglichen. Der dabei geöffnete Ring kann, obwohl das entstandene Amid kein gutes Nukleophil ist, durch die Einstellung des EWGs und der damit verbundenen Abgangsgruppe in Kombination mit dem Energiegewinn, welcher mit der Bildung eines sechsgliedrigen Rings einhergeht, geschlossen werden. Für die Synthese des Standards bedeutet das, dass zunächst der Methoxy- oder Ethoxyether **49** oder **50**, welcher gemäß der Literatur über 8 Schritte hergestellt werden kann, in ein geschütztes Uridin überführt werden muss.^[6, 296] Analog zur Literatur^[491] konnte dies unter Einsatz von sauer aktiviertem Dowex50 mit einer annähernd quantitativen Ausbeute von 93 % erreicht werden. Das Lösungsmittel spielte dabei eine entscheidende Rolle, da dies polar genug sein musste für einen guten Protonentransfer, aber unpolar genug, um die Löslichkeit des Eduktes und Produktes zu garantieren. Obwohl verschiedene Lösungsmittelgemische getestet wurden, konnte mit EtOH/ H_2O 16:84 analog zur Literatur^[491] die beste Ausbeute erzielt werden.



Schema 20 Geplanter Syntheseweg für die Herstellung eines [M+3]-SILIS. Ausgehend von cAzadC-Vorläufer **49** und **50** sollte der Ether in eine Carbonylfunktion **96** umgewandelt und anschließend an der N3-Position nitriert werden um diese dann ein ^{15}N -Atom zu ersetzen. Die anschließende Umwandlung des Uridin-Derivats **98** in Cytidin verläuft über Zwischenstufe **99** welche es ermöglicht auch das exocyclische Amin durch ein ^{15}N -Atom auszutauschen. Die finale Entschützung sowie der Redox-Zyklus sind bereits etabliert. Gelb dargestellt sind die dabei eingeführten schweren Isotope.

Das erhaltene 5-Aza-Uridin-Derivat **96** wurde keiner Säulenchromatographie unterzogen, da unter den leicht sauren Bedingungen bei der Verwendung von Kieselgel und MeOH als Laufmittel eine Rückreaktion zum Edukt stattfand. Nach Abfiltrieren des Dowex-Gels lag das Imid **96** in ausreichender Reinheit vor und konnte direkt in die nächste Reaktion eingebracht werden. Im nächsten Schritt sollte

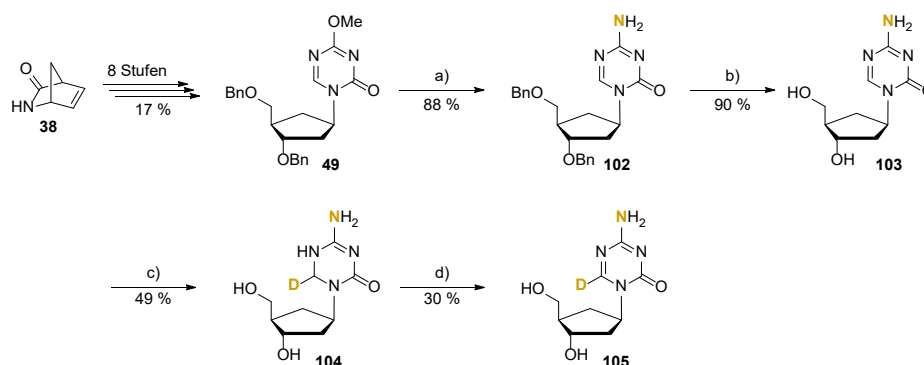
ein EWG an den N3-Stickstoff des Triazinrings angebracht werden. Die stärksten organischen EWGs sind Nitrogruppen und Triflate. Da letztere jedoch bevorzugt mit dem Carbonyl-Sauerstoff reagieren würden, fiel hier die Wahl auf die Nitro-Gruppe. In der Literatur^[91, 492-495] ist eine große Auswahl an Reaktionsbedingungen und Reagenzien zu finden, um diese funktionelle Gruppe selektiv einzuführen. Grundlegend ist allen Methoden, dass eine Nitratquelle, welche in leichtem Überschuss von 2–8 Äq. eingesetzt wird, zusammen mit einem Aktivator meist Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA), welcher hier ebenfalls mit einem Überschuss von 8 Äq. eingesetzt wurde, die reaktive Nitrierungsspezies bildet.^[496] 36 verschiedene Reaktionsbedingungen wurden getestet, welche alle nicht die gewünschte nitrierte Spezies **97** lieferten (**Tabelle 1**). Obwohl verschiedene Nitratquellen getestet wurden, konnte nur Edukt und das zu TFA zerfallene TFAA in DC- sowie MS-Analyse nachgewiesen werden.

Tabelle 1 Überblick über die getesteten Reaktionsbedingungen für die Nitrierung der N3-Position. Die Reaktion wurde gemäß der Literatur^[490] für 1 h bei -20 °C und anschließend für 1 h bei RT gerührt.

Lösungsmittel	Nitratquelle	Äquivalente
MeCN	KNO ₃	2, 3, 4, 8
	NH ₄ NO ₃	2, 3, 4, 8
	TBAN	2, 3, 4, 8
EtOAc	KNO ₃	2, 3, 4, 8
	NH ₄ NO ₃	2, 3, 4, 8
	TBAN	2, 3, 4, 8
DCM	KNO ₃	2, 3, 4, 8
	NH ₄ NO ₃	2, 3, 4, 8
	TBAN	2, 3, 4, 8

Auch die Deprotonierung und damit Aktivierung der N3-Position mit Et₃N konnte keine Konversion des eingesetzten Eduktes bewirken. Da die Triazineinheit im Vergleich zu Benzol drei ungepaarte Elektronenpaare besitzt, ist die Elektronendichte im Ringsystem extrem hoch. Auf Grund dessen ist die Reaktivität von Triazin bezüglich Nitrierung sowie Sulphonierung sehr gering.^[497] Hätte diese Reaktion das gewünschte Produkt geliefert, wären die für den [M+3]-SILIS geplanten finalen Reaktionsschritte die Umwandlung des Uridin-Derivates **98** über Zwischenstufe **99** in das Cytidin-Derivat **100** unter Einsatz von ¹⁵NH₃OH sowie die anschließende Entschützung und Redox-Reaktion zur Einführung des Deuterium Atoms im finalen Produkt **101** gewesen (**Schema 20**).^[91, 498-499]

Alternativ und weil ein [M+2]-SILIS, solange dieser keine Spuren des [M+0]-Moleküls mehr aufweist, auch zur Quantifizierung herangezogen werden kann, wurde die bekannte Syntheseroute leicht modifiziert. Diese erfolgte dabei in den ersten Schritten analog zur Literatur^[6, 296] ausgehend vom VINCE-Lactam (**38**) und unterscheidet sich erst in den letzten vier Stufen (**Schema 21**).



Schema 21 Überblick über die letzten Syntheseschritte der Herstellung des [M+2]-SILIS **105**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) ¹⁵NH₄OH, abs. MeOH, RT, 3 h; b) BCl₃, abs. DCM, -78 °C → RT, 3 h; c) NaBD₄, D₂O, RT, 1 h; d) I₂, Na₂CO₃, RT, 19 h. Gelb dargestellt sind die dabei eingeführten schweren Isotope.

Nach dem Aufbau des Carbacyclus und dem Ringschluss der Triazineinheit konnte das exocyclische Amin statt mit Ammoniak mit schwerem Ammoniumchlorid unter Zugabe von KOH eingeführt werden. Die dabei gute Ausbeute der Zwischenstufe **102** von 85 % konnte unter Verwendung von wässrigem $^{15}\text{N}_3$ auf 88 % gesteigert werden. Die erfolgreiche Inkorporation des ^{15}N -Atoms konnte durch ^{15}N -NMR Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden (**Abbildung 38**).

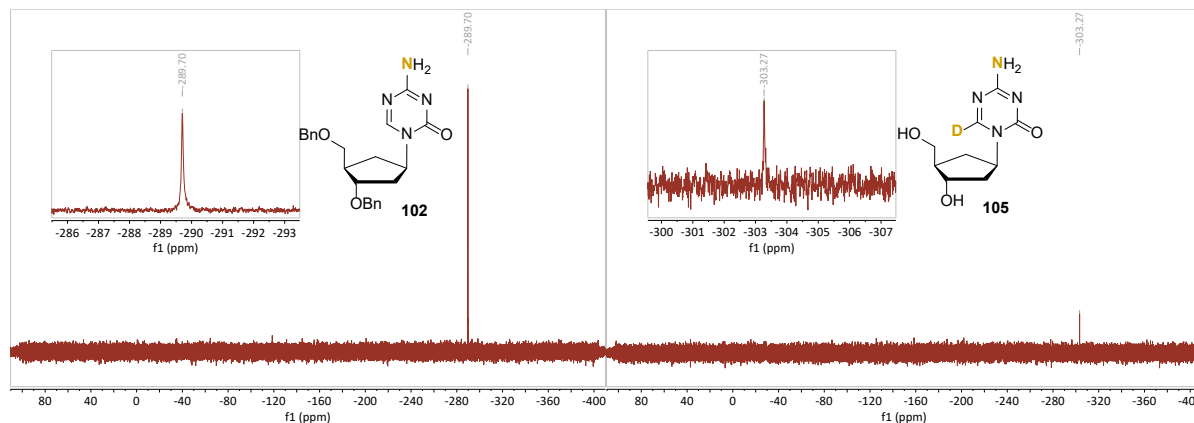


Abbildung 38 ^{15}N -NMR-Spektrum der Benzyl-geschützten Vorstufe **102** (links) und der finalen Verbindung **105** (rechts). Das Signal konnte durch den Literaturvergleich eindeutig den entsprechenden Produkten **102** und **105** zugewiesen werden. Das wie erwartete einzelne Signal bestätigt zudem den Einbau eines einzelnen ^{15}N -Atoms.

Auf Grund der geringen natürlichen Häufigkeit von nur 0,36 % und dem kleinen gyromagnetischen Verhältnis von $-27,13 \cdot 10^6 \text{ rad/s} \cdot \text{T}$ des ^{15}N -Isotops ergibt sich bei der Messung ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis.^[500] Das ^{15}N -Signal der Probe bei $-289,7 \text{ ppm}$, referenziert auf MeNO_2 , ist dennoch eindeutig zu erkennen und stimmt nahezu mit dem ^{15}N -NMR-Literaturwert^[501] des exocyclischenamins von Cytidin bei -282 ppm , überein. Zusätzlich zur NMR-Analyse konnte der Einbau des ^{15}N -Isotops ebenfalls durch eine HRMS-Messung bestätigt werden.

Die anschließende Entschützung der Benzylgruppen erfolgte ebenfalls analog zur Literatur mit BCl_3 -Lösung und lieferte das schwere Aza-Cytidin **103** mit einer sehr guten Ausbeute von 90 %.^[6] Um einen SILIS mit einer Massendifferenz von $[\text{M}+2]$ zu erhalten, wurde im Anschluss der bereits diskutierte Redox-Zyklus durchgeführt. In einem ersten Schritt, der Reduktion unter Verwendung von NaBD_4 , konnte das reduzierte, schwere cAzadC **104** mit einer Ausbeute von 49 % erhalten werden. Die nachfolgende Oxidation mit $\text{I}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ zur Doppelbindung lieferte das schwere cAzadC **105** mit einer mäßigen Ausbeute von 30 %. Grund hierfür kann die Aufreinigung via semi-präparativer HPLC sein, da der kleine Ansatz auf mehrere HPLC-Läufe aufgeteilt wurde und somit mehr Substanz verloren gegangen sein kann. Der finale SILIS **105**, wurde ebenfalls via ^{15}N -NMR-Spektroskopie sowie HRMS untersucht. Sowohl das Signal bei $-303,3 \text{ ppm}$ im NMR-Spektrum als auch die exakte Masse des Moleküls waren dabei eindeutig zu erkennen. Die erfolgreiche Inkorporation des Deuterium-Atoms konnte wie bereits zuvor durch ^1H -NMR-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden. Da auch hier bei der Oxidation nicht vollständig das Proton entfernt wurde, liegt das finale Molekül **105** mit einem $[\text{M}+2]/[\text{M}+1]$ -Verhältnis von 87:13 deuteriert vor. Entsprechend ist die Reinheit des $[\text{M}+2]$ -SILIS nur 87 %. Da in dem Gemisch kein $[\text{M}+0]$, also reines cAzadC, vorhanden war, konnte mit dem so erhaltenen SILIS die Quantifizierung der biochemischen Proben dennoch gut durchgeführt werden.

4.3.2 Quantifizierung der DNA-Inkorporation mittels Triple-Quadrupol-MS

Im Zuge dieser Doktorarbeit konnten erfolgreich sieben verschiedene Moleküle hergestellt werden, die direkt zur Quantifizierung des Einbaus der Aza-Basen in die DNA oder indirekt zur Erstellung einer Kalibriergerade zur Konzentrationsberechnung verwendet wurden (**Abbildung 39**). Die verschiedenen Vor- und Nachteile der einzelnen Moleküle und die Durchführung der Quantifizierung selbst, welche von DR. MATTHIAS HEIß übernommen wurde, werden im Nachfolgenden erklärt und diskutiert. Da zu Beginn dieses Projektes noch kein geeigneter SILIS für cAzadC oder Decitabin vorhanden war, wurden zunächst auf Grund sehr ähnlicher Eigenschaften ein *heavy labelled* dC-Derivat zur Referenzierung herangezogen. Obwohl dies grundsätzlich möglich ist, ist es bei weitem nicht ideal, da durch Ionensuppression und Matrixeffekte sehr große Unterschiede zu den zu untersuchenden Molekülen auftreten können. Um dieses Problem zu minimieren, wurden verschiedene SILIS synthetisiert und auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht.

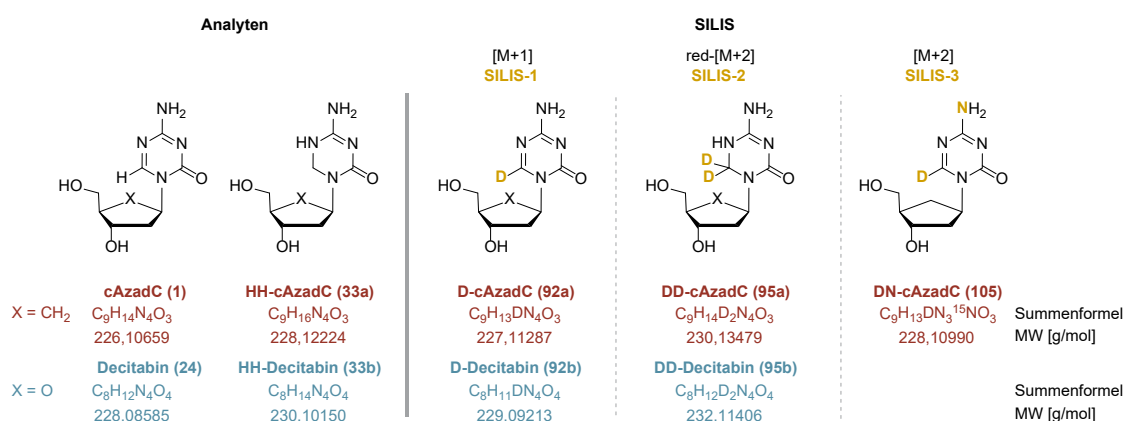


Abbildung 39 Überblick über die verschiedenen Moleküle die direkt oder indirekt für die Quantifizierung des Einbaus der Aza-Basen verschiedener biologischen Proben herangezogen wurden sowie die entsprechenden Analyten cAzadC und Decitabin und ihren reduzierten Derivaten. Angegeben sind sowohl deren Summenformel als auch die von *ChemDraw* berechnete exakte Molekülmasse in g/mol.

Für die Quantifizierung der einzelnen Nukleosid-Analoga ist es jeweils von Nöten eine Kalibriergerade aufzunehmen: Dafür wird eine definierte Menge des SILIS mit steigenden Konzentrationen des Analyten vereint. Wird das Verhältnis von Analyst/SILIS gegen die bekannte SILIS-Konzentration aufgetragen, ergibt sich eine Gerade die die Konzentrationsbestimmung der Probe ermöglicht.^[502] Da der Analyt der biologischen Probe von Decitabin dessen reduziertes Derivat **33b** ist, war es für die Aufnahme der Kalibriergeraden nötig, neben dem SILIS DD-Dec **95b** auch das HH-Dec **33b** herzustellen. Nach Aufnahmen der Kalibriergeraden konnte so direkt die entsprechende Probenkonzentration, der zuvor eine definierte Menge des SILIS zugesetzt wurde, ermittelt werden.

Dank des in Kapitel **4.3.1** beschriebenen Redox-Zyklus konnte erfolgreich der [M+1] cAzadC-Standard **92a** mit einer Reinheit von 95 % synthetisiert werden (**Abbildung 40**). Dieser wurde von DR. MATTHIAS HEIß für einige Tests eingesetzt, wobei sich deutliche Nachteile zeigten, die dessen Einsatz erheblich einschränken. Wie bereits erwähnt, weist der ideale SILIS mindestens eine Massendifferenz von [M+3] oder [M+4] auf.^[503] Dies spielt eine entscheidende Rolle bei der korrekten Auswertung und Quantifizierung der Proben: Ist die Massendifferenz zwischen biologischer Probe und SILIS wie im Fall des ersten synthetisierten SILIS zu niedrig, so überlagert der SILIS und die zu untersuchende Probe.

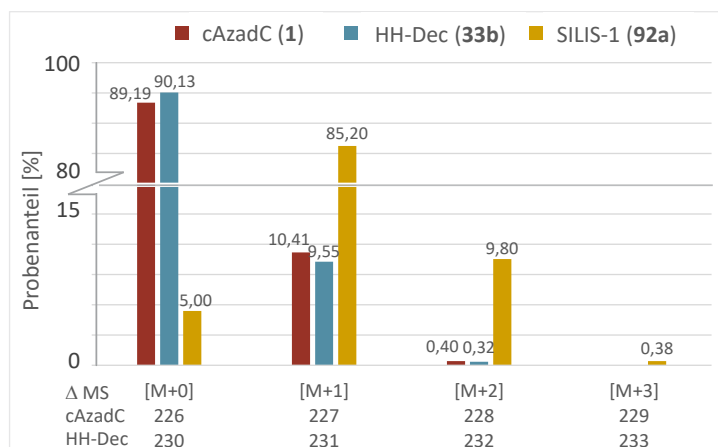


Abbildung 40 Anteilige Verteilung der Massen in biologischer Probe (rot und blau) und dem [M+1]-SILIS-1 (gelb). Die Überlappung der Massen der Analyten und SILIS ist eindeutig zu erkennen, was die Anwendung dieses Standards deutlich einschränkt und keine klare Interpretation der quantitativen Daten zulässt. Während beim Einsatz dieses SILIS cAzadC direkt nachgewiesen werden kann, muss Decitabin auf Grund seiner Instabilität als reduzierte Spezies HH-Dec **332b** analysiert werden.

Unter Berücksichtigung des hohen Anteils natürlicher ^{13}C -Isotope welche sowohl in Analyt als auch SILIS auftreten, kann dieser Überlagerungseffekt keine eindeutige Auswertung der Proben zulassen. Die so durchgeführte Analyse wird verfälscht und die Daten wären nicht repräsentativ. Zusätzlich war der [M+1]-SILIS nur für cAzadC und nicht für Decitabin in hoher Reinheit vorhanden, weshalb auch nur der Carbacyclus mit diesem SILIS untersucht wurde. Der [M+1]-SILIS **92a** wurde auf Grund des hohen Fehlerrisikos entsprechend nicht für die Auswertung der Daten herangezogen. Alternativ wurde ein zweiter SILIS mit einer Massendifferenz von [M+2] einmal für cAzadC und einmal für Decitabin entwickelt. Dafür wurde der in Kapitel **4.3.1** beschriebene Redox-Zyklus mehrfach wiederholt und nach der dritten Reduktion mit zwei doppelt deuterierten und reduzierten Referenzmolekülen **95** beendet. Wie in **Abbildung 41** dargestellt, konnte durch die Massendifferenz von [M+2] ein Überlappen der Proben in den SILIS sehr gut verhindert werden. Eindrücklich ist der nur marginale Überlapp einer biologischen Probe mit den verschiedenen [M+2]-SILIS zu erkennen.

Die Quantifizierung des Einbaus von cAzadC in die DNA konnte mit diesen Isotopenstandards auf eine vergleichsweise kostengünstige Art und Weise bestimmt werden. Ein großer Nachteil dieser Methode ist allerdings die zusätzliche Behandlung aller biologischen Proben vor der Analyse. Da der SILIS die reduzierte Version des cAzadC Moleküls ist, musste nun in der MS nicht cAzadC per se, sondern dessen nicht-aromatisches Derivat analysiert werden. Dies bedeutet, dass alle biologischen Proben ebenfalls einmal den reduktiven Bedingungen ausgesetzt werden müssen, um einen direkten Vergleich mit dem SILIS zu erzielen. Dabei gibt es gleich mehrere Nachteile: Zunächst muss die Reduktion selbst quantitativ ablaufen. Obwohl dies in der chemischen Synthese unter definierten Reaktionsbedingungen der Fall war, kann es möglich sein, dass die Vielzahl an Makromolekülen und Puffer in einer biologischen Probe Einfluss auf den Umsatz haben. Zusätzlich ist das verwendete Reagenz selbst für massenspektrometrische Untersuchungen nicht optimal. Die Verwendung von NaBH_4 hinterlässt Na^+ -Ionen in der biologischen Probe, welche einerseits sehr schwer zu entfernen sind und andererseits die Ionisierung der Proben deutlich verändert. Darüber hinaus besteht bei einer Reduktion immer das Risiko nicht nur wie gewünscht Decitabin zu reduzieren, sondern ebenfalls die in der biologischen Probe enthaltenen kanonischen Nukleoside und damit das Ergebnis grob zu verfälschen.

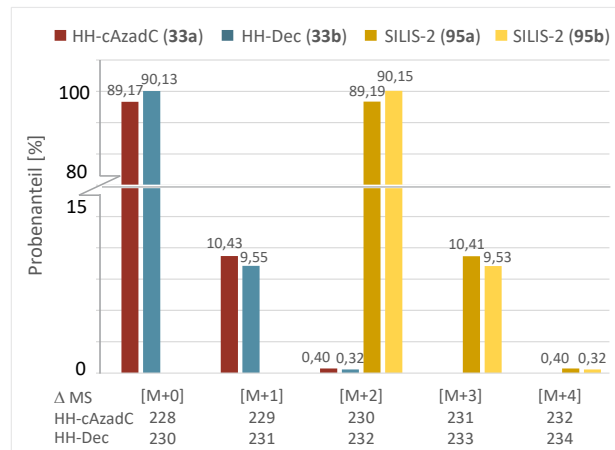


Abbildung 41 Anteilige Verteilung der Massen in biologischer Probe (rot und blau) und den [M+2]-SILIS-2 (gelb). Die Überlappung der Massen der Analyten und der SILIS ist im Vergleich zu SILIS-1 deutlich geringer, was deren Anwendbarkeit deutlich verbessert. Da beide Standards in reduzierter Form vorliegen muss hier auch die biologische Probe reduktiven Bedingungen ausgesetzt werden, was zu Dihydro-Aza-Basen als Analyten führt.

Während die zusätzliche Reduktion bei der Analyse von Decitabin sogar hilfreich ist, da dadurch die sonst instabile Verbindung stabilisiert wird, birgt dieser Schritt bei der Analyse von cAzadC nur einen unnötigen Mehraufwand und großes Fehlerrisiko.^[267] Auf Grund dieses erheblichen Nachteils wurde auch dieser SILIS nicht für die finale Analyse verwendet.

Ein dritter SILIS **106** wurde schließlich im Rahmen der Masterarbeit von HANS HURMIZ synthetisiert. Dieser beinhaltet neben einem ¹⁵N-Atom zusätzlich ein Deuterium-Atom und weist somit ebenfalls eine Massendifferenz von [M+2] zu auf. Auch hier ist die gute Anwendbarkeit auf Grund der geringen Massenüberlappung des Standards mit der biologischen Probe gegeben (**Abbildung 42**).

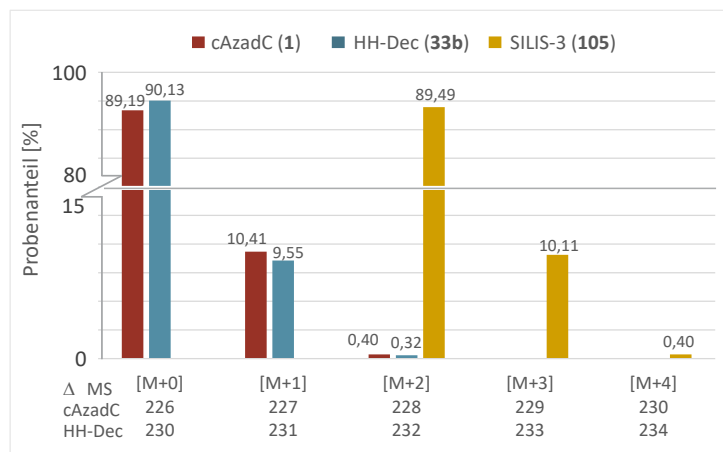


Abbildung 42 Anteilige Verteilung der Massen in biologischer Probe (rot und blau) und dem [M+2] SILIS-3 (gelb). Die Überlappung der Massen der Analyten und des SILIS-3 ist sehr gering was dessen gute Anwendung ermöglicht. Da dieser Standard als schweres cAzadC-Molekül vorliegt müssen die biologischen Proben nicht zusätzlich reduziert werden. Mit diesen beiden hervorragenden Attributen dieses SILIS konnte dieser zur Quantifizierung der Aza-Basen in den biologischen Proben ohne Probleme verwendet werden.

Ohne die Notwendigkeit einer weiteren Behandlung der biologischen Proben konnten diese unter Einsatz dieses SILIS von DR. MATTHIAS HEIß erfolgreich quantifiziert werden. Von den so synthetisierten drei SILIS konnten zwei erfolgreich für die Quantifizierung der biologischen Proben herangezogen werden. Während der doppelt deuterierte, reduzierte Decitabin SILIS, DD-Dec **96b** hervorragend die Analyse des durch Reduktion stabilisierten Decitabins ermöglichte, konnte durch den SILIS **106** cAzadC in seiner natürlichen Form analysiert werden.

Die eingesetzten SILIS konnten sowohl als ihr Nukleosid-Ion als auch Fragment-Ion eindeutig in großer Reinheit nachgewiesen werden. Durch Einstellen verschiedener Parameter wie des Puffersystems, der verwendeten Säule und Temperatur konnte ein Überlappen der SILIS mit anderen in den Proben enthaltenen Nukleosiden sehr gut vermieden werden, weshalb die Quantifizierung der modifizierten Cytidin-Basen mit großer Präzision durchgeführt werden konnte.

4.4 Untersuchung zellulärer Prozesse

Zusammenhänge der intrazellulären Prozesse zu verstehen und die vielen dabei beteiligten Biomoleküle zu identifizieren gestaltet sich im Laboralltag sehr schwierig. Dennoch gibt es Methoden, um herauszufinden, welche Proteine wie miteinander oder mit *small molecules* interagieren.^[504] Viele dieser Assays machen sich dabei die hohe Affinität von Biotin und Avidin/Streptavidin zu Nutze, um die Analyten zu immobilisieren oder einzufangen.^[505-507] Vier Streptavidin-Monomere bilden zusammen einen Protein-Komplex, der wiederum vier Biotin-Moleküle binden kann (**Abbildung 43**).^[508] Die genaue Struktur des Protein-Vitamin-Komplexes wurde bereits von mehreren Gruppen erforscht und aufgeklärt.^[509-510] Die Bindung von Streptavidin und Biotin zählt zu den stärksten nicht-kovalenten biologische Bindungen, mit einer Dissoziationskonstante von $4 \cdot 10^{-14}$ M.^[511] Die Bindung wird sehr schnell gebildet und ist auch in einem großen pH- und Temperaturintervall stabil, was ideale Voraussetzungen für den Einsatz bei verschiedenen Assays sind.^[512] Oft dabei Streptavidin auf einem magnetischen Partikel, einer Mikrotiterplatte oder einem Biosensorchip immobilisiert, während Biotin an das zu untersuchende Molekül gekoppelt ist.^[513] Somit ist nach der Reaktion eine schnelle Trennung des Analyten von der Probe möglich.

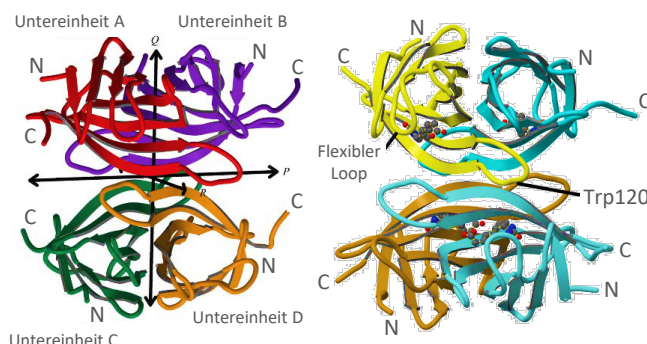
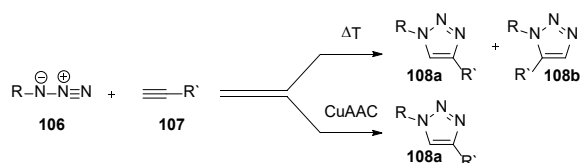


Abbildung 43 Kristallstruktur des Streptavidin-Proteins ohne (links) und mit vier Biotin-Molekülen in dem katalytischen Zentrum (rechts). Abbildung adaptiert von DUNDAS *et al.*^[508]

Eine chemische Methode, die dem Streptavidin-Assays ähnelt, ist der Einsatz der von HUISGEN entdeckten und von SHARPLESS weiterentwickelten Click-Chemie.^[514-515] Bei der Click-Chemie, welche eine 1, 3-dipolare Cycloaddition ist, reagiert ein 1, 3-Dipol, meist ein Azid **106**, mit einem Dipolarophil, einem Alkin **107**, zu einem fünfgliedrigen Heterocyclus **108** unter Aufhebung der Formalladungen (**Schema 22**).^[516] Ähnlich wie bei der Streptavidin/Biotin-Methode ist damit eine quantitative Reaktion ohne Bildung störender Nebenprodukt gefunden, die auch in wässrigem Milieu möglich ist. Dieser Umstand ist ideal, um Biomoleküle einfach mit einem Analyten zu verknüpfen. Der große Durchbruch konnte mit der Entwicklung der Kupfer-katalysierten Click-Reaktion erzielt werden.^[517] Die dadurch gesteigerte Regioselektivität liefert ausschließlich 1, 4-disubstituierte 1, 2, 3-Triazolderivate unter gleichbleibend milden Bedingungen.^[518-519]



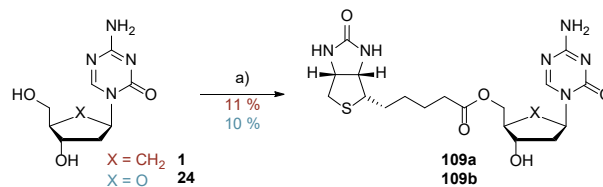
Schema 22 Reaktionsübersicht der 1, 3-dipolaren Cycloaddition der Click-Chemie.

Heutzutage findet Click-Chemie in vielen wissenschaftlichen Bereichen Anwendung. Neben Medizin und Biochemie kann sie auch in Materialwissenschaften oder bei der Wirkstoffsuche eingesetzt werden.^[520-523]

4.4.1 Synthese der Biotin- und Click-Verbindungen

Bei der Aktivierung von cAzadC zum entsprechenden TP im Zellinneren sind viele Stoffwechselprozesse involviert. Deshalb sollte untersucht werden, mit welchen Enzymen cAzadC innerhalb der Zelle wechselwirkt. Um dies zu verfolgen, wurde auf die Biotin/Streptavidin-Technik zurückgegriffen. Voraussetzung für deren Anwendung ist die Kopplung einer Biotin-Einheit an das zu untersuchende Molekül.

Die 5'-Hydroxygruppe ist prädestiniert, um verschiedene Prodrug-Motive, Linker oder andere Reste an Nucleosiden anzubringen. Zusammen mit der in Biotin vorliegenden Säuregruppe bietet es sich an, die zwei Moleküle durch eine Ester-Bindung miteinander zu verbinden. Analog der Ester-Prodrug-Derivate konnte auch hier die Reaktion unter STEGLICH-Bedingungen, sowohl für cAzadC als auch Decitabin, gut durchgeführt werden (**Schema 23**).^[388] Durch Verwenden von nur 1,10 Äq. Biotin konnte gezielt nur die 5'-Hydroxygruppe verestert werden. Da auf eine wässrige Aufarbeitung des Reaktionsgemischs verzichtet wurde, wurden entstandene Nebenprodukte mittels Säulenchromatographie entfernt. Letzte Verunreinigungen der Ester wurden anschließend per semipräparativer HPLC (10 % → 30 % bzw. 15 % → 45 % MeCN in 45 min) abgetrennt.



Schema 23 Reaktionsüberblick über die Veresterung der Aza-Derivate **1** und **24** mit Biotin. *Reagenzien und Bedingungen:* a) Biotin, DMAP, EDC · HCl, abs. DMF, 0 °C, 1h. In rot ist die Ausbeuten der Reaktion des cAzadC-Derivates dargestellt, während blau die des Decitabin-Derivats ist.

Die erhaltenen Verbindungen **109** wurden mittels NMR-Spektroskopie auf ihre Struktur hin untersucht. Obwohl Biotin zu den wasserlöslichen Vitaminen zählt und auch cAzadC bzw. Decitabin selbst sehr gut in Wasser löslich sind, konnten die Verbindungen dafür nicht in D₂O gelöst werden. Auch in deuteriertem MeOH oder MeCN lösten sich die Verbindungen nur sehr schlecht. Als geeignetes Lösungsmittel für die NMR-Analyse fand sich schließlich deuteriertes DMSO. Nach eindeutiger Identifikation der Atomverknüpfungen wurde final noch die Reinheit der Verbindungen mittels analytischer HPLC (10 % → 35 % bzw. 15 % → 45 % MeCN in 45 min) untersucht (**Abbildung 44**). Beide Verbindungen lagen dementsprechend mit großer Reinheit von 100 % und 86 % beim cAzadC- und Decitabin-Derivat vor und konnten so für die biochemischen Untersuchungen verwendet werden.

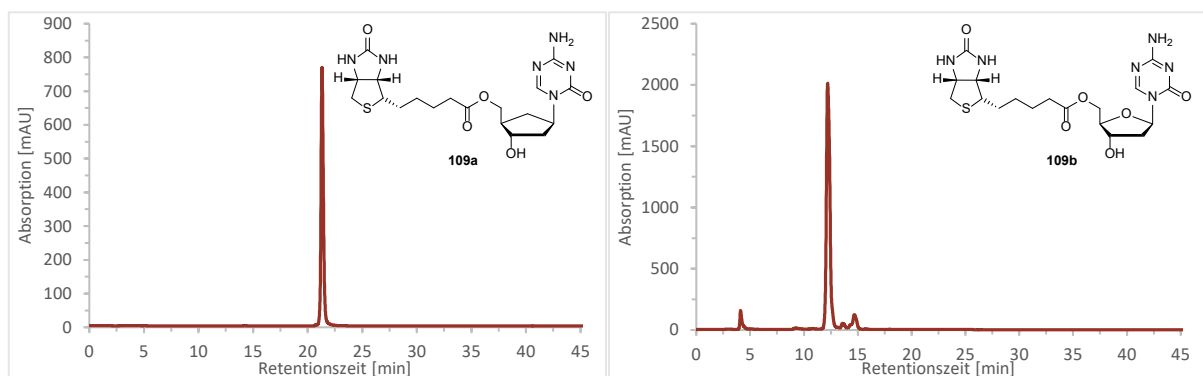
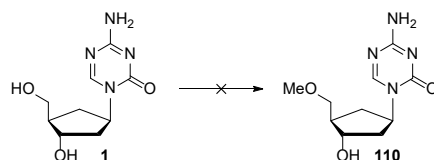


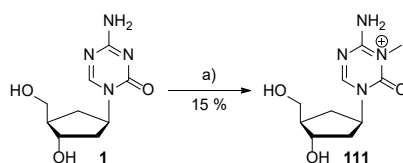
Abbildung 44 UV-Chromatogramme der cAzadC- und Decitabin-Biotin-Ester **109** bei 260 nm, aufgenommen an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von 10 % → 35 % (links) und 15 % → 45 % MeCN in 45 min (rechts). Die Reinheit der Verbindungen betrug 100 % bzw. 86 % für Derivate **109a** und **109b**.

Um weitere Details des Wirkmechanismus zu sammeln sollte ein weiteres Molekül hergestellt werden, welches an der 5'-Hydroxygruppe einen Methylether **110** trägt (**Schema 24**). Der dadurch verhinderte Einbau in die DNA kann so Rückschlüsse auf einen möglichen, von der Inkorporation unabhängigen Wirkeffekt zulassen. Mehrere Reaktionsbedingungen wurden getestet wobei als Methylierungsreagenz MeI^[524] und MeOTf^[525] eingesetzt wurden. Während bei der Reaktion mit MeI auch nach äquimolarem Einsatz des Alkylierungsmittels hauptsächlich di- und trialkyliertes Nebenprodukt erhalten wurden, konnte beim Einsatz von MeOTf hauptsächlich Startmaterial isoliert werden.



Schema 24 Reaktionsüberblick über die Synthese des Methylethers **110**. Das Zielmolekül konnte trotz verschiedener untersuchter Reaktionsbedingungen nicht synthetisiert werden.

Ein weiteres Reagenz Me₂SO₄ wurde als geeignetes Alkylierungsmittel untersucht. Zur Synthese des methylierten cAzadC-Derivats wurde auf die Vorschrift von BERNARDO *et al.* zurückgegriffen, welche schlussendlich nicht den gewünschten Methylether **110**, sondern das kationische Nebenprodukt **111** lieferte (**Schema 25**).^[526] Gemäß der Literatur wurde cAzadC (**1**) in THF suspendiert und obwohl die schlechte Löslichkeit zunächst nicht ideal erschien, konnte die Reaktion sehr gut bei diesen Bedingungen durchgeführt und auf ein Lösungsmittelscreening verzichtet werden.



Schema 25 Reaktionsüberblick über die Synthese des methylierten kationischen Derivats **111**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) Me₂SO₄, NaH, 65 °C, 19 h.

Um ausschließlich monomethyliertes Produkt zu erhalten wurden Me₂SO₄ mit einem leichten Überschuss von 1,20 Äq. eingesetzt. Jegliche Untersuchungen zu Zeitintervallen von 4–8 h zeigten, dass noch sehr viel cAzadC in der Reaktionslösung war. Das nach 19 h Reaktionszeit ermittelte Verhältnis der Reaktionskomponenten lag bei 66 % Produkt und 33 % Edukt. Auf Grund der Doppelmethylierung bei Erhöhen der Äquivalente des Methylierungsreagenzes wurde der Umsatz von 66 % akzeptiert und das überschüssige Startmaterial via Säulenchromatographie entfernt. Nach Reinigung an der semipräparativen HPLC (ddH₂O isokratisch in 45 min) wurde das methylierte cAzadC-Derivat **111** als farbloser Feststoff mit einer Reinheit von 98 % erhalten (**Abbildung 45**).

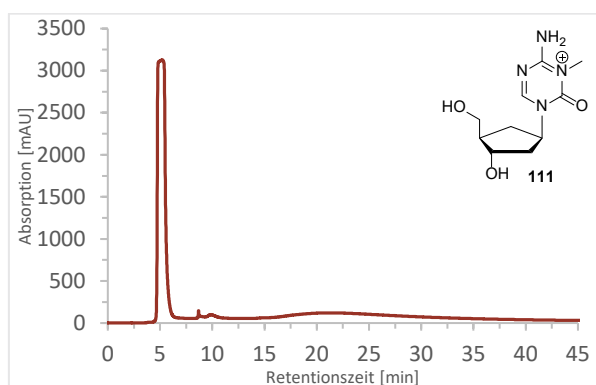


Abbildung 45 UV-Chromatogramm des methylierten Derivates **111**, aufgenommen bei 260 nm an einer analytischen HPLC mit einem Gradienten von ddH₂O isokratisch in 45 min. Die Reinheit der Verbindung betrug 98 %.

Bei der Untersuchung der atomaren Konnektivität via 2D-NMR-Spektroskopie fiel auf, dass sich die Methylgruppe nicht wie gewünscht an der 5'-Hydroxygruppe, sondern an der N3-Position der Aza-Base befand (**Abbildung 46**). Vor allem über die Auswertung des HMBC-Spektrums konnte eindeutig die Position der Methylgruppe bestimmt werden. Tiefere Recherchen zeigten, dass die beobachtete Regioselektivität von Me_2SO_4 vor allem bei der Strukturaufklärung von RNA mit einer als DMS-MaPseq bezeichneten Methode eingesetzt wird,^[527] das dieses Reagenz bevorzugt die DNA-Basen, Cytidin und Adenin, alkyliert.^[528] Obwohl dies nicht das gewünschte Zielmolekül war, wurde dieses dennoch in Zellstudien untersucht, um einen ersten Eindruck des Einflusses des Carbacyclus auf die Zellen zu bekommen.

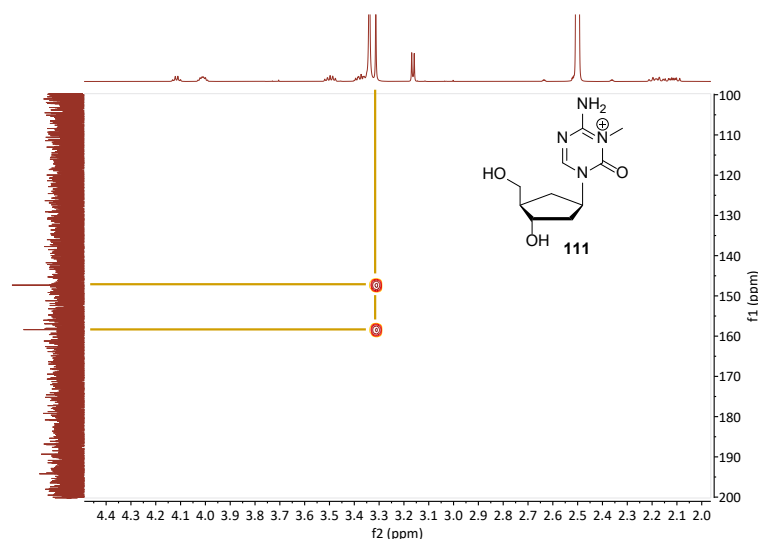
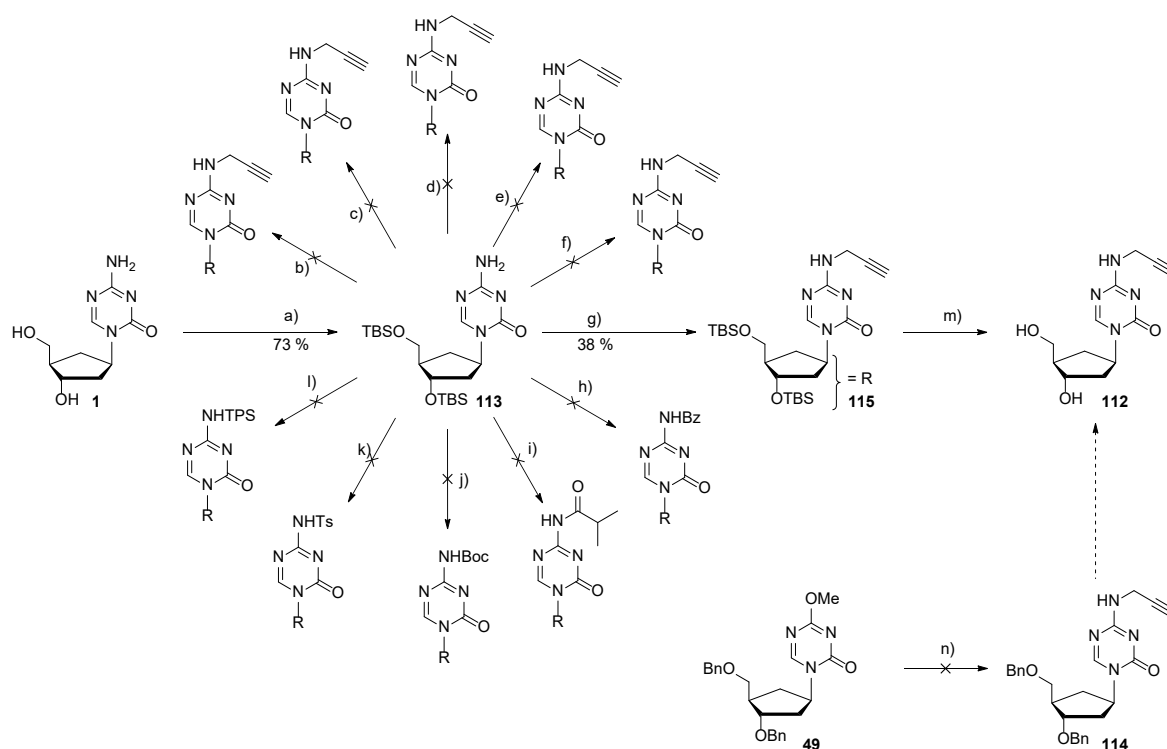


Abbildung 46 Ausschnitt des HMBC 2D-NMR-Spektrums des methylierten Derivates **111**. Deutlich zu erkennen die eingezeichnete 3J -Kopplung zwischen Methylgruppe und C2- und C4- des Triazin-Rings.

Ein weiteres Derivat sollte hergestellt werden, mit dem der Sequenz-Kontext des in die DNA eingebauten cAzadCs sowie mögliche Protein-Interaktionen bestimmt werden können. Durch Anbringen einer Alkin-Einheit können nach Isolierung und Reinigung der gDNA mittels Click-Chemie die cAzadC enthaltenden Fraktionen isoliert und mittels ChIP-Sequenzierung deren Sequenz-Umfeld ermittelt werden. Dies ermöglicht einerseits bestimmte Bereiche zu identifizieren in denen möglicherweise cAzadC präferiert eingebaut wird und andererseits Interaktionen mit Transkriptions-, Reparaturfaktoren oder anderen regulatorischen Proteinen zu ermitteln. Als Position zum Anbringen des Alkins ist nur das exocyclische Amin geeignet, da die Hydroxygruppen für den Einbau in die DNA benötigt werden und die N5-Position der Base für die Interaktion mit DNTM-Enzymen zugänglich sein muss. Zudem ist literaturbekannt, dass eine Propargyl-Einheit am exocyclischen Amin von Cytidin die Basenpaarung innerhalb eines DNA-Stranges, soweit es keine weitere sterische Hinderung durch beispielsweise eine vorhandene C5-Methyl-Gruppe gibt, nicht beeinträchtigt.^[529-530] Das Zielmolekül **112** sollte somit über drei lineare Stufen, Schützen der Hydroxygruppen, Anbringen der Alkin-Einheit und Entfernung der Schutzgruppen, einfach zugänglich sein (**Schema 26**). Der erste Schritt, das Schützen der Hydroxygruppen **113** konnte mit einer guten Ausbeute von 73 % durchgeführt werden. Als Schutzgruppen wurden TBS-Gruppen gewählt, da Silylschutzgruppen häufig in der Nukleosidchemie eingesetzt werden und, obwohl sie eine hohe Stabilität gegenüber einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen aufweisen, einfach mit einer F-Quelle gespalten werden können.^[313, 531] Der nächste Schritt, das Anbringen der Alkin-Einheit war eine große Herausforderung. Es wurden insgesamt 11 verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, von denen nur eine mäßig gute Ergebnisse liefert. Im Folgenden werden die einzelnen Reaktionsbedingungen diskutiert.

Zunächst wurde versucht das Alkin direkt am exocyclischen Amin anzubringen. Für die Substitutionsreaktion wurde Propargylbromid und Et₃N in DMF verwendet (**Schema 26 b**). Da Propargylbromid bekannt dafür ist, auch sehr schwach basische Amine, wie Anilin zu alkylieren, schien dies ein geeignetes Reagenz für diese Reaktion.^[532] Während Et₃N äquivalent eingesetzt wurde, lag das Bromid in leichtem Überschuss vor. Nach 3 h Rühren bei RT konnte mittels MS kein Umsatz beobachtet, sondern nur das Edukt detektiert werden. Da auch nach Rühren über Nacht keine Änderung erkennbar war, wurde dieser Ansatz verworfen.



Schema 26 Überblick über die getesteten Reaktionsbedingungen zur Synthese des Alkin-Derivats **112**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) TBSCl, Imidazol, abs. DMF, RT, 3 h; b) Propargylbromid, Et₃N, abs. DMF, RT, 3 h; c) Propargylbromid, K₂CO₃, abs. THF, 70 °C, ü. N.; d) Propargylalkohol, DIAD, PPh₃, abs. THF, RT, ü. N.; e) Propargylalkohol, DEAD, PPh₃, abs. THF, RT, ü. N.; f) LiOH · H₂O, MS 4 Å, Propargylbromid, abs. DMF, RT → 0 °C, 3 h; g) CsOH · H₂O, MS 3 Å, Propargylbromid, abs. DMF, RT, 3 d; h) BzCl, abs. Pyridin, RT, ü. N.; i) Isobuttersäureanhydrid, H₂O/Dioxan, RT, 3 d; j) 1. Boc₂O, DMAP, abs. THF, 70 °C, 2 h; 2. K₂CO₃, MeOH, 70 °C, 2 h; k) TsCl, DMAP, Et₃N, abs. DCM, RT, ü. N.; l) TPSCl, DMAP, Et₃N, abs. DCM, RT, ü. N.; m) TBAF, abs. THF, RT, 4 h; n) Propargylamin, abs. MeOH, RT, ü. N.

Eine Alternative fand sich in der Literatur von MOLANDER *et al.*^[533] Hier wird eine Allylgruppe an einem sekundären Amin unter Einsatz von Allylbromid und K₂CO₃ eingeführt. Unter diesen Bedingungen, mit Verwendung von Propargylbromid, konnten Spuren des gewünschten Produktes nachgewiesen werden (**Schema 26 c**). Leider konnte nach der wässrigen Aufarbeitung kein Produkt mittels MS detektiert werden, weshalb die Reaktion wiederholt und statt der Aufarbeitung nur das Lösungsmittel entfernt und eine Säulenchromatographie angeschlossen wurde. Auch hier gelang die Isolation des Produktes nicht. Ein alternativer Syntheseweg zeigte sich bei FLETCHER *et al.* welcher das exocyclische Amin von Adenin und Adenosin mittels MITSUNOBU-Reaktion alkylierte.^[534] Auch diese Reaktion wurde für die Alkylierung des cAzadC-Amins getestet. Die Reaktion wurde in zwei Varianten, einmal wurde DEAD und einmal das thermisch stabilere DIAD als Azodicarbonsäureester, verwendet (**Schema 26 d, e**). Die Reaktion wurde gemäß der Literatur^[534] durchgeführt und obwohl die beobachtete Bildung von Ph₃PO auf eine erfolgreiche Reaktion hinwies, konnte in beiden Ansätzen kein Produkt detektiert werden. Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich der pK_A-Wert des exocyclischen Amins, denn obwohl unter dem Namen FUKUYAMA-MITSUNOBU diese Reaktion auch mit einem Amin als Nukleophil durchführbar ist, darf der pK_A-Wert des Amins 14 nicht überschreiten.^[535-536] Ist der pK_A-Wert > 14 oder

das Amin auf Grund sterischer oder elektronischer Faktoren nicht nukleophil genug, kann es zur Bildung von Nebenprodukten kommen.^[537] Der pK_A -Wert des exocyclischen Amins von Cytidin beträgt 16,7, der von Decitabin 13,9, was dem des carbacyclischen-Derivates annähernd gleich kommt.^[538-539] Da dies keine Voraussetzungen für ein erfolgreiches Durchführen der FUKUYAMA-MITSUNOBU Reaktion sind, wurde auch dieser Reaktionsansatz verworfen.

Ein weiterer Ansatz, der explizit die Monoalkylierung von Aminen untersuchte, fand sich bei CHO *et al.*^[540] Dieser untersuchte die Alkylierung von Aminosäuren und Peptiden unter Einsatz von Alkalimetall-Basen, aktiviertem Molekularsieb und einem Bromid. Analoge Bedingungen wurden auch auf die Alkylierung von geschütztem cAzadC angewendet und lieferten bereits nach 1 h nicht das erwartete monoalkylierte, sondern fast ausschließlich das doppeltalkylierte Produkt (**Schema 26 f**). Nach 2 h konnte kein Startmaterial mehr detektiert werden und das Verhältnis von mono- und dialkyliertem Produkt lag bei 7:93. Auch die Änderung der Reaktionstemperatur in Kombination mit der Reduktion der Äquivalente von Propargylbromid lieferte ausschließlich das doppelt-alkylierte Produkt. Ein möglicher Grund ist die Aktivierung des Amins nach der ersten Alkylierung. Während das exocyclische Amin am elektronenarmen Triazin-Ring grundsätzlich ein schlechtes Nukleophil ist, kann durch das Anbringen von Alkylresten und deren +I-Effekt die Nukleophilie des Amins soweit erhöht werden, dass die zweite Alkylierungsreaktion sehr viel schneller abläuft. Obwohl dies nicht das gewünschte Ergebnis lieferte, zeigte diese Reaktion deutlich, dass Alkalibasen durch Koordination an das Amin dessen Protonen azide genug machen, um schließlich mit Propargylbromid zu reagieren.^[541]

Um die Reaktivität des Amins weiter zu untersuchen, wurden Tests mit verschiedenen Säurederivaten durchgeführt. Obwohl die theoretisch entstehende Amid-Funktionalität nicht im Endprodukt gewünscht ist, da dies die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA deutlich stören würde, so sollte doch die Reaktionsfähigkeit dieser Substrate untersucht werden. Da Säurechloride auf Grund des -I-Effekts des Chloratoms die gegenüber Nukleophilen reaktivste Gruppe der Säurederivate darstellen, wurde ein erster Test unter Verwendung von BzCl durchgeführt (**Schema 26 h**).^[542] Einer Vorschrift von GAFFNEY *et al.*^[543] folgend wurde BzCl zu in abs. Pyridin gelöstem, TBS-geschütztem cAzadC gegeben und für 2 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit konnte weder Edukt noch Produkt per MS detektiert werden. Auch Wiederholen des Experiments lieferte nicht den gewünschten Umsatz. Da Säurechloride die reaktivsten Derivate sind, war die Erwartung gering, eine verbesserte Reaktivität beim Einsatz eines Anhydrids zu erkennen. Dennoch wurde auch mit diesem Säurederivat eine Testreaktion durchgeführt (**Schema 26 i**). Die Reaktion nach einer Vorschrift von KALAYANOV *et al.*^[544] lieferte wie erwartet ebenfalls keinen Umsatz.

Da weder die direkte Kopplung des Alkinbromids noch der Einsatz unterschiedlicher Säurederivate vielversprechende Ergebnisse lieferte, wurden Reagenzien zur Aktivierung des exocyclischen Amins in Betracht gezogen. Eine Gruppe die dabei von zentraler Bedeutung ist, ist die Boc-Schutzgruppe, die einerseits als Schutzgruppe fungiert, um Doppelalkylierung zu vermeiden, andererseits auch als schwaches EWG die Azidität des Amins soweit erhöht, dass dieses vor allem bei einer MITSUNOBU-Reaktion als ein besseres Nukleophil eingesetzt werden kann.^[545] Die Synthese des Boc-geschützten Amins erfolgte zunächst mit einer Vorschrift von DARNBROUGH *et al.*^[546] (**Schema 26 j**). Bei dieser Methode wird zunächst mit einem Überschuss von Boc₂O und DMAP das doppelt geschützte Amin erhalten, welches nach wässriger Aufarbeitung direkt mit K₂CO₃ versetzt wird, um so selektiv eine Schutzgruppe wieder zu entfernen. Der erste Schritt, die doppelte Boc-Schätzung, konnte gemäß der Literatur,^[546-547] mit etwas verlängerten Reaktionszeiten von 19 statt 12 h gut durchgeführt werden. Die anschließende Entschätzung lieferte jedoch nicht wie erwartet das mono-Boc-geschützte Produkt, sondern wieder das Edukt, da beide Boc-Gruppen entfernt wurden. Leichte Änderungen der Entschätzungsreaktion gemäß FLETCHER *et al.* konnten das mono-Boc-geschützte Derivat in sehr geringer Ausbeute liefern; Hauptprodukt blieb bei dieser Reaktion jedoch immer das komplett

entschützte Edukt.^[534] Möglicherweise hätte eine Reduktion der Reaktionstemperatur die komplette Entschützung verhindern können, dies wurde jedoch nicht getestet. Reaktionen mit stöchiometrischem Einsatz von Boc_2O und niedrigerer Reaktionskonzentration lieferten ebenfalls nicht das gewünschte mono-geschützte Amin, weshalb auch dieser Ansatz schließlich verworfen wurde. Ebenfalls in der Literatur zu finden ist die Aktivierung des exocyclischenamins mit Derivaten der *p*-Toluolsulphonsäure.^[548] Zunächst wurde hier die Einführung einer Tosylgruppe unter literaturbekannten Bedingungen getestet (**Schema 26 k**). Die in der Literatur^[549] dreistufige *one-pot* Synthese wurde hier auch ausgehend vom freien cAzadC (**1**) getestet. Zunächst wurden die Hydroxygruppen als TMS-Silylether geschützt, nach 2 h wurde TsCl zugegeben um das exocyclische Amin zu aktivieren und schließlich, nachdem dies über Nacht rührte, wurden final die TMS-Gruppen mit NH_3 in MeOH entfernt. MS-Analyse der einzelnen Schritte zeigte eine gute Konversion in das TMS-geschützte Derivat, während nur eine geringe Konversion zum tosyl-geschützten Derivat zu erkennen war. Nach der anschließenden Entschützung waren nur Spuren des Produktes zu erkennen, während viel eines sehr polaren unidentifizierten Nebenproduktes erhalten wurde. Die Reaktion wurde statt einer *one-pot*-Synthese aufgetrennt und die einzelnen Schritte erneut ausgehend vom TBS-geschützten cAzadC getestet. Während die Umsetzung mit TsCl erneut nur Spuren des Produktes zeigte, war nach einer Abspaltung der Silylschutzgruppen mit TBAF kein Produkt in dem Reaktionsgemisch per MS nachzuweisen. Ein letzter und sehr ähnlicher Ansatz zur Aktivierung desamins fand sich bei DOMINGO *et al.*,^[529] welcher statt einer Tosylgruppe eine 2, 4, 6-Triisopropylbenzolsulfonyl-Gruppe (TBS) verwendet hat (**Schema 26 l**). Die Reaktion des geschützten cAzadCs mit TBSCl gemäß der Literatur zeigte jedoch nach 20 h keinen Umsatz und selbst nachträgliche Zugabe von TBSCl ergab keine Änderung. Zu erwähnen ist hier, dass DOMINGO *et al.*^[529] um alkyliertes Cytidin zu erhalten, von Uridin ausgehend einen Sulphonylester anbringt und diesen mit Propargylamin umsetzt. Dieser Ansatz wurde hier auf Grund der zusätzlichen Reaktionschritte nicht getestet und wäre möglicherweise eine weitere zu testende Herangehensweise.

Da bei allen getesteten Reaktionsbedingungen entweder gar kein oder nur geringe Spuren der jeweiligen Produkte zu erkennen waren, wurde nach weiteren Alternativen gesucht. Ein Blick in die ursprüngliche cAzadC-Synthese zeigt eine weitere Möglichkeit auf (**Schema 26 n**). Ausgehend von dem Methylether **49** wird mit NH_3 in MeOH eine Aminolyse durchgeführt, um das exocyclische Amin des Cytidin-Derivats zu erhalten.^[6] Dieser Ansatz, welcher gemäß der Vorschrift von PISKALA *et al.* mit Propargylamin durchgeführt wurde, lieferte auch beim Einsatz eines großen Überschusses desamins nicht das gewünschte Produkt **114**.^[257] Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass das exocyclische Amin durch den Triazin-Ring so stark in seiner Reaktivität geschwächt wird, dass keine Reaktion möglich ist.

Der bis dahin erfolgversprechendste Ansatz, war der Einsatz von aktiviertem Molsieb und einer Alkalibase, welcher deshalb nochmals genauer betrachtet werden soll (**Schema 26 f**). Die bei CHO *et al.*^[540] berichteten Ergebnisse bauen auf der Arbeit von SALVATORE *et al.*^[541] auf, der ebenfalls die Monoalkylierung von Aminen unter Zusatz von CsOH untersuchte. Seinen Ergebnissen zufolge konnte die Addition von $\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ zur Reaktion nicht nur die Überalkylierung verhindern, sondern beschleunigte auch noch die Monoalkylierung drastisch. Wichtig war dabei die Aktivierung des Molsiebes zum Entfernen von Wasser aus dem Reaktionsgemisch, ohne die Selektivität sowie die Ausbeuten deutlich sanken. Dieser sogenannte Cäsium-Ionen-Effekt, anwendbar auf eine Reihe unterschiedlicher Reaktionen, wurde bereits ausführlich in der Literatur^[550] beschrieben und wurde auch bei der Alkylierung von cAzadC ausgenutzt (**Schema 26 g**). Durch die Koordination von Cäsium an das Amin wird das Proton so azid, dass das Amin ein gutes Nukleophil wird und mit Propargylbromid leicht reagieren kann, während der sterische Anspruch des Alkin-Restes unter gleichzeitiger Koordination des Cäsiumions so groß ist, dass eine doppelte Alkylierung verhindert wird (**Abbildung 47**). Die Reaktion konnte gemäß der Literatur durchgeführt werden, wobei die Reaktionszeit deutlich verlängert werden musste.^[541] Während bei SALVATORE *et al.* schon nach 20 h die Reaktion beendet

werden konnte, war hier nach 72 h 44 % Edukt **113**, 52 % Produkt **115** und 4 % doppelt alkyliertes Nebenprodukt vorhanden. Noch längere Reaktionszeiten von bis zu 5 d zeigten keine große Veränderung, außer dass der Anteil an doppeltalkyliertem Nebenprodukt auf 8 % anstieg. Der komplette Umsatz des Eduktes konnte in keinem Experiment, auch nicht bei Änderung der Äquivalente der Reagenzien, beobachtet werden. Dennoch lag die Ausbeute der Reaktion nach wässriger Aufarbeitung und Reinigung via Säulenchromatographie bei 22 %, bezogen auf den Umsatz von 56 % sogar bei 38 %. Dass mit CsOH im Gegensatz zu LiOH die Doppelalkylierung kaum stattfand, kann durch den unterschiedlichen Atomradius dieser Ionen erklärt werden. Während Lithium als kleines Ion mit einem Radius von 152 pm genug Raum für eine zweite Alkylierung lässt, ist das Cäsium-Ion mit 267 pm eines der größten und damit sterisch anspruchsvollsten Ionen.^[551] Der mit dem Ionenradius einhergehende Unterschied der Bindungsstärke sowie das geeignete Lösungsmittel spielen zusätzlich eine wichtige Rolle beim Cäsium-Ionen-Effekt.^[550] Da das Lithiumion zu klein ist, um Doppelalkylierung zu vermeiden und das Cäsiumion dafür zwar groß genug ist, aber möglicherweise zu groß ist, um vollständigen Reaktionsumsatz zu erhalten, wäre die Untersuchung anderer Alkali- oder Erdalkalibasen nötig, um die Reaktionsbedingungen für dieses System weiter zu optimieren.

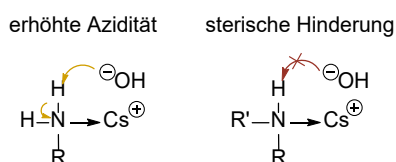


Abbildung 47 Koordination des Cäsiumions an ein primäres und sekundäres Amin. Die Koordination ermöglicht durch Erhöhen der Azidität die Monoalkylierung von primären Aminen (links) während auf Grund des großen Ionenradius und dem dadurch sterisch abgeschirmten Proton eine Doppelalkylierung ausgeschlossen wird. Abbildung adaptiert von SALVATORE *et al.*^[541]

Die Schutzgruppen des durch die Reaktion mit CsOH und Propargylbromid erhaltenen Produktes wurden im Anschluss mit TBAF entfernt und das entschützte Alkin Derivat per semipräparativer HPLC gereinigt (**Schema 26 m**).^[552] Produktenthaltende Fraktionen wurden vereinigt, wobei nach anschließender NMR-Analyse immer noch Verunreinigungen zu erkennen waren. Auch war hier die Ausbeute wieder sehr gering und die Änderung des Fluorid-Donors von TBAF zu HF · Pyridin konnte beide Punkte nicht verbessern.^[553] Zusätzlich waren die sehr geringen Mengen, mit denen die Reaktion durchgeführt wurde, eine Herausforderung. Die im niedrigen Milligrammbereich von 5–10 mg erhaltenen Mengen des geschützten Alkins **115** würden selbst bei quantitativer Abspaltung der Schutzgruppen nur maximal 4 mg Endprodukt liefern. Auf Grund der geringen Mengen konnte auch keine Analytik der Verbindung aufgenommen werden. Einzig die Analyse mittels niedrig aufgelöster Massenspektroskopie deutete auf die erfolgreiche Synthese der Zielverbindung **112** hin.

Die Synthese des Alkinderivates **112** konnte so trotz vieler Versuche nicht in ausreichender Ausbeute erreicht werden. Viele der direkten Kopplungsbedingungen zeigten keinen Umsatz des Startmaterials, während auch der Einsatz verschiedener Carbonsäurederivate keine Verbesserung lieferte. Die Aktivierung des Amins mit verschiedenen Gruppen konnte zwar das entsprechende Produkt in Spuren per MS nachweisen, war jedoch für die Synthese des Alkinderivates nicht ausreichend. Einzig durch den Zusatz von Alkalibasen wie LiOH und CsOH konnte die Reaktivität des exocyclischen Amins ausreichend erhöht werden. Die Wahl der richtigen Base spielte dabei eine große Rolle sowohl für den Umsatz als auch die Entstehung doppelt alkylierter Nebenprodukte. Ein Screening weiterer anorganischer Basen kann möglicherweise die Addition des Alkins weiter verbessern. Mit ausreichend Produkt kann auch die finale Abspaltung der TMS-Gruppen sowie die anschließende Reinigung via HPLC optimiert werden. Weitere Studien sind entsprechend nötig um das gewünschte Alkin Derivat **112** in ausreichender Reinheit und Menge zu synthetisieren.

4.4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus durch *Protein Fishing*

Nachdem die verschiedenen Biotin- und Methyl-Derivate erfolgreich und mit einer ausreichenden Reinheit synthetisiert wurden, wurden diese in biochemischen Experimenten auf ihre Wirkung hin untersucht. Die im Rahmen ihrer Dissertation von ELSA PEEV durchgeführten Experimente werden hier ebenfalls erwähnt und die Auswertung der Daten diskutiert.

Zunächst wurden die Biotin-Derivate verwendet, um im Zelllysat Proteine zu identifizieren, welche mit cAzadC und Decitabin wechselwirken. Dafür wurden die Zellen aufgeschlossen und schließlich das Lysat zu den Biotin-Derivaten gegeben. Mit einer an einem Partikel befestigten Streptavidin-Einheit könnte anschließend das Biotin-Derivat und seine putativen Bindungspartner isoliert werden. Diese Experimente lieferten jedoch nicht die gewünschte Information. Der große Nachteil des Biotin-Streptavidin Assays ist, dass neben dem Zielmolekül auch alle anderen natürlich biotinylierten Proteinen oder Moleküle an den Partikel binden.^[554] Um dieses große Hintergrundrauschen zu verhindern, werden üblicherweise spezielle Linker eingesetzt, die unter definierten Bedingungen gespalten werden können und so selektiv das Zielmolekül freisetzen.^[555-557] In diesem Versuch wurde gar kein Linker eingesetzt, sondern die Biotin-Einheit direkt mittels Esterbindung an das Cytidin-Derivat gekoppelt, welches auf mehrere Arten zu Problemen führen kann: Einerseits ist dadurch der Hintergrund durch weitere Biotin enthaltende Moleküle sehr hoch und andererseits kann durch den geringen Abstand bei einem Zielprotein die Biotin-Einheit möglicherweise nicht weit genug aus der Bindungstasche herausragen.^[558] Auch ist die gewählte Esterbindung möglicherweise nicht ideal, da durch die im Lysat enthaltenen Esterasen diese schnell und unter Umständen zu früh gespalten werden kann.

Es gibt zwei Möglichkeiten diese Probleme zu umgehen: Erstens die synthetische Addition eines gut designten Linkers zwischen cAzadC und der Biotin-Einheit, um so die Bindungen mit den Zielproteinen zu verbessern; zweitens eine Weiterentwicklung des zuvor verwendeten Affinitäts-basierten Ansatzes (ABA) zu *compound-centric chemical proteomics* (CCCP)^[559] (**Abbildung 48**). Diese beiden Ansätze unterscheiden sich wesentlich: Während bei ABA das aktive Molekül mit einem *tag*, häufig Biotin, verknüpft ist, welcher nach erfolgreicher Bindung des Zielproteins an das aktive Molekül durch ein Streptavidin-Bead isoliert werden kann, wird beim CCCP-Ansatz das aktive Molekül direkt auf einer Matrix immobilisiert.

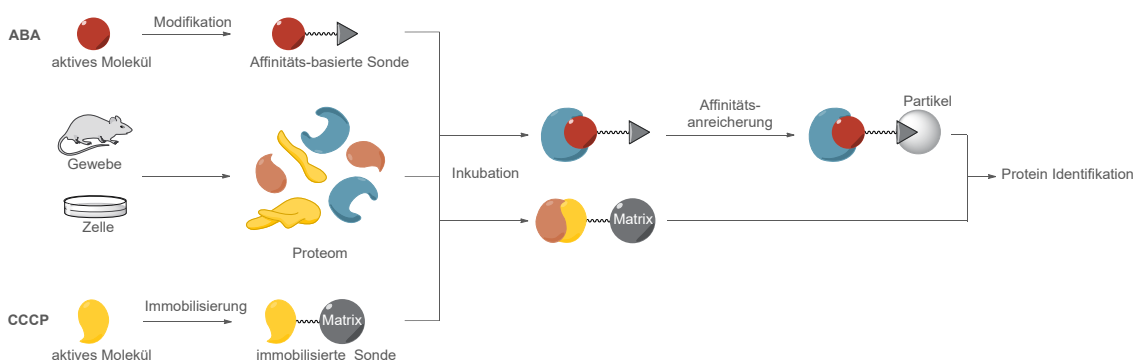


Abbildung 48 Schematischer Überblick über die verschiedenen Ansätze zur Identifikation des mit einem aktiven Molekül wechselwirkenden Proteins. Oben: ABA, bei dem das aktive Molekül mit einem *tag* versehen wird, welcher selektiv an das Bead knüpft; Unten: CCCP, bei dem das aktive Molekül direkt immobilisiert wird und anschließend an das Zielprotein bindet. Abbildung adaptiert von CHEN *et al.*^[560]

Obwohl beide Methoden ihre Vor- und Nachteile haben, so ist insgesamt der Wechsel zum CCCP-Ansatz vorzuziehen. Der große Vorteil des CCCP-Ansatzes im Vergleich zu ABA ist, dass keine Reporter-Gruppe wie Biotin verwendet werden muss, welche möglicherweise die Eigenschaften des zu untersuchenden aktiven Moleküls etwas verändert.^[560] Zusätzlich können damit das ganze Genom und

dessen natürliche Punkt-, Deletions- oder Fusionsmodifikationen sowie weitere mögliche endogene Bindungspartner entdeckt werden.^[559]

Neben den Biotin-Derivaten **109** wurde auch das Methylderivat **111** von ELSA PEEV in Zellstudien untersucht. Dabei wurde wie erwartet keinerlei Effekt des Moleküls auf die Änderung des 5-mdC-Gehalts festgestellt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die behandelten Zellen keine negativen Anzeichen zeigten. Das lässt den Rückschluss zu, dass der verwendete Cyclopentanring im Vergleich zum Ribosering keine Toxizität besitzt. Wäre dies nicht der Fall hätte cAzadC möglicherweise neben seinen DNMT1 inhibierenden Eigenschaften auch durch seinen Carbacyclus einen großen Einfluss auf die Zellproliferation.

Die Untersuchung der genauen Einbauposition bzw. die Untersuchung welche Gene von cAzadC genau betroffen sind, konnte auf Grund der aufwändigen Synthese im begrenzten Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Weitere Arbeiten und Optimierungen an der Syntheseroute sind notwendig, um das Zielmolekül in ausreichender Reinheit und Menge herzustellen. Auf dieser Basis werden Sequenzierungsstudien interessante Ergebnisse der epigenetischen Effekte des Cytidin-Derivates liefern können.

4.5 Chemischer Einbau von cAzadC in einen DNA-Strang

Bei der Betrachtung des Wirkmechanismus von cAzadC fallen einige Unterschiede zu dem von Decitabin ins Auge.^[275] Explizit ist das Auftreten von DNA-Schäden ein Bereich, bei dem große Differenzen zu erkennen sind. Während bei Decitabin DNA-Einzelstrangbrüche überwiegen, können beim Einsatz von cAzadC deutlich mehr Doppelstrangbrüche erkannt werden. Auch kann das BER-System cAzadC als abnormale Base nicht entfernen, was wiederum zu Änderungen im zellulären Ablauf führt. Um diese Differenzen genauer zu erforschen, sollte ein synthetischer DNA-Strang hergestellt werden, bei dem ein oder mehrere cAzadC-Moleküle eingebaut sind. So kann ein genauer Blick auf den DNA-Reparaturmechanismus und den Abbau von entstehenden DNA-Protein-Crosslinks geworfen werden. Zusätzlich können jegliche Proteininteraktionen genauer ermittelt werden um so einen detaillierten Einblick in die enzymatischen Transformationen des Wirkstoffs zu erhalten. Auch die angewendete Analyseverfahren zur Bestimmung des 5-mdC-Gehalts kann mit Hilfe eines definierten synthetischen DNA-Strangs validiert werden. Um den 5-mdC-Gehalt der isolierten gDNA zu bestimmen wird diese enzymatisch verdaut und so in ihre einzelnen Nucleoside aufgespalten. Kommt es hier auf Grund des stark modifizierten cAzadCs zur einer fehlerhaften Abspaltung muss dieser potentielle Fehler frühzeitig erkannt und umgehend behoben werden um so zuverlässige Daten zu generieren.

Das synthetische Oligonucleotid (ON) spielt in der heutigen Pharmazie- und Medizinbranche eine bedeutende Rolle. Dank ihm ist es möglich bis dahin unerreichbare molekulare Ziele im Körper gezielt zu adressieren. Betrachtet man beispielweise das menschliche Genom, so wird geschätzt, dass 15 % der codierten Proteine für verschiedene Krankheiten ausschlaggebend sind.^[561] Nur 2 % dieser Proteine können bis dato von einem *small-molecule*-Therapeutikum erreicht und in ihrer Funktion beeinflusst werden. Der Einsatz synthetischer ONe kann diese immense Differenz überbrücken und liefert neue therapeutische Ansätze. Zusätzlich dazu ist die Selektivität von ONen viel höher und der *off-target*-Effekt entsprechend kleiner. Die primären Strategien um therapeutisch selektiv auf DNA-, RNA- oder Proteinebene einzugreifen sind der Einsatz von antisense Oligonucleotiden, siRNAs, Aptameren oder DNAzymen.^[562] Das wohl aktuellste Beispiel, bei dem synthetische ON im großen Maßstab eingesetzt wurden, ist die Impfung gegen den weltweit verbreiteten Corona-Virus in den Jahren 2020–2023.^[563]

Die Geschichte der ON-Synthese begann im Jahr 1955 mit der Herstellung eines Thymidin-Dinucleotids mit 3'-5'-Verknüpfung.^[564] Dieser Grundstein ebnete den Weg für die chemische Synthese von ONen. Bereits 10 Jahre später, 1965, wurde das erste ON via Festphasensynthese hergestellt.^[565] Von da an dauerte es nochmals 15 Jahre bis das darin steckende Potential erkannt wurde. Die Entwicklung von *multichannel*-Synthesizern steigerte die Ausbeute von ONen drastisch.^[566-567] Auch die Einführung unterschiedlicher Modifikationen in das ON und damit die Verbesserung von deren Eigenschaften war mit der Festphasensynthese leicht möglich (**Abbildung 49**).^[568] Grundsätzlich gibt es dabei 3 Positionen: Das Rückgrat, aufgeteilt in Zucker und Phosphat, sowie die Base selbst. Durch Anbringen spezieller Modifikationen können die Eigenschaften der ONe gesteuert werden. So kann beispielsweise durch Einführen eines Thiophosphats der Abbau durch Endo- und Exonucleasen vermieden oder durch *locked-nucleic-acids* (LNAs) und der damit einhergehenden Stabilisierung des Zucker-*puckers* die Bindungsaffinität zu komplementären Strängen deutlich erhöht werden.^[569] Durch den Einbau modifizierter Basen kann außerdem die Basenpaarung und die Erkennung durch verschiedene Enzyme verändert werden.^[570] Neben dem Einführen von Modifikationen selbst, kann auch die Verknüpfung 3'-5' bzw. 2'-5' variiert werden.^[569]

Über die vielen Jahre, die es brauchte, bis die Festphasensynthese von ONen voll etabliert war, wurden viele verschiedene chemische Ansätze zur Verknüpfung zweier Nucleotide erarbeitet.^[571] Die drei wichtigsten Klassen sind: 1. Phosphortriester-/Phosphordiester-Chemie 2. (modifizierte) *H*-Phosphonat-Chemie und 3. Phosphitriester-/Phosphoramidit-Chemie. Die heutzutage gängigste

Methode bei der Herstellung von ON ist die Phosphoramidit (PA)-Chemie. Dabei wird die größere Reaktivität von P(III) in Vergleich zur P(V)-Spezies ausgenutzt.^[572] Dieser Ansatz erfordert zunächst die Synthese eines hoch reaktiven PAs, welches anschließend mit einem zweiten Nucleosid gekoppelt und zur P(V)-Spezies oxidiert werden kann.^[573]

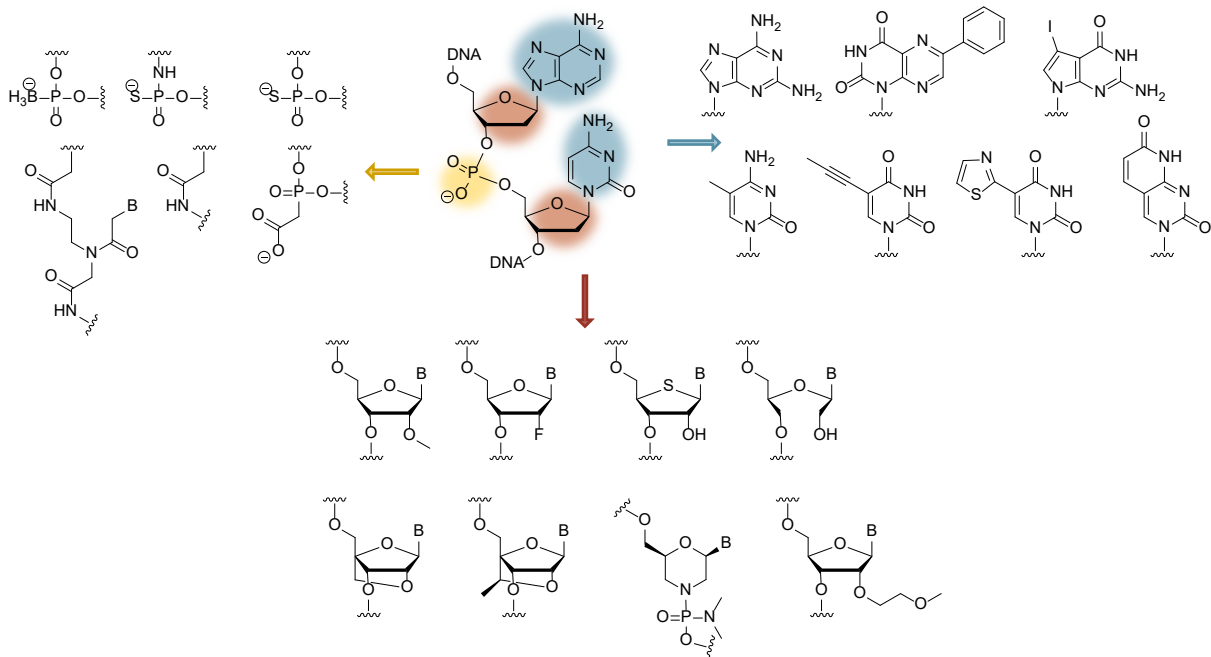
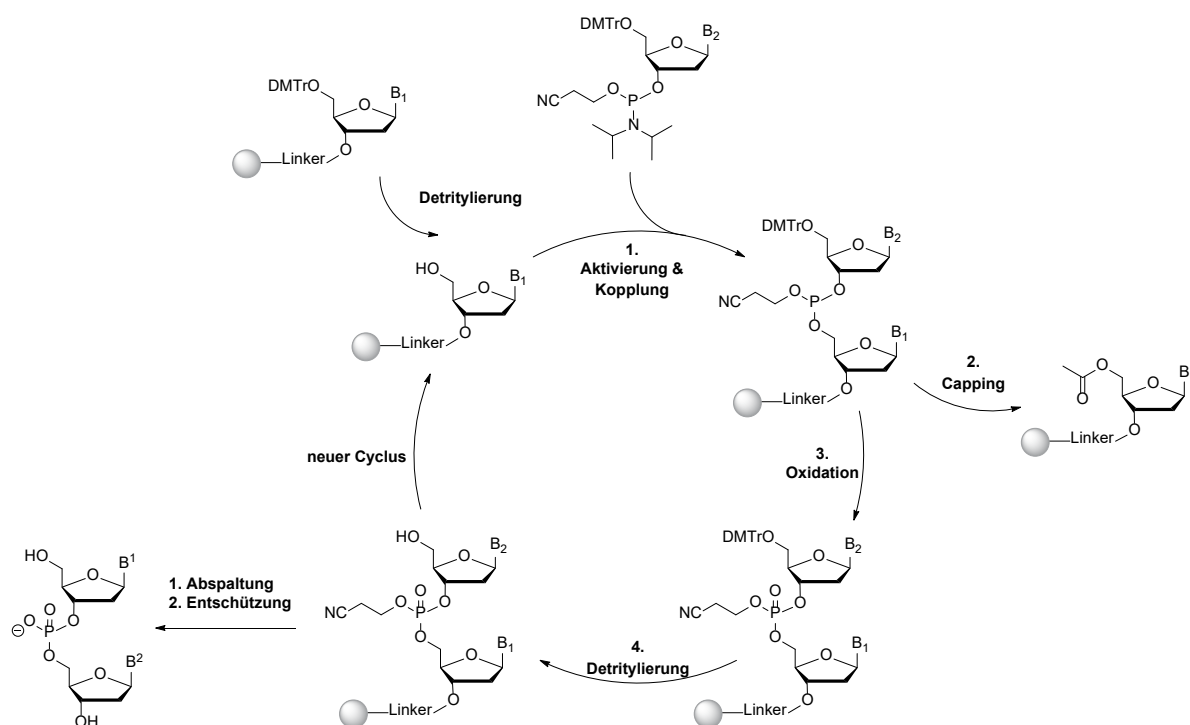


Abbildung 49 Auswahl möglicher Modifikationen der Zucker- und Phosphat-Einheit sowie den DNA-Basen bei synthetischen Oligonucleotiden.^[568-569, 574]

Der Reaktionszyklus des PA-Ansatzes, welcher im Inneren eines DNA-Synthesizers abläuft, wird im Folgenden detaillierter betrachtet (**Schema 27**). Im ersten Schritt des Zyklus steht die Entschützung des mit der Festphase verbundenen Nucleosids.^[575-577] Dieses besitzt einerseits um Nebenreaktionen zu vermeiden andererseits zur direkten Nachverfolgung der Reaktion an der 5'-Hydroxygruppe eine DMTr-Schutzgruppe. Über das bei der Abspaltung der Schutzgruppe mit DCA entstehende rote Tritylkation kann mittels UV-Spektroskopie die Kopplung der Basen unmittelbar verfolgt und eine erste Einschätzung der Ausbeute des Kopplungsschrittes gegeben werden.^[578] Für die Kopplung des nächsten Nucleosids wird ein PA zunächst mit einem Aktivator, Tetrazol und seinen Derivaten hauptsächlich BTT und ETT, in MeCN versetzt, wobei die Diisopropylamino-Gruppe abgespalten und durch ein Tetrazol ausgetauscht wird. Die freie 5'-Hydroxygruppe des ersten Nucleosids kann das Phosphorzentrum nun in einer nukleophilen Reaktion angreifen, wobei die davor generierte gute Abgangsgruppe abgespalten wird. Dieser Schritt liefert zwar durchschnittlich eine sehr gute Ausbeute von 99,5 %, es bleiben aber trotzdem einige unreaktierte Hydroxygruppen des ersten Nucleosids übrig.^[579] Damit diese nicht im nächsten Schritt reagieren und somit zu Fehlsequenzen führen, welche nur schwer vom gewünschten Produkt abgetrennt werden können, müssen diese durch Veresterung mit durch *N*-Methylimidazol aktiviertem Ac₂O deaktiviert werden. Um Detritylierung auf Grund des niedrigen pH-Wertes durch den Zerfall von Ac₂O zu AcOH zu vermeiden, findet dieser Schritt in Pyridin statt. Auf Grund der Säurelabilität des zuvor gebildeten Phosphittriesters, muss dieser, bevor eine weitere Detritylierung stattfinden kann, in eine stabile P(V)-Spezies überführt werden. Durch Einsatz von I₂ in Pyridin und Wasser kann dies quantitativ erfolgen. Im finalen Schritt des Zyklus kann die DMTr-Schutzgruppe des zweiten Nucleosids mit DCA in DCM schnell und quantitativ abgespalten werden, bevor ein neuer Zyklus beginnt. Der synthetische Strang wird somit, in 3'- zu 5'-Richtung aufgebaut.



Schema 27 Überblick über den Phosphoramidit-Oligonucleotid Reaktionszyklus.^[580] Die Kugeln stellen die Festphase dar, während B als Abkürzung der DNA-Basen verwendet wird.

Obwohl dieser Zyklus, hier für DNA-ON gezeigt ist, ist die Synthese von RNA oder der Einbau verschiedener Modifikationen ebenfalls möglich. Je nach Sensitivität der dabei eingebrachten Bausteine können die Reaktionsbedingungen der einzelnen Schritte angepasst und verändert werden.^[581-582] Ist die Festphasensynthese beendet, stehen zwei weitere Schritte an: Die Abspaltung des Strangs von der Festphase und die Abspaltung jeglicher im Strang vorhandenen Schutzgruppen. Hier variieren die zu verwendenden Reaktionsbedingungen stark, je nachdem was für ein Linker die Festphase mit dem Strang verbindet oder welche Schutzgruppen an den Basen vorhanden sind.^[583] Für den Fall, dass manche Basen im Strang zu instabil für die klassisch nukleophilen Entschützungsmittel sind, wurden PAe mit speziellen Schutzgruppen in Form von Phenoxyacetyl (Pac)-Einheiten entwickelt, da diese unter ultramilden Bedingungen entfernt werden können.^[581, 584] Die N6-Position des Adenins **116** und die N2-Position des Guanins **117** tragen dabei die Pac- bzw. *i*PrPac-Schutzgruppen, während Cytidin **118** acetyl-geschützt und Thymin (**119**) ungeschützt vorliegt (**Abbildung 50**). Werden diese *ultra-mild* PAe bei der Festphasensynthese eingesetzt, so muss als Capping Lösung Pac₂O statt Ac₂O verwendet werden. Die andernfalls entstehenden acetyl-geschützten Guanine können nicht mehr unter milden Bedingungen entschützt werden.^[585]

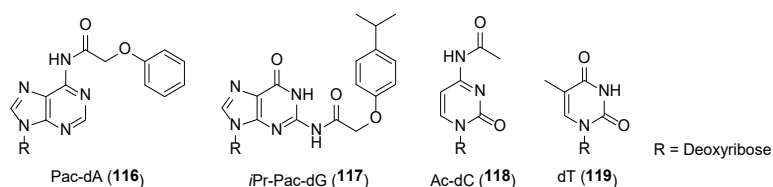


Abbildung 50 Überblick über die ultra milden DNA-PAs mit ihren jeweiligen Schutzgruppen die bei der Festphasensynthese eingesetzt werden.

Die eigentliche Festphase besteht entweder aus *controlled pore glass* (CPG) unterschiedlicher Porengröße, je nach Länge der zu synthetisierenden ONe oder aus hochverknüpften Polystyrol-Granulat.^[586] Ladungsdichten variieren dabei zwischen 0,20 $\mu\text{mol/g}$ wobei auch *highload* Festphasen mit einer Beladung von bis zu 325 $\mu\text{mol/g}$ möglich sind.^[587] Angebracht an die Oberfläche der Beads

sind meist lineare *long chain alkyl amino*-Gruppen (lcaa) an denen, wiederum mit einem Linker, die erste Base verbunden ist. Wird die Struktur verschiedener Linker betrachtet, so fällt auf, dass das Succinyl-Motiv eines der häufigsten ist (**Abbildung 51**). Da diese Einheit nur schwer mit ultra milden Bedingungen abspaltbar ist, wurden alternative Linker entwickelt. Besonders für milde Reaktionsbedingungen hat sich der Q-Linker etabliert.^[588] Dieser aus Hydroquinon-*O, O'*-Diessigsäure bestehende Linker ist deutlich labiler als der Succinyl-Linker und kann entsprechend einfacher abgespalten werden. Um nicht immer jedes Trägermaterial mit jeder möglichen ersten Base auf Vorrat zu haben und Synthesefehler durch Verwendung der falschen Festphase zu verhindern, wurden sogenannte *uni-supports*, bei denen nach Detritylierung jede mögliche erste Base gekoppelt werden kann, entwickelt.^[589]

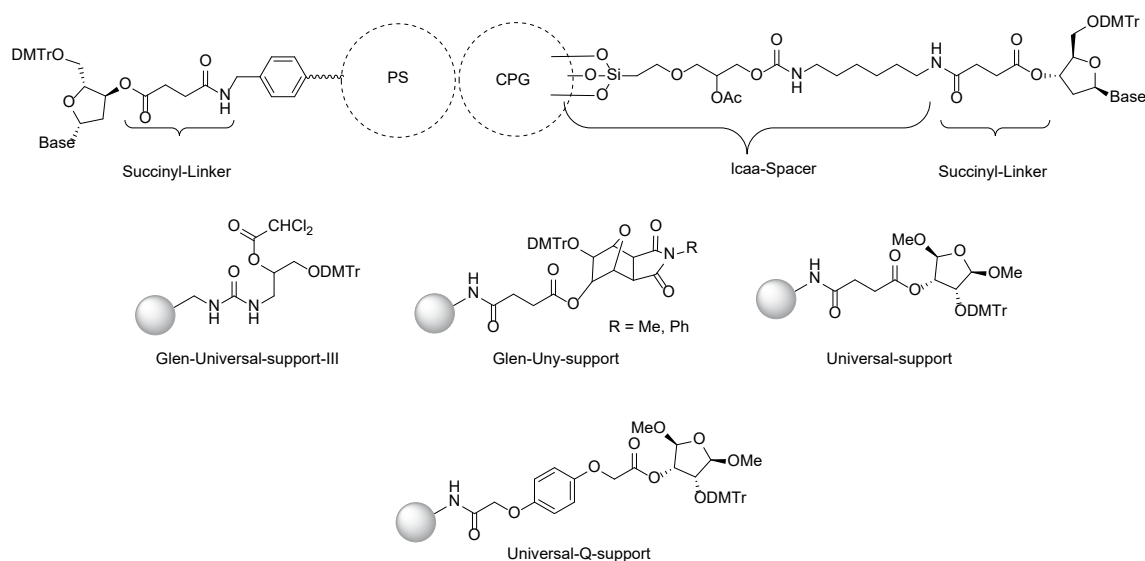


Abbildung 51 Auswahl verschiedener Linker und Verknüpfungen der Festphase.^[586] *Abkürzungen:* CPG = controlled pore glass, PS = Polystyrol, lcaa = *long chain alkyl amino*.

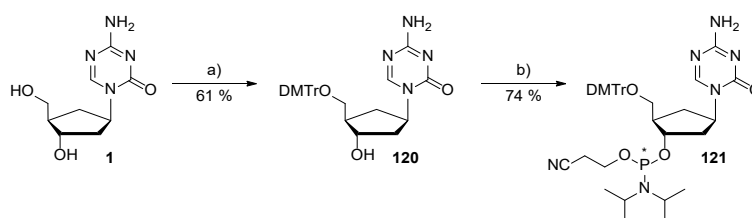
Dank moderner Methoden und hoher Individualität ist es je nach Anwendung so möglich ONe mit einer Länge von bis zu 300 Nukleobasen herzustellen.^[590] Längere Stränge können beispielsweise durch Verknüpfung zweier kürzerer Stränge oder enzymatische Methoden erzielt werden.^[591] Die vielen verschiedenen Methoden, die für die Oligonukleotidsynthese heutzutage bekannt sind, ermöglichen es, vielen Anforderungen die es für die Stränge gibt nachzukommen.^[592]

4.5.1 Synthese des Phosphoramidits und Einbau via DNA-Festphasensynthese

Da die ON-Synthese via PA-Chemie die häufigste Methode bei der *column*-ON-Synthese ist, musste aus cAzadC das entsprechende PA über zwei Stufen hergestellt werden, bevor es in einen DNA-Strang eingebaut werden konnte. Die Synthese und die anschließende Inkorporation mittels Festphasensynthese werden im Folgenden ausführlich diskutiert.

Das Anbringen der DMTr-Schutzgruppe stellt den ersten Schritt der PA Synthese dar. Die DMTr-Schutzgruppe konnte nach literaturbekanntem^[593] Bedingungen mit einer guten Ausbeute von 61 % angebracht werden (**Schema 28**). Die Wahl der Äquivalente spielte dabei eine große Rolle, da schon bei einem leichten Überschuss von 1,10 Äq. DMTrCl die Schützung beider Hydroxygruppen beobachtet werden konnte. Die Reduktion auf nur 1,05 Äq. verbesserte die Ausbeute drastisch. Bei der Reinigung des DMTr-geschützten PA-Vorläufers **120** musste darauf geachtet werden, dass das Kieselgel mit 0,1 % Et₃N deaktiviert wurde, da ansonsten die säurelabile DMTr-Schutzgruppe leicht abgespalten wurde. Die

Änderung des Lösungsmittels von Pyridin zu Lutidin hätte möglicherweise eine weitere Verbesserung der Ausbeute liefern können, da dies die Regioselektivität der Reaktion zu Gunsten der 5'-Position beeinflussen kann.^[594] Für die anschließende Herstellung eines PAs sind mehrere Wege bekannt.^[595-596] Klassischerweise kann entweder 2-Cyanoethyl *N, N*-Diisopropylchlorphosphoramidit (CED-Cl) und DIPEA oder 2-Cyanoethyl *N, N, N', N'*-Tetraisopropylphosphorodiamidit und Diisopropylammonium tetrazolid (DIPAT) eingesetzt werden. Der Einsatz von CED-Cl und DIPEA lieferte das Zielmolekül in nur sehr kleinen Ausbeuten von 10–30 %. Auch die Reinheit war, obwohl zuvor eine Säulenchromatographie durchgeführt wurde, nicht zufriedenstellend, da oft Coelution mehrerer Reaktionsprodukte zu erkennen war. Auch durch Änderung des Gradienten war keine Verbesserung zu erkennen. Ausfällen in Hexan als alternative Reinigungsmethode schlug ebenfalls fehl, da das Rohprodukt nicht ausreichend gut in Et₂O/DCM löslich war. Da diese Reaktionsbedingungen nicht zielführend waren, wurde im Anschluss die Synthese unter Einsatz des Tetraisopropylphosphoramidits (P-Reagenz) und DIPAT getestet. Bereits erste Testreaktionen ergaben eine gute Ausbeute von über 60 %. Deutlich zu erkennen war eine Abhängigkeit der Ausbeute von der Ansatzgröße. Kleine Ansätze mit 50 mg Edukt konnten eine Ausbeute von 60 % erreichen, während größere Ansätze mit über 200 mg Edukt die Ausbeute auf 74 % steigerten.



Schema 28 Reaktionsüberblick zur Synthese des Phosphoramidits **121**, ausgehend von cAzadC **1**. *Reagenzien und Bedingungen:* a) DMTCl, abs. Pyridin, 0 °C → RT, ü. N.; b) DIPAT, 2-Cyanoethyl *N, N, N', N'*-Tetraisopropylphosphorodiamidit, abs. DCM, RT, ü. N.

Das PA **121** lag als Gemisch zweier Diastereomere vor, da durch die Einführung der P(III)-Einheit ein neues Stereozentrum aufgebaut wird.^[597] Die Stereoisomere waren im ³¹P-NMR-Spektrum als zwei Signale bei 147,2 und 147,0 ppm deutlich zu erkennen. Auch das Vorliegen der P(III)-Spezies konnte durch die chemische Verschiebung des Signals eindeutig bestätigt werden (**Abbildung 52**).^[598]

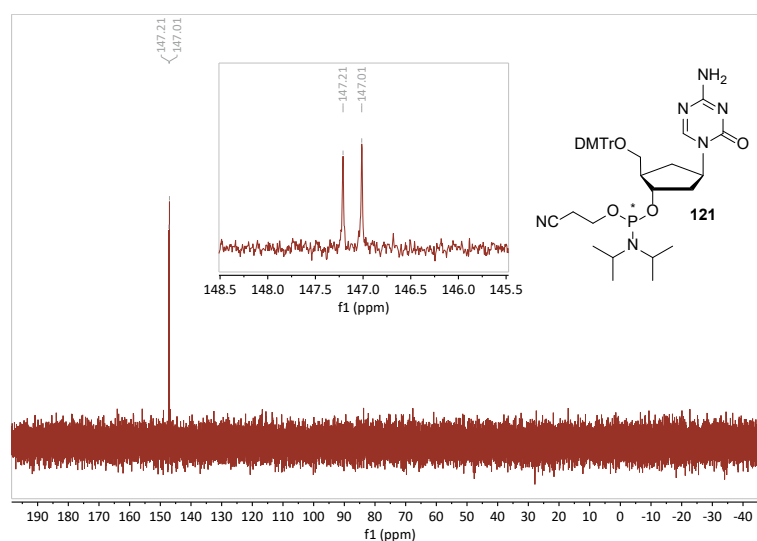


Abbildung 52 ³¹P-NMR-Spektrum des PAs **121**, mit dem deutlich zu erkennenden doppelten Signalsatz, hervorgerufen durch die zwei Diastereomere. Zur besseren Sichtbarkeit ist zusätzlich eine Vergrößerung des Bereichs 145–148 ppm abgebildet.

Bei jeglichen NMR-Messungen der Zielverbindung **121** wurde darauf geachtet, dass nur Aceton-d₆ oder MeCN-d₃ als deuteriertes Lösungsmittel verwendet wurde, da CDCl₃ und auch DCM-d₂ herstellungsbedingt geringe Spuren Säure enthalten können.^[599-600] Da PAe unter sauren Bedingungen nicht stabil sind, konnte so der Zerfall und die damit verbundene Verfälschung des Messergebnisses vermieden werden.^[601] Da das PA für die Kopplung am DNA-Synthesizer besonders trocken sein soll, wurde es aus Benzol lyophilisiert und als farbloser Feststoff erhalten.

Mit dem sauberen cAzadC-PA konnten erste Tests zur Inkorporation in einen DNA-Strang mittels Festphasensynthese durchgeführt werden. Da der eigentliche Kopplungsschritt in MeCN stattfindet und auch der Aktivator in MeCN gelöst ist, werden die PAs, kanonische sowie modifizierte, ebenfalls in MeCN gelöst. Vor diesem Hintergrund wurde auch das cAzadC-PA **121** für einen ersten Test in MeCN gelöst und an dem Synthesizer angebracht. Die während der Synthese erhaltenen Trityl-Werte fielen bei der Position des cAzadC-PAs drastisch ab, was ein Zeichen dafür ist, dass kein Einbau dieser Modifikation stattfand.^[602] Mehrere Optionen, wieso dies der Fall war, wurden nacheinander untersucht: Zunächst wurde das modifizierte PA erst kurz vor der eigentlichen Strang-Synthese an dem Synthesizer angebracht und nicht wie zuvor schon während der Synthese des Test-Strangs. Da PAe relativ instabile Verbindungen sind, sollte so ein möglicher Zerfall bzw. frühzeitiges Oxidieren zur P(V)-Spezies vermieden werden. Zusätzlich wurde die Kopplungszeit im Programm von 25 s zu 4,6 min erhöht. Die Reaktionslösung wird dabei mehrfach in der Säule hin und her gepumpt um so bei weniger reaktiven PAen und geringen Reaktionsvolumina die Reaktionszeit zu erhöhen. Als letzte Änderung wurde das cAzadC-PA nicht wie zuvor in MeCN gelöst, sondern in einem 1:1 Mix aus MeCN und DCM. Der Löslichkeitstest zeigte dabei einen großen Unterschied zur milchig-trüben Suspension mit MeCN und einer klaren durchsichtigen Lösung, wenn das Lösungsmittelgemisch verwendet wurde. Mit diesen drei Veränderungen wurde ein weiterer Test durchgeführt, der das gleiche Ergebnis lieferte: Die Trityl-Werte fielen beim modifizierten PA drastisch ab. Daraufhin wurde die Kopplungszeit auf 10 min erhöht und auch das Lösungsmittelverhältnis zum Lösen des PAs wurde von 1:1 zu 1:1,3 MeCN:DCM erhöht. Der niedrige Siedepunkt von DCM kann dazu führen, dass das Lösungsmittel leicht verdampft und damit zu Verstopfung der Schläuche führt. Da der Aktivator mit dem das PA gemischt wird ebenfalls in MeCN gelöst ist, kann dies leicht das Lösungsmittelverhältnis in dem das PA zuvor gelöst wurde so stark verschieben, dass das PA in dem jetzt größeren Anteil MeCN im Vergleich zu DCM nicht mehr gelöst ist, sondern ausfällt. Besonders bei den kleinen Volumina von 0,3 mL PA-Lösung kann dies sehr große Effekte haben. Diese neuen Einstellungen lieferten beim nächsten Test stabile Trityl-Werte ohne deutlichen Abfall, was für eine gute Inkorporation des PAs sprach.

Dieser Strang, bei dem die Basen mit Acetyl-, Benzoyl-, und DMF-Schutzgruppen versehen waren, wurde mit AMA, einer 1:1 Lösung aus MeNH₂ und NH₄OH, bei 65 °C für 5 min entschützt und anschließend via semipräparativer HPLC (0 % → 40 % TEAA Puffer B in 45 min) gereinigt. Die an der HPLC gesammelten Fraktionen wurden an einem MALDI-Massenspektrometer auf ihr Molekulargewicht hin untersucht. Die Messung ergab im negativen, linearen Messmodus eine Massendifferenz von 9 g/mol, was, obwohl die Auflösung bei großen Massen im MALDI nicht groß ist, dennoch ungewöhnlich viel war. Für genauere Untersuchungen wurde der Strang enzymatisch verdaut und die einzelnen Basen mittels *Q-Exactive* Massenspektrometrie analysiert. Dabei fielen zwei Werte auf, die dem abgebildeten Strang- und dem Basenfragment **122** und **123** zugeordnet werden konnten (**Abbildung 53**).

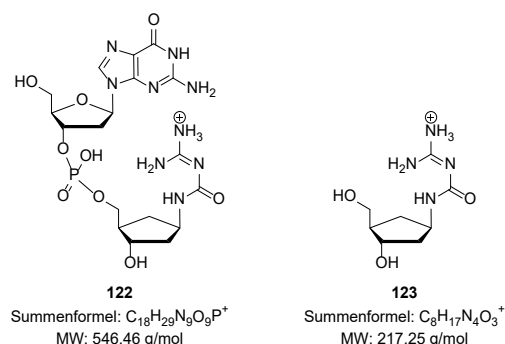


Abbildung 53 Basenfragmente die mittels Hochaufgelöster Massenspektrometrie eindeutig nachgewiesen werden konnten. Sowohl im Strang-Fragment **122** als auch im einzelnen Nucleosid **123** konnte die geöffnete Aza-Base nachgewiesen werden.

Die Literatur bestätigt, dass der Triazinring des cAzadCs unter den nukleophilen Entschützungsbedingungen nicht stabil ist. Bereits PITHOVA *et al.*^[258] berichten 1964 vom hydrolytischem Zerfall von Decitabin (**24**) unter basischen Bedingungen,^[603] welcher in Kapitel **2.5** ausführlich beschrieben und in **Schema 3 B** dargestellt ist. Obwohl cAzadC als carbacyclisches Analogon verbesserte Stabilität aufweist, so sind die stark basischen und nukleophilen Bedingungen der AMA-Lösung dennoch ausreichend, um den Triazinring zu öffnen.^[6] Um nicht jede Entschützungs-methode an einem DNA-Strang testen zu müssen und den damit verbundenen Mehraufwand zu reduzieren, wurde die Stabilität von cAzadC gegen eine Vielzahl von Reagenzien und Bedingungen getestet (**Tabelle 2**).

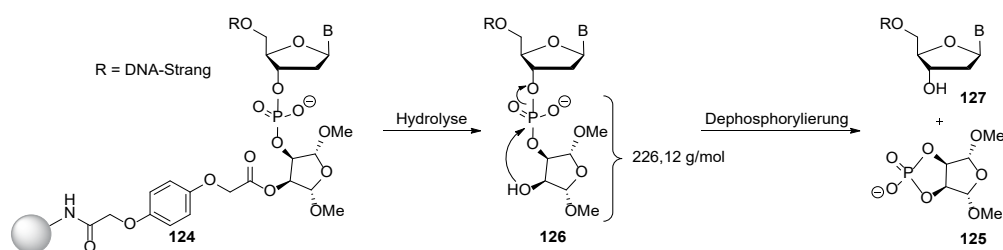
Tabelle 2 Überblick über die getesteten Entschützungs-methoden. 2–3 mg cAzadC (**1**) wurden in die entsprechende Lösung gegeben und nach dem beschriebenen Zeitintervall an einer MSQ-Anlage auf ihre Molekülmasse untersucht. Angegeben ist immer der Hauptpeak der MS-Analyse. Die rot hinterlegte Zeile markiert die optimalen Entschützungsbedingungen bei denen cAzadC stabil ist. Ref = Referenz

	Reagenzien	Lit.	T [°C]	t	Massenpeak [g/mol]
Ref.	ddH ₂ O		RT	20 h	+227
1	NH ₄ OH:MeNH ₂ (1:1; AMA)	[604]	65	5 min	+217
2	0,05 M K ₂ CO ₃ in MeOH	[605]	RT	4 h 20 h	+227
3			RT	2 h	+217
4	NH ₄ OH (33 %)	[606]	55	2 h	+217
5			65	2 h	+217
6	<i>t</i> BuNH ₂ /MeOH/H ₂ O (1:1:2)	[607]	55	ü. N.	+217
7	<i>t</i> BuNH ₂ /H ₂ O (1:3)	[608]	60	3 h	+217
8	10 % <i>i</i> Pr ₂ NH in 0,25 M Mercaptoethanol in MeOH	[609]	55	4 h 20 h	+239 +217
9			RT	4 h	+217
10	0,4 M NaOH in MeOH/H ₂ O (4:1)	[610]	80	1 h	+217
11	Ethylendiamin/Toluol (1:1)	[611]	RT	1 h 2 h	+217 +217
12	3,5 M Et ₃ N, 0,5 M LiOH in MeOH	[612]	75	1 h 4 h	+239
13	Hydrazin/Monoethanolamin/MeOH (1:5:5)	[613]	RT	5 min	+288
14	Ethanolamin	[614]	RT	20 min	+288

Die Reaktionslösung wurde nach dem entsprechenden Zeitpunkt per MS auf ihre enthaltenen Molekulargewichte hin untersucht. Intaktes cAzadC hat ein Gewicht von 226,24 g/mol und das Zerfallsprodukt 216,24 g/mol, womit eine eindeutige Differenzierung der zwei Moleküle möglich war.

Als Referenz wurde cAzadC in ddH₂O gelöst und bei RT gerührt. Bei 11 von 14 Methoden konnte dabei das Zerfallsprodukt **123** als [M+H]⁺-Peak per MS nachgewiesen werden. Bei drei Einträgen wurden Massen detektiert, die keinem Molekül direkt zugeordnet werden konnten. Da die meisten Reagenzien, die für die Entschützung von DNA-Strängen Amine enthalten, wurde nach milderen Methoden und solchen, welche kein Amin enthalten, gesucht. Der Stabilitätstest unter Verwendung von 0,4 M NaOH war allerdings auch negativ, da auch hier bereits bei RT die Masse des Degradierungsproduktes **123** mit +217 g/mol detektiert werden konnte. Einzig bei der Verwendung von 0,05 M K₂CO₃ in MeOH konnte auch nach 20 h intaktes cAzadC nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die am ON-Synthesizer verwendeten Reagenzien-Lösungen ebenfalls zum Zerfall des cAzadC-PAs führen, wurden auch hier Stabilitätsstudien mit cAzadC durchgeführt. Diese zeigten keine Beeinträchtigung der Verbindung, sondern hohe Stabilität gegenüber jeglicher Reagenzien-Lösung.

Da mit 0,05 M K₂CO₃ in MeOH das einzige Entschützungsreagenz identifiziert wurde, bei welchem cAzadC stabil ist, musste einerseits auf ultra milde PAe, welche mit Pac-Schutzgruppen versehen sind umgestiegen werden und andererseits auch der richtige Festphasenlinker verwendet werden. Als Trägermaterial wurde CPG mit Q-Linker gewählt, da dieser besonders für Reaktionen unter milden Bedingungen entwickelt wurde. Die Trityl-Werte während der so durchgeführten Festphasensynthese waren stabil und auch die Entschützung mit anschließendem Entsalzen, da K₂CO₃ nicht an der Gefriertrocknungsanlage entfernt werden kann, lief problemlos ab. Bei Überprüfen der Massen des kanonischen und modifizierten Strangs stimmten die gemessenen Massen nicht mit den entsprechenden Molekulargewichten überein. Die Abweichung betrug bei beiden Strängen 226 g/mol. Um zu verstehen, was der Grund für diese große Abweichung war, wurde der Abspaltungsmechanismus des Universal Q-Linkers von dem DNA Strang **124** genauer betrachtet. Der zweistufige Abspaltungsprozess besteht im ersten Schritt aus der Abspaltung des Q-Linkers und im zweiten Schritt aus der Dephosphorylierung unter Abspaltung von **125** zur Freisetzung der gewünschten 3'-Hydroxygruppe (**Schema 29**).^[615] Während der erste Schritt des Mechanismus vergleichsweise schnell abläuft, ist die Dephosphorylierung der geschwindigkeitsbestimmende Faktor.^[616] Die zusätzliche Phosphat- und Zucker-Einheit die das Zwischenprodukt **126** im Vergleich zum Produkt **127** beinhaltet, hat ein Molekulargewicht von 226,12 g/mol. Die Massendifferenz, die im MALDI detektiert wurde, ist somit der nicht komplett entschützte Strang **126**.



Schema 29 Reaktionsmechanismus der basenvermittelten Abspaltung des DNA-Strangs von einem Q-Uni-Trägermaterial.^[615] Während die Kugel die Festphase darstellt, ist mit B eine beliebige DNA-Base abgekürzt.

Neben dieser unvollständigen Abspaltung des Strang von der Festphase fiel auf, dass sich die produktenthaltenden Fraktionen nicht wie erwartet in einem der Hauptpeaks des Chromatogramms bei ca. 16 min befanden, sondern in einem kleinen Nebenpeak bei 17,8 min (**Abbildung 54**). Um diese beiden Probleme nacheinander zu adressieren, wurde zunächst, obwohl der zusätzliche Ribose-Ring die geplante Untersuchung des Abbaus des DNA-Protein-Crosslinks nicht behindert, ein anderer Linker getestet, um die vollständige Abspaltung und Entschützung des DNA-Strangs zu gewährleisten.

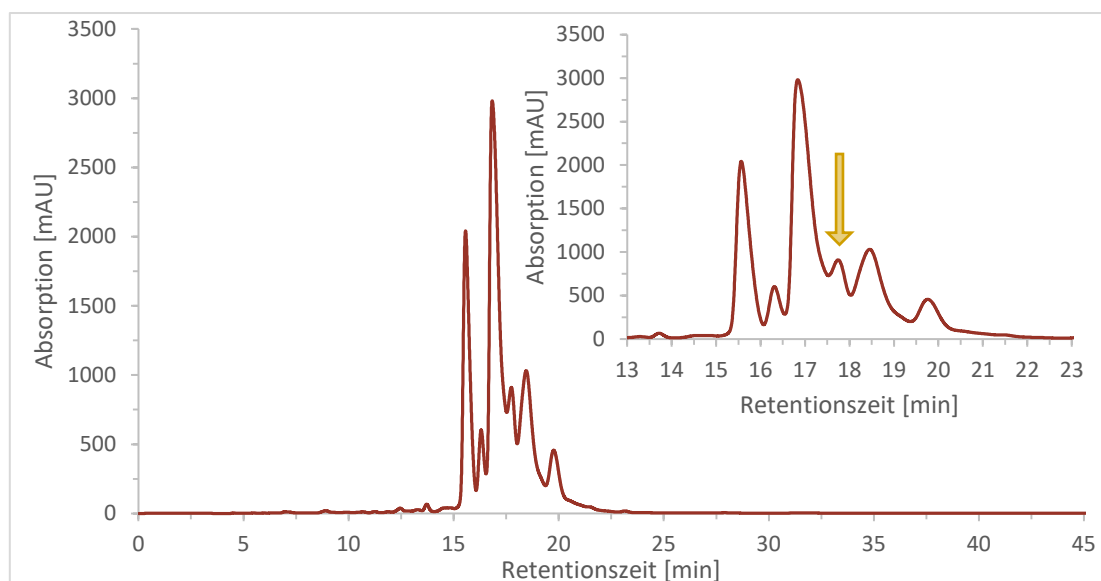


Abbildung 54 UV-Chromatogramm des modifizierten Strangs bei 260 nm, aufgenommen an einer semipräparativen HPLC (10 % → 30 % TEAA Puffer B in 45 min). Der gelbe Pfeil markiert die produktenthaltende Fraktion. Zur besseren Sichtbarkeit ist eine Vergrößerung des Bereichs 13–23 min eingefügt.

Um die Geschwindigkeit des Dephosphorylungsschrittes zu erhöhen, wurden andere Universal-Linker, mit rigideren Strukturen entwickelt, um die räumliche Nähe zwischen Hydroxygruppe und Phosphor zu gewährleisten.^[616-617] Eines dieser Trägermaterialien ist der *Glen-UnySupport*, der einen succinyl-gekoppelten überbrückten Bicyclus aufweist (**Abbildung 51**). Unter Verwendung dieses Trägermaterials und der zuvor etablierten Bedingungen wurde ein weiterer DNA-Strang synthetisiert. Auch hier blieben die Trityl-Werte während des Strang-Wachstums stabil und nach der Abspaltung und Aufreinigung des Strangs konnte über MALDI-TOF die richtige Molekülmasse detektiert werden. Dennoch war auch hier die produktenthaltende Fraktion nicht im Hauptpeak des Chromatogramms enthalten (**Abbildung 55**).

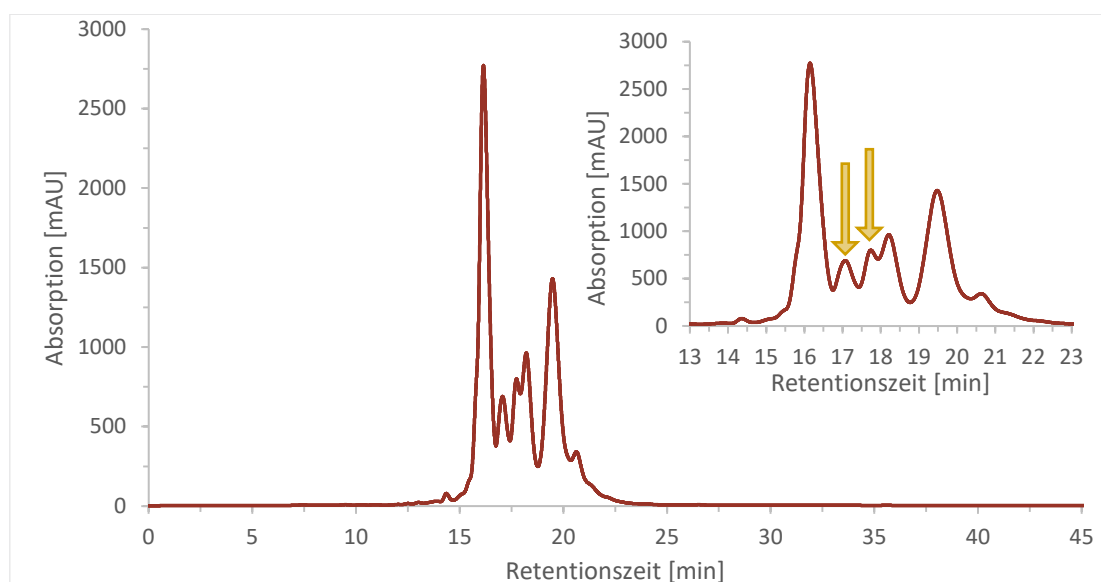


Abbildung 55 UV-Chromatogramm des modifizierten Strangs bei 260 nm, aufgenommen an einer semipräparativen HPLC (10 % → 30 % TEAA Puffer B in 45 min). Die gelben Pfeile markieren die produktenthaltenden Fraktionen. Zur besseren Sichtbarkeit ist eine Vergrößerung des Bereichs 13–23 min eingefügt.

Nur in den Fraktionen bei 17,0 und 17,7 min konnte die richtige Molekülmasse zusammen mit undefinierten Verunreinigungen festgestellt werden, während die Hauptfraktion bei 16,1 min den

Strang ohne cAzadC enthielt. Dieses Ergebnis zeigt, dass erstens die Kopplung des cAzadC-PAs, trotz stabiler Trityl-Werte nicht effizient ist und zweitens, dass das Capping der freien Hydroxygruppen ebenfalls fehlerhaft war. Da die Lösungsmittel zur Herstellung der PA-Lösung bereits angepasst wurden, das PA, bestätigt durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie, rein und nicht zur P(V)-Spezies oxidiert vorlag und die Schläuche am Synthesizer sehr gut zu Beginn der Synthese mit der Lösung gespült wurden, verbleibt darüber hinaus nur noch die Kopplungszeit als mögliche Testvariable. Da die PA-Lösungen, auch die der kanonischen PAs mit einer Konzentration von 0,1 M vorlagen und pro Synthese 1 μmol Festphase eingesetzt wurde, lag ein starker Überschuss der PAs vor; eine weitere Erhöhung der Konzentration sollte somit nicht von Nöten sein.

Für eine zukünftige Optimierung der Synthese können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Das Fehlschlagen des Capping-Schrittes kann möglicherweise vermieden werden, indem die Capping Lösung für jede Synthese neu angesetzt wird. Auch beim Capping kann die Kopplungszeit manuell angepasst werden, um längere Reaktionszeiten der Reagenzien zu ermöglichen. Alternativ kann getestet werden, ob die Verwendung von Ac_2O als Capping Reagenz, möglicherweise *nur* nach Kopplung des cAzadC-PAs eingesetzt, bei der Abspaltung und Entschützung der Stränge wirklich problematisch ist, oder ob diese Stränge auch mit K_2CO_3 in MeOH entschützt werden können. Möglich ist auch, dass es auf Grund der schlechten Löslichkeit des cAzadC-PAs in MeCN zu Problemen kommt. Da viele der Reagenzien in einer MeCN-Lösung vorliegen, kann dadurch das cAzadC-PA sowohl in den Schläuchen als auch in der Festphasenkartusche ausfallen. Nach Beenden der Reaktion kann dies möglicherweise zwischen den Festphasenpartikeln abgelagert und nicht vollständig entfernt werden. Durch einen Wechsel des Lösemittels bei der Detritylierung von MeCN zu DCM und der dadurch verbesserten Löslichkeit des PAs **121**, kann dies zu hohen Trityl-Werten führen welche fälschlicherweise als eine gute Kopplung interpretiert werden. Der mögliche Austausch von MeCN zu DCM bzw. das häufige Spülen der Schläuche mit DCM stellt somit eine weitere Stellschraube dar, die für die Optimierung der Strang-Synthese untersucht werden muss.

4.5.2 Zukünftige Studien mithilfe des synthetischen DNA-Strangs

Die Synthese des artifiziellen DNA-Strangs konnte in Spuren erreicht werden. Obwohl im Verlauf der vorliegenden Arbeit schon viele Probleme erkannt und gelöst wurden, sind noch weitere Optimierungen der Reaktionsbedingungen nötig, um einen Strang in ausreichender Menge und Reinheit zu erhalten. Erst dann kann mithilfe des DNA-Strangs der Wirkmechanismus von cAzadC genauer untersucht werden.

Obwohl cAzadC und Decitabin die gleiche 5-Aza-Cytidin Base aufweisen und damit den gleichen Wirkmechanismus bezüglich der epigenetischen Reaktivierung von zuvor stillgelegten Genen haben, so zeigen sich in ersten Studien doch deutliche Differenzen beider Moleküle, beispielsweise bei ihrer Interaktion mit den zellulären Reparaturmechanismen. Das BER-System ist für die Integrität der genomischen DNA verantwortlich, welche durch verschiedene Umweltfaktoren beschädigt werden kann.^[618] Um eine funktionierende DNA mit möglichst wenig Mutationen zu reproduzieren, ist dieser Reparaturmechanismus äußerst wertvoll.^[619] Obwohl es mehrere Wege gibt, wie beschädigte DNA vom BER-System repariert werden kann, so laufen die Reaktionen doch im Wesentlichen in drei Schritten ab:^[620] Zunächst wird die abnormale Base von Glycosylasen erkannt und entfernt, während anschließend die generierten abasischen Stellen durch Endonukleasen bearbeitet werden und 3'OH-Termini erzeugen, welche schließlich von Polymerasen und Ligasen zum geschlossenen DNA-Strang umgewandelt werden (**Abbildung 56**).^[621]

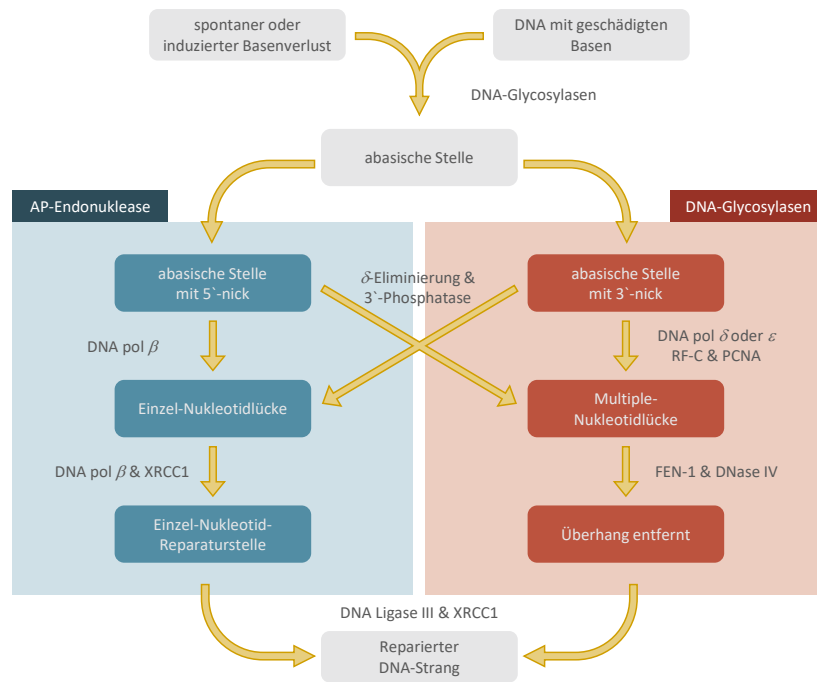


Abbildung 56 Überblick über die am BER-System beteiligten Schritte und Enzyme. Während links (blau) der Reparaturweg der AP-Endonukleasen gezeigt wird, ist rechts (rot) der der DNA-Glycosylasen dargestellt. Bild adaptiert von KROKAN *et al.*^[622] **Abkürzungen:** AP = apurin/apyrimidin, PCNA = *proliferating-cell-nuclear-antigen*, FEN1 = *Flap structure-specific endonuclease 1*, RF-C = Replikationsfaktor C.

Besonders die Glykosylasen, welche direkt am Erkennen und Ausschneiden der geschädigten Basen beteiligt sind, spielen eine wichtige Rolle in dieser molekularen Maschine.^[622] Diese Enzyme hydrolysieren selektiv die *N*-glykosidische Bindung zwischen Ribosering und Base. Während dieser Mechanismus bei Decitabin sehr gut ablaufen kann, ist er durch den Austausch von Ribosering zu Carbacyclus deutlich gestört und es kann keine abasische Stelle generiert werden.^[275, 623-624] Da cAzadC dennoch eine nicht-kanonische Base darstellt, ist die detaillierte Untersuchung, auf welche Art und Weise die Zellen dies erkennen und behandeln, Gegenstand zukünftiger Forschung. Bekannt ist bereits, dass die DNA-Schäden, die durch cAzadC hervorgerufen werden, deutlich stärker sind und mehr Doppelstrang- als Einzelstrangbrüche zu beobachten sind.^[275]

Wie bereits erwähnt ist einer der Wirkmechanismen der 5-Aza-Basen die Reaktivierung verschiedener zellulärer Funktionen durch die Reduktion der DNA-Methylierung, indem DNMT-Enzyme kovalent an den Cytidin-Heterocyclus verknüpft bleiben.^[231] Die Reparatur dieses entstehenden DNA-Protein-Crosslinks (DPCs) ist ebenfalls im Fokus zukünftiger Untersuchungen. Werden Proteine auf Grund von Chemotherapeutika oder anderen Umweltfaktoren kovalent an DNA gebunden, so unterbrechen diese die normale DNA-Replikation und -Transkription und können so zur Mutagenese erheblich beitragen.^[625] Um die gesunde Funktion einer Zelle zu erhalten, ist der Abbau und die Reparatur dieser Crosslinks von Nöten. Mehrere Wege für die Spaltung dieser DPCs sind bekannt und beinhalten unter anderem die direkte hydrolytische Spaltung, nuklease- oder proteaseabhängige Prozesse (**Abbildung 57**).^[626] Da der Crosslink ausgehend von einer Cystein-Seitenkette des DNMT-Enzyms mit der Base entsteht und den DNA-Strang dabei intakt lässt, kommt die direkte Crosslink-Hydrolyse, welche meist von Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterasen durchgeführt wird, nicht in Frage.^[627-628] Die anderen Wege, Abbau durch Nukleasen wie beispielsweise den MRN-Komplex, oder Proteasen wie der SPRTN/Wss1 erscheinen wesentlich wahrscheinlicher.^[629-631] Da gerade bei dem Abbau mit SPRTN-Enzymen bekannt ist, dass der Abbau nicht komplett erfolgt, sondern ein kleiner Teil des Proteins verbleibt, stellt dies eine vielversprechende Forschungsrichtung für zukünftige Untersuchungen dar.

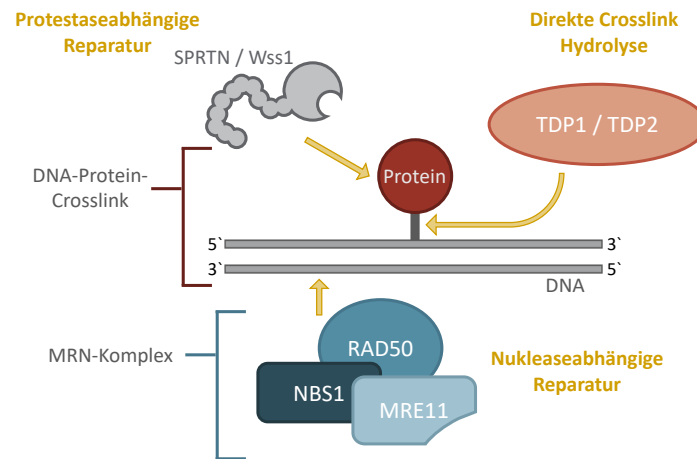


Abbildung 57 Übersicht über die möglichen Angriffspunkte zum Abbau von DPCs. Von den drei möglichen Abbauwegen der direkten Crosslink Hydrolyse, der Nuklease- und Proteaseabhängigen Reparatur ist letztere am wahrscheinlichsten. Abbildung adaptiert von STINGELE *et al.*^[626] Abkürzungen: MRE = *meiotic recombination*, NBS = *nijmegen breakage syndrome protein 1*, RAD = *DNA repair protein*, SPRTN = Spartan Protein, TDP = Tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Wss1 = *Weak suppressor of SMT3*.

Neben der Untersuchung zellulärer Reparatur-Maschinen kann ein synthetischer DNA-Strang mit inkorporiertem cAzadC auch zur Überprüfung des enzymatischen Verdau herangezogen werden. Unveröffentlichte Studien lassen vermuten, dass der Abbau der genomischen DNA, welcher zur Analyse der 5-mdC-Niveaus verwendet wird, für cAzadC enthaltende Proben möglicherweise Fehler aufweist. Das Vorhandensein des Carbacyclus im Vergleich zum Ribosering kann unter Umständen die Nukleasen in ihrer Aktivität so einschränken, dass cAzadC nicht als freies Nukleosid, sondern als Dinukleotid vorliegt und so in der UHPLC-MS-Analyse zu Fehlinterpretationen führt. Da dieser enzymatische Verdau die Grundlage aller biochemischen Analysen bildet, muss mit hoher Sicherheit der einwandfreie Ablauf dieser Reaktion gewährleistet sein. Der Verdau verschiedener Stränge mit einer bekannten Anzahl von cAzadC-Modifikationen kann dies in naher Zukunft eindeutig nachweisen.

5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Verständnis über die chemischen und biologischen Eigenschaften des Nukleosid-Derivates cAzadC deutlich erweitert. Die eigentliche Syntheseroute wurde dabei mit einer Steigerung der Gesamtausbeute um 36 % auf insgesamt 15 % deutlich optimiert. Mithilfe der so erreichten größeren Menge an Wirkstoff konnten schließlich großangelegte Zellstudien durchgeführt und das große anti-leukämische Potential von cAzadC sowie dessen Wirkmechanismus untersucht werden. Darüber hinaus wurden auch verschiedene Prodrugs, Isotopenstandards und weitere Derivate zur Aufklärung der zellinternen Proteininteraktionen hergestellt. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Wirkung des Nukleosid-Analogons auch trotz Addition einer Prodrug-Einheit sowohl mit als auch ohne maskiertem Monophosphat nicht verbesserte. Weiterführend bleibt noch zu untersuchen, ob die Bioverfügbarkeit der Substanz und damit der Einbau in die DNA durch eine noch nicht getestete Prodrug-Einheit deutlich gesteigert werden könnte. Hierfür kann ausgenutzt werden, dass bereits Xenograft-Studien initiiert wurden, welche ein besseres Verständnis des Metabolismus sowie der Verteilung im Körper etablieren. Nach Abschluss dieser Studien und der vollständigen Analyse der Daten kann basierend darauf nach einer optimierten Prodrug-Trägergruppe gesucht werden.

Die für die quantitative Analyse des Einbaus von cAzadC und Decitabin in die DNA benötigten Isotopenstandards wurden ebenfalls erfolgreich synthetisiert. Bei der Datenverarbeitung kommt der Überlagerung zwischen Analyt und SILIS eine entscheidende Rolle zu. Durch Synthese und Einsatz eines weiteren SILIS mit Massendifferenz [M+3] statt der verwendeten [M+2] kann diese Überlagerung noch weiter reduziert und die Ergebnisse dadurch stärker differenziert werden. Alternative Syntheserouten für einen solchen SILIS wurden bereits etabliert und können zügig getestet werden.

Auch die Inkorporation des synthetisierten cAzadC-PAs in einen DNA-Strang wurde im Rahmen dieser Arbeit via Festphasensynthese erfolgreich durchgeführt. Dies wurde nach Adressieren und Beheben vieler grundsätzlicher Probleme in geringer Ausbeute erreicht, was noch Raum für zukünftige Optimierungen lässt. Vor allem die Wahl des geeigneten Linkers der Festphase sowie die verwendeten Lösungsmittel und Reaktionszeiten am Synthesizer wurden spezifisch angepasst und justiert. Dabei war stets die Löslichkeit des PAs sowie die Labilität der Aza-Base unter verschiedenen Entschützungsbedingungen zu berücksichtigen. Sind diese chemischen Optimierungen vorgenommen, kann der biologische Aspekt des Wirkstoffs weiter untersucht werden. Dafür sind vor allem Experimente nötig, die den Abbau von cAzadC aus der DNA untersuchen. Hilfreich können dabei Kristallstrukturanalysen verschiedener Proteine mit einem modifizierten DNA-Strang sein. Aber auch die Auswirkungen des durch den Wirkstoff veränderten Epigenoms kann durch Sequenzierung, Proteomics- und Metabolomics-Analysen genauer betrachtet werden. Dafür ist es wichtig, den disziplinären Rahmen zu erweitern und geeignete Kooperationspartner mit entsprechender Expertise jenseits der organischen Chemie zur Abstimmung konkreter weiterer Studien einzubeziehen.

Drüber hinaus ist auch ein Zusammenhang zwischen veränderten Methylierungsmustern und physischen Alterungsprozessen bekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Vor diesem Hintergrund zeigt cAzadC auch noch weiterführende Anwendungsmöglichkeiten beispielsweise als Anti-Ageing-Wirkstoff. Insgesamt eröffnet das im Rahmen dieser Dissertation erarbeitete Verständnis über die Wirkung des Nukleosid-Analogons also ein reiches Potential zur Anwendung und Kommerzialisierung dieser Substanz nicht nur in der wichtigen Leukämie-Bekämpfung, sondern auch weit darüber hinaus. Weiterführende Studien sind somit zweifelsohne nicht nur von hohem wissenschaftlichen Interesse, sondern auch für die medizinische Anwendung gewinnbringend und wichtig.

6 Experimenteller Teil

Zur ausführlichen Nachvollziehbarkeit der nachfolgenden Durchführungsprotokolle und Analysen der Unterkapitel **6.2-6.6** liefert der erste Abschnitt **6.1** eine Dokumentation der dabei angewendeten Arbeitsweisen, Geräte und Programme.

6.1 Methoden und Materialien

Allgemeine Arbeitsweise

Luft- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter Verwendung der SCHLENK-Technik durchgeführt. Die dafür verwendeten Glasgeräte wurden vor Gebrauch in einem Trockenschrank der Firma HERASEUS INSTRUMENTS für einige Stunden getrocknet und zusätzlich im Hochvakuum (10^{-2} mbar) mit einer Heißluftpistole bei 650 °C ausgeheizt. Als Schutzgas wurde Stickstoff (Reinheitsstufe 5.0) oder Argon (Reinheitsstufe 5.0) verwendet. Flüssige Reagenzien wurden durch Septen aus Naturkautschuk von SAINT GOBAIN PERFORMANCE PLASTICS zugegeben und dabei verwendete Spritzen der Firma HENKE-SASS WOLF sowie die *Sterican* Kanülen der Firma B. BRAUN dreimal mit dem entsprechenden Schutzgas gespült. Feststoffe wurden unter Schutzgasgegenstrom zugegeben. Das Hochvakuum wurde durch eine PFEIFFER *Vakuum Duo Line* Drehschieberpumpe erzeugt.

Chemikalien und Lösungsmittel

Alle verwendeten Chemikalien wurden kommerziell bei SIGMA-ALDRICH, MERCK, ACROS ORGANICS oder CARBOLUTION in der Qualität *puriss.*, *pro analysi*, oder *purum* erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Reaktionsprodukte wurden vor weiterem Einsatz und analytischen Messungen mehrere Stunden am Hochvakuum (10^{-2} – 10^{-3} mbar) getrocknet. Kommerziell erworbene Lösungsmittel (EtOAc, Hexan, DCM, MeOH, Toluol) zur Extraktion und Säulenchromatographie standen in technischer Qualität bereit und wurden vor Verwendung unter Vakuum destilliert. Lösungsmittel welche in *reagent grade* (Et₂O, EtOH) vorhanden waren, wurden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Getrocknete Lösungsmittel (Wassergehalt < 0,001 %; DCM, DMF, MeCN, Toluol, Pyridin, THF, MeOH) für luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden von SIGMA-ALDRICH und ACROS ORGANICS erworben und unter Schutzgas über 3 Å Molekularsieb aufbewahrt. Acetonitril für den Einsatz an der HPLC und dem DNA-Synthesizer wurde von VWR in *hplc-grade* Qualität oder von CARL ROTH kommerziell erworben. Als *brine*-Lösung wird im Nachfolgenden eine gesättigte wässrige NaCl-Lösung bezeichnet.

Doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)

Zur Herstellung von Pufferlösungen für den Einsatz an der HPLC wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet, welches mithilfe des *arium pro DI* der Firma SARTORIUS STEDIM oder des *OmniaTaps* der Firma STAKPURE gewonnen wurde.

Dünnschichtchromatographie

Qualitative dünnschichtchromatographische Analysen zur Überwachung des Reaktionsverlaufs und zur Fraktionenbestimmung bei der Säulenchromatographie wurden auf Aluminium-Fertigfolien der Firma MERCK (DC *Kieselgel 60*, Schichtdicke 0,2 mm, F₂₅₄) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch

Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder durch Anfärben der Trägerplatten mit verschiedenen Färbelösungen und anschließendem Erhitzen. Die Kompositionen der Färbelösungen waren wie folgt:

- Wässrige KMnO_4 -Lösung: 1,5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 , 2,5 mL NaOH (5 wt% in H_2O), 150 mL H_2O
- Vanillin-Lösung: 7,5 g Vanillin, 125 mL EtOH, 1,25 mL konz. H_2SO_4
- Cer-Ammonium-Molybdat-Lösung (*Hanessian's stain*): 90 mL dd H_2O , 10 mL konz. H_2SO_4 , 5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- Ninhydrin-Lösung: 0,3 g Ninhydrin, 100 mL *n*-Butanol, 3 mL AcOH
- Iodkammer: einige Körnchen elementares Iod und Sand

Die Mischungsverhältnisse der so durchgeführten DC-Proben beziehen sich auf die Volumenanteile der einzelnen Lösungsmittel. Zur Aufreinigung mancher Moleküle wurde eine präparativen Dünnschichtchromatographie herangezogen. Hierfür wurden Glasplatten der Firma MERCK (DC Kieselgel 60, F_{254}) verwendet. Die Isolation der einzelnen Fraktionen erfolgte via Detektion der UV-Löschung und anschließendem Abkratzen des Kieselgels mit einem Skalpell. Durch Waschen des Kieselgels mit einem polaren Lösungsmittelgemisch (DCM:MeOH / 8:2) konnten die Substanzen erfolgreich von der stationären Phase abgetrennt werden.

Entsalzen mittels SepPak-Säule

Zum Entsalzen von Oligonukleotiden nach dem Entschützen mit K_2CO_3 wurden *SepPak* Säulen herangezogen. Die Säule wurde dafür zunächst mit MeCN (10 mL), NaCl (100 mM):MeCN (1:1; 10 mL), und schließlich mit NaCl (100 mM; 10 mL) equilibriert. Anschließend wurde die Probe, gelöst in NaCl-Lösung (100 mM, 5 mL) aufgetragen und mit dd H_2O (10 mL) gewaschen. Die Elutionslösung bestand aus MeCN:MeOH:dd H_2O (35:35:30; 5 mL). Von den so erhaltenen Produktlösungen wurden zunächst MeOH und MeCN an der *SpeedVac*-Anlage entfernt und die Probe schließlich lyophilisiert.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur Reinigung der finalen Produkte wurde eine präparative Umkehrphasen-HPLC-Anlage der Firma AGILENT, *1260 Infinity II*, bestehend aus *1260 Quat. Pump VL*, *1260 man. Inj.* und einem *Variable Wavelength Detector* (1260 VWD) verwendet. Die eingesetzten Säulen waren *reversed Phase VP 250/10 Nucleodur 100-3*, 10 μm , C18 ec, 110 Å 250 × 21 mm Säulen von MACHEREY NAGEL. Die Flussrate betrug 5,0 mL/min. Zum Überprüfen der Reinheit standen analytische HPLC-Anlagen, ebenfalls von AGILENT, *1260 Infinity II*, bestehend aus *1260 Flexible Pump*, *1260 Vialsampler* und *1260 Multiple Wavelength Detector* (MWD) bereit. Dabei wurden *reversed Phase EC 250/4 Nucleodur 100-5*, 5 μm , C18 ec, 110 Å 4,6 × 25 mm Säulen verwendet. Die Flussrate für analytische Messungen betrug 0,5 mL/min. Die Reinheit wurde über die Integration der verschiedenen Peaks und ihre relative Integralgröße bestimmt.

Als mobile Phase wurde MeCN und dd H_2O entweder rein, unter Zusatz von 0,1 % TFA oder als Pufferlösung eingesetzt. Die Zusammensetzung der Puffer ist nachfolgend aufgelistet:

- Stammlösung TEAA (Triethylammoniumacetat) Puffer (1 M $\text{Et}_3\text{N}/\text{AcOH}$): 101,19 g Et_3N , 60,06 g konz. AcOH, Einstellen auf pH = 7 und mit dd H_2O auf 1 L auffüllen.
- Puffer A (wässrig): 100 g TEAA-Stammlösung, 900 g dd H_2O
- Puffer B (organisch): 100 g TEAA-Stammlösung, 100 g dd H_2O , 624 g *HPLC-grade* MeCN

Die jeweiligen Gradienten sind den entsprechenden Vorschriften zu entnehmen. Bevor Proben an der HPLC-Anlage analysiert wurden, wurden sie durch einen CHROMAFIL *PET-20/25* (25 mm, 0,20 µm) Spritzenfilter der Firma MACHEREY-NAGEL oder einen MILLEX *Low binding Hydrophilic LCR* (PTFE) Membran (13 mm, 0,20 µm) Spritzenfilter der Firma MERCK filtriert.

Infrarotspektroskopie (IR)

Spektren wurden an einem *Spectrum BX FT-IR* Spektrometer der Firma PERKINELMER aufgenommen, nachdem davor jeweils eine Hintergrundmessung durchgeführt worden war. Der Messbereich des Spektrometers betrug 650–4400 cm⁻¹. Flüssigkeiten konnten direkt auf die ATR-Einheit gegeben werden; bei Feststoffen wurde zusätzlich der Stempel bis zum Anschlag angezogen. Als Software zur Steuerung und Auswertung der Spektren wurde das Programm *Spectrumv5.3.1* der Firma PERKINELMER verwendet. Ein weiteres Gerät, das für die Aufnahme von IR-Spektren bereit stand, war das *IRSpirit* mit einem QATR-S ATR-Messaufsatz der Firma SHIMADZU. Auch hier wurde vor der eigentlichen Messung zunächst eine Hintergrundmessung durchgeführt. Der Messbereich betrug 400–4000 cm⁻¹. Als Software zur Steuerung und Auswertung der Spektren wurde das Programm *LabSolutions IR* der Firma SHIMADZU verwendet. Die Absorption der synthetisierten Verbindungen wird in Wellenzahlen (cm⁻¹) angegeben und als deskriptive Abkürzungen dienen die Kürzel: stark (*s*), mittel (*m*), schwach (*w*).

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die strukturelle Analyse der gewonnenen Substanzen erfolgte mittels ¹H-, ¹³C- ³¹P- und ¹⁵N-NMR-Spektroskopie bei RT (298 K) in einem NMR-Röhrchen mit 5 mm Durchmesser. Hierzu standen verschiedene Geräte mit Autosampler zur Verfügung: BRUKER *Avance III HD* mit Cryo-Kopf 800 MHz, BRUKER *Avance III* 400 MHz und BRUKER *Ascend* 500 MHz. Die Spektren wurden teilweise von der Kernresonanzabteilung der LMU, Fakultät Chemie und Pharmazie unter Leitung von DR. DAVID STEPHENSON gemessen. Die Spektren wurden alle in deuterierten Lösungsmitteln (CDCl₃, CD₂Cl₂, D₂O, DMSO-d₆, MeCN-d₃) der Firma EURISO-TOP und SIGMA-ALDRICH aufgenommen und gemäß FULMER *et al.*^[632] auf den entsprechenden Rest des Lösungsmittels referenziert. Die chemische Verschiebung (δ) wird in *parts per million* (ppm), relativ zu Tetramethylsilan (TMS) und die Kopplungskonstante (*J*) jeweils in Hertz (Hz) angegeben. Die Kopplungskonstante bezieht sich, wenn nicht explizit anders erwähnt, auf eine ³J_{HH}-Kopplung. Zur Beschreibung der Signalformen werden folgende Abkürzungen verwendet, welche auch kombinatorisch eingesetzt werden: Singulett (*s*), Dublett (*d*), Triplett (*t*), Quartett (*q*), Multiplett (*m*). Wenn nötig kann die Signalform durch den Zusatz *breit* (*br.*) ergänzt werden. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffresonanzen erfolgte durch 2D-Experimente (*H,H*-COSY, HMQC und HMBC). Für Phosphor-Verbindungen wurde ein separates ³¹P-Spektrum aufgenommen und ebenso wie die ¹⁵N-Spektren ohne interne Referenz ausgewertet. Die Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffatome bezieht sich auf die angegebene Molekülnummerierung, welche nicht IUPAC-konform erfolgte. Nukleotide und deren Derivate wurden gemäß deren Nomenklatur nummeriert. Die Auswertung der Spektren erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms *MestReNova* der Firma MESTRELAB RESEARCH S.L.

Kleingeräte

Elementaranalyse: Proben deren Elementzusammensetzung untersucht wurde, wurden an einem ICP OES Spektrometer der Firma VARIAN VISTA RL vermessen.

Gefriertrockner: Hochsiedende Lösungsmittel wie DMSO, Wasser und Acetonitril wurden an einer *Alpha 2-4 LSCbasic* Gefriertrocknungsanlage der Firma CHRIST entfernt.

Rotationsverdampfer: Lösungsmittel die *in vacuo* entfernt wurden, wurden an einem *Laborota 4001* Rotationsverdampfer der Firma HEIDOLPH mit einer angeschlossenen *PC 3001 Vario pro* Membranpumpe der Firma VACUUBRAND einkondensiert. Die Wasserbadtemperatur betrug dabei, wenn nicht anders angegeben, 40 °C. Alternativ standen *Rotavapor R-300* Rotationsverdampfer der Firma BÜCHI, mit angeschlossener *PC 3001 VARIO select* Membranpumpe der Firma VACUUBRAND zur Verfügung.

Schmelzpunktbestimmung: Schmelzpunkte von reinen Feststoffen wurden mit einem *EZ-Melt* Schmelzpunktmessgerät der Firma STANFORD RESEARCH SYSTEMS gemessen und sind ohne weitere Korrektur angegeben.

SpeedVac: Zum Entfernen geringer Mengen Lösungsmittel die nicht an der Gefriertrockenanlage entfernt werden konnten wurde eine *Savant SpeedVac SPD120* der Firma THERMOSCIENTIFIC oder eine *RVC 2-33 IR* SpeedVac der Firma CHRIST verwendet. Angeschlossen waren jeweils eine *CT 02-50 SR* Kühlfalle der Firma CHRIST, sowie *MD 4C* Membranpumpen der Firma VACUUBRAND.

Thermoshaker: Reaktionen in kleinen Maßstäben wurden in *SafeLock Tubes* der Firma EPPENDORF unter Verwendung eines *ThermoMixer C* Thermoshakers der Firma EPPENDORF durchgeführt werden. Die genauen Einstellungen sind den jeweiligen Reaktionsvorschriften zu entnehmen.

Waagen: Zum Einwiegen der Edukte und Reagenzien standen eine *Extend* Waage der Firma SARTORIUS, sowie eine *Adventurer* Waage von OHAUS zur Verfügung. Zusätzlich wurde eine *Entris II Essential Line* Waage der Firma SARTORIUS verwendet.

Zentrifugen: Je nach Größe des Reaktionsgefäßes standen unterschiedliche Zentrifugen zur Verfügung. Für kleine *SafeLock* EPPENDORF *Tubes* fand eine *miniSpin* Zentrifuge der Firma EPPENDORF, für größere *CellStar* Tubes der Firma GREINER eine *Compact Star CS8* Zentrifuge der Firma VWR Anwendung.

Massenspektrometrie (MS)

Hochaufgelöste Massenspektren wurden von der Analytikabteilung Massenspektroskopie der Fakultät für Chemie und Pharmazie unter der Leitung von DR. WERNER SPAHL übernommen. HRMS-Spektren wurden an einem *LTQ FT Ultra Fourier Transform Ionen Cyclotron Resonanz* Massenspektrometer von THERMO FINNIGAN aufgenommen. Die Proben wurden via Elektrosprayionisation ionisiert, wobei die Spraykapillarenspannung 4 kV, die Heizkapillarentemperatur 250 °C, der Stickstoff Sheathgasfluss 20 und der Sweepgasfluss 5 Einheiten betrug. Je nach Probe wurde ein Massenbereich von 50–2000 u gemessen. Die zum Vergleich berechnete Masse der gemessenen Proben konnte über das Programm *ChemDraw 20.0* der Firma CAMBRIDGESOFT ermittelt werden.

Die Überprüfung des Reaktionsfortschrittes sowie die Ermittlung der gewünschten Fraktion während der Säulenchromatographie erfolgte teilweise an einer *Dionex UltiMate 3000* RP-LCMS-Anlage (Pumpe, Autosampler, Column Compartment, Diode Array Detector) von THERMO SCIENTIFIC mit einer *Hypersil Gold C18* Selektivitätssäule (100 × 2,1 mm) und angeschlossenen *MSQ Plus Single Quadrupol* Massenspektrometer, ebenfalls von THERMO SCIENTIFIC. Die Proben wurden vor der Injektion in MeCN HPLC-grade gelöst und konnten direkt oder mit vorgeschalteter Säulenmethode vermessen werden.

Modifizierte, sowie kanonische Oligonukleotide wurden an einem MALDI-TOF *autoflex maX* der Firma BRUKER vermessen. Der *SmartBeam II* Laser (Nd:YAG, 355 nm) hatte dabei eine Frequenz von 200 Hz.

Als Software zur Steuerung und Auswertung der Spektren wurde das Programm *flexControl3.4*, bzw. *flexAnalysis* der Firma BRUKER verwendet.

Vor den MALDI-Messungen wurden die Proben über eine *MF-Millipore* MCE Membran (0,025 μm) der Firma MERCK auf ddH₂O entsalzt. Anschließend wurden die Proben mittels einer HPA-Matrix (10 mg Di-Ammoniumhydrogencitrat, 50 mg 3-Hydroxypicolinsäure, 500 μL ddH₂O, 500 μL MeCN, 40 °C für 30 min) kokristallisiert.

Oligonukleotid-Synthese

Oligonukleotid-Stränge wurden an einem *ABI 394 DNA/RNA-Synthesizer* der Firma THERMOSCIENTIFIC hergestellt. Das angeschlossene Argon hatte ebenfalls die Reinheitsstufe 5.0. Die verwendeten Reagenzien, *J. T. Baker Oxidizing (ABI)*, *J. T. Baker Capping A (ABI)*, sowie *J. T. Baker Capping B (ABI)* der Firma FISHERSCIENTIFIC, wurden kommerziell erworben und direkt, ohne weitere Aufreinigung, verwendet. Ebenso wurden die Lösungsmittel MeCN *Rotisolv* $\geq 99,95\%$, LC-MS Grade der Firma CARL ROTH, DCM $\geq 99,9\%$ *laboratory reagent grade* der Firma FISHERSCIENTIFIC und *DCA Deblock* mit DCM der Firma SIGMA-ALDRICH kommerziell erhalten und direkt an den Synthesizer angeschlossen.

Als Festphase wurden unter anderem Kartuschen der Firma LINKTECH befüllt mit CPG und bereits beladen mit der ersten geschützten DNA-Base oder ein *universal support* in einem 1,0 μmol Maßstab verwendet.

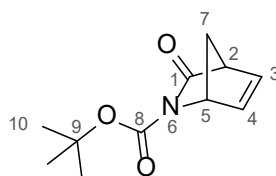
Säulenchromatographie

Zur chromatographischen Reinigung der Substanzen wurde *Kieselgel 60* der Firma MACHEREY-NAGEL mit einer Partikelgröße von 0,063–0,040 mm als stationäre Phase verwendet und die Säulen nass gepackt. Die Zusammensetzung der Laufmittelgemische ist den jeweiligen Experimenten in Volumenanteilen zu entnehmen. Alle Säulenchromatographien wurden mittels Stickstoffdruck durchgeführt und das Kieselgel bei säureempfindlichen Produkten mit Et₃N (0,1 %) deaktiviert.

Abbildungen in Kapitel 2 mit biologischen Motiven wurden mit dem Programm BioRender angefertigt.

6.2 Synthese von cAzadC

tert-Butyl (1*R*, 4*S*)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxylat (**39**)

**39**C₁₁H₁₅NO₃

209,25 g/mol

Gemäß der Literatur^[296] wurde (1*R*, 4*S*)-VINCE-Lactam (**38** 10,0 g, 91,7 mmol, 1,00 Äq.) in abs. THF (126 mL) gelöst, DMAP (11,2 g, 91,6 mmol, 1,00 Äq.) und flüssiges Boc₂O (39 mL, 183 mmol, 2,00 Äq.) zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das erhaltene Öl direkt säulenchromatographisch (*iso*-Hexan:EtOAc / 9:1 → 6:4) gereinigt. Das geschützte Lactam **39** (19,2 g, 91,7 mmol) wurde als farbloser Feststoff in quantitativer Ausbeute erhalten.

R_f = 0,47 (*iso*-Hexan:EtOAc / 7:3).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.88 (dd, *J* = 5.3, 2.3 Hz, 1H, H-4), 6.65 (ddd, *J* = 5.1, 3.3, 1.5 Hz, 1H, H-3), 4.95 (h, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-5), 3.38 (dq, *J* = 4.5, 2.0, 1.5 Hz, 1H, H-2), 2.34 (dt, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 1H, H-7a), 2.14 (dt, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H, H-7b), 1.49 (s, 9H, H-10) ppm.

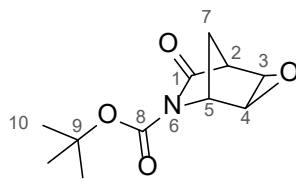
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 176,4 (C-1), 150,5 (C-8), 140,1 (C-4), 138,3 (C-3), 82,7 (C-9), 62,5 (C-5), 55,1 (C-7), 54,6 (C-2), 28,2 (C-10) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 2977,6 (w), 1750,4 (s), 1702,9 (s), 1562,1 (w), 1474, 4 (w), 1458,6 (m), 1392,5 (w), 1365,2 (m), 1329,3 (s), 1304, 9 (s), 1221,5 (m), 1194, 2 (m), 1165,5 (m), 1152,5 (s), 1135,3 (s), 1120,9 (s), 1086,4 (m), 1017,4 (m), 994,5 (s), 964,3 (w), 937,0 (m), 903,9 (m), 888,1 (m), 855,1 (s), 777,5 (s), 763,1 (s), 705,6 (s), 656,7 (m), 613,6 (m), 461,3 (m), 445,5 (m), 411,0 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₁H₁₅O₃NNa]⁺, [M+Na]⁺: berechnet: 232,09441, gefunden: 232,09458.

Schmelzpunkt: 86,5 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[296] überein.

tert-Butyl (1S, 2R, 4S, 5R)-7-oxo-3-oxa-6-azatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octan-6-carboxylat (40)**40**C₁₁H₁₅NO₄

225,24 g/mol

Gemäß der Literatur^[296] wurde das geschützte Lactam **39** (66,1 g, 316 mmol, 1,00 Äq.) in DCM (1580 mL) gelöst und *m*-CPBA (77 %ig; 177 g, 790 mmol, 2,50 Äq.) zugegeben. Nach 24 h Rühren bei RT wurde das Gemisch mit gesättigter wässriger Na₂CO₃-Lösung (5 × 700 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (5 × 700 mL) und *brine*-Lösung (400 mL) gewaschen. Nach Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Toluol:EtOAc / 9:1 → 3:2) gereinigt. Das Epoxid **40** (59,2 g, 263 mmol) wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 83 % erhalten.

R_f = 0,66 (Toluol:EtOAc / 2:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.61 (p, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-5), 3.76 (dd, *J* = 3.6, 1.3 Hz, 1H, H-4), 3.60 (dd, *J* = 3.7, 1.6 Hz, 1H, H-3), 3.05 (p, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2), 1.80 (dt, *J* = 10.3, 1.7 Hz, 1H, H-7a), 1.62 (dt, *J* = 10.4, 1.8 Hz, 1H, H-7b), 1.51 (s, 9H, H-10) ppm.

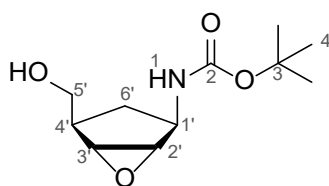
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 173,6 (C-1), 149,5 (C-8), 83,4 (C-9), 59,0 (C-5), 53,2 (C-4), 50,1 (C-3), 48,4 (C-2), 28,1 (C-10), 27,2 (C-7) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 2989,1 (w), 1763,3 (s), 1702,9 (s), 1460,1 (w), 1366,7 (s), 1329,3 (s), 1303,4 (s), 1256,0 (s), 1212,9 (s), 1192,8 (m), 1151,1 (s), 1135,3 (s), 1116,6 (s), 1096,5 (s), 1007,4 (s), 990,1 (m), 934,1 (s), 892,4 (w), 855,1 (s), 837,8 (s), 817,7 (m), 801,9 (m), 770,3 (s), 751,6 (s), 714,2 (m), 628,0 (s), 600,7 (m), 527,4 (w), 464,2 (m) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₁₁H₁₅O₄NNa]⁺, [M+Na]⁺: berechnet: 248,23322, gefunden: 248,08974.

Schmelzpunkt: 119,7 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[296] überein.

tert-Butyl ((1S, 2R, 4R, 5R)-4-(hydroxymethyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-yl)carbammat (41)**41**

$C_{11}H_{19}NO_4$
229,28 g/mol

Gemäß der Literatur^[296] wurde das Epoxid **40** (59,2 g, 263 mmol, 1,00 Äq.) in abs. MeOH (877 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und portionsweise $NaBH_4$ (49,8 g, 1,32 mol, 5,00 Äq.) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit 10 % AcOH in MeOH (850 mL) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung aufgenommen und mit DCM (4 × 500 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (700 mL) gewaschen. Nach Trocknen ($MgSO_4$) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der primäre Alkohol **41** (51,2 g, 223 mmol) als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 85 % erhalten.

$R_f = 0,50$ (Toluol:EtOAc / 1:1).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 6.09$ – 5.81 (m, 1H, H-1), 4.25 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-1'), 3.90 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5'a), 3.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5'b), 3.42 (s, 2H, H-3', H-2'), 2.43 – 2.35 (m, 1H, H-4'), 2.10 (dt, $J = 16.6, 8.6$ Hz, 1H, H-6'a), 1.44 (s, 10H, H-6'b, H-4) ppm.

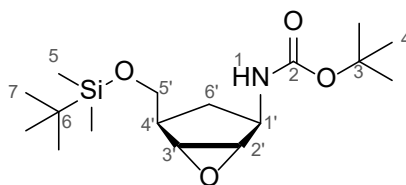
^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155,6$ (C-2), $79,4$ (C-3), $63,3$ (C-5'), $59,9$ (C-2'/C-3'), $59,6$ (C-2'/C-3'), $49,8$ (C-1'), $40,3$ (C-4'), $33,1$ (C-6'), $28,6$ (C-4) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3408,7$ (m), $3334,0$ (m), $2979,0$ (w), $2951,7$ (w), $2911,5$ (w), $1690,0$ (s), $1526,2$ (s), $1474,4$ (m), $1454,3$ (w), $1438,5$ (w), $1395,4$ (m), $1368,1$ (s), $1352,3$ (m), $1333,6$ (m), $1314,9$ (s), $1281,9$ (s), $1257,4$ (s), $1231,6$ (s), $1212,9$ (m), $1171,2$ (s), $1142,5$ (m), $1120,9$ (m), $1093,6$ (w), $1053,4$ (m), $1033,3$ (m), $1011,7$ (s), $975,8$ (m), $962,8$ (m), $921,2$ (w), $911,1$ (w), $859,4$ (m), $840,7$ (s), $790,4$ (m), $777,5$ (m), $740,1$ (w), $668,2$ (s), $613,6$ (s), $574,8$ (s), $452,7$ (m), $423,9$ (w), $409,6$ (w), $400,9$ (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z für $[C_{11}H_{19}O_4NCl]^-$, $[M+Cl]^-$: berechnet: 264,10081, gefunden: 264,10092.

Schmelzpunkt: 129,7 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[296] überein.

tert-Butyl ((1S, 2R, 4R, 5R)-4-(((tert-butylidimethyl- λ^4 -sulfanyl)oxy)methyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl)carbamate (42**)****42**C₁₇H₃₃NO₄Si

343,54 g/mol

Gemäß der Literatur^[296] wurde der primäre Alkohol **41** (22,8 g, 99,4 mmol, 1,00 Äq.) in abs. DMF (270 mL) gelöst, Imidazol (14,9 g, 219 mmol, 2,20 Äq.) und TBSCl (33,0 g, 219 mmol, 2,20 Äq.) zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit EtOAc (1100 mL) verdünnt, mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (3 × 750 mL) und *brine*-Lösung (4 × 500 mL) gewaschen. Nach Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Toluol:EtOAc / 95:5 → 9:1) gereinigt. Der geschützte Alkohol **42** (34,3 g, 98,3 mmol) wurde als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 99 % erhalten.

R_f = 0,48 (Toluol:EtOAc / 9:1).

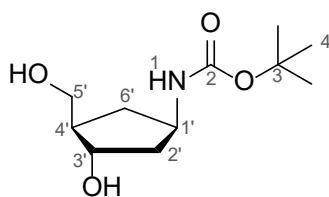
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.71 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-1), 4.24 (dd, *J* = 9.9, 8.0 Hz, 1H, H-1'), 3.87 (dd, *J* = 10.5, 2.4 Hz, 1H, H-5'a), 3.64 (dd, *J* = 10.5, 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 3.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-2'), 3.33 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 2.35 (dt, *J* = 9.3, 2.9 Hz, 1H, H-4'), 2.10 (dt, *J* = 14.4, 8.7 Hz, 1H, H-6'a), 1.43 (s, 10H, H-4, H-6'b), 0.92 (s, 9H, H-7), 0.13 (d, *J* = 3.1 Hz, 6H, H-5) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 155,4 (C-2), 79,2 (C-3), 64,9 (C-5'), 60,0 (C-3'), 59,6 (C-2'), 49,7 (C-1'), 40,9 (C-4'), 33,5 (C-6'), 28,6 (C-4), 26,3 (C-7), 18,9 (C-6), -5,2 (C-5a), -5,4 (C-5b) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3382,9 (w), 2930,2 (w), 2859,8 (w), 1705,8 (s), 1506,1 (s), 1471,6 (m), 1441,4 (w), 1391,1 (w), 1366,7 (m), 1320,7 (m), 1254,6 (m), 1235,9 (w), 1215,8 (w), 1165,5 (s), 1126,7 (m), 1093,6 (w), 1044,8 (m), 1016,0 (s), 984,4 (m), 968,6 (w), 928,4 (w), 862,2 (m), 834,9 (s), 824,9 (s), 813,4 (m), 796,1 (m), 780,3 (s), 701,3 (m), 663,9 (m), 582,0 (w), 551,8 (m), 451,2 (w), 409,6 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁻): *m/z* für [C₁₇H₃₃O₄NSiCl]⁻, [M+Cl]⁻: berechnet: 378,18729, gefunden: 378,18791.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[296] überein.

tert-Butyl ((1R, 3S, 4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)carbamat (43)**43**C₁₁H₂₁NO₄

231,29 g/mol

Gemäß der Literatur^[296] wurde der geschützte Alkohol **42** (15 g, 43,7 mmol, 1,00 Äq.) in abs. Toluol (520 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Red-Al (70 wt% in Toluol; 24,3 mL, 87,3 mmol, 2,00 Äq.) wurde langsam zugegeben, das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch für 1,5 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (600 mL) beendet und die wässrige Phase mit EtOAc (500 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit *brine*-Lösung (2 × 400 mL) gewaschen und mit EtOAc (2 × 500 mL) reextrahiert. Nach Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt mit kaltem *iso*-Hexan gewaschen. Der Alkohol **43** (8,38 g, 36,23 mmol) wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 83 % erhalten.

R_f = 0,51 (DCM:MeOH / 9:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.62 (br. s, 1H, H-1), 4.18 (qd, *J* = 6.6, 3.4 Hz, 1H, H-3'), 4.13 (br. s, 1H, H-1'), 3.82 (dt, *J* = 9.9, 4.8 Hz, 1H, H-5'a), 3.61 (ddd, *J* = 10.3, 7.8, 4.5 Hz, 1H, H-5'b), 2.29 (dt, *J* = 14.0, 7.8 Hz, 1H, H-6'a), 2.12 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, C-3'OH), 2.08–1.94 (m, 2H, H-4', H-2'a), 1.89–1.80 (m, 2H, H-2'b, C-5'OH), 1.43 (s, 9H, H-4), 1.12 (ddd, *J* = 13.2, 9.7, 7.7 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

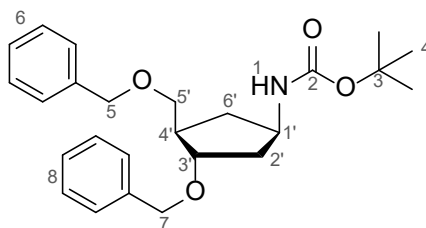
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 155,5 (C-2), 79,6 (C-3), 75,6 (C-3'), 65,6 (C-5'), 49,3 (C-1'), 48,7 (C-4'), 42,2 (C-2'), 34,6 (C-6'), 28,6 (C-4) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3369,9 (m), 3279,4 (m), 2967,5 (m), 2928,7 (m), 2361,1 (w), 1684,2 (s), 1524,7 (s), 1438,5 (m), 1391,1 (m), 1363,8 (s), 1335,0 (m), 1294,8 (m), 1279,0 (s), 1251,7 (m), 1230,1 (m), 1174,1 (s), 1158,3 (s), 1109,4 (m), 1090,7 (m), 1080,7 (m), 1050,5 (s), 1043,3 (s), 1014,6 (s), 978,6 (m), 916,9 (m), 865,1 (w), 855,1 (w), 832,1 (m), 778,9 (m), 745,8 (m), 668,2 (w), 620,8 (s), 462,7 (m), 432,6 (m) cm⁻¹.

HRMS (ESI): *m/z* für [C₁₁H₂₁O₄NCl]⁻, [M+Cl]⁻: berechnet: 266,11646, gefunden: 266,11662.

Schmelzpunkt: 122,6 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[296] überein.

tert-Butyl ((1R, 3S, 4R)-3-(benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentyl)carbamat (44)**44**

$C_{25}H_{33}NO_4$
411,54 g/mol

Gemäß der Literatur^[6] wurde der freie Alkohol **43** (16,9 g, 73,0 mmol, 1,00 Äq.) in abs. DMF (406 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und NaH (60 wt%; 6,43 g, 161 mmol, 2,20 Äq.) zugegeben. Nach 40 min Rühren bei 0 °C wurde BnBr (21,7 mL, 183 mmol, 2,50 Äq.) bei RT zugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h gerührt. Das Gemisch wurde mit DCM (200 mL) verdünnt, die Reaktion durch Zugabe gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (200 mL) beendet und die wässrige Phase mit DCM (2 × 450 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (5 × 500 mL) und *brine*-Lösung (500 mL) gewaschen. Nach Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (*iso*-Hexan:EtOAc / 9:1 → 3:2) gereinigt. Das geschützte Diol **44** (20,7 g, 50,4 mmol) wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 69 % erhalten.

$R_f = 0,64$ (*iso*-Hexan:EtOAc / 8:2).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.38\text{--}7.27$ (m, 10H, H-6, H-8), 4.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1), 4.50 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H, H-5/H-7), 4.41 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-5/H-7), 4.20–4.09 (m, 1H, H-1'), 3.92 (p, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-3'), 3.47 (qd, $J = 9.2, 3.9$ Hz, 2H, H-5'), 2.29 (tt, $J = 9.2, 5.7$ Hz, 2H, H-6'a, H-4'), 2.08 (ddd, $J = 13.3, 6.8, 4.6$ Hz, 1H, H-2'a), 1.80–1.69 (m, 1H, H-2'b), 1.42 (s, 9H, H-4), 1.30–1.20 (m, 1H, H-6'b) ppm.

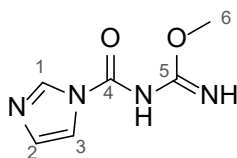
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 155,5$ (C-2), 138,7 (C-8/C-6), 138,4 (C-8/C-6), 128,5 (C-8/C-6), 127,8 (C-8/C-6), 127,7 (C-8/C-6), 127,6 (C-8/C-6), 81,0 (C-3'), 79,1 (C-3), 73,3 (C-7), 71,8 (C-5'), 71,2 (C-5), 50,2 (C-1'), 44,9 (C-4'), 39,6 (C-2'), 34,9 (C-6'), 28,6 (C-4) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3364,2$ (w), 2967,5 (w), 1867,0 (w), 2361,1 (w), 1675,6 (s), 1529,0 (s), 1497,4 (m), 1455,8 (m), 1389,6 (m), 1365,2 (s), 1348,0 (m), 1306,3 (m), 1289,1 (s), 1268,9 (m), 1247,4 (m), 1208,6 (s), 1165,5 (m), 1109,4 (s), 1079,2 (s), 1064,9 (m), 1043,3 (m), 1027,5 (s), 1018,9 (m), 1004,5 (m), 998,8 (m), 951,3 (w), 924,0 (w), 908,2 (w), 856,5 (w), 780,3 (w), 732,9 (s), 695,5 (s), 630,9 (m), 610,8 (m), 474,2 (m), 462,7 (m), 411,0 (m) cm⁻¹.

Schmelzpunkt: 55,6 °C.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₂₅H₃₄O₄N]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 412,24824, gefunden: 412,24861.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[6] überein.

Methyl (1*H*-imidazol-1-carbonyl)carbamimidat (47)**47**C₆H₈N₄O₂

168,16 g/mol

Gemäß der Literatur^[6] wurde *O*-Methylisoureahydrochlorid (**45**; 10 g, 90,5 mmol, 1,00 Äq.) in Et₂O/H₂O (39:1, 160 mL) gelöst, auf -15 °C gekühlt und KOH Pulver (101,6 g, 1810 mmol, 20 Äq.) zugegeben. Nach 30 min Rühren bei -15 °C wurde das Gemisch unter Argonstrom filtriert und der Feststoff mit kaltem Et₂O (3 × 100 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde auf 30 mL eingeeengt und bei -20 °C auskristallisiert. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Das freie *O*-Methylisourea **46** (3,54 g, 47,8 mmol) wurde mit einer Ausbeute von 53 % als farbloser Feststoff erhalten. Auf Grund der Oxidationsempfindlichkeit des Zwischenproduktes wurde dieses ohne weitere Analytik direkt im nächsten Schritt umgesetzt.

Das freie Amin wurde in abs. THF (278 mL) gelöst, Carbonyldiimidazol (21,6 g, 133 mmol, 1,07 Äq.) zugegeben und das Gemisch bei RT für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Feststoff mit kaltem abs. THF (30 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 98:2 → 94:6) gereinigt. Das Carbonylimidazol **47** (15,7 g, 93 mmol) wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 34 % über zwei Schritte erhalten.

R_f = 0,57 (DCM:MeOH / 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.61 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, H-1), 7.58 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-3), 7.03 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-2), 5.91 (s, 1H, NH), 3.96 (s, 3H, H-6) ppm.

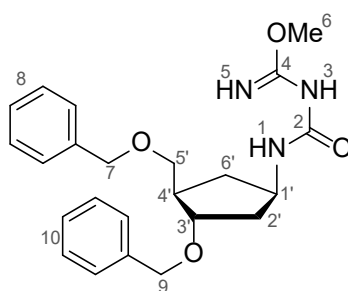
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 165,6 (C-5), 157,4 (C-4), 137,5 (C-1), 130,1 (C-2), 117,1 (C-3), 55,3 (C-6) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3339,7 (m), 3125,6 (m), 3015,0 (m), 2963,2 (m), 1649,8 (s), 1498,9 (s), 1474,4 (s), 1460,1 (m), 1363,8 (s), 1327,9 (s); 1313,5 (s), 1300,6 (s), 1254,6 (m), 1205,7 (s), 1177,0 (s), 1090,7 (s), 1062,0 (s), 1040,4 (s), 997,3 (m), 911,1 (m), 879,5 (w), 849,3 (s), 780,3 (s), 755,9 (s), 744,4 (s), 688,3 (s), 652,4 (s), 615,1 (s), 603,6 (s), 531,7 (s), 503,0 (m), 436,9 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₆H₉O₂N₄]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 169,07200, gefunden: 169,07187.

Schmelzpunkt: 143,1 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[6] überein.

1-[(1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-Benzyloxy-4-(benzyloxymethyl)-cyclopentyl]-methylisobiuret (**48**)**48**

$C_{23}H_{29}N_3O_4$
411,50 g/mol

Gemäß der Literatur^[6] wurde der geschützte Alkohol **44** (1,11 g, 2,71 mmol, 1,00 Äq.) in abs. DCM (9 mL) gelöst und langsam TFA (3,58 mL, 30 vol% insgesamt) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* (Rotationsverdampfer unter Argon) entfernt. Der Rückstand wurde in entgaster, gesättigter wässriger Na_2CO_3 -Lösung (60 mL, Na_2CO_3 -Lösung wurde für 1,5 h mit Argon geflutet) aufgenommen und mit EtOAc (3 × 50 mL; EtOAc wurde für 2 h mit Argon geflutet) unter Argon extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ($MgSO_4$), das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt für 1 h am Hochvakuum weiter getrocknet. Das dabei entstandene freie Amin wurde in abs. MeCN (25 mL) gelöst, Carbonylimidazol **47** (0,50 g, 2,98 mmol, 1,10 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (*iso*-Hexan:EtOAc / 7:3 → 1:1) gereinigt. Das geschützte Isobiuret **48** (722 mg, 1,75 mmol) wurde als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 65 % über zwei Schritte erhalten.

$R_f = 0,24$ (*iso*-Hexan:EtOAc / 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.38\text{--}7.27$ (m, 10H, H-8/H-10), 5.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1), 4.55–4.49 (m, 3H, H-7/H-9), 4.42 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-7/H-9), 4.30 (p, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-1'), 3.94 (dt, $J = 6.7, 4.3$ Hz, 1H, H-3'), 3.66 (s, 3H, H-6), 3.53–3.42 (m, 2H, H-5'), 2.40–2.26 (m, 2H, H-6'a, H-4'), 2.17–2.09 (m, 1H, H-2'a), 1.78 (dt, $J = 13.6, 7.0$ Hz, 1H, H-2'b), 1.39–1.28 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 163,7$ (C-2), 162,3 (C-4), 138,8 (C-8/C-10), 138,5 (C-8/C-10), 128,5 (C-8/C-10), 128,4 (C-8/C-10), 127,7 (C-8/C-10), 127,6 (C-8/C-10), 127,5 (C-8/C-10), 81,0 (C-3'), 73,2 (C-7), 71,8 (C-5'), 71,2 (C-9), 53,7 (C-6), 49,4 (C-1'), 44,9 (C-4'), 39,4 (C-2'), 34,9 (C-6') ppm.

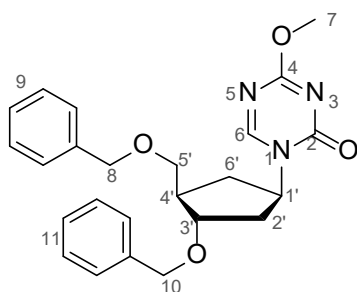
ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3371,8$ (w), 3290,9 (w), 2948,9 (w), 2858,3 (w), 2361,1 (w), 1736,0 (w), 1628,2 (s), 1494,6 (s), 1454,3 (s), 1419,8 (w), 1362,3 (s), 1289,1 (s), 1233,0 (m), 1189,9 (m), 1090,7 (s), 1067,7 (s), 1027,5 (s), 1001,6 (m), 908,2 (w), 876,6 (w), 799,0 (m), 734,3 (s), 697,0 (s), 668,2 (8w), 603,6 (w), 457,0 (w), 409,6 (w) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_{23}H_{30}O_4N_3]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 412,22308, gefunden: 412,22320.

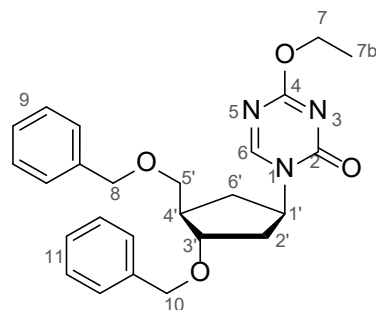
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[6] überein.

1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-(benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentyl)-4-methoxy-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (49)

1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-(benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentyl)-4-ethoxy-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (50)

**49**

$C_{24}H_{27}N_3O_4$
421,50 g/mol

**50**

$C_{25}H_{29}N_3O_4$
435,52 g/mol

Gemäß der Literatur^[6] wurde das geschützte Isobiuret **48** (3,42 g, 8,31 mmol, 1,00 Äq.) in Triethylorthoformiat (55 mL) gelöst, eine katalytische Menge TFA (106 μ L) zugegeben und das Gemisch für 3 h bei 90 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und Coevaporation mit abs. MeOH (18 mL) wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (*iso*-Hexan:EtOAc / 7:3 \rightarrow 8:2) gereinigt. Das geschützte Triazin wurde in zwei Derivaten, einem Methoxy- **49** (2,28 g, 5,40 mmol) und einem Ethoxyether **50** (602 mg, 1,38 mmol), jeweils als gelbe Feststoffe mit einer Ausbeute von 65 % und 17 % erhalten.

Methoxyether 49:

$R_f = 0,20$ (*iso*-Hexan:EtOAc / 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.24$ (s, 1H, H-6), 7.39–7.27 (m, 10H, H-9/H-11), 4.98 (tt, $J = 9.9, 7.4$ Hz, 1H, H-1'), 4.54–4.42 (m, 4H, H-8/H-10), 4.03 (dt, $J = 6.3, 3.1$ Hz, 1H, H-3'), 4.00 (s, 3H, H-7), 3.58–3.48 (m, 2H, H-5'), 2.51–2.39 (m, 2H, H-6'a, H-4'), 2.28 (ddd, $J = 13.2, 7.6, 2.8$ Hz, 1H, H-2'a), 2.12 (ddd, $J = 13.2, 10.1, 6.3$ Hz, 1H, H-2'b), 1.78–1.70 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 169,8$ (C-4), 158,5 (C-6), 154,9 (C-2), 138,9 (C-9/C-11), 138,2 (C-9/C-11), 138,1 (C-9/C-11), 128,6 (2 \times , C-9/C-11), 127,9 (C-9/C-11), 127,8 (2 \times , C-9/C-11), 80,3 (C-3'), 73,4 (C-8 / C-10), 71,2 (C-8 / C-10, C-5'), 56,9 (C-1'), 56,0 (C-7), 44,9 (C-4'), 36,9 (C-2'), 32,5 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3030,8$ (w), 2928,7 (w), 2851,1 (w), 2833,9 (w), 2361,10 (w), 2332,4 (w), 1701,5 (s), 1629,6 (s), 1508,9 (s), 1497,4 (m), 1465,8 (s), 1452,9 (m), 1415,5 (s), 1404,0 (s), 1353,7 (m), 1337,9 (s), 1329,3 (s), 1306,3 (m), 1256,0 (m), 1217,2 (m), 1204,3 (m), 1175,5 (m), 1126, 7 (s), 1085,0 (m), 1073,5 (m), 1041,9 (s), 1027,5 (s), 1003,1 (w), 993,0 (w), 984,4 (w), 048,5 (w), 912,5 (w), 899,6 (w), 849,3 (w), 800,5 (s), 751,6 (m), 732,9 (m), 722,8 (s), 698,4 (s), 689,8 (s), 665,4 (m), 612,2 (w), 600,7 (m), 580,6 (m), 531,7 (m), 511,6 (w), 494,4 (w), 462,7 (m), 452,7 (m) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₂₄H₂₈O₄N₃]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 412,20743, gefunden: 412,20761.

Schmelzpunkt: 61,7 °C.

Ethoxyether 50:

$R_f = 0,25$ (*iso*-Hexan:EtOAc / 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.16$ (s, 1H, H-6), 7.31–7.20 (m, 10H, H-9, H-11), 4.90 (dt, $J = 10.0, 7.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.47–4.34 (m, 6H, H-7, H-8, H-10), 3.96 (dt, $J = 6.4, 3.1$ Hz, 1H, 3'), 3.47 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H, H-5'), 2.40–2.34 (m, 2H, H-6'a, H-4'), 2.21 (ddd, $J = 13.2, 7.6, 2.8$ Hz, 1H, H-2'a), 2.05 (ddd, $J = 13.2, 10.1, 6.4$ Hz, 1H, H-2'b), 1.69–1.65 (m, 1 H, H-6'b), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-7b) ppm.

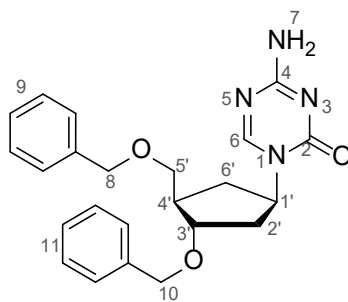
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,4$ (C-2), 158,6 (C-6), 155,0 (C-4), 138,2 (C-9i/C-11i), 138,1 (C-9j/C-11j) 128,6 (C-9, C-11), 127,9 (C-9, C-11), 127,8 (C-9, C-11), 80,4 (C-3'), 73,5 (C-8, C-10), 71,3 (C-5'), 65,1 (C-7), 56,9 (C-1'), 44,9 (C-4'), 36,9 (C-2'), 32,6 (C-6'), 14,2 (C-7b) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3061,0$ (w), 3033,7 (w), 2973,3 (w), 2927,3 (w), 2856,9 (w), 2792,2 (w), 1685,7 (s), 1626,8 (s), 1510,4 (s), 1481,6 (m), 1441,4 (s), 1417,0 (m), 1389,6 (m), 1366,7 (m), 1356,6 (m), 1320,7 (s), 1260,3 (m), 1247,4 (m), 1237,3 (m), 1200,0 (m), 1165,5 (m), 1122,4 (m), 1089,3 (s), 1059,1 (s), 1040,4 (m), 1027,5 (s), 1006,0 (m), 988,7 (m), 972,9 (m), 911,1 (m), 865,1 (m), 846,4 (w), 819,1 (w), 801,9 (s), 754,5 (s), 741,5 (s), 695,5 (s), 662,5 (m), 616,5 (m), 606,4 (m), 540,3 (m), 513,0 (w), 494,4 (m), 475,7 (m), 461,3 (m), 439,7 (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{N}_3]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 436,22309, gefunden: 436,22371.

Schmelzpunkt: 105,6 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[6] überein.

4-Amino-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-(benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (51)**51**

$C_{23}H_{26}N_4O_3$
406,49 g/mol

Gemäß der Literatur^[6] wurde das geschützte Triazin **49** (1,71 g, 4,06 mmol, 1,00 Äq.) in NH_3 -Lösung (7 N in MeOH; 63 mL) gelöst und 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (357 mL) beendet und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 210 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das freie Amin **51** (1,64 g, 4,04 mmol) als farbloser zäher Schaum mit einer quantitativen Ausbeute erhalten.

$R_f = 0,24$ (DCM:MeOH / 98:2).

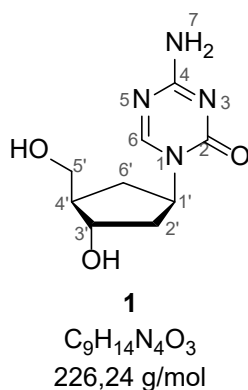
¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.02$ (s, 1H, H-6), 7.38–7.27 (m, 10H, H-9/H-11), 7.14 (s, 1H, H-7a), 5.70 (s, 1H, H-7b), 4.87 (qd, $J = 9.9, 7.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.54–4.41 (m, 4H, H-8/H-10), 4.01 (dt, $J = 6.5, 3.3$ Hz, 1H, H-3'), 3.53 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, H-5'), 2.46–2.32 (m, 2H, H-6'a, H-4'), 2.24 (ddd, $J = 13.2, 7.6, 2.9$ Hz, 1H, H-2'a), 2.13 (ddd, $J = 13.2, 10.0, 6.5$ Hz, 1H, H-2'b), 1.82–1.70 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 165,9$ (C-4), 157,0 (C-6), 154,4 (C-2), 138,3 (2 ×, C-9/C-11), 128,6 (C-9/C-11), 128,5 (C-9/C-11), 127,8 (3 ×, C-9/C-11), 80,3 (C-3'), 73,3 (C-8/C-10), 71,4 (C-5'), 71,2 (C-8, C-10), 56,7 (C-1'), 44,9 (C-4'), 36,8 (C-2'), 32,5 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3322,5$ (w), 3188,9 (w), 3088,3 (w), 3063,8 (w), 3030,8 (w), 2927,3 (w), 2858,3 (w), 1631,1 (s), 1496,0 (s), 1471,6 (s), 1452,9 (s), 1402,6 (m), 1359,5 (m), 1303,4 (m), 1251,7 (m), 1207,1 (m), 1155,4 (m), 1089,3 (s), 1066,3 (s), 1027,5 (m), 1001,6 (m), 925,5 (w), 797,6 (s), 734,3 (s), 695,5 (s), 597,8 (m), 445,5 (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_{23}H_{27}O_3N_4]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 412,20777, gefunden: 407,20819.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[6] überein.

4-Amino-1-((1R, 3S, 4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1H)-on (1)

Gemäß der Literatur^[6] wurde das freie Amin **51** (1,64 g, 4,04 mmol, 1,00 Äq.) in abs. DCM (101 mL) gelöst, auf -78 °C gekühlt und tropfenweise BCl₃-Lösung (1 M in DCM; 14,1 mL) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei -78 °C wurde das Gemisch auf RT erwärmt und weitere 2 h gerührt. Nach Zugabe von MeOH (95 mL) und weiteren 20 min Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 9:1 → 7:3) gereinigt. Das freie cAzadC (**1**, 914 mg, 4,04 mmol) wurde als leicht gelber Feststoff mit einer quantitativen Ausbeute erhalten.

R_f = 0,31 (DCM:MeOH / 7:3).

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ = 8.47 (s, 1H, H-6), 4.93–4.81 (m, 1H, H-1'), 4.25 (ddd, J = 7.4, 5.9, 4.7 Hz, 1H, H-3'), 3.75 (dd, J = 11.2, 5.6 Hz, 1H, H-5'a), 3.64 (dd, J = 11.2, 6.7 Hz, 1H, H-5'b), 2.44–2.35 (m, 1H, H-6'a), 2.30 (ddd, J = 14.0, 8.7, 7.5 Hz, 1H, H-2'a), 2.13 (ddd, J = 14.2, 8.0, 2.9 Hz, 2H, H-2'b, H-4'), 1.75 (dt, J = 12.8, 10.2 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ = 160,7 (C-4), 160,2 (C-6), 149,5 (C-2), 72,0 (C-3'), 62,6 (C-5'), 57,0 (C-1'), 48,1 (C-4'), 37,7 (C-2'), 31,7 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3290,9 (m), 3038,0 (m), 2934,5 (m), 2875,6 (m), 2544,2 (m), 1767,6 (m), 1695,7 (s), 1677,1 (s), 1611,0 (s), 1559,2 (w), 1521,9 (s), 1458,6 (w), 1406,9 (s), 1320,7 (m), 1296,2 (m), 1245,9 (m), 1188,5 (w), 1166,9 (w), 1138,2 (m), 1063,4 (s), 1041,9 (s), 1013,1 (s), 994,5 (s), 919,7 (m), 873,7 (m), 813,4 (m), 771,7 (s), 744,4 (m), 721,4 (m), 616,5 (s), 546,1 (w), 501,5 (w), 423,9 (w), 409,6 (m) cm⁻¹.

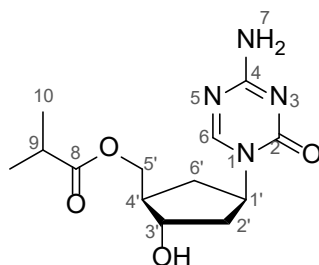
HRMS (ESI⁺): m/z für [C₉H₁₅O₃N₄]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 227,11387, gefunden: 227,11411.

Schmelzpunkt: 144,7 °C.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[6] überein.

6.3 Synthese der Prodrugs

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl isobutyrat (52a)



52a

$C_{13}H_{20}N_4O_4$

296,33 g/mol

Gemäß der Literatur^[498] wurde cAzadC (**1**, 50 mg, 221 μ mol, 1,00 Äq.) in abs. MeCN gelöst, DMAP (1,00 mg, 44,0 μ mol, 0,20 Äq.) sowie DBU (69 μ L, 464 μ mol, 2,10 Äq.) zugegeben und für 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt und langsam Isobuttersäureanhydrid (40 μ L, 243 μ mol, 1,10 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde für 2 h gerührt und dabei auf RT erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in etwas DCM aufgenommen, Celite zugegeben und das Lösungsmittel erneut *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 49:1 \rightarrow 9:1) und im Anschluss per semipräparativer HPLC (10 % \rightarrow 60 % MeCN + 0.01 % FA, t_R 12,1 min) gereinigt. Der Isobuttersäureester **52a** (10 mg, 34 μ mol) wurde mit einer Ausbeute von 15 % als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0,23$ (DCM:MeOH / 46:4).

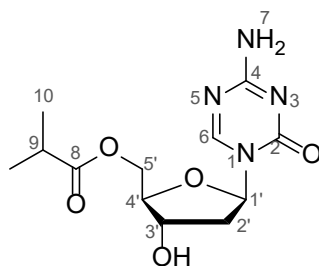
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.05 (s, 1H, H-6), 7.20 (s, 1H, H-7a), 6.16 (s, 1H, H-7b), 4.83 (p, J = 8.6 Hz, 1H, H-1'), 4.32 (q, J = 6.1 Hz, 1H, H-3'), 4.24–4.17 (m, 2H, H-5'), 2.56 (hept, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 2.35 (dt, J = 12.5, 7.5 Hz, 1H, H-6'a), 2.30–2.23 (m, 2H, H-4', H-2'a), 2.17 (ddd, J = 13.7, 8.9, 5.0 Hz, 1H, H-2'b), 1.75 (dt, J = 11.9, 9.9 Hz, 1H, H-6'b), 1.17 (s, 3H, H-10a), 1.15 (s, 3H, H-10b) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 177,5 (C-8), 166,0 (C-4), 157,2 (C-6), 154,4 (C-2), 73,1 (C-3'), 65,2 (C-5'), 56,2 (C-1'), 46,5 (C-4'), 39,2 (C-2'), 34,1 (C-9), 33,0 (C-6'), 19,2 (C-10a), 19,1 (C-10b) ppm.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ = 3396,0 (m), 3203,7 (m), 2873,4 (m), 2875,6 (m), 2358,5 (w), 1726,2 (s), 1660,3 (s), 1628,3 (s), 1476,3 (s), 1403,9 (w), 1387,4 (m), 1327,8 (m), 1296,9 (w), 1255,5 (w), 1195,8 (s), 1154,5 (s), 1098,2 (w), 1067,2 (w), 1033,9 (m), 993,6 (m), 945,4 (w), 801,3 (s), 734,7 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₁₃H₂₁O₄N₄]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 297,15573, gefunden: 297,15591.

Schmelzpunkt: 118,2 °C.

((2R, 3S, 5R)-5-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2H)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl isobutyrat (52b)**52b**C₁₂H₁₈N₄O₅

298,30 g/mol

Gemäß der Literatur^[498] wurde Decitabin (**24**, 50 mg, 219 µmol, 1,00 Äq.) in abs. MeCN (0,88 mL) gelöst, DMAP (2,7 mg, 22 µmol, 0,10 Äq.) und DBU (34,3 µL, 230 µmol, 1,05 Äq.) zugegeben und bei RT für 5 min gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf -40 °C gekühlt, Isobuttersäureanhydrid (18,3 µL, 110 µmol, 0,50 Äq.) zugegeben und das Gemisch bei 0 °C für 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM → DCM:MeOH / 8:2) sowie anschließend per semipräparativer HPLC (10 % → 60 % MeCN+0,01 % FA in 45 min, *t_R* 11,6 min) gereinigt. Der Isobuttersäureester **52b** (4.6 mg, 44 µmol) wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 7 % erhalten.

R_f = 0.50 (DCM:MeOH / 8:2).

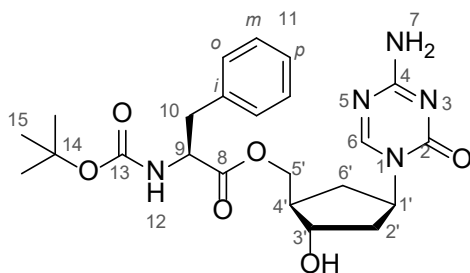
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.40 (s, 1H, H-6), 6.07 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-1'), 4.48 (dt, *J* = 6.6, 4.1 Hz, 1H, H-3'), 4.33–4.31 (m, 2H, H-5'), 4.30–4.27 (m, 1H, H-4'), 2.61–2.51 (m, 2H, H-2'a, H-9), 2.42 (dt, *J* = 14.3, 6.2 Hz, 1H, H-2'b), 1.08 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, H-10a), 1.07 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, H-10b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 179,7 (C-8), 165,7 (C-2), 156,3 (C-4), 155,5 (C-6), 87,3 (C-1'), 84,7 (C-4'), 70,4 (C-3'), 63,7 (C-5'), 39,7 (C-2'), 33,8 (C-9), 18,1 (C-10a), 17,9 (C-10b) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3335,4 (s), 3203,2 (s), 2976,2 (m), 1622,5 (s), 1506,1 (s), 1470,1 (s), 1389,6 (w), 1291,9 (m), 1191,3 (m), 1155,4 (s), 1082,1 (s), 797,6 (s), 750,2 (w), 597,8 (m) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₂H₁₈O₅N₄Na]⁺, [M+Na]⁺: berechnet: 321,11694, gefunden: 321,11686.

Schmelzpunkt: 42,1 °C.

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl pivaloyl-L-phenylalaninat (53**)****53**C₂₃H₃₁N₅O₅

457,53 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde Boc-Phe-OH (129 mg, 486 µmol, 1,10 Äq.) in abs. DMF gelöst, EDC · HCl (75 mg, 486 µmol, 1,10 Äq.) und DMAP (54 mg, 442 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde cAzadC (**1**, 100 mg, 442 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und das Gemisch bei 0 °C für 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* (Rotationsverdampferwasserbad 60 °C) entfernt und der Rückstand in EtOAc (60 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (80 mL), HCl (0,1 M, 80 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (80 mL) und *brine*-Lösung (80 mL) gewaschen. Die vereinigte wässrige Phase wurde anschließend mit EtOAc (100 mL) extrahiert. Nach Trocknen (MgSO₄) der vereinigten organischen Phasen und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM → DCM:MeOH / 9:1) gereinigt. Der geschützte Phenylalaninester **53** wurde mit einer Ausbeute von 45 % als farbloser Schaum erhalten

$R_f = 0,43$ (DCM:MeOH / 9:1).

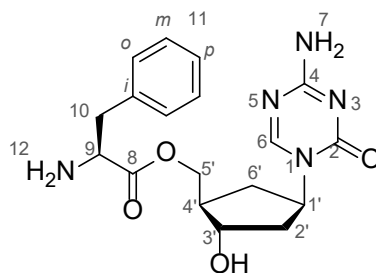
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 8.23 (s, 1H, H-6), 7.31–7.17 (m, 5H, H-11), 4.80–4.70 (m, 1H, H-1'), 4.38–4.32 (m, 1H, H-3'), 4.28 (dd, *J* = 11.0, 4.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.13 (dt, *J* = 7.4, 4.9 Hz, 1H, H-9), 4.08 (dd, *J* = 11.0, 5.9 Hz, 1H, H-5'b), 3.09 (dd, *J* = 13.7, 6.3 Hz, 1H, H-10a), 2.94 (dd, *J* = 13.7, 8.5 Hz, 1H, H-10b), 2.28–2.12 (m, 3H, H-4', H-6'a, H-2'a), 2.01 (ddd, *J* = 13.4, 8.8, 4.3 Hz, 1H, H-2'b), 1.67 (ddd, *J* = 13.0, 10.4, 2.9 Hz, 1H, H-6'b), 1.38 (s, 9H, H-15) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 173,9 (C-8), 167,6 (C-2), 159,1 (C-6), 157,8 (C-13), 156,7 (C-4), 138,4 (C-11*i*), 130,3 (C-12), 129,5 (C-12), 127,8 (C-12), 80,7 (C-14), 73,5 (C-9), 67,0 (C-5'), 57,5 (C-1'), 56,8 (C-3'), 47,4 (C-4'), 39,7 (C-2'), 38,6 (C-10), 33,4 (C-6'), 28,7 (C-15) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3125,5 (w), 3059,6 (w), 2979,8 (w), 2307,6 (w), 1686,1 (s), 1628,8 (s), 1497,9 (m), 1476,1 (m), 1408,7 (m), 1365,8 (m), 1251,8 (s), 1159,0 (s), 1079,9 (w), 1048,9 (m), 1021,9 (w), 928,3 (w), 855,7 (w), 799,8 (s), 750,9 (m), 700,2 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₂₃H₃₂O₆N₅]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 474,23471, gefunden: 474,23477.

Schmelzpunkt: 96,1 °C.

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl L-phenylalaninat (54**)****54**C₁₈H₂₃N₅O₄

373,41 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde das Boc-geschützte Nukleosid **53** (50 mg, 106 µmol, 1,00 Äq.) in DCM:TFA:Wasser (6:3:1, 0,36 mL), gelöst und bei RT für 5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und mit DCM (3 × 5 mL) coevaporiert. Das Rohprodukt wurde per semipräparativer HPLC (0 % → 30 % MeCN + 0.01 % FA in 45 min, *t_R* 14,5 min) gereinigt und der Phenylalaninester **54** (26,4 mg, 71 µmol) mit einer Ausbeute von 67 % als farbloser Feststoff erhalten.

R_f = 0,22 (DCM:MeOH / 9:1).

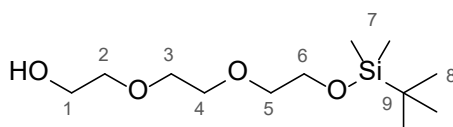
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.27 (s, 1H, H-6), 7.54 (br. s, 2H, H-12), 7.44–7.37 (m, 2H, H.7), 7.34–7.29 (m, 2H, H-11*m*), 7.24–7.21 (m, 3H, H-11*o*, H-11*p*), 4.92 (br. s, 1H, 3'-OH), 4.74–4.64 (m, 1H, H-1'), 4.26–4.19 (m, 2H, H-5'a, H-3'), 4.00 (dd, *J* = 10.8, 7.2 Hz, 1H, H-5'b), 3.98–3.94 (m, 1H, H-9), 3.04 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-10), 2.14–2.05 (m, 1H, H-2'a), 2.05–1.94 (m, 2H, H-4', H-6'a), 1.81 (ddd, *J* = 13.0, 8.7, 4.2 Hz, 1H, H-2'b), 1.48–1.37 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ = 170,1 (C-8), 165,8 (C-2), 157,8 (C-6), 153,7 (C-4), 135,2 (C-11*i*), 129,4 (C-11*o*), 128,6 (C-11*m*), 127,1 (C-11*p*), 71,3 (C-9), 66,9 (C-5'), 54,6 (C-1'), 53,7 (C-3'), 45,7 (C-4'), 38,4 (C-2'), 37,0 (C-10), 32,4 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3337,9 (w), 3198,5 (w), 2950,5 (w), 1743,7 (m), 1673,5 (s), 1634,0 (s), 1499,0 (s), 1479,5 (s), 1412,2 (w), 1289,5 (w), 1200,1 (s), 1176,3 (s), 1130,1 (s), 1081,9 (w), 1046,8 (w), 1025,1 (w), 1002,3 (w), 930,9 (w), 833,1 (m), 799,3 (s), 747,3 (m), 720,7 (s), 701,7 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₈H₂₄O₄N₅]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 374,18228, gefunden:374,18224.

Schmelzpunkt: 58,8 °C.

2, 2, 3, 3-Tetramethyl-4, 7, 10-trioxa-3-siladodecan-12-ol (56)**56** $C_{12}H_{28}O_4Si$
264,44 g/mol

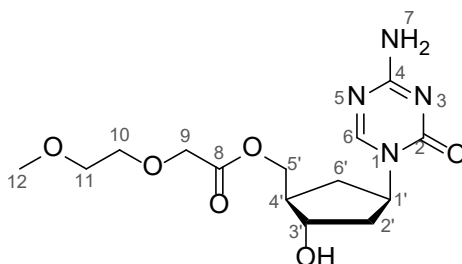
Gemäß der Literatur^[401] wurde Triethylenglycol (5,00 g, 33,3 mmol, 5,00 Äq.) in abs. DCM (10 mL) gelöst und DMAP (161 mg, 1,30 mmol, 0,20 Äq.) sowie TBSCl (1,00 g, 6,60 mmol, 1,00 Äq.) zugegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (50 mL) beendet und die wässrige Phase mit DCM (3 × 30 mL) extrahiert. Nach Trocknen ($MgSO_4$) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM → DCM/MeOH 9:1) gereinigt. Der geschützte Alkohol **56** (4,57 g, 15,9 mmol) wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 48 % erhalten.

$R_f = 0,29$ (DCM:MeOH / 98:2).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3.77$ (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, H-6), 3.74–3.71 (m, 2H, H-1), 3.67 (s, 4H, H-4, H-3), 3.61 (dd, $J = 5.3, 3.8$ Hz, 2H, H-2), 3.57 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, H-5), 0.89 (s, 9H, H-8), 0.06 (s, 6H, H-7) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 72,8$ (C-5), 72,6 (C-2), 70,9 (C-4), 70,6 (C-3), 62,8 (C-6), 62,0 (C-1), 26,1 (C-8), 18,5 (C-9), -5,1 (C-7) ppm.

Auf Grund der nicht entfernbaren Lösemittelrückstände wurde nur eine NMR-Analyse durchgeführt.

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl 2-(2-methoxyethoxy)acetat (58a**)****58a**C₁₄H₂₂N₄O₆

342,35 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure (38,6 µL, 340 µmol, 1,10 Äq.) in abs. DMF (3,1 mL) gelöst, EDC · HCl (53,0 mg, 340 µmol, 1,10 Äq.) und DMAP (38,0 mg, 309 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde cAzadC (**1**, 70 mg, 309 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, einmal mit Toluol (5 mL) coevaporiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM → DCM:MeOH / 9:1) gereinigt. Das erhaltene Produkt wurde per semipräparativer HPLC (2 % → 80 % TEEA Puffer B in 45 min, *t_R* 11,5 min) und anschließend per präparativer DC (DCM:MeOH / 8:2) gereinigt um den Ester **58a** (9,00 mg, 23,3 µmol) mit einer Ausbeute von 8 % als farbloses Öl erhalten.

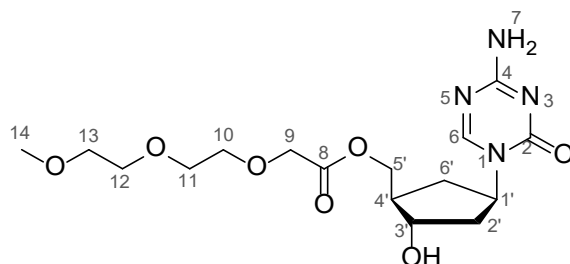
R_f = 0,58 (DCM:MeOH / 43:7).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.26 (s, 1H, H-6), 4.74 (p, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-1'), 4.33–4.25 (m, 3H, H-5', H-3'), 4.23 (s, 2H, H-10), 3.73–3.70 (m, 2H, H-11), 3.63–3.59 (m, 2H, H-12), 3.34 (s, 3H, H-12), 2.38–2.32 (m, 1H, H-6'a), 2.31–2.23 (m, 2H, H-4', H-2'a), 2.09 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 5.2 Hz, 1H, 2'b), 1.79–1.71 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 172,4 (C-8), 165,5 (C-4), 158,6 (C-6), 156,2 (C-2), 72,3 (C-3'), 70,9 (C-11), 70,1 (C-10), 67,7 (C-9), 65,9 (C-5'), 58,0 (C-12), 56,2 (C-1'), 45,1 (C-4'), 37,8 (C-2'), 31,6 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3329,7 (w), 3201,8 (w), 2928,7 (w), 1744,6 (m), 1626,8 (s), 1504,6 (s), 1471,6 (s), 1284,7 (m), 1248,8 (m), 1200,0 (s), 1142,5 (s), 1112,3 (s), 1090,7 (s), 1031,8 (m), 978,6 (m), 931,2 (m), 849,3 (m), 799,0 (s), 593,5 (m), 503,0 (w), 444,1 (w), 436,9 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₄H₂₂O₆N₄Na]⁺, [M+Na]⁺: berechnet: 365,14316, gefunden: 365,14338.

((1R, 2S, 4R)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2H)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl 2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)acetat (58b)**58b**C₁₆H₂₆N₄O₇

386,41 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure (52,2 µL, 340 µmol, 1,10 Äq.) in abs. DMF (3,10 mL) gelöst, EDC · HCl (53 mg, 340 µmol, 1,10 Äq.) und DMAP (38 mg, 309 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde cAzadC (**1**, 70 mg, 309 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben, das Gemisch für 2 d gerührt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal via präparativer DC (DCM:MeOH / 21:4 und 8:2), anschließend per semipräparativer HPLC (2 % → 80 % TEAA Puffer B in 45 min, *t_R* 12,6 min) und daraufhin erneut via präparativer DC (DCM:MeOH / 21:4) gereinigt. Der Ester **58b** (9 mg, 23,3 µmol) wurde mit einer Ausbeute von 8 % als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0,27 (DCM:MeOH / 23:2).

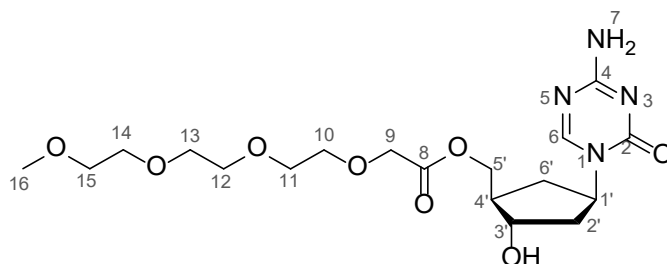
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.25 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-6), 4.73 (p, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-1'), 4.32–4.21 (m, 5H, H-5', H-9, H-3'), 3.74–3.70 (m, 2H, H-10), 3.67 (td, *J* = 3.6, 2.0 Hz, 2H, H-11), 3.65–3.63 (m, 2H, H-12), 3.59–3.56 (m, 2H, H-13), 3.33 (s, 3H, H-14), 2.37–2.30 (m, 2H, H-4', H-6'a), 2.27 (dt, *J* = 13.7, 8.2 Hz, 1H, H-2'a), 2.07 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 5.1 Hz, 1H, H-2'b), 1.74 (dt, *J* = 12.2, 10.0 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 172,4 (C-8), 165,5 (C-4), 158,6 (C-6), 156,2 (C-2), 72,3 (C-3'), 70,9 (C-13), 70,2 (C-10), 69,44 (C-11), 69,35 (C-12), 67,7 (C-5'), 65,9 (C-9), 58,0 (C-14), 56,2 (C-1'), 45,1 (C-4'), 37,8 (C-2'), 31,6 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3336,9 (m), 3198,9 (m), 2950,3 (w), 2915,8 (s), 2838,2 (w), 1748,9 (m), 1635,4 (s), 1507,5 (s), 1465,8 (s), 1376,7 (m), 1294,8 (w), 1201,4 (m), 1100,8 (s), 974,3 (w), 931,2 (w), 843,6 (w), 800,5 (s), 595,0 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₆H₂₇O₇N₄]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 387,18743, gefunden: 387,18768.

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl 2, 5, 8, 11-tetraoxatridecan-13-olat (58c**)**

**58c**C₁₈H₃₀N₄O₈

430,46 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde 2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-on säure (66,8 µL, 340 µmol, 1,10 Äq.) in abs. DMF (3,1 mL) gelöst, EDC · HCl (53,0 mg, 340 µmol, 1,10 Äq.) und DMAP (38,0 mg, 309 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde cAzadC (**1**, 70 mg, 309 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und das Gemisch über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und einmal mit Toluol (5 mL) coevaporiert. Das Rohprodukt wurde via präparativer DC (DCM:MeOH / 8:2), anschließend per semipräparativer HPLC (2 % → 80 % TEEA Puffer B in 45 min, *t_R* 13,2 min) und daraufhin erneut via präparativer DC (DCM:MeOH / 21:4) gereinigt. Der Ester **58c** (18 mg, 41,8 µmol) wurde mit einer Ausbeute von 14 % als farbloses Öl erhalten.

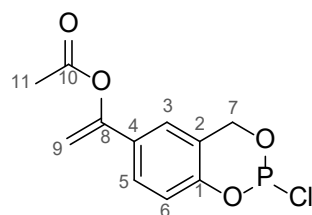
R_f = 0,61 (DCM:MeOH / 21:4).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.27 (s, 1H, H-6), 4.75 (p, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-1'), 4.34–4.26 (m, 3H, H-3', H-5'), 4.25 (s, 2H, H-9), 3.75–3.72 (m, 2H, H-10), 3.71–3.68 (m, 2H, H-11), 3.67–3.66 (m, 4H, H-12, H-13), 3.66–3.64 (m, 2H, H-14), 3.60–3.57 (m, 2H, H-15), 3.35 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, H-16), 2.39–2.32 (m, 1H, H-6'a), 2.32–2.25 (m, 2H, H-2'a, H-4'), 2.10 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 5.2 Hz, 1H, H-2'b), 1.76 (dt, *J* = 11.9, 9.9 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 172,4 (C-8), 165,6 (C-4), 158,6 (C-6), 156,2 (C-2), 72,3 (C-3'), 70,9 (C-15), 70,2 (C-10), 69,5 (C-11, C-12, C-13), 69,4 (C-14), 67,8 (C-9), 65,9 (C-5'), 58,0 (C-16), 56,2 (C-1'), 45,1 (C-4'), 37,8 (C-2'), 31,7 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3331,1 (m), 3201,8 (m), 2924,4 (s), 2872,7 (w), 1746,0 (m), 1677,1 (w), 1632,5 (s), 1507,5 (s), 1471,6 (s), 1406,9 (w), 1376,7 (w), 1350,8 (w), 1294,8 (m), 1244,5 (w), 1201,4 (s), 1096,5 (s), 1039,0 (s), 991,6 (w); 931,2 (m), 850,7 (m), 800,5 (s), 770,3 (m), 595,0 (s), 439,7 (w), 426,8 (w), 411,0 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₈H₃₀O₈N₄Na]⁺, [M+Na]⁺: berechnet: 453,19559, gefunden: 453,19551.

1-(2-Chloro-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinin-6-yl)vinyl acetat (71)**71**C₁₁H₁₀ClO₄P

272,62 g/mol

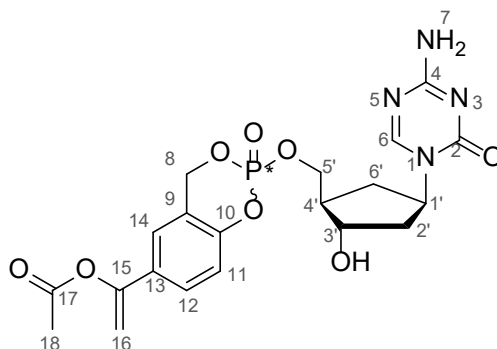
Gemäß der Literatur^[419] wurde das Diol **70** (400 mg, 1,92 mmol, 1,00 Äq.) in abs. THF (11 mL) gelöst, auf -20 °C gekühlt, PCl₃ (0,20 mL, 2,30 mmol, 1,20 Äq.) tropfenweise zugegeben und das Gemisch für 1 h bei -20 °C gerührt. Eine Mischung aus abs. Pyridin (0,36 mL, 4,42 mmol, 2,30 Äq.) und abs. THF (3,60 mL) wurde tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung 1 h bei -20 °C und 2 h bei RT gerührt ehe das Gemisch über Nacht bei -20 °C stehen gelassen wurde. Der Überstand wurde abgenommen, der Feststoff mit abs. THF (3 × 15 mL) gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in abs. THF (3 mL) aufgenommen, über einen Spritzenfilter filtriert und das Lösungsmittel erneut *in vacuo* entfernt. Das Chlorophosphin **71** (505 mg, 1,85 mmol) wurde als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 96 % erhalten.

Auf Grund der hohen Luftempfindlichkeit des reaktiven Produktes wurde unter Argon nur ein ¹H- und ³¹P-NMR-Spektrum gemessen und auf weitere Analytik verzichtet.

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 7.35 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H, H-5), 7.07–7.05 (m, 1H, H-3), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-6), 5.48–5.40 (m, 1H, H-7a), 5.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-9a), 5.10–5.01 (m, 1H, H-7b), 5.00 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-9b), 2.26 (s, 3H, H-11) ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, MeOH-d₄): δ = 139.6 ppm.

1-(2-(((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methoxy)-2-oxido-4*H*-benzo[d][1, 3, 2]dioxaphosphinin-6-yl)vinyl acetat (59)



59

$C_{20}H_{23}N_4O_8P$

478,40 g/mol

Gemäß der Literatur^[419] wurde cAzadC (**1**, 100 mg, 422 μ mol, 1,00 Äq.) bei 80 °C *in vacuo* getrocknet bevor das Edukt in abs. DMF (4,42 mL) gelöst, DIPEA (0,15 mL, 884 μ mol, 2,00 Äq.) zugegeben und das Gemisch auf -40 °C gekühlt wurde. Das zuvor synthetisierte Chlorophosphit **71** (181 mg, 663 μ mol, 1,50 Äq.), gelöst in abs THF (0,36 mL), wurde tropfenweise zugegeben, das Gemisch auf RT erwärmt und 3 h gerührt. Anschließend wurde es erneut auf -20 °C gekühlt, *t*BuOOH (5 M in Decan; 0,18 mL, 884 μ mol, 2,00 Äq) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaHSO₃-Lösung (0,5 g/mL; 0,18 mL) beendet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 19:1 → 8:2) gereinigt. Die Diastereomere des Prodrugs **59** wurden anschließend per semipräparativer HPLC (10 % → 25 % MeCN in 45 min; *t*_RDia1 36,7 min; *t*_RDia2 37,5 min) getrennt. Das finale CycloSal-Prodrug **59** wurde als weißer Feststoff, Diastereomer 1 (1,8 mg, 3,76 μ mol) mit einer Ausbeute von 0,8 % und Diastereomer 2 (1,6 mg, 3,34 μ mol) mit einer Ausbeute von 0,8 %, erhalten.

Diastereomer 1:

$R_f = 0,27$ (CH₂Cl₂:MeOH / 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, MeCN-d₃): $\delta = 7.95$ (s, 1H, H-6), 7.49 (ddd, *J* = 8.5, 2.3, 1.3 Hz, 1H, H-12), 7.34 (dd, *J* = 2.2, 1.1 Hz, 1H, H-14), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 5.86 (br. s, 2H, H-7), 5.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 16a), 5.50–5.35 (m, 2H, H-8), 5.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-16b), 4.65 (p, *J* = 8.5 Hz, 1H, 1'), 4.23–4.19 (m, 2H, H-5'), 4.17–4.11 (m, 1H, H-3'), 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, OH), 2.23 (s, 3H, H-17), 2.14–2.09 (m, 3H, H-2'a, H-4', H-6'a), 1.93–1.87 (m, 1H, H-2'b), 1.68–1.57 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, MeCN-d₃): $\delta = 169,0$ (C-17), 166,4 (C-2), 158,3 (C-6), 154,2 (C-4), 151,5 (C-10, C-15), 130,6 (C-12), 127,4 (C-12), 123,4 (C-14), 121,4 (C-9), 119,6 (C-11), 103,4 (C-16), 72,5 (C-3'), 70,1 (C-5'), 69,6 (C-8), 56,7 (C-1'), 48,1 (C-4'), 39,3 (C-2'), 32,5 (C-6'), 21,1 (C-18) ppm.

³¹P-NMR (202 MHz, MeCN-d₃): $\delta = -10,29$ ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3330,4$ (w), 1757,8 (m), 1635,5 (s), 1500,2 (s), 1476,0 (m), 1370,5 (w), 1288,3 (m), 1270,0 (m), 1209,6 (s), 1179,4 (s), 1124,1 (s), 1088,2 (w), 1020,7 (s), 940,9 (s), 905,7 (m), 879,9 (w), 829,8 (w), 800,4 (s), 757,8 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₂₀H₂₄O₈N₄P]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 479,13263, gefunden: 479,13252.

Schmelzpunkt: 80,2 °C.

Diastereomer 2:

$R_f = 0,27$ (CH₂Cl₂:MeOH / 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 7.97$ (s, 1H, H-6), 7.52–7.48 (m, 1H, H-12), 7.34 (dd, $J = 2.2, 1.1$ Hz, 1H, H-14), 7.09 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 5.87 (br. s, 2H, H-7), 5.52 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16a), 5.48–5.36 (m, 2H, H-8), 5.01 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16b), 4.72–4.63 (m, 1H, H-1'), 4.27 (ddd, $J = 10.3, 6.8, 5.6$ Hz, 1H, H-5'a), 4.19–4.13 (m, 1H, H-5'b), 4.11 (dq, $J = 7.1, 4.7$ Hz, 1H, H-3'), 3.08 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, OH), 2.23 (s, 3H, H-18), 2.21–2.18 (m, 1H, H-6'a), 2.18–2.16 (m, 1H, H-4'), 2.14–2.10 (m, 1H, H-2'a), 1.93–1.88 (m, 1H, H-2'b), 1.69–1.61 (m, 1H, H-6'b) ppm.

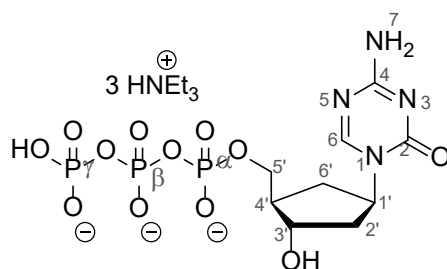
¹³C-NMR (126 MHz, MeCN-d₃): $\delta = 169,7$ (C-17), 166,9 (C-2), 158,3 (C-6), 154,3 (C-4), 152,3 (C-15), 150,8 (C-10), 131,2 (C-13), 126,7 (C-12), 122,9 (C-14), 122,0 (C-9), 119,5 (C-11), 102,9 (C-16), 72,2 (C-3'), 69,9 (C-5'), 69,3 (C-8), 56,2 (C-1'), 47,9 (C-4'), 39,0 (C-2'), 32,2 (C-6'), 20,7 (C-18) ppm.

³¹P-NMR (202 MHz, MeCN-d₄): $\delta = -10,26$ ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3332,2$ (w), 1757,4 (m), 1635,3 (s), 1500,0 (s), 1475,9 (s), 1370,1 (w), 1288,3 (m), 1269,8 (m), 1209,0 (s), 1179,1 (s), 1123,8 (s), 1088,3 (w), 1020,2 (s), 940,3 (m), 905,4 (m), 879,8 (w), 829,3 (w), 800,2 (s), 757,9 (w), 729,1 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₂₀H₂₄O₈N₄P]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 479,13263, gefunden: 479,13264.

Schmelzpunkt: 81,0 °C.

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl hydrogen triphosphat (60**)****60**

$C_{27}H_{62}N_7O_{12}P_3$
769,75 g/mol

Gemäß der Literatur^[434] wurde cAzadC (**1**, 20 mg, 88,4 μ mol, 1,00 Äq.) und $(Bu_3NH)_2PP_i$ (154 mg, 281 μ mol, 3,18 Äq.) über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Salicylchlorophosphit wurde über Nacht in einen ausgeheizten SCHLENK-Kolben unter Argon gelagert. Pyrophosphat wurde in abs. DMF (0,50 mL) gelöst, das Chlorophosphit wurde in einem separaten Kolben ebenfalls in abs. DMF (0,50 mL) gelöst und $(Bu_3NH)_2PP_i$ (0,50 mL, 2,10 mmol, 23,8 Äq.) zugegeben. Die zwei Reaktionslösungen wurden vereinigt und für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung und der Kolben mit dem vorgelegten cAzadC (**3**) wurden auf 0 °C gekühlt und die Lösung langsam auf das Startmaterial gegeben. Nach 10 min Rühren bei 0 °C wurde das Gemisch auf RT erwärmt und für weitere 4 h gerührt. Anschließend wurde eine zuvor hergestellte I_2 -Lösung (80 mM I_2 in Pyridine:ddH₂O / 98:2; 2,40 mL) zugegeben bis der Farbumschlag von farblos zu kräftigem orange für 15 min konstant blieb. Nach Zugabe von frischem ddH₂O (2,75 mL) wurde das Gemisch 1 h bei RT gerührt, in ein schmales Reaktionsgefäß überführt und *brine*-Lösung (1,63 mL; 3 mM NaCl in ddH₂O) zugegeben. Das Gemisch wurde für 10 s gevortext, EtOH (17 mL) zugegeben und über Nacht bei -80 °C das Produkt ausgefällt. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Ausfällungsprozess ein weiteres Mal wiederholt. Das Triphosphat wurde anschließend per semipräparativer HPLC (0 % → 20 % TEAA Puffer B in 45 min, t_R 9,3 min) gereinigt. Das cAzadC-Triphosphat **60** (4,6 mg, 44 μ mol) wurde in Form eines $HNEt_3$ -Salzes als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 7 % erhalten.

Das Vorliegen des 5'-Triphosphates wurde durch 1H - ^{31}P -Korrelation Spektroskopie eindeutig bestätigt. Der leichte Überschuss von $HNEt_3^+$ Gegenionen konnte auch durch mehrfaches Lyophilisieren aus Wasser nicht entfernt werden.

1H -NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.34 (s, 1H, H-6), 4.87–4.80 (m, 1H, H-1'), 4.34 (dt, J = 7.3, 5.0 Hz, 1H, H-3'), 4.09–3.98 (m, 2H, H-5'), 3.15 (q, J = 7.3 Hz, 27H, CH_2CH_3), 2.33 (dt, J = 13.2, 7.5 Hz, 1H, H-6'a), 2.26–2.20 (m, 1H, H-4'), 2.20–2.13 (m, 1H, H-2'a), 2.08 (ddd, J = 13.5, 8.5, 4.5 Hz, 1H, H-2'b), 1.73 (dt, J = 12.8, 10.4 Hz, 1H, H-6'b), 1.23 (t, J = 7.3 Hz, 39H, CH_2CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D₂O): δ = 165,5 (C-2), 158,3 (C-6), 156,6 (C-4), 71,9 (C-3'), 66,6 (C-5'), 55,1 (C-1'), 46,6 (C-4'), 46,5 (CH_2CH_3), 38,1 (C-2'), 31,6 (C-6'), 8,1 (CH_2CH_3) ppm.

^{31}P -NMR (202 MHz, D₂O): δ = -10,7 (d, J = 20,2 Hz, P_γ), -11,0 (d, J = 20,1 Hz, P_α), -23,4 (t, J = 23,4 Hz, P_β) ppm.

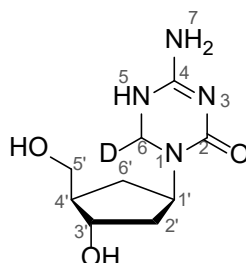
ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 2984,8 (w), 2622,7 (w) 2458,8 (w), 1638,3 (m), 1473,0 (m), 1396,8 (w), 1215,8 (s), 1043,3 (s), 993,0 (s), 941,3 (s), 892,4 (s), 839,3 (m), 800,5 (m), 734,4 (w), 689,8 (w), 505,9 (s), 418,2 (w) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_{21}H_{48}O_{12}N_6P_3]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 669,25376, gefunden: 669,25403.

Schmelzpunkt: 166,2 °C.

6.4 Synthese der Isotopenstandards

4-Amino-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on-6-d (**83a**)

**83a**C₉H₁₅DN₄O₃

229,26 g/mol

Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige NaBD₄-Lösung (0,17 M, 74 mg, 1,77 mmol, 4,00 Äq.) zu cAzadC (**1**, 100 mg, 442 µmol, 1,00 Äq.) gegeben und 1,5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5; 3,30 mL) zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (H₂O isokratisch für 45 min, t_R 12,9 min) gereinigt und das deuterierte Hydrolyseprodukt **83a** (74,3 mg, 324 µmol) mit einer Ausbeute von 73 % als farbloser Feststoff erhalten.

R_f = 0,10 (DCM:MeOH / 6:4).

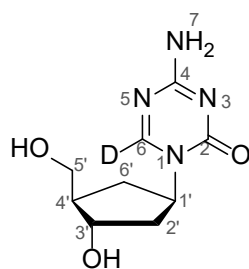
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.74–4.65 (m, 1H, H-1'), 4.48 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-6), 4.03 (dt, J = 7.1, 4.4 Hz, 1H, H-3'), 3.64 (dd, J = 11.2, 5.7 Hz, 1H, H-5'a), 3.54 (dd, J = 11.2, 6.6 Hz, 1H, H-5'b), 2.05 (dt, J = 12.0, 7.3 Hz, 1H, H-6'a), 1.99 (dd, J = 10.0, 6.1 Hz, 1H, H-4'), 1.95–1.90 (m, 1H, H-2'a), 1.80 (ddd, J = 13.5, 8.4, 4.0 Hz, 1H, H-2'b), 1.34 (dt, J = 12.3, 10.2 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 157,6 (C-2), 157,2 (C-4), 72,3 (C-3'), 62,9 (C-5'), 51,8 (C-1'), 51,5 (d, J = 23.3 Hz, C-6), 47,8 (d, J = 1.6 Hz, C-4'), 35,8 (d, J = 6.1 Hz, C-2'), 29,8 (d, J = 5.2 Hz, C-3') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3331,1 (s), 3137,1 (s), 2961,8 (s), 1720,2 (w), 1645,4 (m), 1611,0 (s), 1583,7 (s), 1527,6 (s), 1415,5 (s), 1273,2 (s), 1228,7 (w), 1207,1 (w), 1158,3 (m), 1034,7 (w), 1023,2 (s), 974,3 (s), 949,9 (m), 931,2 (w), 901,0 (w), 880,9 (w), 837,8 (w), 767,4 (m), 599,3 (s), 557,6 (s), 534,6 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₉H₁₆O₃N₄D]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 230,13579, gefunden: 230,13566.

Schmelzpunkt: 163,7 °C.

4-Amino-1-((1R, 3S, 4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1H)-on-6-d (92a)**92a**C₉H₁₃DN₄O₃

227,24 g/mol

Gemäß der Literatur^[479] wurde das reduzierte cAzadC **83a** (75,2 mg, 328 µmol, 1,00 Äq.) in abs. MeOH (0,68 mL) gelöst und Na₂CO₃ (70 mg, 656 µmol, 2,00 Äq.) sowie I₂ (116 mg, 459 µmol, 1,40 Äq.) zugegeben. Nach 16 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in ddH₂O (3 mL) gelöst und direkt per semipräparativer HPLC (0 % → 2 % MeCN in 45 min, t_R 11,2 min) gereinigt. Das deuterierte rearomatisierte cAzadC **92a** (69,6 mg, 306 µmol) wurde mit einer Ausbeute von 93 % als farbloser Feststoff erhalten.

Das Produkt lag als 82:18 Gemisch, bestehend aus deuteriertem cAzadC **83a** und cAzadC (**1**), vor. Nach einem weiteren Redox-Zyklus lag das Verhältnis bei 94:6.

R_f = 0,29 (DCM:MeOH / 8:2).

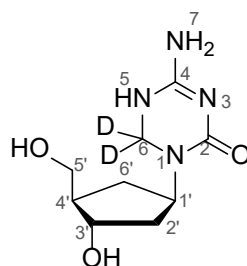
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.74 (dt, J = 10.0, 8.3 Hz, 1H, H-1'), 4.23–4.17 (m, 1H, H-3'), 3.70 (dd, J = 11.2, 5.7 Hz, 1H, H-5'a), 3.59 (dd, J = 11.2, 6.8 Hz, 1H, H-5'b), 2.32 (dt, J = 13.4, 7.5 Hz, 1H, H-6'a), 2.21 (ddd, J = 13.8, 8.7, 7.4 Hz, 1H, H-2'a), 2.13–2.02 (m, 2H, H-2'b, H-4'), 1.65 (dt, J = 12.4, 10.2 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 165,5 (C-4), 158,5 (C-6), 156,4 (C-2), 72,2 (C-3'), 62,8 (C-5'), 56,1 (C-1'), 48,1 (C-4'), 37,9 (C-2'), 32,0 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3309,6 (s), 3186,0 (s), 2920,1 (m), 2358,2 (w), 2312,2 (w), 1684,2 (w), 1622,5 (s), 1590,8 (w), 1559,2 (s), 1540,5 (w), 1507,5 (w), 1473,0 (w), 1457,2 (s), 1418,4 (w), 1398,3 (w), 1375,3 (w), 1362,3 (w), 1151,1 (m), 1037,6 (s), 929,8 (m), 790,4 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₉H₁₄O₃N₄D]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 228,12014, gefunden: 228,12003.

Schmelzpunkt: 148,7 °C.

4-Amino-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on-6, 6-d2 (95a)**95a**C₉H₁₄D₂N₄O₃

230,26 g/mol

Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige NaBH₄-Lösung (0,17 M, 52,1 mg, 1,24 mmol, 4,00 Äq.) zu deuteriertem cAzadC **92a** (70,6 mg, 311 µmol, 1,00 Äq.) gegeben und 1,5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5; 1,50 mL) zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (ddH₂O isokratisch für 45 min, t_R 4,5 min) gereinigt und das doppelt deuterierte Hydrolyseprodukt **95a** (1,69 mg, 7,34 µmol) mit einer Ausbeute von 84 % als farbloser Feststoff erhalten.

Das Produkt lag als 78:22 Gemisch, bestehend aus doppelt und einfach deuteriertem reduziertem cAzadC **96a** und **84a** vor. Nach einem weiteren Redox-Zyklus lag das Verhältnis bei 91:9.

R_f = 0,05 (DCM:MeOH / 8:2).

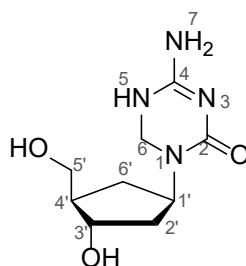
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.71 (tt, *J* = 9.2, 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.02 (dt, *J* = 7.4, 4.4 Hz, 1H, H-3'), 3.64 (dd, *J* = 11.1, 5.6 Hz, 1H, H-5'a), 3.54 (dd, *J* = 11.1, 6.5 Hz, 1H, H-5'b), 2.08–1.95 (m, 2H, H-6'a, H-4'), 1.94–1.88 (m, 1H, H-2'a), 1.79 (ddd, *J* = 13.1, 8.3, 3.8 Hz, 1H, H-2'b), 1.37–1.28 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 159,2 (C-2), 72,4 (C-3'), 63,0 (C-5'), 51,9 (C-6), 51,6 (C-1'), 47,8 (C-4'), 35,8 (C-2'), 29,8 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3332,6 (m), 3204,7 (s), 3128,5 (s), 2961,8 (m), 1639,7 (s), 1609,5 (s), 1577,9 (s), 1521,9 (s), 1442,8 (w), 1385,3 (s), 1366,7 (s), 1286,2 (m), 1228,7 (w), 1205,7 (w), 1158,3 (m), 1093,6 (w), 1072,1 (m), 1023,2 (s), 972,9 (m), 925,5 (m), 875,2 (m), 833,5 (m), 764,5 (s), 606,4 (m), 553,3 (s), 503,0 (s), 467,1 (s), 435,4 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₉H₁₅O₃N₄D₂]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 231,14207, gefunden: 231,14198.

Schmelzpunkt: 212,0 °C.

4-Amino-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (33a)**33a**

$C_9H_{16}N_4O_3$
228,25 g/mol

Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige $NaBH_4$ -Lösung (0,17 M, 352 μ mol, 4,00 Äq.) zu cAzadC (**1**, 20 mg, 88 μ mol, 1,00 Äq.) gegeben und 1,5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde ein NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5; 0,66 mL) zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (0 % \rightarrow 3 % MeCN in 45 min, t_R 15,5 min) gereinigt und das Hydrolyseprodukt **33a** (4,64 mg, 20,3 μ mol) mit einer Ausbeute von 23 % als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0,12$ (DCM:MeOH / 6:4).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 4.71$ (p, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-1'), 4.46 (s, 2H, H-6), 4.06–3.99 (m, 1H, H-3'), 3.64 (dd, $J = 11.2, 5.5$ Hz, 1H, H-5'a), 3.54 (dd, $J = 11.2, 6.5$ Hz, 1H, H-5'b), 2.08–2.01 (m, 1H, H-6'b), 2.01–1.95 (m, 1H, H-4'), 1.95–1.89 (m, 1H, H-2'a), 1.79 (ddd, $J = 13.4, 8.6, 4.0$ Hz, 1H, H-2'b), 1.38–1.28 (m, 1H, H-6'b) ppm.

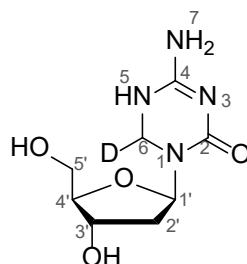
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 159,8$ (C-2), 158,2 (C-4), 72,4 (C-3'), 62,9 (C-5'), 52,2 (C-6), 51,6 (C-1'), 47,8 (C-4'), 35,8 (C-2'), 29,8 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3332,6$ (m), 3213,3 (m), 3137,1 (m), 2961,8 (m), 1644,0 (m), 1612,4 (s), 1586,5 (m), 1527,6 (s), 1488,8 (w), 1464,4 (w), 1439,9 (s), 1296,2 (m), 1273,2 (m), 1251,7 (w), 1207,1 (w), 1156,8 (w), 1089,3 (m), 1067,7 (m), 1046,2 (m), 1021,8 (s), 977,2 (w), 909,7 (w), 886,7 (w), 840,7 (w), 781,8 (s), 560,5 (s) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_9H_{17}O_3N_4]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 229,12952, gefunden: 229,12938.

Schmelzpunkt: 202,0 °C.

4-Amino-1-((2*R*, 4*S*, 5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on-6-d (83b**)**



83b

$C_8H_{13}DN_4O_4$

231,23 g/mol

Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige NaBD₄-Lösung (0,17 M, 88 mg, 2,10 mmol, 4,00 Äq.) zu Decitabin (**2**, 120 mg, 526 µmol, 1,00 Äq.) gegeben und 1,5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5; 4,00 mL) zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (H₂O isokratisch 45 min, *t_R* 6,8 min) gereinigt und das Hydrolyseprodukt **83b** (104,1 mg, 450 µmol) mit einer Ausbeute von 86 % als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0,15$ (DCM:MeOH / 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 6.15$ (dd, $J = 8.3, 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.50 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, H-6), 4.27 (dt, $J = 6.7, 3.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.81 (dt, $J = 5.2, 3.7$ Hz, 1H, H-4'), 3.67 (dd, $J = 12.3, 3.9$ Hz, 1H, H-5'a), 3.60 (dd, $J = 12.4, 5.3$ Hz, 1H, H-5'b), 2.17 (ddd, $J = 14.6, 8.3, 6.6$ Hz, 1H, H-2'a), 2.02 (ddd, $J = 14.2, 6.5, 3.3$ Hz, 1H, H-2'b) ppm.

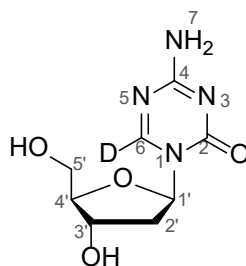
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 160,4$ (C-2), 159,4 (C-4), 84,8 (C-4'), 83,6 (C-1'), 70,8 (C-3'), 61,5 (C-5'), 50,5 (m, C-6), 35,0 (C-2') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3339,7$ (m), 3177,4 (s), 2928,7 (m), 1662,7 (m), 1593,7 (s), 1534,8 (s), 1412,6 (s), 1342,2 (w), 1273,2 (w), 1192,8 (w), 1112,3 (w), 1087,9 (w), 1072,1 (m), 1051,9 (s), 1020,3 (s), 885,2 (w), 860,8 (w), 757,3 (m), 596,4 (s), 563,3 (s), 468,5 (m), 409,6 (m) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₈H₁₄DO₄N₄]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 232,11506, gefunden: 232,11491.

Schmelzpunkt: 89,3 °C.

4-Amino-1-((2R, 4S, 5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1, 3, 5-triazin-2(1H)-one-6-d (92b)



92b

$C_8H_{11}DN_4O_4$

229,21 g/mol

Gemäß der Literatur^[479] wurde das reduzierte Decitabin **83b** (104,1 mg, 450 μ mol, 1,00 Äq.) in abs. MeOH (4,50 mL) gelöst und Na_2CO_3 (95 mg, 900 μ mol, 2,00 Äq.) sowie I_2 (160 mg, 630 μ mol, 1,40 Äq.) zugegeben. Nach 18 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in ddH_2O (3 mL) gelöst und direkt per semipräparativer HPLC (0 % \rightarrow 2 % MeCN in 45 min, t_R 7,9 min) gereinigt. Das deuterierte rearomatisierte Decitabin **92b** (42,6 mg, 186 μ mol) wurde mit einer Ausbeute von 41 % als farbloser Feststoff erhalten.

Das Produkt lag als 81:19 Gemisch, bestehend aus deuteriertem Decitabin **92b** und Decitabin (**24**), vor.

$R_f = 0,47$ (DCM:MeOH / 8:2).

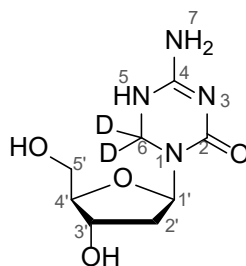
1H -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = 6.08$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 4.41 (dt, $J = 6.5, 4.5$ Hz, 1H, H-3'), 4.05 (td, $J = 4.8, 3.5$ Hz, 1H, H-4'), 3.81 (dd, $J = 12.5, 3.4$ Hz, 1H, H-5'a), 3.71 (dd, $J = 12.6, 5.1$ Hz, 1H, H-5'b), 2.47 (ddd, $J = 14.2, 6.6, 4.7$ Hz, 1H, H-2'a), 2.39 (dt, $J = 14.1, 6.3$ Hz, 1H, H-2'b) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): $\delta = 165,7$ (C-2), 156,7 (C-6), 155,6 (C-4), 87,0 (C-4'), 86,7 (C-1'), 70,0 (C-3'), 60,8 (C-5'), 39,4 (C-2') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3466,2$ (m), 3296,6 (s), 3188,9 (s), 1631,1 (s), 1590,8 (s), 1474,4 (s), 1316,4 (m), 1306,3 (w), 1276,1 (w), 1253,1 (m), 1198,5 (w), 1182,7 (w), 1154,0 (m), 1089,3 (s), 1031,8 (s), 1007,4 (s), 942,7 (w), 902,5 (w), 860,8 (w), 797,6 (s), 666,8 (w), 636,6 (w), 592,1 (w) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_8H_{11}O_4N_4DNa]^+$, $[M+Na]^+$: berechnet: 252,08135, gefunden: 252,08121.

Schmelzpunkt: 171,7 °C.

4-Amino-1-((2R, 4S, 5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1H)-on-6, 6-d2 (95b)**95b**C₈H₁₂D₂N₄O₄

232,24 g/mol

Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige NaBH₄-Lösung (0,17 M, 33 mg, 784 µmol, 4,00 Äq.) zu deuteriertem Decitabin **92b** (45 mg, 196 µmol, 1,00 Äq.) gegeben und 1,5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5, 1,50 mL) zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (ddH₂O isokratisch für 45 min, t_R 6,7 min) gereinigt und das doppelt deuterierte Hydrolyseprodukt **95b** (1,69 mg, 7,34 µmol) mit einer Ausbeute von 47 % als farbloser Feststoff erhalten.

Das Produkt lag als 79:21 Gemisch, bestehend aus doppelt und einfach deuteriertem reduziertem Decitabin **92b** und **83b**, vor.

R_f = 0,13 (DCM:MeOH / 8:2).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 6.15 (dd, J = 8.3, 6.4 Hz, 1H, H-1'), 4.27 (dt, J = 6.7, 3.4 Hz, 1H, H-3'), 3.81 (dt, J = 5.1, 3.7 Hz, 1H, H-4'), 3.67 (dd, J = 12.3, 3.9 Hz, 1H, H-5'a), 3.60 (dd, J = 12.4, 5.3 Hz, 1H, H-5'b), 2.17 (dddd, J = 14.9, 8.2, 6.6, 1.4 Hz, 1H, H-2'a), 2.02 (ddd, J = 14.1, 6.4, 3.3 Hz, 1H, H-2'b) ppm.

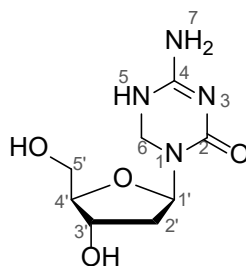
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 160,5 (C-2), 159,4 (C-4), 84,8 (C-4'), 83,6 (C-1'), 70,9 (C-3'), 61,5 (C-5'), 50,6 (C-6), 35,0 (C-2') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3332,6 (w), 3196,0 (s), 2930,2 (w), 1652,6 (w), 1593,7 (m), 1527,6 (s), 1365,2 (s), 1276,1 (w), 1171,2 (w), 1086,4 (w), 1047,6 (s), 1018,9 (s), 937,0 (m), 876,6 (m), 859,4 (m), 757,3 (w), 560,5 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₈H₁₃O₄N₄D₂]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 233,12133, gefunden: 233,12121.

Schmelzpunkt: 65,1 °C.

4-Amino-1-((2*R*, 4*S*, 5*R*)-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (33b**)**



33b

$C_8H_{14}N_4O_4$

230,22 g/mol

Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige $NaBH_4$ -Lösung (0,17 M, 524 μ mol, 4,00 Äq.) zu Decitabin (**24**, 30 mg, 131 μ mol, 1,00 Äq.) gegeben und 1,5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde ein NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5; 1,00 mL) zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (ddH₂O isokratisch 45 min, t_R 5,5 min) gereinigt und das Hydrolyseprodukt **33b** (27,43 mg, 119 μ mol) mit einer Ausbeute von 91 % als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0,18$ (DCM:MeOH / 1:1).

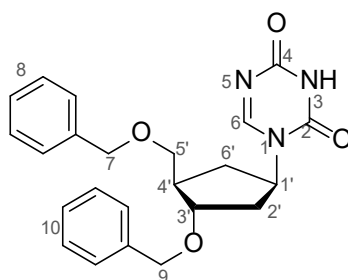
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 6.15$ (dd, $J = 8.3, 6.4$ Hz, 1H, H-1'), 4.53 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-6a), 4.50 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-6b), 4.27 (dt, $J = 6.7, 3.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.81 (dt, $J = 5.2, 3.8$ Hz, 1H, H-4'), 3.67 (dd, $J = 12.3, 4.0$ Hz, 1H, H-5'a), 3.59 (dd, $J = 12.3, 5.3$ Hz, 1H, H-5'b), 2.17 (ddd, $J = 14.7, 8.3, 6.6$ Hz, 1H, H-2'a), 2.02 (ddd, $J = 14.1, 6.5, 3.4$ Hz, 1H, H-2'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 160,4$ (C-2), 159,4 (C-4), 84,8 (C-4'), 83,6 (C-1'), 70,9 (C-3'), 61,5 (C-5'), 50,7 (C-6), 34,9 (C-2') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3334,0$ (m), 3184,5 (s), 2930,2 (m), 1654,1 (m), 1540,5 (s), 1490,2 (w), 1447,1 (s), 1375,3 (w), 1273,2 (s), 1189,9 (w), 1086,4 (m), 1047,6 (s), 1021,8 (s), 929,8 (s), 883,8 (w), 857,9 (w), 783,2 (m), 602,1 (m), 566,2 (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_8H_{15}O_4N_4]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 231,10878, gefunden: 231,10862.

Schmelzpunkt: 84,5 °C.

1-((1R, 3S, 4R)-3-(Benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2, 4(1H, 3H)-dion (96)**96**C₂₃H₂₅N₃O₄

407,47 g/mol

Gemäß der Literatur^[491] wurde Methoxytriazol **49** (120 mg, 285 µmol, 1,00 Äq.) in EtOH/H₂O (1:5; 6 mL) gelöst. Mit HCl (2 M) aktiviertes Dowex (1,00 g) wurde zugegeben und das Gemisch bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂O/EtOAc beendet und das Dowex-Gel mit einem Spritzenfilter entfernt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit *brine*-Lösung (60 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die Carbonylverbindung **96** (108 mg, 265 µmol) wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 93 % erhalten.

R_f = 0,44 (DCM:MeOH / 48:2).

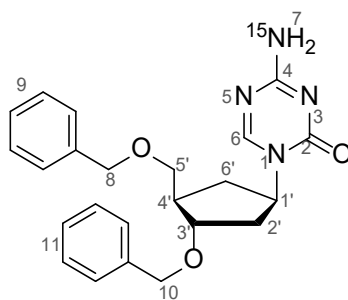
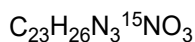
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.69 (s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H; H-6), 7.39–7.27 (m, 10H, H-8/H-10), 4.93 (tt, *J* = 10.0, 7.4 Hz, 1H, H-1'), 4.51 (s, 2H, H-7), 4.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-9), 4.01 (dt, *J* = 5.1, 2.4 Hz, 1H, H-3'), 3.52 (qd, *J* = 9.3, 4.3 Hz, 2H, H-5'), 2.47–2.38 (m, 2H, H-4', H-6'a), 2.26 (ddd, *J* = 13.3, 7.6, 2.2 Hz, 1H, H-2'a), 2.13–2.05 (m, 1H, H-2'b), 1.79–1.68 (m, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 156,6 (C-6), 154,9 (C-4), 149,0 (C-2), 138,1 (C-8i/C-10i), 138,0 (C-8i/C-10i), 128,7 (C-8/C-10), 128,6 (C-8/C-10), 128,0 (C-8/C-10), 127,9 (C-8/C-10), 127,8 (C-8/C-10), 80,5 (C-3'), 73,5 (C-7), 71,3 (C-9), 71,2 (C-5'), 55,9 (C-1'), 44,7 (C-4'), 37,1 (C-2'), 32,6 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3201,8 (w), 3062,4 (w), 3030,8 (w), 2858,3 (m), 1692,9 (s), 1611,0 (s), 1496,0 (w), 1452,9 (s), 1356,6 (s), 1300,6 (m), 1247,4 (m), 1207,1 (w), 1174,1 (w), 1089,3 (s), 1066,3 (s), 1027,5 (m), 1001,6 (w), 925,5 (w), 912,5 (w), 790,4 (m), 734,3 (s), 697,0 (s), 605,0 (m), 494,4 (w), 474,2 (w), 432,6 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₂₃H₂₅O₄N₃Na]⁺, [M+Na]⁺: berechnet: 430,17373, gefunden: 430,17377.

4-(Amino-¹⁵N)-1-((1R, 3S, 4R)-3-(benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1H)-on (102)

**102**

407,48 g/mol

Ähnlich der Literatur^[6] wurde Methoxyether **49** (100 mg, 237 μmol , 1,00 Äq.) in abs. MeOH (2,50 mL) gelöst, wässrige ¹⁵NH₄OH-Lösung (14 N; 1,83 mL, 25,6 mmol, 108 Äq.) zugegeben, das Gemisch nach Bildung eines farblosen Niederschlags mit abs. MeOH (30 mL) verdünnt und für 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (50 mL) beendet und die wässrige Phase mit EtOAc (3 \times 100 mL) extrahiert. Nach Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 99:1 \rightarrow 9:1) gereinigt. Das geschützte Nucleosid **102** (85,0 mg, 209 μmol) wurde als zäher farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 88 % erhalten.

$R_f = 0,50$ (DCM:MeOH / 9:1).

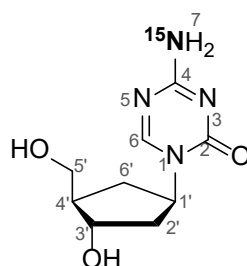
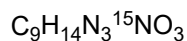
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.07$ (s, 1H, H-6), 7.36–7.27 (m, 10H, H-9/H-11), 7.00–6.83 (m, 1H, H-7), 5.92–5.75 (m, 1H, NH), 4.88 (qd, $J = 9.9, 7.4$ Hz, 1H, H-1'), 4.50 (s, 2H, H-8), 4.49 (s, 1H, H-10a), 4.45 (s, 1H, H-10b), 4.01 (dt, $J = 6.6, 3.2$ Hz, 1H, H-3'), 3.53 (q, $J = 4.4$ Hz, 2H, H-5'), 2.44–2.36 (m, 2H, H-6'a/H-4'), 2.26–2.21 (m, 1H, H-2'a), 2.13 (ddd, $J = 13.2, 10.0, 6.5$ Hz, 1H, H-2'b), 1.74 (td, $J = 11.7, 7.5$ Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (201 MHz, CDCl₃): $\delta = 165,5$ (C-4), 157,3 (C-6), 153,9 (C-2), 138,3 (2 \times , C-9i, C-11i), 128,6 (C-9/C-11), 128,5 (C-9/C-11), 127,9 (C-9/C-11), 127,8 (3 \times , C-9/C-11), 127,7 (C-9/C-11), 80,3 (C-3'), 73,4 (C-8), 71,4 (C-5'), 71,2 (C-10), 56,7 (C-1'), 44,9 (C-4'), 36,8 (C-2'), 32,5 (C-6') ppm.

¹⁵N-NMR (41 MHz, CDCl₃): $\delta = -289,7$ ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3308,1$ (w), 3178,8 (w), 3030,8 (w), 2855,5 (w), 1677,1 (m), 1626,8 (s), 1496,0 (m), 1470,1 (s), 1452,9 (s), 1402,6 (w), 1359,5 (m), 1303,4 (m), 1254,6 (m), 1207,1 (w), 1154,0 (w), 1118,0 (s), 1089,3 (s), 1067,7 (s), 1027,5 (m), 888,1 (w), 872,3 (m), 797,6 (s), 734,3 (s), 697,0 (s), 612,2 (m), 595,0 (m), 457,0 (m), 408,1 (m) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₂₃H₂₇O₃N₃¹⁵N]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 408,20480, gefunden: 408,20465.

4-(Amino-¹⁵N)-1-((1R, 3S, 4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1H)-on (103)**103**

227,23 g/mol

Gemäß der Literatur^[6] wurde das freie Amin **102** (30,0 mg, 73,6 µmol, 1,00 Äq.) in abs. DCM (1,5 mL) gelöst, auf -78 °C gekühlt und tropfenweise BCl₃-Lösung (1 M in DCM; 1,50 mL, 1,50 mmol, 20,4 Äq.) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei -78 °C wurde das Gemisch auf RT erwärmt und weitere 3 h gerührt. Nach Zugabe von MeOH (2,00 mL) und weiteren 20 min Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 9:1 → 7:3) gereinigt. Das freie carbacyclische 5-Aza-deoxycytidin **103** (15,0 mg, 66,0 µmol) wurde als leicht gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 90 % erhalten.

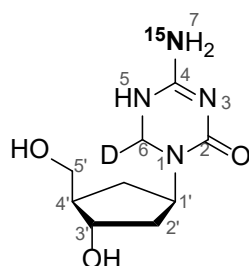
$R_f = 0,2$ (DCM:MeOH / 8:2)..

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ = 8.31 (s, 1H, H-6), 4.77 (s, 1H, H-1'), 4.24 (ddd, *J* = 7.7, 6.0, 4.6 Hz, 1H, H-3'), 3.74 (dd, *J* = 11.2, 5.7 Hz, 1H, H-5'a), 3.66–3.62 (m, 1H, H-5'b), 2.37 (dt, *J* = 12.5, 7.6 Hz, 1H, H-6'a), 2.25 (ddd, *J* = 14.1, 8.6, 7.4 Hz, 1H, H-2'a), 2.16–2.09 (m, 2H, H-2'b, H-4'), 1.69 (dt, *J* = 13.0, 10.2 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (201 MHz, D₂O): δ = 165,6 (C-4), 158,5 (C-6), 156,5 (C-2), 72,2 (C-3'), 62,8 (C-5'), 56,2 (C-1'), 48,2 (C-4'), 38,0 (C-2'), 32,1 (C-6') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₉H₁₅O₃N₃¹⁵N]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 228,11090, gefunden: 228,11070.

4-(Amino-¹⁵N)-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-5, 6-dihydro-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on-6-d (104)



104



230,25 g/mol

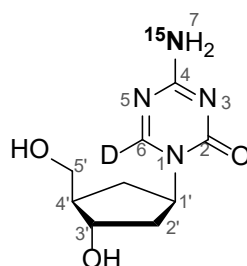
Gemäß der Literatur^[464] wurde eine wässrige NaBD₄-Lösung (0,35 M in D₂O, 29,5 mg, 705 μmol, 4,00 Äq.) zu schwerem cAzadC **103** (40,0 mg, 176 μmol, 1,00 Äq.) gegeben und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde NaOAc-Puffer (750 mM, pH 5; 3,30 mL) zugegeben und das Gemisch 20 min bei RT gerührt. Nachdem das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert wurde, wurde es direkt per semipräparativer HPLC (0 % → 5 % MeCN in 30 min, *t_R* 11,9 min) gereinigt und das deuterierte Hydrolyseprodukt **104** (20,0 mg, 86,9 μmol) mit einer Ausbeute von 49 % als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 4.45 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-6), 4.25 (p, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.04 (dtd, *J* = 6.9, 4.6, 2.2 Hz, 1H, H-3'), 3.64–3.54 (m, 2H, H-5'), 2.36–2.25 (m, 1H, H-6'a), 2.03–1.93 (m, 2H, H-2'a, H-4'), 1.73 (ddd, *J* = 13.5, 8.1, 6.8 Hz, 1H, H-2'b), 1.22 (dt, *J* = 13.1, 8.7 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOH-d₄): δ = 158,2 (n.k.), 156,1 (n.k.), 74,1 (C-3'), 64,7 (C-5'), 55,4 (C-6), 50,4 (C-4'), 49,4 (C-1'), 42,6 (C-2'), 35,7 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3311,0 (m), 2933,1 (w), 2871,3 (w), 1674,2 (s), 1635,4 (s), 1550,6 (s), 1497,4 (s), 1435,6 (s), 1362,3 (m), 1251,7 (s), 1205,7 (s), 1155,4 (s), 1051,9 (s), 797,6 (s), 770,3 (s), 732,9 (s), 695,5 (s) cm⁻¹.

4-(Amino-¹⁵N)-1-((1R, 3S, 4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1H)-on-6-d (105)



105



228,24 g/mol

Gemäß der Literatur^[479] wurde das reduzierte schwere cAzadC **104** (10,0 mg, 43,4 μmol , 1,00 Äq.) in abs. MeOH (0,50 mL) gelöst und Na_2CO_3 (10,0 mg, 94,3 μmol , 2,17 Äq.) sowie I_2 (15,4 mg, 60,7 μmol , 1,40 Äq.) zugegeben. Nach 16 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in ddH_2O (3 mL) gelöst und direkt per semipräparativer HPLC (0 % \rightarrow 2 % MeCN in 45 min, t_R 15,5 min) gereinigt. Das deuterierte rearomatisierte cAzadC **105** (3,00 mg, 13,1 μmol) wurde mit einer Ausbeute von 30 % als farbloser Feststoff erhalten.

Das Produkt lag als 87:13 Gemisch, bestehend aus deuteriertem cAzadC **105** und schwerem cAzadC **103**, vor.

¹H-NMR (800 MHz, D_2O): δ = 4.77–4.72 (m, 1H, H-1'), 4.15 (ddd, J = 7.8, 6.0, 4.6 Hz, 1H, H-3'), 3.65 (dd, J = 11.2, 5.7 Hz, 1H, H-5'a), 3.55 (dd, J = 11.3, 6.9 Hz, 1H, H-5'b), 2.28 (dt, J = 12.6, 7.6 Hz, 1H, H-6'a), 2.16 (ddd, J = 14.1, 8.8, 7.5 Hz, 1H, H-2'a), 2.06–2.00 (m, 2H, H-2'b, H-4'), 1.60 (dt, J = 12.8, 10.3 Hz, 1H, H-6'b) ppm.

¹³C-NMR (201 MHz, D_2O): δ = 171,0 (C-4), 158,5 (C-6), 156,5 (C-2), 72,2 (C-3'), 62,8 (C-5'), 56,2 (C-1'), 48,2 (C-4'), 38,0 (C-2'), 32,0 (C-6') ppm.

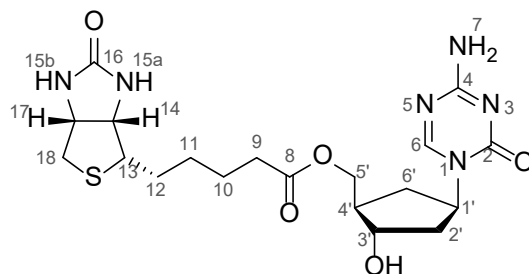
¹⁵N-NMR (41 MHz, D_2O): δ = - 303,3 ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3331,1 (w), 3211,8 (w), 2921,6 (w), 1763,3 (w), 1697,2 (m), 1625,3 (m), 1595,1 (m), 1501,7 (m), 1474,4 (m), 1368,1 (w), 1326,4 (m), 1303,4 (m), 1148,2 (s), 1047,6 (s), 1008,8 (s), 932,7 (m), 853,6 (m), 794,7 (s), 770,3 (s), 753,0 (s), 697,0 (m), 628,0 (s), 599,3 (s) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_3\text{N}^{15}\text{ND}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 229,11718, gefunden: 229,11684.

6.5 Synthese von Derivaten für biochemische Analysen

((1*R*, 2*S*, 4*R*)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-2-hydroxycyclopentyl)methyl 5-((3*aS*, 4*S*, 6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3, 4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoat (109a**)**



109a

$C_{19}H_{28}N_6O_5S$
452,18 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde Biotin (76,3 mg, 340 μ mol, 1,10 Äq.) in abs. DMF (3,1 mL) gelöst, EDC · HCl (62,4 mg, 402 μ mol, 1,30 Äq.) und DMAP (49,1 mg, 402 μ mol, 1,30 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde cAzadC (**1**, 70 mg, 309 μ mol, 1,00 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei -3 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM \rightarrow DCM:MeOH / 7:3) gereinigt. Das erhaltene Produkt wurde per semipräparativer HPLC (10 % \rightarrow 35 % MeCN in 45 min, t_R 13,8 min) gereinigt um den Biotin-Ester **109a** (15,3 mg, 33,9 μ mol) mit einer Ausbeute von 11 % als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0,17$ (DCM:MeOH / 3:1).

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.29$ (s, 1H, H-6), 7.45 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-7a), 7.40 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-7b), 6.53 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-15b), 6.40 (s, 1H, H-15a), 4.91 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, OH), 4.76–4.66 (m, 1H, H-1'), 4.30 (dd, $J = 7.7, 5.0$ Hz, 1H, H-17), 4.17 (dd, $J = 10.9, 5.8$ Hz, 1H, H-5'a), 4.13 (ddd, $J = 7.8, 4.4, 1.8$ Hz, 1H, H-14), 4.03 (dq, $J = 9.2, 4.6$ Hz, 1H, H-3'), 3.96 (dd, $J = 10.9, 6.9$ Hz, 1H, H-5'b), 3.09 (ddd, $J = 8.6, 6.0, 4.3$ Hz, 1H, H-13), 2.82 (dd, $J = 12.4, 5.0$ Hz, 1H, H-18a), 2.57 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-18b), 2.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-9), 2.17–2.08 (m, 2H, H-2'a, H-6'a), 2.08–2.01 (m, 1H, H-4'), 1.82 (ddd, $J = 12.9, 8.6, 4.1$ Hz, 1H, H-2'b), 1.66–1.59 (m, 1H, H-12a), 1.59–1.51 (m, 3H, H-6'b, H-10), 1.49–1.40 (m, 1H, H-12b), 1.33 (tdd, $J = 14.3, 10.5, 6.3$ Hz, 2H, H-11) ppm.

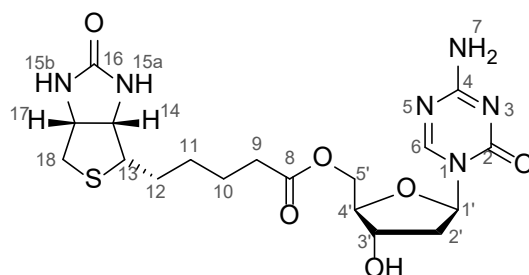
^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO): $\delta = 173,0$ (C-8), 165,9 (C-2), 162,8 (C-16), 157,8 (C-6), 153,7 (C-4), 71,4 (C-3'), 65,1 (C-5'), 61,1 (C-14), 59,2 (C-17), 55,4 (C-13), 54,8 (C-1'), 46,0 (C-4'), 39,6 (C-18), 38,4 (C-2'), 33,3 (C-9), 32,4 (C-6'), 28,9 (C-11, C-12), 24,6 (C-10) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3308,1$ (br. m), 2935,9 (m), 2256,2 (w), 1678,5 (s), 1631,1 (s), 1503,2 (m), 1474,4 (s), 1304,9 (w), 1260,3 (m), 1156,8 (m), 1069,2 (w), 799,0 (s), 595,0 (w), 536,0 (w) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_{19}H_{29}O_5N_6S]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 453,19147, gefunden: 453,19183.

Schmelzpunkt: 103,8 °C.

((2*R*, 3*S*, 5*R*)-5-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2*H*)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl 5-((3*aS*, 4*S*, 6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3, 4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoat (109b**)**

**109b**C₁₈H₂₆N₆O₆S

454,50 g/mol

Gemäß der Literatur^[388] wurde Biotin (82,6 mg, 338 µmol, 1,10 Äq.) in abs. DMF (3,0 mL) gelöst, EDC · HCl (61,9 mg, 399 µmol, 1,30 Äq.) und DMAP (48,7 mg, 399 µmol, 1,30 Äq.) zugegeben und auf -3 °C gekühlt. Anschließend wurde Decitabin (**24**, 70 mg, 307 µmol, 1,00 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei -3 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM → DCM:MeOH / 7:3) gereinigt. Das erhaltene Produkt wurde per semipräparativer HPLC (15 % → 45 % MeCN in 45 min, t_R 6,61 min) gereinigt um den Biotin-Ester **109b** (13,4 mg, 29,4 µmol) mit einer Ausbeute von 10 % als farbloser Feststoff erhalten.

R_f = 0,10 (DCM:MeOH / 7:3).

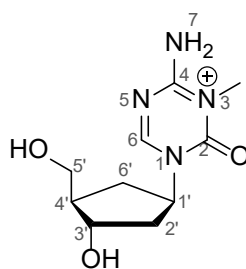
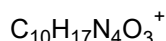
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.27 (s, 1H, H-6), 7.60 (s, 2H, H-7), 6.47 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-15b), 6.40 (s, 1H, H-15a), 6.02 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 4.30 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 1H, H-17), 4.26–4.22 (m, 1H, H-3'), 4.22–4.17 (m, 2H, H-5'), 4.12 (ddd, *J* = 7.7, 4.5, 1.8 Hz, 1H, H-14), 3.96 (dt, *J* = 5.7, 3.9 Hz, 1H, H-4'), 3.08 (ddd, *J* = 8.6, 6.1, 4.4 Hz, 1H, H-13), 2.82 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H, H-18a), 2.57 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-18b), 2.32 (td, *J* = 7.4, 3.4 Hz, 2H, H-9), 2.29–2.18 (m, 2H, H-2'), 1.66–1.57 (m, 1H, H-12a), 1.57–1.51 (m, 2H, H-10), 1.49–1.41 (m, 1H, H-12b), 1.39–1.27 (m, 2H, H-11) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ = 172,3 (C-8), 165,9 (C-16), 162,8 (C-2), 156,0 (C-6), 152,9 (C-4), 85,4 (C-1'), 84,2 (C-4'), 70,2 (C-3'), 63,7 (C-5'), 61,1 (C-14), 59,2 (C-17), 55,3 (C-13), 39,7 (C-18), 39,4 (C-2'), 33,2 (C-9), 27,9 (C-11, C-12), 24,2 (C-10) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3300,9 (br. m), 2935,9 (m), 1682,8 (s), 1633,9 (s), 1507,5 (m), 1471,6 (s), 1293,4 (w), 1260,3 (w), 1159,7 (w), 1086,4 (s), 961,4 (w), 866,6 (w), 799,0 (s), 760,2 (w), 727,2 (w), 597,8 (w), 541,8 (w), 426,8 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₁₈H₂₇O₆N₆S]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 455,17073, gefunden: 455,17115.

Schmelzpunkt: 106,3 °C.

4-Amino-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-hydroxy-4-(methoxymethyl)cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (111)**111**

241,27 g/mol

Gemäß der Literatur^[526] wurde cAzadC (**1**, 80 mg, 354 μmol , 1,00 Äq.) in abs. THF (17,7 mL) gelöst, NaH (60 wt% in Mineralöl; 15,6 mg, 389 μmol , 1,10 Äq.) zugegeben und für 20 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Me_2SO_4 (36,9 μL , 389 μmol , 1,10 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 19 h bei 65 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM \rightarrow DCM:MeOH / 7:3) gereinigt. Das erhaltene Produkt wurde per semipräparativer HPLC (ddH₂O + 0,1 % FA isokratisch, t_R 3,76 min) gereinigt, um den Methylether **111** (12,9 mg, 54 μmol) mit einer Ausbeute von 15 % als farblosen Feststoff zu erhalten.

$R_f = 0,20$ (DCM:MeOH / 7:3).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 8.63$ (s, 1H, H-6), 4.83 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.01 (dq, $J = 8.0, 4.1$ Hz, 1H, H-3'), 3.54–3.46 (m, 1H, H-5'a), 3.40–3.36 (m, 1H, H-5'b), 3.32 (s, 3H, H-8), 2.22–2.15 (m, 1H, H-6'a), 2.12 (ddd, $J = 13.1, 9.5, 6.7$ Hz, 1H, H-2'a), 1.95–1.90 (m, 1H, H-4'), 1.87 (dq, $J = 8.0, 4.1, 3.6$ Hz, 1H, H-2'b), 1.58 (dt, $J = 12.8, 9.5$ Hz, 1H, H-6'b) ppm.

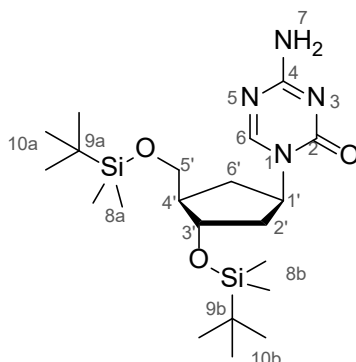
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 158,4$ (C-2), 157,0 (C-6), 147,4 (C-4), 71,1 (C-3'), 65,0 (C-5'), 56,8 (C-1'), 48,9 (C-4'), 38,4 (C-2'), 32,1 (C-6'), 30,6 (C-8) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3342,6$ (s), 3213,3 (s), 1748,9 (w), 1616,7 (s), 1508,9 (m), 1483,1 (m), 1323,5 (w), 1201,4 (s), 1054,8 (m), 972,9 (s), 931,2 (m), 797,6 (s), 773,1 (s), 576,3 (s) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}_4]^+$, $[\text{M}]^+$: berechnet: 241,12952, gefunden: 241,12946.

Schmelzpunkt: 181,5 °C.

4-Amino-1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl) cyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (113**)**



113

$C_{21}H_{42}N_4O_3Si_2$
454,76 g/mol

Gemäß der Literatur^[296] wurde cAzadC (**1**, 50 mg, 221 μ mol, 1,00 Äq.) in abs. DMF (1,2 mL) gelöst, Imidazol (45,1 mg, 663 μ mol, 3,00 Äq.) und TBSCl (99,9 mg, 663 μ mol, 3,00 Äq.) zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (25 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger $NaHCO_3$ -Lösung (1 M, 2 \times 15 mL) sowie *brine*-Lösung (5 \times 20 mL) gewaschen. Nach Trocknen ($MgSO_4$) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM:MeOH / 10:0 \rightarrow 97:3) gereinigt. Das geschützte Nucleosid **113** (73 mg, 161 μ mol) wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 73 % erhalten.

$R_f = 0,22$ (DCM:MeOH / 95:5).

¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.05$ (s, 1H, H-6), 6.18 (s, 1H, H-7a), 5.39 (s, 1H, H-7b), 4.98 (p, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.24 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-3'), 3.68 (dd, $J = 10.1, 4.5$ Hz, 1H, H-5'a), 3.62 (dd, $J = 10.1, 4.5$ Hz, 1H, H-5'b), 2.36 (dt, $J = 13.0, 8.2$ Hz, 1H, H-6'a), 2.08 (td, $J = 8.7, 4.4$ Hz, 1H, H-4'), 2.04 (ddd, $J = 8.2, 5.5, 2.9$ Hz, 2H, H-2'), 1.65–1.58 (m, 1H, H-6'b), 0.90 (d, $J = 0.8$ Hz, 9H, H-10a), 0.87 (d, $J = 0.7$ Hz, 9H, H-10b), 0.06 (s, 3H, H-8b), 0.05 (s, 3H, H-8b), 0.05 (s, 3H, H-8a), 0.04 (s, 3H, H-8a) ppm.

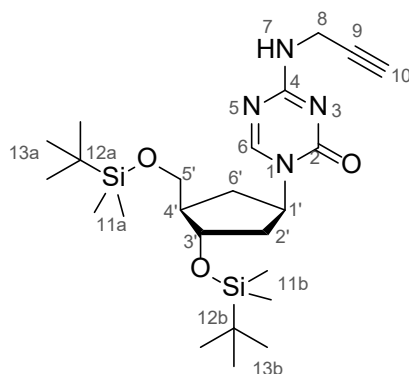
¹³C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 165,9$ (C-2), 156,9 (C-6), 154,4 (C-4), 73,0 (C-3'), 55,5 (C-5'), 49,7 (C-1'), 40,4 (C-4'), 32,2 (C-2'), 26,1 (C-10a), 25,9 (C-10b), 18,5 (C-9a), 18,1 (C-9b), -4,5 (C-8a), -4,6 (C-8a), -5,3 (C-8b) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 3356,5$ (m), 3177,8 (m), 2952,8 (m), 2929,1 (m), 2856,5 (m), 1675,9 (m), 1645,0 (s), 1610,6 (m), 1509,1 (w), 1468,8 (s), 1389,9 (w), 1360,3 (w), 1301,5 (s), 1250,5 (s), 1156,3 (w), 1098,9 (s), 1071,1 (s), 1004,6 (m), 937,8 (m), 876,0 (m), 833,6 (s), 797,3 (s), 775,6 (s), 668,5 (s) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[C_{21}H_{43}O_3N_4Si_2]^+$, $[M+H]^+$: berechnet: 455,28682, gefunden: 455,28693.

Schmelzpunkt: 191,3 °C.

1-((1*R*, 3*S*, 4*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)cyclopentyl)-4-(prop-2-yn-1-ylamino)-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (115)

**115**

$C_{24}H_{44}N_4O_3Si_2$
492,81 g/mol

Gemäß der Literatur^[541] wurde aktiviertes Molsieb (4 Å, 66 mg) zu abs. DMF (0,66 mL) gegeben, CsOH · H₂O (3,7 mg, 22 μmol, 0,20 Äq.) zugegeben und für 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das TBS-geschützte cAzadC **113** (50 mg, 110 μmol, 1,00 Äq.) zugegeben und für 30 min bei RT gerührt. Schließlich wurde Propargylbromid (11,5 μL, 121 μmol, 1,10 Äq.) zugegeben und für 3 d bei RT gerührt. Anschließend wurde EtOAc (3 mL) zugegeben, das Gemisch durch einen Spritzenfilter filtriert und mit EtOAc (2 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit NaOH (1 N, 5 mL) gewaschen, die wässrige Phase mit EtOAc (4 × 5 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit *brine*-Lösung gewaschen. Nach Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (*iso*-Hexan:EtOAc / 9:1 → EtOAc) gereinigt. Das geschützte Nukleosid **115** (7 mg, 14 μmol) wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 22 % erhalten.

$R_f = 0,29$ (*iso*-Hexan:EtOAc / 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.61 (s, 1H, H-6), 4.93 (p, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-8), 4.24–4.21 (m, 1H, H-3'), 3.68 (dd, $J = 10.2, 4.4$ Hz, 1H, H-5'a), 3.59 (dd, $J = 10.2, 4.5$ Hz, 1H, H-5'b), 2.30 (dt, $J = 13.0, 8.2$ Hz, 1H, H-6'a), 2.22 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-10), 2.09–2.05 (m, 1H, H-4'), 1.99 (ddd, $J = 9.0, 5.2, 3.5$ Hz, 2H, H-2'), 1.63–1.58 (m, 1H, H-6'b), 0.90 (s, 9H, H-13a), 0.88 (s, 9H, H-13b), 0.06 (s, 3H, H-11a), 0.06 (s, 3H, H-11a), 0.05 (s, 3H, H-11b), 0.05 (s, 3H, H-11b) ppm.

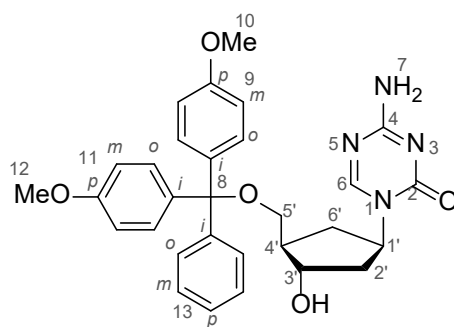
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 153,9 (C-4*), 148,2 (C-6*), 77,6 (C-9*), 73,1 (C-3'), 70,3 (C-10*), 63,2 (C-5'), 54,3 (C-1'*), 49,5 (C-4'), 40,5 (C-2'), 32,0 (C-8), 31,3 (C-6'*), 26,1 (C-13a), 25,9 (C-13b), 18,5 (C-12a*), 18,1 (C-12b*), -4,5 (C-11b), -4,6 (C-11b), -5,3 (C-11a), -5,3 (C-11a) ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 2928,7$ (s), 2856,9 (s), 1720,2 (m), 1632,5 (s), 1560,7 (w), 1442,8 (m), 1386,8 (w), 1360,9 (w), 1250,3 (s), 1165,46 (w), 1087,9 (s), 1006,0 (m), 935,4 (m), 832,1 (s), 773,1 (s), 623,7 (m), 419,6 (w) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z für [C₂₄H₄₅O₃N₄Si₂]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 493,30247, gefunden: 493,30289.

6.6 Synthese des Phosphoramidits

4-Amino-1-((1*R*, 3*R*, 4*S*)-3-((bis(4-chlorophenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxycyclopentyl)-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-on (**120**)

**120**C₂₈H₂₆Cl₂N₄O₃

537,44 g/mol

Gemäß der Literatur^[593] wurde cAzadC (**1**, 161 mg, 712 μmol, 1,00 Äq.) in abs. Pyridin (7,12 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde DMTrCl (253 mg, 748 μmol, 1,05 Äq.) zugegeben, der Kolben mit Alufolie umhüllt und das Gemisch über Nacht gerührt. Anschließend wurde wässrige gesättigte NaHCO₃-Lösung (50 mL) zugegeben und mit DCM (3 × 50 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen (MgSO₄) wurde Toluol (30 mL) zugegeben und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM → DCM:MeOH / 6:4; Zusatz von 0,1 % Et₃N) gereinigt, um das DMT-geschützte cAzadC **120** (230 mg, 435 μmol) mit einer Ausbeute von 61 % zu erhalten.

R_f = 0,44 (DCM:MeOH / 47:3).

¹H-NMR (500 MHz, DCM-d₂): δ = 7.93 (s, 1H, H-6), 7.43–7.40 (m, 2H, H-13*o*), 7.33–7.28 (m, 6H, H-9*o*, H-11*o*, H-13*m*), 7.26–7.20 (m, 1H, H-13*p*), 6.86–6.81 (m, 4H, H-9*m*, H-11*m*), 5.95 (s, 1H, H-7*a*), 5.41 (s, 1H, H-7*b*), 4.78 (tt, *J* = 9.9, 7.6 Hz, 1H, H-1'), 4.28–4.22 (m, 1H, H-3'), 3.78 (s, 6H, H-10, H-12), 3.29 (dd, *J* = 9.1, 5.3 Hz, 1H, H-5'a), 3.13 (dd, *J* = 9.1, 7.1 Hz, 1H, H-5'b), 2.27–2.16 (m, 2H, H-4', H-6'a), 2.16–2.12 (m, 1H, H-2'a), 2.08 (ddd, *J* = 19.3, 8.8, 4.2 Hz, 1H, H-2'b), 1.63–1.56 (m, 1H, H-6'b) ppm.

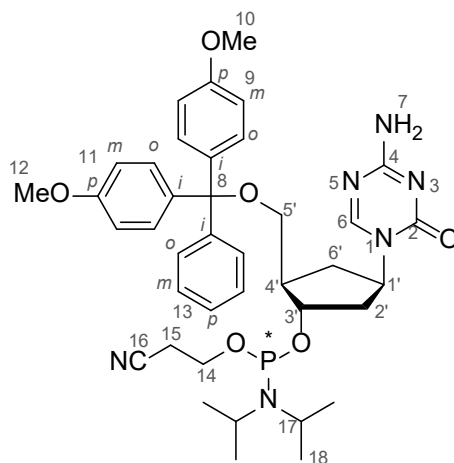
¹³C-NMR (126 MHz, DCM-d₂): δ = 166,4 (C-2), 159,0 (C-9*p*, C-11*p*), 157,4 (C-6), 154,2 (C-4), 145,4 (C-13*i*), 136,4 (C-9*i*), 136,2 (C-11*i*), 130,4 (C-9*o*, C-11*o*, C-13*m*), 130,3 (C-9*o*, C-11*o*, C-13*m*), 128,4 (C-13*o*), 128,3 (C-13*o*), 127,2 (C-13*p*), 113,5 (C-9*m*, C-11*m*), 86,7 (C-8), 74,9 (C-3'), 65,7 (C-5'), 56,1 (C-1'), 55,6 (C-10, C-12), 47,7 (C-4'), 39,4 (C-2'), 33,4 (C-6') ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3332,6 (m), 3200,4 (m), 2933,1 (m), 1678,5 (w), 1629,6 (s), 1608,1 (s), 1506,1 (s), 1470,1 (s), 1445,7 (w), 1411,2 (w), 1299,1 (m), 1245,9 (s), 1174,1 (s), 1154,0 (m), 113,7 (w), 1066,3 (m), 1028,9 (s), 932,7 (w), 827,8 (s), 799,0 (s), 755,9 (m), 727,2 (m), 701,3 (s), 528,0 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* für [C₃₀H₃₃O₅N₄]⁺, [M+H]⁺: berechnet: 529,24455, gefunden: 529,24627.

Schmelzpunkt: 108,2 °C.

(1S, 2R, 4R)-4-(4-Amino-2-oxo-1, 3, 5-triazin-1(2H)-yl)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)cyclopentyl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidit (121**)**

**121**

$C_{39}H_{49}N_6O_6P$
728,83 g/mol

Gemäß der Literatur^[593] wurde das geschützte cAzadC **120** (231 mg, 437 μ mol, 1,00 Äq.) in abs. DCM (5,50 mL) gelöst und Diisopropylammoniumtetrazolid (45 mL, 262 μ mol, 0,60 Äq.) sowie 2-Cyanoethyl *N, N, N', N'*-Tetraisopropylphosphorodiamidit (180 μ L, 568 μ mol, 1,30 Äq.) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM \rightarrow DCM:IPA 4:6) gereinigt. Das Phosphoramidit wurde aus Benzol (4,00 mL) lyophilisiert, um so das trockene Produkt **121** (237 mg, 325 μ mol) als farblosen Feststoff mit einer Ausbeute von 74 % zu erhalten.

Die erhaltenen Diastereomere konnten nicht via Säulenchromatographie getrennt werden. Im NMR-Spektrum ist entsprechend der doppelte Signalsatz zu erkennen.

$R_f = 0,32$ (DCM: IPA / 47:3).

¹H-NMR (500 MHz, MeCN-d₃): $\delta = 8.01$ (s, 1H, H-6), 8.01 (s, 1H, H-6), 7.46–7.42 (m, 4H, H-13_m), 7.33–7.29 (m, 12H, H-9_m, H-11_m, H-13_o), 7.24–7.19 (m, 2H, H-13_p), 6.87–6.84 (m, 8H, H-9_o, H-11_o), 6.10 (s, 2H, H-7), 5.93 (s, 2H, H-7), 4.76–4.66 (m, 2H, H-1'), 4.40–4.32 (m, 1H, H-3'), 4.31–4.23 (m, 1H, H-3'), 3.77 (s, 6H, H-10, H-12), 3.76 (s, 6H, H-10, H-12), 3.75–3.71 (m, 1H, H-14_a), 3.70–3.66 (m, 1H, H-14_b), 3.61–3.57 (m, 2H, H-14), 3.52 (ddq, $J = 13.6, 10.2, 6.7$ Hz, 4H, H-17), 3.25 (ddd, $J = 9.0, 7.0, 5.0$ Hz, 2H, H-5'), 3.04 (ddd, $J = 21.5, 9.1, 6.8$ Hz, 2H, H-5'), 2.60 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H-15), 2.49 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H-15), 2.35 (ddd, $J = 19.5, 13.5, 6.0$ Hz, 2H, H-6'a), 2.31–2.24 (m, 2H, H-4'), 2.15 (dddd, $J = 11.4, 10.0, 8.5, 6.0$ Hz, 3H, H-2'), 2.06 (ddd, $J = 13.5, 8.7, 4.5$ Hz, 1H, H-2'), 1.73 (ddt, $J = 29.7, 12.2, 9.9$ Hz, 2H, H-6'b), 1.15–1.10 (m, 20H, H-18), 1.03 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H, H-18) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, MeCN-d₃): $\delta = 167,4$ (C-2), 159,6 (C-9_i, C-11_i), 158,7 (2 \times , C-6), 155,1 (2 \times , C-4), 146,4 (2 \times , C-13_i), 137,3 (C-9_p, C-11_p), 137,2 (C-9_p, C-11_p), 131,1 (C-9_m, C-11_m), 131,0 (C-9_m, C-11_m), 129,1 (C-13_m), 129,0 (C-13_m), 128,8 (C-13_o), 127,7 (2 \times , C-13_p), 119,6 (C-16), 119,5 (C-16), 114,0 (C-9_o, C-11_o), 86,7 (2 \times , C-8), 76,1 (d, C-3'), 75,2 (d, C-3'), 65,4 (C-5'a), 64,9 (C-5'b), 59,5 (d, C-14), 59,2 (d, C-14), 56,8 (2 \times , C-1'), 55,9 (2 \times , C-10, C-12), 48,1 (d, C-4'), 47,9 (d, C-4'), 43,9 (2 \times , C-17), 43,8 (2 \times , C-17), 38,8 (d, C-2'), 38,7 (d, C-2'), 33,8 (C-6'), 33,6 (C-6'), 25,0 (C-18), 24,9 (2 \times , C-18), 24,8 (2 \times , C-18), 21,0 (dd, C-15) ppm.

³¹P-NMR (202 MHz, MeCN-d₃): $\delta = 147,2, 147,0$ ppm.

ATR-IR: $\tilde{\nu} = 2966,1$ (m), 1685,7 (m), 1636,8 (w), 1609,5 (s), 1508,9 (m), 1465,8 (s), 1365,2 (s), 1300,6 (w), 1248,8 (w), 1201,4 (s), 1177,0 (w), 1155,4 (s), 1126,7 (w), 1030,4 (w), 977,2 (s), 935,5 (s), 829,2

(w), 799,0 (s), 755,9 (s), 727,2 (w), 702,7 (w), 583,5 (m), 459,9 (s), 444,1 (w), 431,1 (w), 423,9 (w), 402,4 (w) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z für $[\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{N}_6\text{P}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 729,34240, gefunden: 729,35492.

Schmelzpunkt: 53,9 °C.

Für den einmaligen Einbau in den DNA-Strang wurde das PA **121** (25,5 mg, 35 μmol) unter Argon in abs. MeCN (0,15 mL) und abs. DCM (0,20 mL) gelöst, durch einen Spritzenfilter filtriert und an den entsprechendem PA-Port am Synthesizer angebracht. Nach dem Entgasen der Lösung (10 Sekunden) wurde der Schlauch manuell gespült und die Synthese an der Maschine gestartet. Geladen waren Festphasenkartuschen mit 1,0 μmol Festphase. Die Methode wurde auf eine 10-minütige Kopplungszeit für modifizierte PAs umgeschrieben. Nachdem die Synthese beendet war, wurden die Festphasenkartuschen über Nacht oder mindestens 1 h im Hochvakuum getrocknet. Entschützt wurde der Strang mit 0,05 M K_2CO_3 in MeOH mindestens 17 h über Nacht bei RT in einem ThermoShaker bei 500 rpm. Die Festphase wurde anschließend mit Wasser ($3 \times 0,2$ mL) gewaschen, das MeOH an der SpeedVac für 15–20 min entfernt und der Strang mittels einer SepPak-Säule entsalzt. Anschließend konnte dieser mittels semipräparativer HPLC gereinigt und per MALDI-MS auf sein Molekulargewicht hin untersucht werden.

7 Publikationen

Erste biochemische Ergebnisse aus Zellstudien welche den erheblichen Unterschied der Wirkmechanismen des *orphan drugs* Decitabins und des sich im Forschungsstadium befindenden cAzadCs aufzeigen, sowie dessen erhöhte Stabilität mithilfe molekularer Dynamik Simulationen erklären konnten, wurden bereits veröffentlicht. Die entsprechende Publikation ist in Chemistry - A European Journal am 25.03.2022 von John Wiley and Sons im Wiley-VCH GmbH Verlag unter einer Creative Commons CC BY Lizenz publiziert worden und mit freundlicher Genehmigung auf den nächsten Seiten abgedruckt.

Als Chemiker dieses fachübergreifenden Projektes war ich für die Synthese von cAzadC und dessen Distribution zu den jeweiligen Experten für theoretische Chemie und Biochemie verantwortlich.

Epigenetic Anti-Cancer Treatment With a Stabilized Carbocyclic Decitabine Analogue

Franziska R. Traube,^{*,[a]} Natércia F. Brás,^[a, b] Wynand P. Roos,^[c] Corinna C. Sommermann,^[a] Tamara Diehl,^[c] Robert J. Mayer,^[a, d] Armin R. Ofial,^[a] Markus Müller,^[a] Hendrik Zipse,^[a] and Thomas Carell^{*,[a]}

Dedicated to Prof. Wolfgang Beck on the occasion of his 90th birthday.

Abstract: 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine, AzadC) is a nucleoside analogue, which is in clinical use to treat patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia. Its mode of action is unusual because the compound is one of the few drugs that act at the epigenetic level of the genetic code. AzadC is incorporated as an antimetabolite into the genome and creates covalent, inhibitory links to DNA methyltransferases (DNMTs) that methylate 2'-deoxycytidine (dC) to 5-methyl-dC (mdC). Consequently, AzadC treatment leads to a global loss of mdC, which presumably results in a reactivation of silenced genes, among them tumor suppressor and DNA damage response genes. Because AzadC suffers

from severe instability, which limits its use in the clinic, a more sophisticated AzadC derivative would be highly valuable. Here, we report that a recently developed carbocyclic AzadC analogue (cAzadC) blocks DNMT1 in the AML cell line MOLM-13 as efficient as AzadC. Moreover, cAzadC has a surprisingly strong anti-proliferative effect and leads to a significantly higher number of double strand breaks compared to AzadC, while showing less off-target toxicity. These results show that cAzadC triggers more deleterious repair and apoptotic pathways in cancer cells than AzadC, which makes cAzadC a promising next generation epigenetic drug.

Acute myeloid leukemia (AML) is a severe highly diverse cancer of the blood building system and very difficult to treat.^[1] AzadC 1 (Figure 1) is an orphan drug used to treat AML in older, medically non-fit patients with a significant beneficial effect on therapeutic outcome.^[2] The broader use of AzadC 1 is currently limited due to the high hematotoxicity of the compound, which

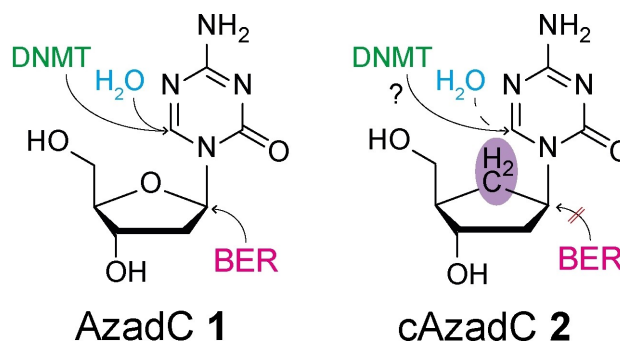


Figure 1. Presentation of 5-aza-2'-deoxycytidine (AzadC 1) and a carbocyclic derivative thereof (cAzadC 2). AzadC 1 is already in use in the clinic as an orphan drug against different forms of leukemia. For AzadC 1, nucleophilic attacks occur at position 6 of the nucleobase by water or DNMT enzymes or at the anomeric C1'-center by a BER glycosylase. For cAzadC 2, hydrolysis is dramatically slowed down (H₂O dashed line) and the nucleophilic attack at position C1' by glycosylases is not possible anymore.

[a] Dr. F. R. Traube, Dr. N. F. Brás, C. C. Sommermann, Dr. R. J. Mayer, Dr. A. R. Ofial, Dr. M. Müller, Prof. H. Zipse, Prof. T. Carell
Department of Chemistry
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: franziska.traube@lmu.de
thomas.carell@lmu.de

[b] Dr. N. F. Brás
LAQV-REQUIMTE
Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
Rua do Campo Alegre s/n, 4169-007 Porto (Portugal)

[c] Dr. W. P. Roos, T. Diehl
Institut für Toxikologie
Universitätsmedizin Mainz
Obere Zahlbacher Str. 67, 55131 Mainz (Germany)

[d] Dr. R. J. Mayer
Present address: Institut des Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS)
Université des Strasbourg & CNRS
8 Allée Gaspard Monge, 67000 Strasbourg (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/chem.202200640>

© 2022 The Authors. Chemistry - A European Journal published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

sets tight boundaries to the dosing.^[3] The treatment requires repeated administration cycles, which, however, can go on for several years.^[2,4] AzadC 1 operates at the epigenetic level and has potential also for the treatment of cancers other than AML.^[5] The compound is converted in cells into the corresponding triphosphate followed by a DNA-polymerase-based integration into the genome of dividing cells.^[6] After genomic incorporation, AzadC 1 represents an abnormal base, which is removed together with its degradation products by the base

excision repair (BER) system.^[7] BER requires a family of glycosylases, which attack the anomeric C1' position with a nucleophile to cleave the glycosidic bond. This ultimately results in a DNA single-strand break (SSB), which is quickly repaired.^[8] In addition, genomically incorporated AzadC 1 inhibits DNA methyltransferases (DNMTs).^[6a] These enzymes initially catalyze a nucleophilic attack at the C6 position of dC, resulting in a covalent intermediate that is subsequently methylated at C5 by the cofactor SAM. In the last step, the DNMT enzyme is released.^[9] This DNA methylation in promoter regions causes a permanent silencing of the corresponding genes.^[10] Due to the exchange of the –CH at the C5 position to N, AzadC 1 leads to covalent trapping of the DNMTs because the protein cannot be released anymore after the methylation reaction.^[6a] This trapping creates DNA-protein crosslinks, which results in a reduction of the global mdC levels.^[6c] AzadC 1 has therefore three levels of action. First, it triggers BER-mediated repair of the abnormal base itself or of its degradation products. Second it leads to DNA-protein adducts, which are repaired by Fanconi anemia-dependent homologous recombination (FA pathway).^[7,11] Finally, it operates at the epigenetic level by causing global DNA demethylation.

The problem with AzadC 1 is its inherent instability against hydrolytic deactivation especially at basic or acidic pH, which is often a hallmark of the microenvironment of solid tumors.^[12] We believe that stabilized 5-azacytosine-based nucleosides with a more defined drug profile would have a chance to become broadly beneficial as anti-cancer agents. Recently, we reported

in this direction a carbocyclic version of AzadC (cAzadC 2), in which the ribose O-atom is replaced by a CH₂-group (Figure 1). We observed that cAzadC 2 is substantially more stable than AzadC 1 towards hydrolysis.^[12b] However, in a mouse embryonic stem cell model, cAzadC 2 required higher dosage and longer incubation times to show a demethylation effect comparable to AzadC 1, raising the question whether cAzadC 2 can inhibit the DNMTs as efficiently as AzadC 1 in cancer cells.

First, we determined the rate constant of a nucleophilic attack of a hydroxide ion at position C6. In principle, we observed the same reaction kinetics for AzadC 1 (Figure S1a) and cAzadC 2 (Figure S1b), but in accordance with our previous study, the rate constant *k* was 59 times higher for AzadC 1 ($k = 2.13 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) compared to cAzadC 2 ($k = 3.6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). To obtain quantitative data on the potentially reduced electrophilic activity of the C6 position in 2, we modelled the corresponding reaction products after the nucleophilic attack of the hydroxyl group on C6 from the representative optimized geometries of AzadC 1, cAzadC 2 and dC 3. After conformational analysis of 1, 2 and 3 in an aqueous environment (see Schemes S1 and S2, Tables S1–S4 and Figure S2 for details), the respective product geometries were optimized at the SMD(water)/B3LYP-D3/6-31+G(d,p) level of theory. Figure 2 illustrates the most thermodynamically stable conformers for each of the three systems together with their respective conformational free energies. The reaction energies ΔG_{R} , which are shown for the best conformers, were calculated relative to the best conformer of the neutral parent plus free

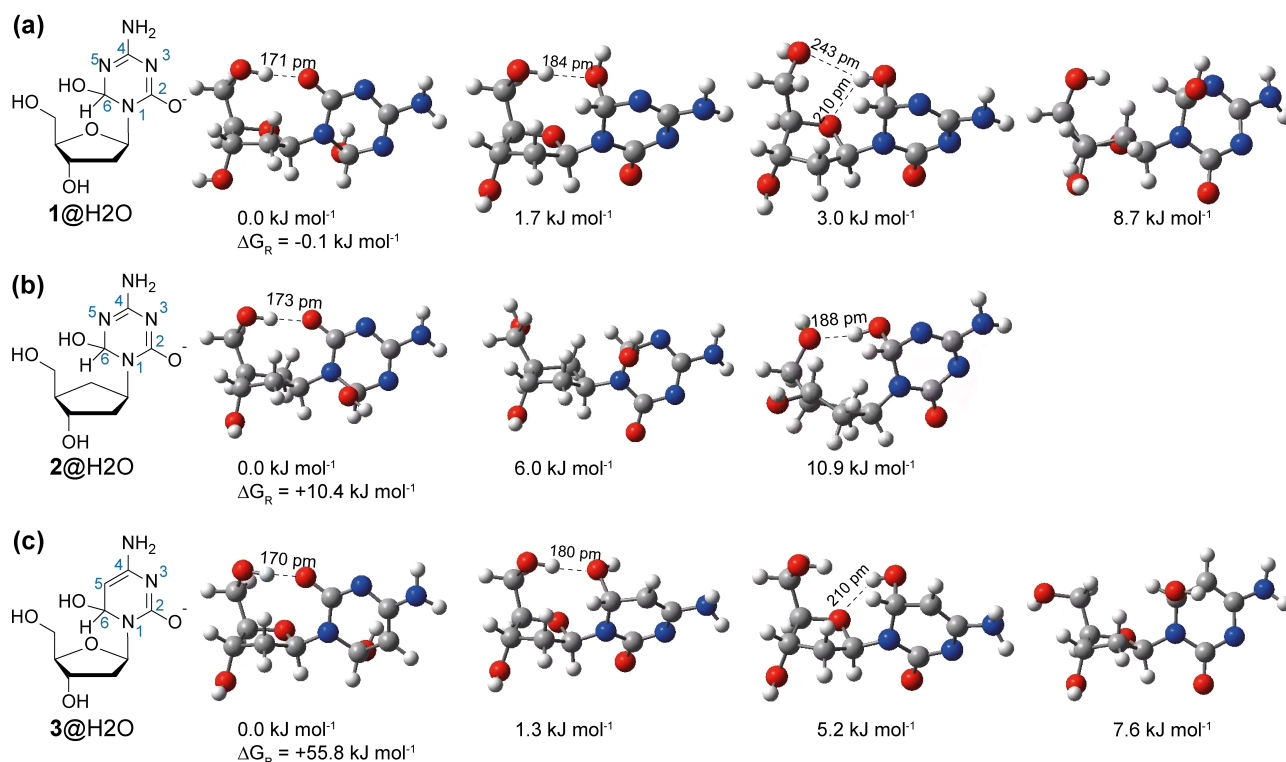


Figure 2. Thermodynamically most favored geometries of a) AzadC 1@H₂O, b) cAzadC 2@H₂O and c) dC 3@H₂O obtained at the SMD(water)/B3LYP–D3/6–31 + G(d,p) level of theory. The Gibbs energy of each molecule and the reaction energies are displayed.

hydroxide in water. Conformations with intramolecular hydrogen bonds between the C5'-OH and the O2 of the base (*syn* conformation) were the most favorable for all three systems studied here. For both AzadC 1 and dC 3, we also found conformers with an intramolecular H-bond between the added nucleophile hydroxyl group and the ring oxygen atom of ribose, which is absent in cAzadC 2, resulting in an energetically favored six-membered ring. The reaction energies for hydroxide addition to the C6 carbon atom are most favorable for AzadC 1 ($\Delta G_R = -0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$), followed by cAzadC 2 ($\Delta G_R = +10.4 \text{ kJ mol}^{-1}$), and finally dC 3 ($\Delta G_R = +55.8 \text{ kJ mol}^{-1}$). The reaction energy difference between AzadC 1 and cAzadC 2 of $\Delta\Delta G_R = 10.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ is remarkably similar to the activation free energy difference observed between those two systems in water at 20 °C of $\Delta\Delta G_{act} = 9.9 \text{ kJ mol}^{-1}$. We therefore concluded that the reactivity difference between AzadC 1 and cAzadC 2 towards hydrolysis presumably results from the stability differences between the initially formed hydroxide adducts at the C6 position (1@H₂O versus 2@H₂O).

Next, we aimed to assess how AzadC 1 and cAzadC 2 inhibit DNMTs in cultured cells. Inhibition of DNMTs by crosslinking them to the DNA is followed by crosslink removal as part of the repair process and subsequent DNMT degradation (Figure 3a).^[13] Therefore, efficient DNMT inhibition by 5-azacytosine results in reduced amounts of DNMT enzymes, which can be detected by western blotting. To test the ability of AzadC 1 and cAzadC 2 to deplete the DNMT pool, we decided to use the AML cell line MOLM-13 as a model system, since AzadC 1 is primarily applied in the clinic against AML and myelodysplastic syndrome. We treated the MOLM-13 for 40 h with 0.5 μM AzadC 1 or 0.5 μM cAzadC 2. MOLM-13 that were treated with 0.03%

DMSO only served as a control. Afterwards, the cells were lysed and the nuclear proteins were isolated as previously described. We then analyzed the amount of DNMT1, which is the most abundant DNMT in MOLM-13 by western blotting.^[14] For both compounds, we detected a clear depletion of DNMT1 and to our surprise, the effect was stronger for cAzadC 2 compared to AzadC 1 (Figures 3b and S3). This shows that the higher hydrolytic stability of cAzadC 2 does not affect its reactivity towards DNMTs *in cellulo*. Next, we investigated how application of increasing concentrations of AzadC 1 or cAzadC 2 (0.5, 1.0 or 3.0 μM) for 72 h influence the global mdC levels in MOLM-13 using our previously reported UHPLC-QQQ-MS method (Figure 3c).^[15] We observed the expected substantial reduction of mdC for all concentrations and both compounds. At higher concentrations (3.0 μM), AzadC 1 seems to show a slightly better reduction (-57%) compared to cAzadC 2 (-40%), but the difference was not statistically significant considering the overall reduction compared to the untreated control.

To compare AzadC 1 and cAzadC 2 in their ability to trigger cell death in the MOLM-13, we measured the viability of MOLM-13 with increasing exposure time (24–72 h) and concentrations (0.5–3.0 μM) of AzadC 1 and cAzadC 2 using a methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) based metabolic activity assay.^[16] The data show that both compounds lead to strongly reduced metabolic activity indicating advanced cell death with increased exposure time at all concentrations that were examined (Figure 4a). In this assay the stabilized compound cAzadC 2 showed a stronger effect than AzadC 1, although the difference between AzadC 1 and cAzadC 2 was not statistically significant when considering the overall reduc-

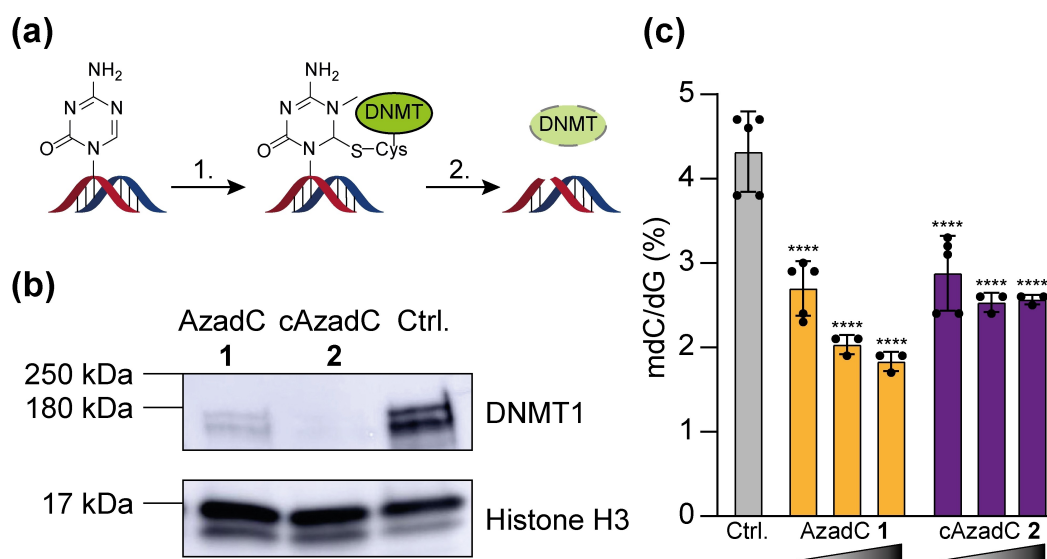


Figure 3. Inhibition of DNMT enzymes in MOLM-13 by AzadC 1 or cAzadC 2. a) Formation of DNA-protein crosslinks between DNMT enzymes and 5-azacytosines (1.) is followed by removal of the crosslink and DNMT degradation (2.). b) Western blot against DNMT1 and histone H3 as a loading control. 15 μg of nuclear lysate of MOLM-13 that were treated for 40 h with 0.5 μM of AzadC 1 or cAzadC 2 were used. Untreated cells served as a negative control. c) Global mdC levels determined by UHPLC-QQQ-MS of MOLM-13 that were treated for 72 h with either 0.5, 1.0 or 3.0 μM of AzadC 1 or cAzadC 2 (increasing concentrations are represented by the triangle). Ordinary one-way ANOVA combined with Tukey's multiple comparisons test was used to analyze differences in the mdC levels between the different conditions. The adjusted p-value of the treated cells compared to the Ctrl. is displayed, **** p_{adj} -value < 0.0001. Each dot represents measurements from one biologically independent experiment.

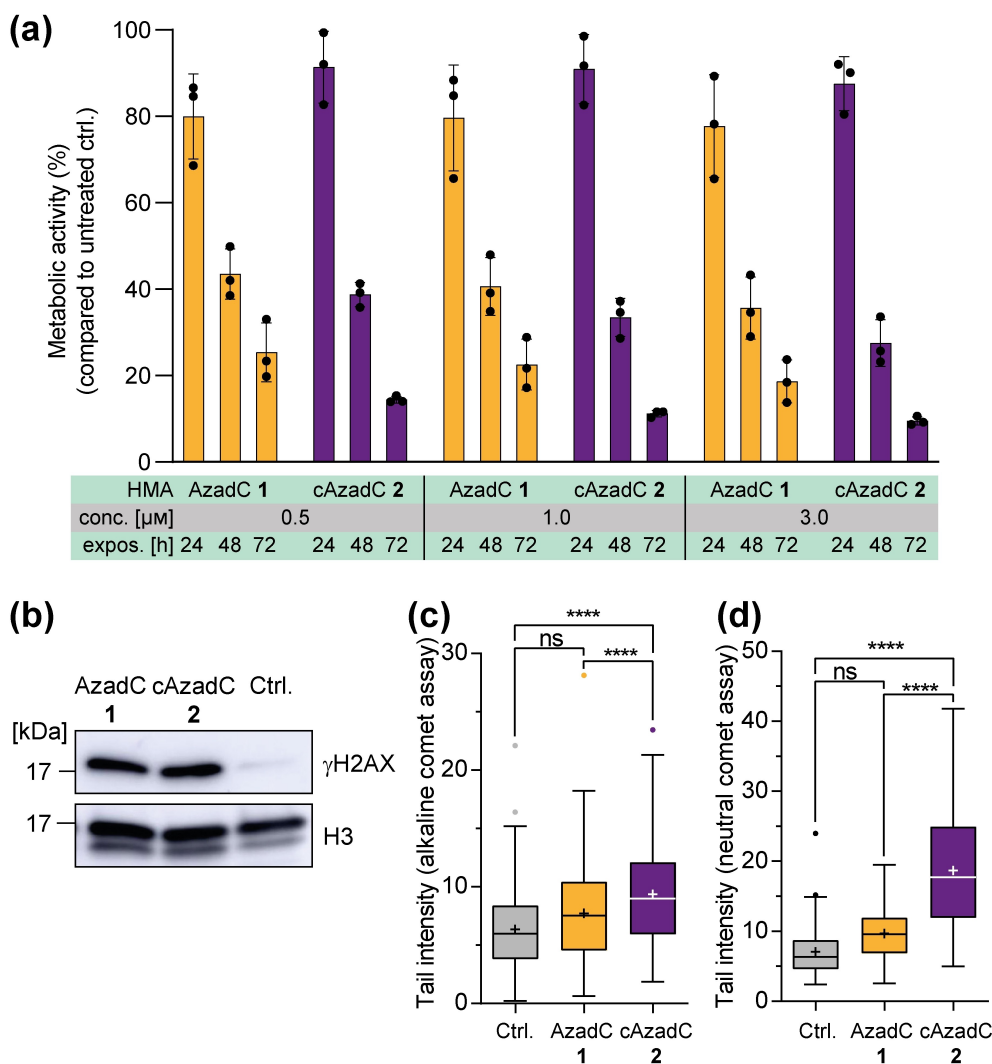


Figure 4. Cellular viability and DNA damage in MOLM-13 after AzadC 1 or cAzadC 2 treatment. a) MTT assay to check for metabolic activity as an indicator for cell viability and proliferation of MOLM-13. The cells were treated for 24 h, 48 h or 72 h with 0.5, 1.0 or 3.0 μM of either AzadC 1 or cAzadC 2 before the assay was performed. Untreated cells served for each measurement as a reference to normalize the metabolic activity of the treated cells. Each dot represents one biologically independent sample. b) Western blot against γH2AX and histone H3 as a loading control. 15 μg of nuclear lysate of MOLM-13 that were treated for 40 h with 0.5 μM of AzadC 1 or cAzadC 2 were used. Untreated cells served as a negative control. c and d) MOLM-13 were treated for 60 h with either 0.5 μM of AzadC 1 or cAzadC 2 before the comet assay was performed. c) Result of the alkaline comet assay to determine DNA single-strand breaks. d) Result of the neutral comet assay to determine the DNA double-strand breaks. c) and d) Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests combined with Dunnett's T3 multiple comparisons test were used for the analysis. ns p_{adj} -value ≥ 0.5 , **** p_{adj} -value < 0.0001 . Three biologically independent experiments were performed for each condition and 50 tail measurements were performed within each biological replicate.

tion of metabolic activity compared to the untreated control. After 72 h of 3.0 μM cAzadC 2 exposure, the metabolic activity of the MOLM-13 was reduced to less than 10%, while still 20% residual metabolic activity was observed for MOLM-13 treated with 3.0 μM of AzadC 1. Given that both compounds have a dual function consisting of mdC reduction, which may reactivate silenced tumor suppressor genes, and formation of DNA-protein crosslinks, which is a severe form of DNA damage, the better performance of cAzadC 2 compared to AzadC 1 on the AML cell line might be caused by different repair profiles. All types of DNA repair involve SSBs as intermediates that are quickly repaired by the different repair machineries to avoid formation of the more deleterious double-strand breaks (DSBs),

a process which is dramatically accelerated by the accumulation of SSBs.^[17] The exchange of the ribose O in AzadC 1 to CH_2 in cAzadC 2 has the effect that repair glycosylases of BER cannot cleave the glycosidic bond anymore to create an abasic site. To investigate the level of DNA damage in MOLM-13 caused by 0.5 μM of AzadC 1 or cAzadC 2 exposure after 40 h, we performed first a western blot against γH2AX , which is a histone variant, phosphorylated at position Ser-139, that is placed at sites of DSBs to recruit the repair machinery. γH2AX therefore represents an early marker of severe DNA damage (Figures 4b and S3).^[18] As expected, the western blot shows highly increased levels of γH2AX , confirming that both compounds induced substantial DNA damage after 40 h. We then quantified

the extent of SSBs and DSBs in individual cells after longer exposure times (60 h). To this end we performed a single-cell gel electrophoresis comet assay.^[19] For the assay, MOLM-13 cells were incubated for 60 h with either 0.5 μM of AzadC 1 or cAzadC 2. Untreated cells served as a negative control, while cells treated with 150 μM of *t*-BuOOH for 1 h served as a positive control (Figure S4a and b). Afterwards, the cells were embedded in agarose placed on a slide and exposed to a lysis buffer. The DNA was subsequently denatured and subjected to electrophoresis followed by fluorescence microscopy, where it creates an image like a comet. The head of the comet is composed out of intact DNA, while the tail is generated by broken DNA. The longer the tail, the more broken DNA was generated by the added substance. Importantly, when the assay is conducted under neutral conditions, the tail is predominantly caused by DSBs, while under alkaline conditions SSBs and DSBs can be observed in theory. However, the contribution of the DSBs to the tail length is only marginal compared to the SSBs under alkaline conditions. The comet assay consequently allows to measure which types of DNA strand breaks are generated by a given compound. The data obtained for AzadC 1 and cAzadC 2 are depicted in Figure 4c and d. For both compounds, the levels of SSBs were increased relative to the untreated control (Figure 4c), but the increase was only significant for cAzadC 2 when comparing the tail intensities among all three treatments (untreated, AzadC 1 and cAzadC 2). Furthermore, we detected for cAzadC 2 highly increased levels of the deleterious DSBs not only compared to the untreated control but also compared to treatment with equal amounts of AzadC 1 (Figure 4d). The combined comet assay data suggest that AzadC 1 treatment either leads to less lesions than cAzadC 2 treatment or that lesions caused by AzadC 1 can be repaired more efficiently by the MOLM-13. Although the glycosidic bond of cAzadC 2 cannot be cleaved by BER glycosylases and hydrolytic degradation is dramatically reduced, which prevents the formation of abasic sites, treatment with cAzadC 2 lead to significantly more damage than treatment with AzadC 1. Existing literature suggests that abasic sites caused by AzadC 1 are quickly repaired when the BER machinery is intact.^[7] This can explain the comet assay results. Important is the observation that the levels of DSBs after 60 h were strongly increased after cAzadC 2 treatment. This shows that cAzadC 2 causes DNA lesions that remain unrepaired to a larger extent and are therefore highly deleterious for the cells.

In summary, our decitabine-derivative cAzadC 2 is not only chemically significantly more stable than AzadC 1, which makes administration easier, but it also shows increased activity to induce cell death of cancer cells despite the higher stability. Initial data about potential off-target toxicity of cAzadC 2 seem to indicate that the compound can be dosed much higher than AzadC 1 (Figure S5). This, together with the here reported data suggest that cAzadC 2 could open a new chapter in our desire to establish epigenetic anticancer treatments.

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support via CRC1309 (Project ID 325871075), CRC1361 (Project ID 893547839) and the DFG project 326039064. This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 741912 (EpiR). We are grateful for additional funding from the Volkswagen Foundation. N.F.B. thanks the Portuguese Foundation for Science and Technology for a research grant (CEECIND/02017/2018). R.J.M. thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a Kekulé fellowship. We thank Luis de la Osa de la Rosa for initial assistance with the MTT assays and passaging of MOLM-13. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: acute myeloid leukemia · cell death · DNA damage · DNA hypomethylating agents · DNA-methyltransferases · epigenetics · 5-aza-2'-deoxycytidine

- [1] H. Kantarjian, T. Kadia, C. DiNardo, N. Daver, G. Borthakur, E. Jabbour, G. Garcia-Manero, M. Konopleva, F. Ravandi, *Blood Cancer J.* **2021**, *11*, 41.
- [2] J. Stomper, J. C. Rotondo, G. Greve, M. Lübbert, *Leukemia* **2021**, *35*, 1873–1889.
- [3] J. Diesch, A. Zwick, A. K. Garz, A. Palau, M. Buschbeck, K. S. Götze, *Clin. Epigenet.* **2016**, *8*, 71.
- [4] H. M. Kantarjian, X. G. Thomas, A. Dmoszynska, A. Wierzbowska, G. Mazur, J. Mayer, J.-P. Gau, W.-C. Chou, R. Buckstein, J. Cermak, C.-Y. Kuo, A. Oriol, F. Ravandi, S. Faderl, J. Delaunay, D. Lysák, M. Minden, C. Arthur, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2670–2677.
- [5] a) R. L. Momparker, *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 188–188; b) M. Parhizkar, P. J. T. Reardon, A. H. Harker, R. J. Browning, E. Stride, R. B. Pedley, J. C. Knowles, M. Edirisinghe, *Nanoscale Adv.* **2020**, *2*, 1177–1186.
- [6] a) C. Stresemann, F. Lyko, *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8–13; b) S. Oz, G. Raddatz, M. Rius, N. Blagitko-Dorfs, M. Lübbert, C. Maercker, F. Lyko, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e152; c) S. Schiffers, T. M. Wildenhof, K. Iwan, M. Stadmeier, M. Müller, T. Carell, *Helv. Chim. Acta* **2019**, *102*.
- [7] M. L. Orta, A. Hoglund, J. M. Calderon-Montano, I. Dominguez, E. Burgos-Moron, T. Visnes, N. Pastor, C. Strom, M. Lopez-lazaro, T. Helleday, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9108–9120.
- [8] W. A. Beard, J. K. Horton, R. Prasad, S. H. Wilson, *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 137–162.
- [9] F. Lyko, *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 81–92.
- [10] a) A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6–21; b) A. Breiling, F. Lyko, *Epigenet. Chromatin* **2015**, *8*, 24.
- [11] M. L. Orta, J. M. Calderon-Montano, I. Dominguez, N. Pastor, E. Burgos-Moron, M. Lopez-Lazaro, F. Cortes, S. Mateos, T. Helleday, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 5827–5836.
- [12] a) E. Boedtker, S. F. Pedersen, *Annu. Rev. Physiol.* **2020**, *82*, 103–126; b) T. M. Wildenhof, S. Schiffers, F. R. Traube, P. Mayer, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 12984–12987; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 13118–13121; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 12984–12987.

- [13] a) K. Ghoshal, J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala, S. T. Jacob, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 4727–4741; b) J. Stinglele, R. Bellelli, S. J. Boulton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 563–573.
- [14] a) J. D. Dignam, R. M. Lebovitz, R. G. Roeder, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 1475–1489; b) E.-H. Hur, S.-H. Jung, B.-K. Goo, J. Moon, Y. Choi, D. R. Choi, Y.-J. Chung, J.-H. Lee, *Oncotarget* **2017**, *8*, 11748–11762.
- [15] F. R. Traube, S. Schiffers, K. Iwan, S. Kellner, F. Spada, M. Müller, T. Carell, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 283–312.
- [16] J. van Meerloo, G. J. Kaspers, J. Cloos, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237–245.
- [17] S. P. Scott, T. K. Pandita, *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 1463–1475.
- [18] L. J. Mah, A. El-Osta, T. C. Karagiannis, *Leukemia* **2010**, *24*, 679–686.
- [19] a) A. R. Collins, *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 249–261; b) P. L. Olive, J. P. Banáth, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 23–29.

Manuscript received: February 27, 2022

Accepted manuscript online: March 14, 2022

Version of record online: March 25, 2022

Chemistry–A European Journal

Supporting Information

Epigenetic Anti-Cancer Treatment With a Stabilized Carbocyclic Decitabine Analogue

Franziska R. Traube,* Natércia F. Brás, Wynand P. Roos, Corinna C. Sommermann, Tamara Diehl, Robert J. Mayer, Armin R. Ofial, Markus Müller, Hendrik Zipse, and Thomas Carell*

Materials and Methods

Comparison of the reactivity of AzadC 1 and cAzadC 2

The reactivity of AzadC 1 and cAzadC 2 was determined using stopped-flow spectrophotometry using the absorbance changes in the UV region. For both compounds, the attack of hydroxide ions was monitored in aqueous solution at 20 °C (pH 11 – 12). To simplify the evaluation, the kinetic measurements were performed under 1st order conditions, i.e., the hydroxide concentrations were chosen to be high enough to be considered constant during the course of reactions (12.5 mM KOH and 0.35 mM AzadC 1 or 5.0 mM KOH and 0.41 mM cAzadC 2).

The UV spectra in Figure S1a show a two-step reaction between AzadC 1 and OH⁻. In the first step of the reaction sequence, a new species was formed within a few seconds with a clearly pronounced absorption at 248 nm (left panel, brown to green UV spectra). In a slower subsequent reaction, the peak at 248 nm was disappearing while a new species with an absorption maximum at 225 nm was formed (left panel, green to black UV spectra). The isosbestic point (UV spectra green to black) indicates that the decay of the AzadC/OH⁻ primary adduct to the secondary product proceeded without forming any intermediates. The first-order rate constant k_{obs} for the temporal change of the absorption at 248 nm by formation of the primary adduct was determined at different OH⁻ concentrations. The rate for the formation of the primary adduct showed a clear linear dependence on the concentration of the nucleophilic OH⁻ ions. From the slope of the plot (Figure S1a, right panel), a rate constant $k = 2.13 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ could be determined for the attack of the OH⁻ ions on AzadC.

In principle, the observed kinetics for the reactions of the OH⁻ ions with cAzadC 2 are analog to those for OH⁻/AzadC (Figure S1b). There is also an initial increase of absorption at 248 nm (left panel, brown to green UV spectra), which is caused by the formation of the primary adduct. However, as the reaction continues, the adduct disappears, leaving behind a second species with an absorption maximum at 228 nm (left panel, green to black UV spectra). Since the formation of the primary adduct was much slower in this case, but the subsequent reaction was equally rapid, the primary adduct did not accumulate as much as for the AzadC/OH⁻ reaction, which resulted in a lower absorption maximum at 248 nm. Again, the rate for the formation of the primary adduct showed a clear linear dependence on the concentration of the nucleophilic OH⁻ ions. From the slope of the plot (Figure S1b, right panel), a rate constant $k = 3.60 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ could be determined for the attack of the OH⁻ ions on cAzadC, which is 59 times smaller than for the analog reaction of AzadC/OH⁻.

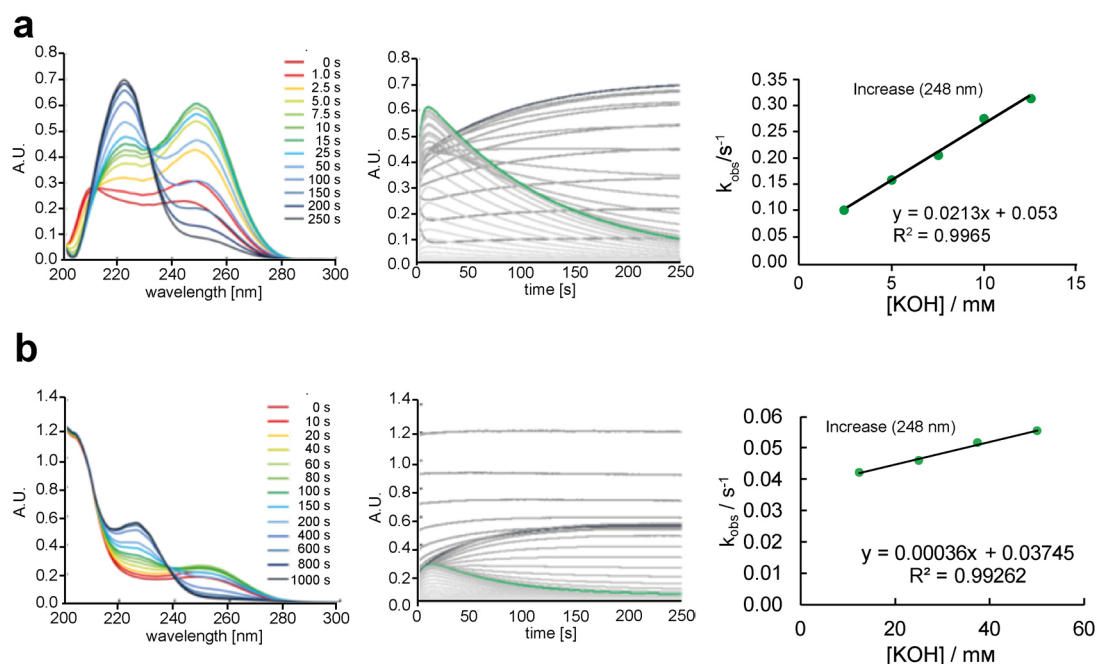
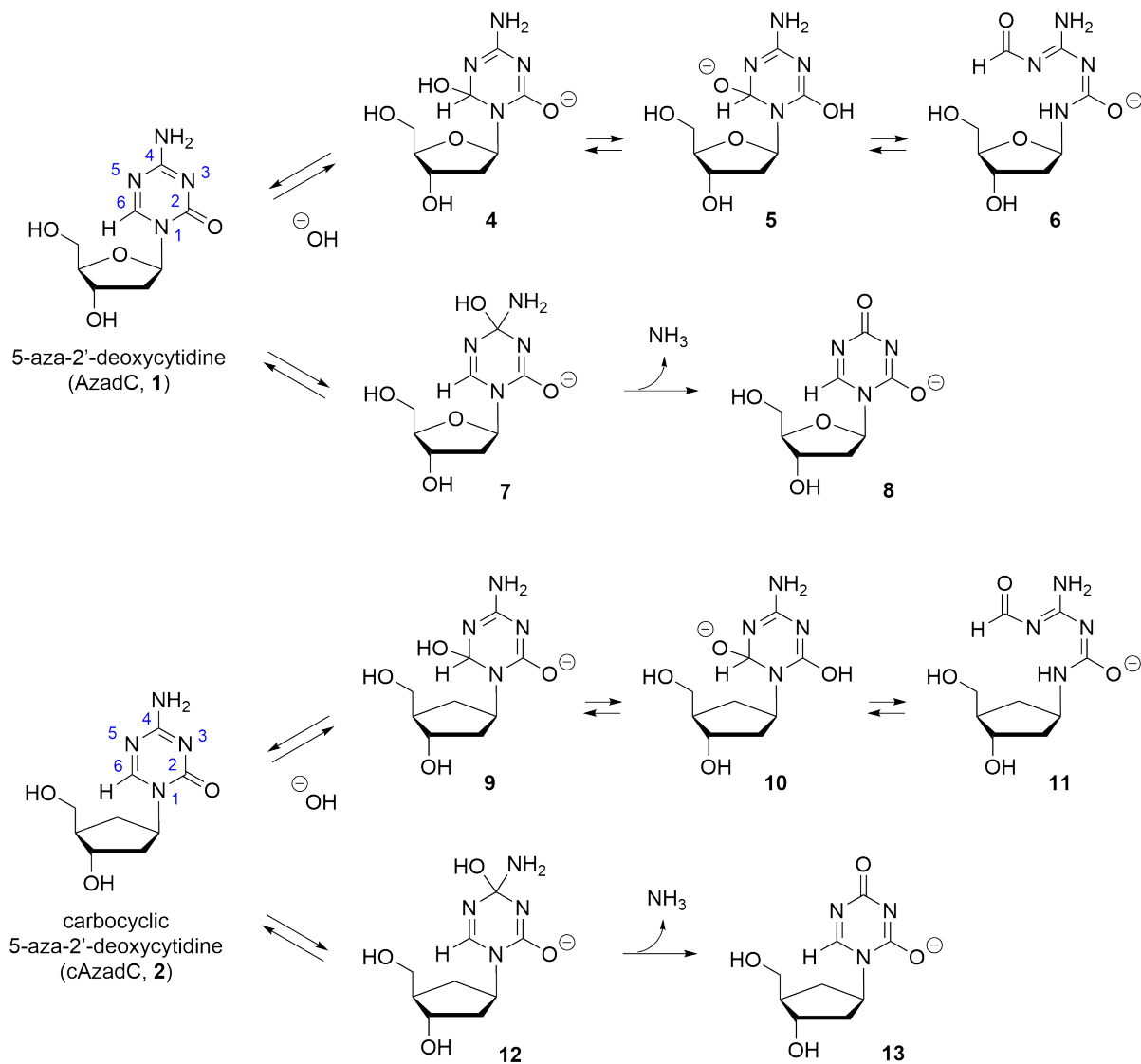


Figure S1. Temporal change of the UV spectra for the reactions of AzadC (a) or cAzadC (b) with OH⁻ in aqueous solution at 20 °C and the determined rate constants k_{obs} (1st order reaction) for the formation of the primary adducts. **a** [OH⁻] = 12.5 mM, [AzadC] = 0.35 mM **b** [OH⁻] = 5.0 mM, [cAzadC] = 0.41 mM.

Theoretical studies on AzadC **1** and cAzadC **2**

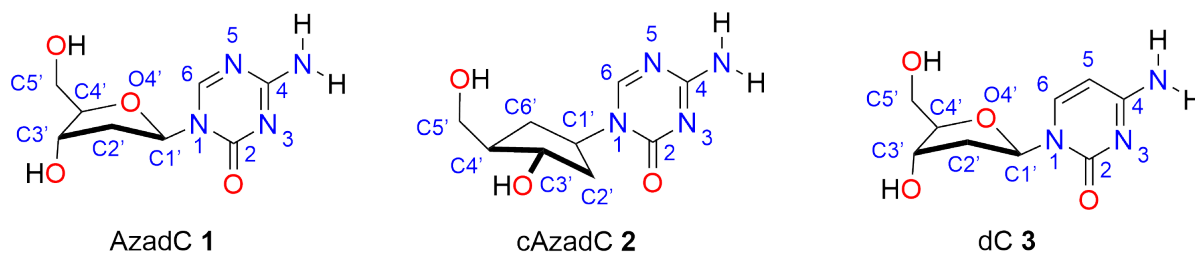
The hydrolysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (AzadC, Decitabine, **1**) in basic aqueous solution (pH 11 - 12, 20 °C) proceeds approx. 59 times faster as compared to that of its carbocyclic analog cAzadC **2**. Following the currently established mechanism for aqueous degradation of **1**,^[1] this may include initial hydroxide attack at the C6 position, followed by ring opening to derivative **6** (and ultimately elimination of formate). Alternatively, reversible attack of hydroxide at C4 may trigger the well-established deamination mechanism of cytosine, which eventually leads to elimination of ammonia and the C4-keto derivative **8**.^[2] For **2** the same reaction pathways may be anticipated (Scheme S1).



Scheme S1. Base hydrolysis pathways for 5-aza-2'-deoxycytidine (AzadC, Decitabine, **1**) and its carbocyclic analog **2**.

To rationalize the experimental observations, the conformational space accessible to **1** and **2** in aqueous solution has been analyzed using classical Molecular Dynamics (MD) simulations in water. For the sake of comparison, we also include 2'-deoxycytidine (dC, **3**) in these studies. MD simulations were performed using the Amber 18 software package^[3] using the ff14SB and bsc1 force field parameters.^[4] The parameterization of the AzadC (**1**) and cAzadC (**2**) compounds was adapted from that of dC **3**. Each molecule was inserted in a rectangular solvent box (TIP3P water type), in a total of 1026 water molecules. Each system was minimized and equilibrated for 100 ps, followed by 60 ns of production. The SHAKE algorithm^[5] was employed to constrain the bond lengths involving hydrogen atoms. To control the pressure (1 atm) and the temperature (310 K) of the systems, the Berendsen barostat and the Langevin thermostat^[6] were used. Periodic boundary conditions were considered. Non-bonded interaction pairs were calculated within a 10 Å. Beyond that, Coulomb interactions were treated with the Particle-Mesh Ewald (PME) method^[7] and vdW interactions were truncated. The MD trajectories were analysed with the CPPTRAJ module^[8], combined with the Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.2) program^[9] for visualization and image rendering. For each MD trajectory, three different cluster analyses were carried out, in which all geometries were grouped in 10 groups, using a distance metric: the root-mean square deviation of *i*) all atoms of the molecule, *ii*) all atoms of the base ring, and *iii*) all atoms of the sugar ring. Tables S1 displays the frequency of each group as well as the dihedrals ω_1 (O4'-C1'-N1-C6) and ω_2 (O4'-C1'-C2'-C3') values of the representative geometry of each group for the AzadC, cAzadC, and dC molecules, respectively.

A clear preference for the *anti* conformation ($\omega_1 > 0^\circ$) of the base in all molecules was observed. This is expected due to the fact that the DNA duplex adopts the *anti* conformation of nucleosides (well mimicked/represented by the force field). Regarding the ribose ring pucker, the C2'-endo is the most populated conformation in both dC and AzadC; however, the substitution of the O4' by a carbon changes this tendency to a C3'-endo conformation ($\omega_2 < 0^\circ$) as shown schematically in Scheme S2.



Scheme S2. Schematic representations of the preferred conformations of dC (**3**), AzadC (**1**), and cAzadC (**2**) according to MD simulations in water.

Table S1. Frequency of each group throughout the MD simulation as well as the dihedrals ω_1 (O4'-C1'-N1-C6) and ω_2 (O4'-C1'-C2'-C3') of the representative geometry of each group for dC (**3**), AzadC (**1**), and cAzadC (**2**).

cluster by rms	group	AzadC (1)			cAzadC (2)			dC (3)		
		frequency / %	$\omega_1 / ^\circ$	$\omega_2 / ^\circ$	frequency / %	$\omega_1 / ^\circ$	$\omega_2 / ^\circ$	frequency / %	$\omega_1 / ^\circ$	$\omega_2 / ^\circ$
all atoms	1	81	41.59	37.02	42.6	75.8	-6.1	55.7	46.0	41.8
	2	7	73.53	38.41	29.9	57.7	42.4	19.6	25.3	36.8
	3	6	34.83	46.36	10.7	44.4	-30.7	9.6	59.4	28.6
	4	1.8	22.81	44.06	7.2	74.0	41.0	6.1	16.8	35.8
	5	1.5	9.02	13.32	2.5	54.7	-2.9	5.5	74.4	40.5
	6	1.3	34.79	-9.76	2.2	26.1	51.4	2.1	44.9	-10.4
	7	0.5	85.88	43.35	1.9	95.3	-26.2	0.7	-120.2	43.6
	8	0.4	41.57	47.3	1.5	92.7	7.3	0.3	68.4	31.3
	9	0.3	-43.56	35.49	0.7	76.1	35.2	0.2	84.0	-10.3
	10	0.2	-5.94	-39.89	0.7	73.2	46.6	0.1	68.1	49.3
base ring	1	49.4	41.48	32.54	73.6	62.3	-6.6	33.3	46.0	41.76
	2	15.9	6.4	37.95	7.3	62.9	-6.5	23.6	25.34	36.84
	3	8.8	26.48	35.91	5.4	53.1	4.1	22	59.44	28.55
	4	7.1	36.88	44.91	4.7	77.7	38.5	0.9	16.78	35.84
	5	7	39.74	25.35	2.4	42.1	-9.3	3.5	74.37	40.51
	6	4.7	48.67	39.5	2	49.2	-4.0	3.2	44.88	-10.35
	7	4	39.47	36.28	1.8	75.7	43.7	2.7	-120.16	43.64
	8	1.6	44.14	42.99	1.6	68.4	-22.9	2	68.39	31.33
	9	0.7	-3.33	27.66	0.8	55.8	40.0	0.4	83.95	-10.3
	10	0.7	27.48	43.66	0.4	112.0	49.1	0.2	68.14	49.33
ribose ring	1	33.5	16.08	34.63	34.2	51.59	40.51	48.9	59.61	41.72
	2	24.1	34.27	40.23	33	33.01	-15.28	23.5	54.85	44.09
	3	14.6	63.82	46.78	15	66	0.41	17.4	44.02	32
	4	8.3	10.25	24.91	4.1	54.2	-9.66	3.3	50.45	33.73
	5	7.3	46.07	51.18	3.6	80.49	39.37	2.3	68.19	51.35

	6	5.1	37.74	28.68	3.5	3.41	22.89	2	78.27	43.25
	7	2.5	70.23	16.8	2.2	68.39	-22.87	1.7	63.88	-11.58
	8	2.2	29.29	30.44	1.6	55.87	-30.08	0.7	57.99	16.66
	9	1.8	45.9	43.44	1.5	32.85	32.4	0.3	53.4	18.12
	10	0.5	42.81	42.43	1.4	48.1	49.22	0.1	46.85	6.81

Single-point quantum chemical energy calculations at the SMD(water)/B3LYP-D3/6-31+G(d,p) level of theory were then performed on the thirty representative geometries of each compound obtained in the MD simulations. Table S2 shows the total energy values in kJ mol^{-1} of all geometries of the three molecules. Figure S1 illustrates the most favored geometries (lowest total energy) of AzadC (**1**) and cAzadC (**2**) solvated with all water molecules within a radius of 400 pm, while Table S3 summarizes the charge distribution of some atoms as well as the HOMO/LUMO energy data for these geometries. No significant differences can be observed in the HOMO/LUMO energies of the three molecules. Analysis of the charge distributions in the base region indicates that the substitution of the C5 by a nitrogen atom in both AzadC and cAzadC molecules increases the charge of the neighbors C4 and C6 atoms by *ca.* 0.16 and 0.27. However, no significant differences were observed in the charge of key atoms as well as in the overall charge of the base ring of both AzadC (**1**) and cAzadC (**2**): the charge of the C6 atom amounts to +0.344 in AzadC (**1**) and +0.349 in cAzadC (**2**). In addition, it was verified that the charge distribution of the key atoms is independent of the base (*anti* or *syn*) and ribose (C2'-endo or C3'-endo) conformations. Concerning the ribose group, the substitution of the O4' by a carbon on cAzadC decreased the charges of the C1' and C4' by 0.34, in comparison with both AzadC and dC molecules. As the C1' is close to C6 of the base, this particular electronegativity effect could, in combination with the conformational effect (from the ribose ring pucker change), influence or reduce the nucleophilic attack of the HO^- on the C6.

Table S2. Single-point energy calculations at the SMD(water)/B3LYP-D3/6-31+G(d,p) level of theory. E_{tot} and ΔE_{tot} values are in Hartree and kJ mol^{-1} units, respectively.

cluster by rms	group	AzadC (1)		cAzadC (2)		dC (3)	
		E_{tot} SMD(water)/ B3LYP-D3/ 6-31+G(d,p)	ΔE_{tot}	E_{tot} SMD(water)/ B3LYP-D3/ 6-31+G(d,p)	ΔE_{tot}	E_{tot} SMD(water)/ B3LYP-D3/ 6-31+G(d,p)	ΔE_{tot}
all atoms	1	-832.0798025	0.1	-796.1639656	38.5	-816.0173034	63.8
	2	-832.0773821	6.4	-796.1618055	44.2	-816.0231602	48.5
	3	-832.0626682	45.1	-796.1780663	1.5	-816.017933	62.2
	4	-832.0738105	15.8	-796.1652015	35.3	-816.0179378	62.2
	5	-832.0798334	0.0	-796.159843	49.4	-816.0170988	64.4
	6	-832.0670444	33.6	-796.1589965	51.6	-816.0232427	48.2
	7	-832.0704742	24.6	-796.1567612	57.5	-816.0223944	50.5
	8	-832.0616325	47.8	-796.1693341	24.4	-816.0034762	100.1
	9	-832.0732924	17.2	-796.1509493	72.7	-816.0342452	19.3
	10	-832.0634447	43.0	-796.1604646	47.7	-816.0062143	92.9
base ring	1	-832.0641103	41.3	-796.16921	24.8	-816.0132825	74.4
	2	-832.0725515	19.1	-796.1558364	59.9	-816.0220693	51.3
	3	-832.0750838	12.5	-796.1743076	11.4	-816.0206029	55.2
	4	-832.075635	11.0	-796.1464377	84.6	-816.0242915	45.5
	5	-832.0706781	24.0	-796.1659611	33.3	-816.012191	77.3
	6	-832.0695186	27.1	-796.1786455	0.0	-816.0254292	42.5
	7	-832.0756101	11.1	-796.1664473	32.0	-816.0039746	98.8
	8	-832.0747626	13.3	-796.1495968	76.3	-816.022872	49.2

	9	-832.0396054	105.6	-796.1641989	37.9	-816.0212608	53.4
	10	-832.060693	50.3	-796.1706543	21.0	-816.0018177	104.5
ribose ring	1	-832.0577641	57.9	-796.1677223	28.7	-816.0225052	50.2
	2	-832.0702711	25.1	-796.1454403	87.2	-816.0320508	25.1
	3	-832.0656523	37.2	-796.1511173	72.3	-816.0416146	0.0
	4	-832.0763641	9.1	-796.1695313	23.9	-816.0159893	67.3
	5	-832.079079	2.0	-796.1779298	1.9	-816.0129497	75.3
	6	-832.0629524	44.3	-796.1602721	48.2	-816.007289	90.1
	7	-832.0627538	44.8	-796.1495968	76.3	-816.0230578	48.7
	8	-832.0744174	14.2	-796.1413294	98.0	-816.0189656	59.5
	9	-832.0752297	12.1	-796.1621835	43.2	-816.0213363	53.2
	10	-832.0723323	19.7	-796.1617467	44.4	-816.0270276	38.3

Table S3. Charge distribution (Natural Bond Orbital (NBO) analysis) of some atoms as well as the HOMO/LUMO energy data at the SMD(water)/B3LYP-D3/6-31+G(d,p) level of theory, for the geometries with the lowest total energy of each compound.

	atom	AzadC (1)	cAzadC (2)	dC (3)	AzadC (1) - cAzadC (2)	AzadC (1) - dC (3)	cAzadC (2) - dC (3)
base	N1	-0.479	-0.446	-0.463	-0.03	-0.02	0.02
	C2	0.807	0.801	0.800	0.01	0.01	0.00
	O2	-0.731	-0.759	-0.755	0.03	0.02	0.00
	N3	-0.635	-0.631	-0.652	0.00	0.02	0.02
	C4	0.596	0.589	0.440	0.01	0.16	0.15
	N4	-0.810	-0.815	-0.820	0.00	0.01	0.01
	H4_1	0.459	0.456	0.460	0.00	0.00	0.00
	H4_2	0.458	0.463	0.454	0.00	0.00	0.01
	N5	-0.587	-0.592	-	0.01	-	-
	C6	0.344	0.349	0.078	-0.01	0.27	0.27
	H6	0.267	0.280	0.279	-0.01	-0.01	0.00
total	-0.311	-0.306	-0.179	-0.01	-0.13	-0.13	
ribose	C1'	0.255	-0.083	0.259	0.34	0.00	-0.34
	H1'	0.275	0.307	0.264	-0.03	0.01	0.04
	C2'	-0.527	-0.514	-0.529	-0.01	0.00	0.02
	C3'	0.051	0.078	0.038	-0.03	0.01	0.04
	O3'	-0.830	-0.833	-0.828	0.00	0.00	0.00
	C4'	0.029	-0.308	0.039	0.34	-0.01	-0.35
	H4'	0.275	0.274	0.266	0.00	0.01	0.01
	C5'	-0.140	-0.117	-0.131	-0.02	-0.01	0.01
O5'	-0.824	-0.846	-0.823	0.02	0.00	-0.02	
conformation	base	<i>anti</i> / C6-up	<i>anti</i> / C6-up	<i>anti</i> / C6-up			
	ribose	C2'-endo	C3'-endo	C2'-endo			

MO	HOMO	-0.26307	-0.26085	-0.24356	0.00	-0.02	-0.02
	LUMO	-0.04119	-0.06335	-0.04255	0.02	0.00	-0.02
dihedral	$\omega 1$	9.057	49.215	44.081			
	$\omega 2$	13.267	-4.051	31.959			

All thirty representative geometries of each compound were then optimized at the SMD(water)/B3LYP-D3/6-31+G(d,p) level of theory. Figure S2 illustrates the thermo-dynamically most favored geometries of each compound, whilst Table S4 summarizes the charge distribution of some atoms as well as the HOMO/LUMO energy data for these geometries. The results are quite similar to those obtained in the single-point energy calculations. Again, it can be seen that AzadC (1) and cAzadC (2) share a rather similar charge distribution in the base, which also leads to comparable electrostatic potential energy maps for both. From this type of ground state data it is thus not immediately possible to derive significantly different reactivities towards nucleophiles at the C6 position of the base.

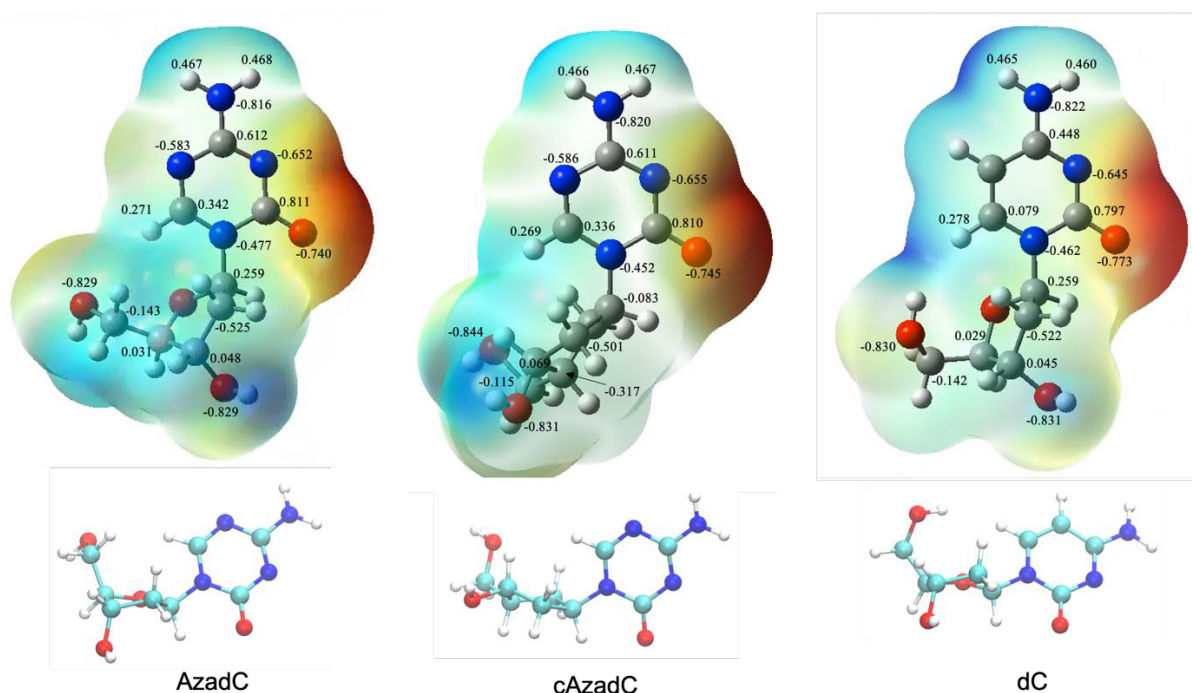


Figure S2. Thermo-dynamically most favored geometries of AzadC (1), cAzadC (2), and dC (3) obtained at the SMD(water)/B3LYP-D3/6-31+G(d,p) level of theory. The electrostatic potential energy (ESP) map and the charges (NBO analysis) of the key atoms are also shown.

Table S4. Charge distribution of some atoms as well as the HOMO/LUMO energy data for the thermo-dynamically most favored geometries of each compound.

	atom	AzadC (1)	cAzadC (2)	dC (3)	AzadC (1) - cAzadC (2)	AzadC (1) - dC (3)	cAzadC (2) - dC (3)
base	N1	-0.477	-0.452	-0.462	-0.03	-0.01	0.01
	C2	0.811	0.810	0.797	0.00	0.01	0.01
	O2	-0.740	-0.745	-0.773	0.00	0.03	0.03
	N3	-0.652	-0.655	-0.645	0.00	-0.01	-0.01
	C4	0.612	0.611	0.448	0.00	0.16	0.16
	N4	-0.816	-0.820	-0.822	0.00	0.01	0.00
	H4_1	0.467	0.466	0.465	0.00	0.00	0.00
	H4_2	0.468	0.467	0.460	0.00	0.01	0.01
	N5	-0.583	-0.586	-	0.00	-	-

	C6	0.342	0.336	0.079	0.01	0.26	0.26
	H6	0.271	0.269	0.278	0.00	-0.01	-0.01
	total	-0.29845	-0.298	-0.175	0.00	-0.12	-0.12
ribose	C1'	0.259	-0.083	0.259	0.34	0.00	-0.34
	H1'	0.275	0.297	0.270	-0.02	0.01	0.03
	C2'	-0.525	-0.501	-0.522	-0.02	0.00	0.02
	C3'	0.048	0.069	0.045	-0.02	0.00	0.02
	O3'	-0.829	-0.831	-0.831	0.00	0.00	0.00
	C4'	0.031	-0.317	0.029	0.35	0.00	-0.35
	H4'	0.265	0.272	0.264	-0.01	0.00	0.01
	C5'	-0.143	-0.115	-0.142	-0.03	0.00	0.03
	O5'	-0.829	-0.844	-0.830	0.02	0.00	-0.01
conformation	base	<i>anti /</i> C6-up	<i>anti /</i> C6-up	<i>anti /</i> C6-up			
	ribose	C2'-endo	C3'-endo	C2'-endo			
MO	HOMO	-0.26345	-0.26595	-0.24254	0.00	-0.02	-0.02
	LUMO	-0.05163	-0.05008	-0.04296	0.00	-0.01	-0.01
dihedral	$\omega 1$	38.632	68.251	40.259			
	$\omega 2$	29.115	-5.087	39.299			

Preparation of AzadC 1 and cAzadC 2 for cell culture experiments

AzadC 1 was purchased (Carbosynth NA02969) and used without further purification. cAzadC 2 was synthesized as previously described by *Wildenhof et al., 2019*^[10]. Both compounds were dissolved in DMSO to a final concentration of 10 mM. Aliquots (10 μ L) were made and stored at -80 °C. Directly before usage, the required volume of 10 mM stock solution was thawed and diluted to 100 μ M with Milli-Q H₂O.

Cell culture MOLM-13

MOLM-13 cells (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; AML cell line^[11]) were cultivated at 37°C in water saturated, CO₂-enriched (5%) atmosphere. RPMI 1640 (Sigma-Aldrich R0883), containing 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen 10500-064) and 1% (v/v) L-alanyl-L-glutamine (Sigma-Aldrich G8541) were used as growing medium. When reaching a density of 2x10⁶ cells/mL, the cells were routinely passaged to a density of 0.25 – 0.4 x 10⁶ cells/mL. Cells were tested at least once in two months for Mycoplasma contamination using Mycoplasma Detection Kit (Jena Bioscience PP-401L).

Treatment of MOLM-13 with AzadC 1 or cAzadC 2

For all experiments, cells were seeded at a concentration of 0.5 x 10⁶ cells/mL and directly treated with AzadC 1 or cAzadC 2 using the indicated concentration and incubation time during which the medium was not renewed. Cells that were treated with 0.03% (v/v) of DMSO (final concentration in the medium), which is the DMSO dose the cells were exposed to when treated with 3 μ M of AzadC 1 or cAzadC 2, served as a negative control in all experiments that involved MOLM-13.

Isolation of nuclear proteins

For the preparation of nuclear extracts 2.5 x 10⁶ cells were seeded and treated with 0.5 μ M of AzadC 1 or cAzadC 2 or 0.03% of DMSO for 40 h. After treatment, the cells were harvested and nuclear extracts were prepared as previously described by *Dignam et al., 1983*^[12] with the modification that every buffer was supplemented with Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich P5726) and Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (Sigma-Aldrich P0044), 1:100 each. Afterwards, the protein concentration was determined using a Bradford assay (Biorad #5000006) as described by the manufacturer. SDS loading buffer (final concentration 50 mM Tris pH 6.8, 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue) was added and the samples were incubated for 5 min at 92 °C before being stored at -20 °C. Before loading the samples on a polyacrylamide gel, the samples were heated for additional 2 min at 92 °C and vortexed thoroughly.

Western blotting

15 µg of nuclear extract in SDS loading buffer were loaded on a 4-15% precast polyacrylamide gel (Bio-Rad #4561083EDU) and Color-coded Prestained Protein Marker, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs P7719S) was used as a protein standard. The gel was run at constant 150 V for 60 min in SDS running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS). For blotting, we used a PVDF blotting membrane (GE Healthcare Amersham Hybond P0.45 PVDF membrane 10600023) and pre-cooled Towbin blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, 0.038% (w/v) SDS). The membrane was activated for 1 min in methanol, washed with Milli-Q water and equilibrated for additional 1 min in Towbin blotting buffer; the Whatman gel blotting papers (Sigma-Aldrich WHA 10426981) were equilibrated for 15 min in Towbin buffer and the precast gel was equilibrated for 5 min in Towbin buffer after the run. Western blotting (tank (wet) electro transfer) was performed at 4°C for 9 h at constant 35 V. After blotting, the PVDF membrane was blocked for 0.5 - 1 h at room temperature using 5% (w/v) milk powder in TBS-T (20 mM Tris pH = 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20). The primary antibodies were diluted in 5 mL of 5% (w/v) milk powder in TBS-T. The blocking suspension was discarded, and the diluted primary antibodies were added for 12 h at 4°C and shaking. After incubation, the primary antibodies were discarded, and the membrane was washed three times ten minutes with TBS-T. HRP-conjugated secondary antibodies were diluted in 5% (w/v) milk powder in TBS-T and added for 1 h at room temperature under shaking. Afterwards, the membrane was washed two times with TBS-T and one time with TBS (TBS-T without Tween-20) before SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific 34077) was used for imaging. Western blots were imaged using Amersham Imager 680 (auto exposure mode).

For imaging the same blot multiple times using different antibodies, the membrane was directly stripped after imaging. To this end, the membrane was put in TBS-T and the buffer was heated in a microwave until boiling. Afterwards, the buffer was discarded and the procedure was repeated in total three times. After stripping, the membrane was blocked again using 5% (w/v) milk powder in TBS-T and the protocol followed the above described procedure.

Primary antibodies

- Anti-DNMT1 antibody, Active Motif 61457 clone 2C1, rat monoclonal antibody, 1:1000
- Anti-phospho-Histone-H2AX (γH2AX, Ser-139) antibody, Millipore 05-636-1 clone 7BW301, mouse monoclonal antibody, 1:1000
- Anti-Histone-H3 antibody, Cell Signaling Technology 4499S clone D1H2, rabbit monoclonal antibody, 1:1000

Secondary antibodies

- HRP-conjugated anti-mouse IgG, Sigma-Aldrich AP130P, 1:5000
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG, Sigma-Aldrich A0545, 1:5000
- HRP-conjugated anti-rat IgG, Cell Signaling technology 7077S, 1:5000

Isolation of gDNA and UHPLC-QQQ-MS

For the determination of mdC levels, 1.5×10^6 cells were seeded and treated with either 0.5 µM, 1.0 µM or 3.0 µM of AzadC 1 or cAzadC 2 or with only 0.03% of DMSO for 72 h. After 72 h of incubation time, the cells were harvested, gDNA was isolated and UHPLC-QQQ-MS measurements were performed as previously described in *Traube et al., 2019*.^[13] Three biological independent experiments were performed for each experimental condition.

MTT assay

For the MTT assay, 5×10^4 cells were seeded in 100 µL RPMI/20% FBS medium that did not contain phenol red. The assay was performed as described previously^[14]. Each timepoint (24 h, 48 h or 72 h) included samples for 0.03% DMSO-treated cells and cells that were treated with 0.5 µM, 1.0 µM or 3.0 µM of either AzadC 1 or cAzadC 2. Each timepoint was measured individually and after measuring the absorption at 570 nm, the average of the technical replicates was calculated and the absorption of the AzadC 1 or cAzadC 2 treated cells was set in relation to the absorption measured for the DMSO-only treated cells, resulting in the relative metabolic activity. Three biologically independent experiments were performed per time point and each sample was measured in technical quadruplicates.

Alkaline and neutral comet assay

DNA single-strand breaks induced by AzadC 1 and cAzadC 2 were detected and quantified via single-cell gel electrophoresis under alkaline conditions, as described.^[15] Shortly, MOLM13 cells were exposed to 0.5 µM cAzadC and 0.5 µM AzadC and 60 h later the comet assay was performed. As positive control, cells were exposed to 150 µM tert-Butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) for 1 h. Cells were imbedded in 0.5 % low melting point agarose in PBS and spread onto glass slides coated with 1.2 % agarose. All following steps were performed at 4 °C. Cells were lysed in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-Laurylsarcosinate, 1% Tryton X-100) at a pH of 10 for the alkaline comet and at a pH of 7.5 for the neutral comet. For the alkaline comet, DNA was unwound for 25 min and electrophoresed for 15 min

in the same solution (0.3 N NaOH, 6 mM EDTA, pH>13) at 0.74 V/cm and 300 mA. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), fixed in 100 % methanol and dried. For the neutral comet, slides were electrophoresed for 25 min in electrophoresis buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH= 7.5), fixed in 100% methanol and then dried. All following steps were performed at room temperature. DNA was stained using propidium iodide (50 µg/ml) and 50 cells per slide were evaluated using a fluorescence microscope and the Comet IV software (Perceptive Imaging, Liverpool, UK). Data are expressed as tail intensity or tail moment, which denotes the percentage of DNA in the tail multiplied by the length between the centre of the head and tail.^[16]

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.

Additional supporting figures

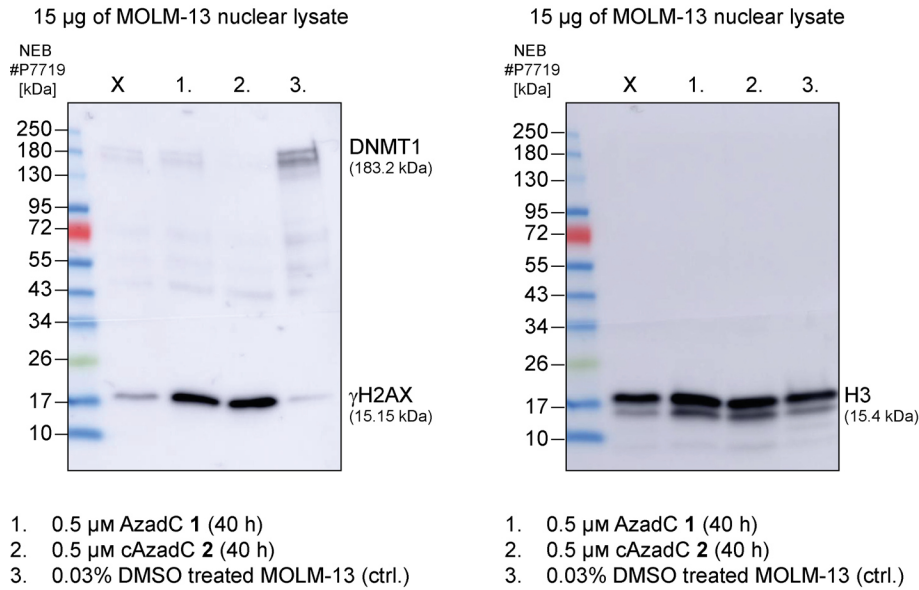


Figure S3. Depicted are the entire images for the western blots in Figures 3 and 4. X represents a treatment that is not included in this study.

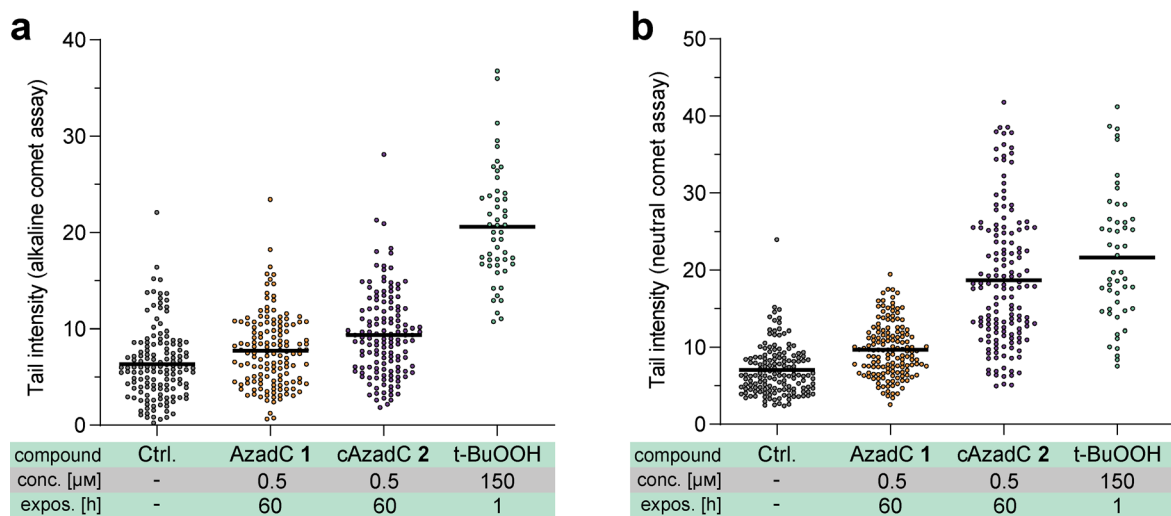


Figure S4. Alkaline comet assay (DNA single strand breaks, a) and neutral comet assay (DNA double strand breaks, b) including the t-BuOOH positive control. Each dot represents the tail intensity measurement of one individual cell. Measurements from three independent experiments were analyzed and are displayed in that graph.

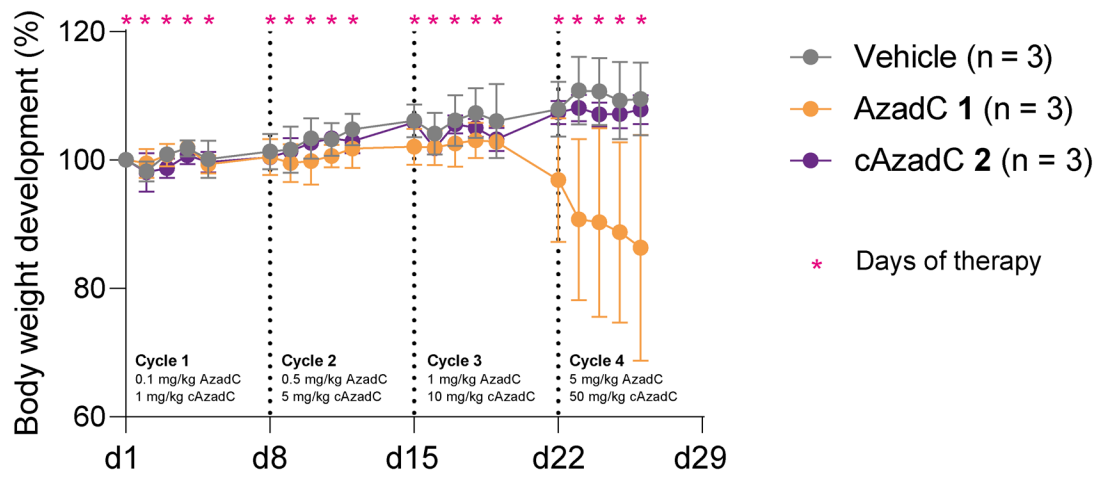


Figure S5. Bodyweight development of mice, which are treated with AzadC 1 or cAzadC 2 in different concentrations. Each treatment cycle consists of treatment with the compound for five consecutive days, followed by a treatment break for two days. The bodyweight of each mice was normalized to the body weight the mouse had at the begin of therapy (d1).

References Supplement

- [1] D. K. Rogstad, J. L. Herring, J. A. Theruvathu, A. Burdzy, C. C. Perry, J. W. Neidigh, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1194-1204.
- [2] C. S. Nabel, S. A. Manning, R. M. Kohli, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 20-30.
- [3] D. A. Case, R. C. Walker, T. E. Cheatham III, C. Simmerling, A. Roitberg, K. M. Merz, R. Luo, T. Darden, J. Wang, R. E. Duke, D. R. Roe, S. LeGrand, J. Swails, A. W. Götz, J. Smith, D. Cerutti, S. R. Brozell, T. Luchko, V. W. D. Cruzeiro, D. Ghoreishi, G. Monard, C. Sagui, F. Pan, G. A. Cisneros, Y. Miao, J. Shen, R. Harris, Y. Huang, C. Lin, D. J. Mermelstein, P. Li, A. Onufriev, S. Izadi, R. M. Wolf, X. Wu, H. Gohlke, S. Schott-Verdugo, N. Homeyer, R. Qi, L. Xiao, H. Wei, D. A. Greene, T. Lee, D. York, J. Liu, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Kovalenko, M. Gilson, I. Ben-Shalom, C. Nguyen, R. Salomon-Ferrer, T. Kurtzmann, P. A. Kollman, University of California, San Francisco.
- [4] I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy, A. Pérez, I. Faustino, A. Hospital, J. Walther, P. Andrio, R. Gofii, A. Balaceanu, G. Portella, F. Battistini, J. L. Gelpí, C. González, M. Vendruscolo, C. A. Laughton, S. A. Harris, D. A. Case, M. Orozco, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 55-58.
- [5] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
- [6] J. A. Izaguirre, D. P. Catarello, J. M. Wozniak, R. D. Skeel, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 2090-2098.
- [7] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577-8593.
- [8] D. R. Roe, T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084-3095.
- [9] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33-38, 27-38.
- [10] T. M. Wildenhof, S. Schiffers, F. R. Traube, P. Mayer, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 12984-12987.
- [11] Y. Matsuo, R. A. F. MacLeod, C. C. Uphoff, H. G. Drexler, C. Nishizaki, Y. Katayama, G. Kimura, N. Fujii, E. Omoto, M. Harada, K. Orita, *Leukemia* **1997**, *11*, 1469 - 1477.
- [12] J. D. Dignam, R. M. Lebovitz, R. G. Roeder, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 1475-1489.
- [13] F. R. Traube, S. Schiffers, K. Iwan, S. Kellner, F. Spada, M. Müller, T. Carell, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 283-312.
- [14] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, in *Cell Viability Assays - The Assay Guidance Manual* (Eds.: Markossian S, Grossman A, B. K), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), **2016**.
- [15] T. Nikolova, F. Marini, B. Kaina, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2017**, *822*, 10-18.
- [16] P. L. Olive, J. P. Banáth, R. E. Durand, *Radiat. Res.* **1990**, *122*, 86-94.

8 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organisation, *Fact Sheets - Cancer*, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> (25.03.2023).
- [2] *Stärker gegen Krebs*, <<https://www.staerkergegenkrebs.de/krebsarten/#:~:text=Derzeit%20sind%20mehr%20als%20300,%2C%20Lungenkrebs%2C%20Hautkrebs%20und%20Geb%C3%A4rmutterhalskrebs>> (30.01.2024).
- [3] Huang J., Chan S. C., Ngai C. H. *et al.*, *Front. Oncol.* **2022**, *12*.
- [4] PhRMA, *New Report: 1,600 cancer treatments and vaccines in clinical development*, <<https://phrma.org/Blog/New-Report-1600-cancer-treatments-and-vaccines-in-clinical-development>>
- [5] Ghasemi S., *Pharmacogenomics J.* **2020**, *20*, 367-379.
- [6] Wildenhof T. M., Schiffers S., Traube F. R. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 12984-12987.
- [7] Avery O. T., Macleod C. M., McCarty M., *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158.
- [8] Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [9] Waddington C. H., *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 10-13.
- [10] Waddington C. H., *Proc. Zool. Soc.* **1942**, *A111*, 181-188.
- [11] Gerri C., Menchero S., Mahadevaiah S. K. *et al.*, *Annu. Rev. Cell Biol.* **2020**, *36*, 411-440.
- [12] Braude P., Bolton V., Moore S., *Nature* **1988**, *332*, 459-461.
- [13] Baines K. J., Renaud S. J., *Chapter 3 - Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function*, Vol. 145, 1 Ed. (Ed.: W. R. Huckle), Academic Press, Cambridge, **2017**, 39-88.
- [14] Hermitte S., Chazaud C., *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **2014**, *369*, 20130537-20130546.
- [15] Hancock G. V., Wamaitha S. E., Peretz L. *et al.*, *Development* **2021**, *148*, dev189217.
- [16] Aplin J. D., *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2000**, *14*, 757-764.
- [17] Xie W., Schultz M. D., Lister R. *et al.*, *Cell* **2013**, *153*, 1134-1148.
- [18] Lyon M. F., *Nature* **1961**, *190*, 372-373.
- [19] Heard E., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 247-255.
- [20] Ishida M., Moore G. E., *Mol. Asp. Med.* **2013**, *34*, 826-840.
- [21] Liu L., Bailey S. M., Okuka M. *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1436-1441.
- [22] Hackett J. A., Sengupta R., Zyllicz J. J. *et al.*, *Science* **2013**, *339*, 448-452.
- [23] Sarge K. D., Park-Sarge O.-K., *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 605-610.
- [24] Sandhu K. S., Shi C., Sjölander M. *et al.*, *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2598-2603.
- [25] Rassoulzadegan M., Magliano M., Cuzin F., *EMBO J.* **2002**, *21*, 440-450.
- [26] Hollick J. B., *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 5-23.
- [27] Tycko B., *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 401-407.
- [28] Portela A., Esteller M., *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1057-1068.
- [29] Lodewijk I., Nunes S. P., Henrique R. *et al.*, *Clin. Epigenetics* **2021**, *13*, 63-86.
- [30] Bártoová E., Krejčí J., Harničarová A. *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* **2008**, *56*, 711-721.
- [31] Cheung P., Lau P., *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 563-573.
- [32] Huertas D., Sendra R., Muñoz P., *Epigenetics* **2009**, *4*, 31-42.
- [33] Kouzarides T., *Cell* **2007**, *128*, 693-705.
- [34] Li B., Carey M., Workman J. L., *Cell* **2007**, *128*, 707-719.
- [35] Rodríguez-Paredes M., Esteller M., *Nat. Med.* **2011**, *17*, 330-339.
- [36] Jenuwein T., Allis C. D., *Science* **2001**, *293*, 1074-1080.
- [37] Jiang Z., Zhang B., *PLoS Comput. Biol.* **2021**, *17*, e1008556.
- [38] Schones D. E., Cui K., Cuddapah S. *et al.*, *Cell* **2008**, *132*, 887-898.
- [39] Cairns B. R., *Nature* **2009**, *461*, 193-198.
- [40] Singh A. K., Mueller-Planitz F., *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166847-166865.
- [41] Chodavarapu R. K., Feng S., Bernatavichute Y. V. *et al.*, *Nature* **2010**, *466*, 388-392.

- [42] Talbert P. B., Henikoff S., *J. Cell Sci.* **2021**, *134*, jcs244749.
- [43] Yoo A. S., Staahl B. T., Chen L. *et al.*, *Nature* **2009**, *460*, 642-646.
- [44] Feoktistov A. V., Georgieva S. G., Soshnikova N. V., *Mol. Biol.* **2022**, *56*, 182-195.
- [45] Egger G., Liang G., Aparicio A. *et al.*, *Nature* **2004**, *429*, 457-463.
- [46] Bird A., *Nature* **2007**, *447*, 396-398.
- [47] Boulias K., Greer E. L., *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 411-428.
- [48] Chen W., Yang H., Feng P. *et al.*, *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3518-3523.
- [49] Douvlataniotis K., Bensberg M., Lentini A. *et al.*, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay3335.
- [50] Ehrlich M., Gama-Sosa M. A., Huang L.-H. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 2709-2721.
- [51] Antequera F., Bird A., *Chapter 8 - CpG Islands*, Vol. 64, 1 Ed. (Ed.: J.-P. Jost), Birkhäuser, Basel, **1993**, 169-185.
- [52] Breiling A., Lyko F., *Epigenetics Chromatin* **2015**, *8*, 24-32.
- [53] Gowher H., Jeltsch A., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20409-20414.
- [54] Smith Z. D., Meissner A., *Nat Rev Genet* **2013**, *14*, 204-220.
- [55] Saxonov S., Berg P., Brutlag D. L., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 1412-1417.
- [56] Nicholson T. B., Veland N., Chen T., *Chapter 3 - Writers, Readers, and Erasers of Epigenetic Marks*, 1 Ed. (Ed.: S. G. Gray), Academic Press, Boston, **2015**, 31-66.
- [57] Goll M. G., Kirpekar F., Maggert K. A. *et al.*, *Science* **2006**, *311*, 395-398.
- [58] Jia D., Jurkowska R. Z., Zhang X. *et al.*, *Nature* **2007**, *449*, 248-251.
- [59] Chédin F., *Chapter 7 - The DNMT3 Family of Mammalian De Novo DNA Methyltransferases*, Vol. 101, 1 Ed. (Ed.: X. Cheng), Academic Press, London, **2011**, 255-285.
- [60] Gujar H. W., Daniel J.; Liang, Gangning, *Genes* **2019**, *10*, 172-189.
- [61] Zhang Z.-M., Liu S., Lin K. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2520-2531.
- [62] Song J., Teplova M., Ishibe-Murakami S. *et al.*, *Science* **2012**, *335*, 709-712.
- [63] Ren W., Gao L., Song J., *Genes* **2018**, *9*, 620-639.
- [64] Reither S., Li F., Gowher H. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2003**, *329*, 675-684.
- [65] O'Gara M., Klimašauskas S., Roberts R. J. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 634-645.
- [66] Jüttermann R., Li E., Jaenisch R., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 11797-11801.
- [67] Chen L., MacMillan A. M., Chang W. *et al.*, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11018-11025.
- [68] Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R. J. *et al.*, *Cell* **1994**, *76*, 357-369.
- [69] Roberts R. J., Cheng X., *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 181-198.
- [70] Fatemi M., Hermann A., Pradhan S. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1189-1199.
- [71] Okano M., Bell D. W., Haber D. A. *et al.*, *Cell* **1999**, *99*, 247-257.
- [72] Zhang Z.-M., Lu R., Wang P. *et al.*, *Nature* **2018**, *554*, 387-391.
- [73] Lin C.-C., Chen Y.-P., Yang W.-Z. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 3949-3961.
- [74] Haggerty C., Kretzmer H., Riemenschneider C. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28*, 594-603.
- [75] Rountree M. R., Bachman K. E., Baylin S. B., *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 269-277.
- [76] Hermann A., Goyal R., Jeltsch A., *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48350-48359.
- [77] Hendrich B., Tweedie S., *Trends Genet.* **2003**, *19*, 269-277.
- [78] Fillion G. J., Zhenilo S., Salozhin S. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 169-181.
- [79] Sharif J., Koseki H., *Chapter 8 - Recruitment of Dnmt1: Roles of the SRA Protein Np95 (Uhrf1) and Other Factors*, Vol. 101, 1 Ed. (Ed.: X. Cheng), Academic Press, London, **2011**, 289-310.
- [80] Cramer J. M., Scarsdale J. N., Walavalkar N. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 1294-1302.
- [81] Manvilla B. A., Maiti A., Begley M. C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2012**, *420*, 164-175.
- [82] Rauch C., Trieb M., Wibowo F. R. *et al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2005**, *22*, 695-706.
- [83] Wakefield R. I. D., Smith B. O., Nan X. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 1055-1065.
- [84] Clouaire T., de Las Heras J. I., Merusi C. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 4620-4634.
- [85] Lopes E. C., Valls E., Figueroa M. E. *et al.*, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 7258-7263.
- [86] Xue B., Zhao J., Feng P. *et al.*, *Onco. Targets Ther.* **2019**, *12*, 549-559.
- [87] Avvakumov G. V., Walker J. R., Xue S. *et al.*, *Nature* **2008**, *455*, 822-825.
- [88] He Y.-F., Li B.-Z., Li Z. *et al.*, *Science* **2011**, *333*, 1303-1307.
- [89] Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y. *et al.*, *Science* **2009**, *324*, 930-935.
- [90] Ito S., Shen L., Dai Q. *et al.*, *Science* **2011**, *333*, 1300-1303.

- [91] Kamińska E., Korytiaková E., Reichl A. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23207-23211.
- [92] Schiesser S., Hackner B., Pfaffeneder T. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6516-6520.
- [93] Krokan H. E., Bjørås M., *CSH Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012583.
- [94] Cortellino S., Xu J., Sannai M. *et al.*, *Cell* **2011**, *146*, 67-79.
- [95] Pfaffeneder T., Spada F., Wagner M. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574-581.
- [96] DeNizio J. E., Dow B. J., Serrano J. C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166877-166890.
- [97] Hu L., Li Z., Cheng J. *et al.*, *Cell* **2013**, *155*, 1545-1555.
- [98] Rasmussen K. D., Helin K., *Genes Dev.* **2016**, *30*, 733-750.
- [99] Kohli R. M., Zhang Y., *Nature* **2013**, *502*, 472-479.
- [100] Yamaguchi S., Shen L., Liu Y. *et al.*, *Nature* **2013**, *504*, 460-464.
- [101] Solary E., Bernard O. A., Tefferi A. *et al.*, *Leukemia* **2014**, *28*, 485-496.
- [102] Gu T. P., Guo F., Yang H. *et al.*, *Nature* **2011**, *477*, 606-610.
- [103] Meda F., Folci M., Baccarelli A. *et al.*, *Cell. Mol. Immunol.* **2011**, *8*, 226-236.
- [104] Robertson K. D., *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 597-610.
- [105] Greenberg M. V. C., Bourc'his D., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 590-607.
- [106] Baylin S. B., *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2005**, *2*, 4-11.
- [107] National Cancer Institute, *Cancer Stat Facts: Leukemia — Acute Myeloid Leukemia (AML)*, <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>> (10.01.2024).
- [108] MedicalNewsToday, *What are the most curable cancers?*, <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/322700>> (10.01.2024).
- [109] Birbrair A., Frenette P. S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2016**, *1370*, 82-96.
- [110] Jagannathan-Bogdan M., Zon L. I., *Development* **2013**, *140*, 2463-2467.
- [111] Laurenti E., Göttgens B., *Nature* **2018**, *553*, 418-426.
- [112] Lim W. F., Inoue-Yokoo T., Tan K. S. *et al.*, *Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 71-61.
- [113] Broudy V. C., *Blood* **1997**, *90*, 1345-1364.
- [114] Ketley N. J., Newland A. C., *Postgrad. Med. J.* **1997**, *73*, 215-221.
- [115] Hauke R. J., Tarantolo S. R., *Lab. Med.* **2000**, *31*, 613-615.
- [116] Katsumura K. R., DeVilbiss A. W., Pope N. J. *et al.*, *CSH Perspect. Med.* **2013**, *3*, a015412.
- [117] Oikawa T., Yamada T., Kihara-Negishi F. *et al.*, *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 599-608.
- [118] Bamashmos S. H., Moussa G. H., Wadaane M. *et al.*, *Affordable Automated Blood Cell Imager*, Fifth International Conference on Advances in Biomedical Engineering (ICABME), Tripoli Lebanon, **2019**, 1-4.
- [119] Greaves M., Maley C. C., *Nature* **2012**, *481*, 306-313.
- [120] Derks L. L. M., van Boxtel R., *Cell Stem Cell* **2023**, *30*, 1421-1433.
- [121] Jan M., Snyder T. M., Corces-Zimmerman M. R. *et al.*, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 149ra118.
- [122] Liggett L. A., Degregori J., *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **2017**, *1867*, 84-94.
- [123] Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D., *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1136-1152.
- [124] Thomas D., Majeti R., *Blood* **2017**, *129*, 1577-1585.
- [125] Hanahan D., Weinberg R. A., *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [126] Hanahan D., Weinberg R. A., *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [127] Wadleigh M., DeAngelo D. J., Griffin J. D. *et al.*, *Blood* **2005**, *105*, 22-30.
- [128] Wallwitz J., Aigner P., Stoiber D., *Leuk. Lymphoma* **2021**, *62*, 2320-2330.
- [129] Stavast C. J., van Zuijlen I., Karkoulia E. *et al.*, *Leukemia* **2022**, *36*, 687-700.
- [130] Licht J. D., Sternberg D. W., *Hematology* **2005**, *1*, 137-142.
- [131] Stratmann S., Vesterlund M., Umer H. M. *et al.*, *Leukemia* **2023**, *37*, 550-559.
- [132] Taghilloo S., Asgarian-Omran H., *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2021**, *157*, 103164-103183.
- [133] DeNardo D. G., Andreu P., Coussens L. M., *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, *29*, 309-316.
- [134] Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M., *Cell* **2010**, *140*, 883-899.
- [135] Broccoli D., Young J. W., de Lange T., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 9082-9086.
- [136] Lansdorp P. M., *Blood Adv.* **2017**, *1*, 2467-2472.
- [137] Farge T., Nakhle J., Lagarde D. *et al.*, *Cancer Res.* **2023**, *83*, 2824-2838.
- [138] Whiteley A. E., Price T. T., Cantelli G. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *21*, 461-475.
- [139] Haouas H., *Hematology* **2014**, *19*, 311-323.

- [140] Hope K. J., Jin L., Dick J. E., *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 738-743.
- [141] Alcalay M., Tiacci E., Bergomas R. *et al.*, *Blood* **2005**, *106*, 899-902.
- [142] Figueroa M. E., Lugthart S., Li Y. *et al.*, *Cancer Cell* **2010**, *17*, 13-27.
- [143] Steffen B., Müller-Tidow C., Schwäble J. *et al.*, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2005**, *56*, 195-221.
- [144] Kantarjian H., Kadia T., DiNardo C. *et al.*, *Blood Cancer J.* **2021**, *11*, 41-45.
- [145] Kishtagari A., Levine R. L., *CSH Perspect. Med.* **2021**, *11*, a034975.
- [146] Karimjadi Sariyani O., Eghbalpour S., Kazemi E. *et al.*, *Cytokine* **2021**, *142*, 155508-155517.
- [147] Kantarjian H., *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 131-145.
- [148] Burnett A., Stone R., *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2020**, *20*, 341-350.
- [149] National Cancer Institute, *Drugs Approved for Leukemia*, <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/leukemia#3>> (17.01.2024).
- [150] Lancharro P. M., Iglesias N. d. C.-A., González-Barcala F.-J. *et al.*, *Farm. Hosp.* **2016**, *40*, 604-621.
- [151] Preston-Martin S., Pike M. C., Ross R. K. *et al.*, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 7415-7421.
- [152] Gale R. P., *N. Engl. J. Med.* **1979**, *300*, 1189-1199.
- [153] Dombret H., Gardin C., *Blood* **2016**, *127*, 53-61.
- [154] Löwenberg B., Ossenkoppele G. J., van Putten W. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1235-1248.
- [155] Kantarjian H. M., Keating M. J., Walters R. S. *et al.*, *Am. J. Med.* **1986**, *80*, 789-797.
- [156] Chabner B. A., Myers C. E., Coleman C. N. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **1975**, *292*, 1107-1113.
- [157] Bertuzzi C., Paolini S., Visani G. *et al.*, *Expert Opin. Orphan Drugs* **2014**, *2*, 1075-1087.
- [158] White R. J., Durr F. E., *Invest. New Drugs* **1985**, *3*, 85-93.
- [159] Thomas X., Archimbaud E., *Hematol. Cell Ther.* **1997**, *39*, 163-174.
- [160] Warrell R. P., Jr., Frankel S. R., Miller W. H., Jr. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1385-1393.
- [161] Gillis J. C., Goa K. L., *Drugs* **1995**, *50*, 897-923.
- [162] Ravandi F., Estey E., Jones D. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 504-510.
- [163] Platzbecker U., Avvisati G., Cicconi L. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 605-612.
- [164] Bross P. F., Beitz J., Chen G. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1490-1496.
- [165] McGavin J. K., Spencer C. M., *Drugs* **2001**, *61*, 1317-1322.
- [166] Borthakur G., Cortes J. E., Estey E. E. *et al.*, *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 964-968.
- [167] Hills R. K., Castaigne S., Appelbaum F. R. *et al.*, *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 986-996.
- [168] Goldenson B. H., Goodman A. M., Ball E. D., *Expert Opin. Biol. Ther.* **2021**, *21*, 849-862.
- [169] Loke J., Buka R., Craddock C., *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 659595-659612.
- [170] Short N. J., Konopleva M., Kadia T. M. *et al.*, *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 506-525.
- [171] Stomper J., Rotondo J. C., Greve G. *et al.*, *Leukemia* **2021**, *35*, 1873-1889.
- [172] Unnikrishnan A., Papaemmanuil E., Beck D. *et al.*, *Cell Rep.* **2017**, *20*, 572-585.
- [173] Gu X., Tohme R., Tomlinson B. *et al.*, *Leukemia* **2021**, *35*, 1023-1036.
- [174] Qin T., Jelinek J., Si J. *et al.*, *Blood* **2009**, *113*, 659-667.
- [175] Oellerich T., Schneider C., Thomas D. *et al.*, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3475-3488.
- [176] Herold N., Rudd S. G., Sanjiv K. *et al.*, *Exp. Hematol.* **2017**, *52*, 32-39.
- [177] Zhao G., Wang Q., Li S. *et al.*, *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 706030-706041.
- [178] Yeoh Z. H., Bajel A., Wei A. H., *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 1003-1016.
- [179] Yang X., Wong M. P. M., Ng R. K., *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4576-4595.
- [180] Yang X., Lay F., Han H. *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 536-546.
- [181] Schoofs T., Müller-Tidow C., *Cancer Treat. Rev.* **2011**, *37*, 13-18.
- [182] Spencer D. H., Russler-Germain D. A., Ketkar S. *et al.*, *Cell* **2017**, *168*, 801-816.
- [183] Khrabrova D. A., Yakubovskaya M. G., Gromova E. S., *Biochemistry* **2021**, *86*, 307-318.
- [184] Xu W., Yang H., Liu Y. *et al.*, *Cancer Cell* **2011**, *19*, 17-30.
- [185] Pimenta D. B., Varela V. A., Datoguia T. S. *et al.*, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 764698-764706.
- [186] Davies T. J., Mc Auley M. T., Morgan A. E., *Proc. Nutr. Soc.* **2018**, *77*, 412-422.
- [187] Bell J. T., Tsai P. C., Yang T. P. *et al.*, *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002629.
- [188] Schoofs T., Berdel W. E., Müller-Tidow C., *Leukemia* **2014**, *28*, 1-14.
- [189] Ley T. J., Miller C., Ding L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 2059-2074.
- [190] Akalin A., Garrett-Bakelman F. E., Kormaksson M. *et al.*, *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002781.

- [191] Giacomelli B., Wang M., Cleary A. *et al.*, *Genome Res.* **2021**, *31*, 747-761.
- [192] Palanisamy N., *Chapter 3 - Chromosomal Translocations in AML: Detection and Prognostic Significance* (Ed.: L. Nagarajan), Springer, New York, **2010**, 41-58.
- [193] Bahoush G., Vafapour M., Kariminejad R., *Leuk. Res. Rep.* **2020**, *14*, 100209-100211.
- [194] Boulwood J., Wainscoat J. S., *Br. J. Haematol.* **2007**, *138*, 3-11.
- [195] Ehrlich M., *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2424-2429.
- [196] Muller I. C., Ruter B., Phillip Koeffler H. *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2006**, *7*, 315-321.
- [197] Scalea S., Maresca C., Catalanotto C. *et al.*, *The FEBS Journal* **2020**, *287*, 1155-1175.
- [198] Galm O., Wilop S., Lüders C. *et al.*, *Ann. Hematol.* **2005**, *84*, 39-46.
- [199] Garzon R., Volinia S., Liu C.-G. *et al.*, *Blood* **2008**, *111*, 3183-3189.
- [200] Marcucci G., Mrózek K., Radmacher M. D. *et al.*, *Blood* **2011**, *117*, 1121-1129.
- [201] Szyf M., *Biochemistry* **2005**, *70*, 533-549.
- [202] Guillaumot M., Cimmino L., Aifantis I., *Trends Cancer* **2016**, *2*, 70-83.
- [203] Xu W. S., Parmigiani R. B., Marks P. A., *Oncogene* **2007**, *26*, 5541-5552.
- [204] Babu A., Verma R. S., *Chromosome Structure: Euchromatin and Heterochromatin, Vol. 108* (Eds.: G. H. Bourne, K. W. Jeon, M. Friedlander), Academic Press, Orlando, **1987**, 1-60.
- [205] Morrison O., Thakur J., *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6922-6949.
- [206] Finkemeier I., Schwarzer D., *BioSpektrum* **2013**, *19*, 810-812.
- [207] Marmorstein R., *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 693-703.
- [208] Johnstone R. W., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 287-299.
- [209] My Cancer Genome, *Chromatin remodeling/DNA methylation*, <<https://www.mycancergenome.org/content/pathways/chromatin-remodeling-DNA-methylation/>> (22.01.2024).
- [210] Vannini A., Volpari C., Filocamo G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15064-15069.
- [211] Karagiannis D., Rampias T., *Cancers* **2021**, *13*, 3575-3603.
- [212] Bose P., Dai Y., Grant S., *Pharmacol. Ther.* **2014**, *143*, 323-336.
- [213] Suto M. J., Bookhaker R., Jung D. Y. *et al.*, I. Southern Research Institute; Pinotbio PCT/US2021/028726, **28.10.2021**.
- [214] Pliml J., Šorm F., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2576-2578.
- [215] Sorm F., Veselý J., *Neoplasma* **1968**, *15*, 339-343.
- [216] Meulenbelt-Snijders S., Meulenbelt F., Paalman A. *et al.*, *Pharm. Weekbl.* **1984**, *119*, 1186-1189.
- [217] Pískala A., Synáčková M., Tománková H. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 109-114.
- [218] Pískala A., Šorm F., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2060-2076.
- [219] Haňka L. J., Evans J. S., Mason D. J. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1966**, *6*, 619-624.
- [220] Veselý J., Čihák A., *Pharmacol. Ther.* **1978**, *2*, 813-840.
- [221] Riggs A. D., Jones P. A., *Chapter 1 - 5-Methylcytosine, Gene Regulation, and Cancer, Vol. 40, 1 Ed.* (Eds.: G. Klein, S. Weinhouse), Academic Press, New York, **1983**, 1-30.
- [222] De Vos D., Van Overveld W., *Ann. Hematol.* **2005**, *84*, 3-8.
- [223] Pastor-Anglada M., Pérez-Torras S., *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 606-613.
- [224] Errasti-Murugarren E., Pastor-Anglada M., *Pharmacogenet.* **2010**, *11*, 809-841.
- [225] Damaraju V. L., Mowles D., Yao S. *et al.*, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2012**, *31*, 236-255.
- [226] Wu L., Shi W., Li X. *et al.*, *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 66-74.
- [227] Wiley J. S., Jones S. P., Sawyer W. H. *et al.*, *J. Clin. Investig.* **1982**, *69*, 479-489.
- [228] Oki Y., Aoki E., Issa J.-P. J., *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2007**, *61*, 140-152.
- [229] Momparler R. L., Derse D., *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 1443-1444.
- [230] Lee T., Karon M., Momparler R. L., *Cancer Res.* **1974**, *34*, 2482-2488.
- [231] Stresemann C., Lyko F., *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8-13.
- [232] Chabot G. G., Bouchard J., Momparler R. L., *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 1327-1328.
- [233] Maley F., *Chapter 23 - Deoxycytidylate deaminase, Vol. 12, 1 Ed.*, Academic Press, New York, **1967**, 170-182.
- [234] Goldstone D. C., Ennis-Adeniran V., Hedden J. J. *et al.*, *Nature* **2011**, *480*, 379-382.

- [235] Müller A., Florek M., *Chapter 11 - 5-Azacytidine/Azacitidine*, 1 Ed. (Ed.: U. M. Martens), Springer, Berlin, **2010**, 159-170.
- [236] Jones P. A., Taylor S. M., *Cell* **1980**, *20*, 85-93.
- [237] Creusot F., Acs G., Christman J. K., *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2041-2048.
- [238] Stresemann C., Brueckner B., Musch T. *et al.*, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2794-2800.
- [239] Santi D. V., Norment A., Garrett C. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6993-6997.
- [240] Steensma D. P., Baer M. R., Slack J. L. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3842-3848.
- [241] Bouligny I. M., Mehta V., Isom S. *et al.*, *Leuk. Res.* **2021**, *103*, 106524.
- [242] Mund C., Hackanson B., Stresemann C. *et al.*, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7086-7090.
- [243] Chuang J. C., Yoo C. B., Kwan J. M. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1515-1520.
- [244] Sato T., Issa J. J., Kropf P., *CSH Perspect. Med.* **2017**, *7*, a026948.
- [245] Pharmazeutische Zeitung, <<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/meran11-25-2004/>> (26.02.2024).
- [246] Reinking H. K., Hofmann K., Stingle J., *DNA Repair* **2020**, *88*, 102822-102828.
- [247] Čihák A., *Oncology* **1974**, *30*, 405-422.
- [248] Pačes V., Doskočil J., Šorm F., *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Prot. Synth.* **1968**, *161*, 352-360.
- [249] Weiss J. W., Pitot H. C., *Biochemistry* **1975**, *14*, 316-326.
- [250] Hollenbach P. W., Nguyen A. N., Brady H. *et al.*, *PLoS One* **2010**, *5*, e9001.
- [251] Čihák A., Brouček J., *Biochem. Pharmacol.* **1972**, *21*, 2497-2507.
- [252] Weiss J. W., Pitot H. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *160*, 119-129.
- [253] Reichman M., Karlan D., Penman S., *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Prot. Synth.* **1973**, *299*, 173-175.
- [254] Čihák A., Weiss J. W., Pitot H. C., *Cancer Res.* **1974**, *34*, 3003-3009.
- [255] Čihák A., Narurkar L., Pitot H., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1973**, *38*, 948-956.
- [256] Rogstad D. K., Herring J. L., Theruvathu J. A. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1194-1204.
- [257] Pískala A., Hanna N. B., Masojídková M. *et al.*, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 711-743.
- [258] Piřhová P., Pískala A., Piřha J. *et al.*, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1965**, *30*, 2801-2811.
- [259] Lin K.-T., Momparler R. L., Rivard G. E., *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 1228-1232.
- [260] Tománková H., Zýka J., *Microchem. J.* **1980**, *25*, 281-288.
- [261] Veselý J., Pískala A., *Cancer Res.* **1984**, *44*, 5165-5168.
- [262] Chan K. K., Giannini D. D., Staroscik J. A. *et al.*, *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 807-812.
- [263] Liu Z., Marcucci G., Byrd J. C. *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1117-1126.
- [264] Notari R. E., DeYoung J. L., *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 1148-1157.
- [265] Aumer T., Linda B., Stephanie K. *et al.*, *bioRxiv*, **2023**.
- [266] Hattori N., Sako M., Kimura K. *et al.*, *Clin. Epigenetics* **2019**, *11*, 111-122.
- [267] Matoušová M., Votruba I., Otmar M. *et al.*, *Epigenetics* **2011**, *6*, 769-776.
- [268] Sheikhnejad G., Brank A., Christman J. K. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2021-2034.
- [269] Kantarjian H., Issa J. P. J., Rosenfeld C. S. *et al.*, *Cancer* **2006**, *106*, 1794-1803.
- [270] Diesch J., Zwick A., Garz A.-K. *et al.*, *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 71-81.
- [271] Wei A. H., Döhner H., Pocock C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2526-2537.
- [272] Tao W., Zhao D., Sun M. *et al.*, *Int. J. Pharm.* **2018**, *541*, 64-71.
- [273] Tao W., Zhao D., Sun M. *et al.*, *Drug Deliv. Transl. Res.* **2017**, *7*, 304-311.
- [274] Cogle C. R., Scott B. L., Boyd T. *et al.*, *Oncologist* **2015**, *20*, 1404-1412.
- [275] Traube F. R., Brás N. F., Roos W. P. *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202200640.
- [276] Rivard G. E., Momparler R. L., Demers J. *et al.*, *Leuk. Res.* **1981**, *5*, 453-462.
- [277] Jabbour E., Issa J.-P., Garcia-Manero G. *et al.*, *Cancer* **2008**, *112*, 2341-2351.
- [278] Chuang J. C., Warner S. L., Vollmer D. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1443-1450.
- [279] Griffiths E. A., Choy G., Redkar S. *et al.*, *Drugs Future* **2013**, *38*, 535-543.
- [280] Issa J.-P. J., Kantarjian H. M., *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 3938-3946.
- [281] Qin T., Castoro R., El Ahdab S. *et al.*, *PLoS One* **2011**, *6*, e23372.
- [282] Prébet T., Gore S. D., Esterni B. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 3322-3327.

- [283] Duong V. H., Bhatnagar B., Zandberg D. P. *et al.*, *Leuk. Lymphoma* **2015**, *56*, 1718-1722.
- [284] Konopleva M., Letai A., *Blood* **2018**, *132*, 1007-1012.
- [285] Döhner H., Wei A. H., Appelbaum F. R. *et al.*, *Blood* **2022**, *140*, 1345-1377.
- [286] McMurry H., Fletcher L., Traer E., *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **2021**, *16*, 207-217.
- [287] Daver N., *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2021**, *34*, 101247-101251.
- [288] Sockel K., Platzbecker U., *Drugs* **2018**, *78*, 1873-1885.
- [289] Heynick F., *British Journal of Psychiatry* **2009**, *195*, 456-456.
- [290] Momparler R. L., Rivard G. E., Gyger M., *Pharmacol. Ther.* **1985**, *30*, 277-286.
- [291] van Groeningen C. J., Leyva A., O'Brien A. M. P. *et al.*, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 4831-4836.
- [292] Momparler R. L., *Semin. Hematol.* **2005**, *42*, 9-16.
- [293] Marquez V. E., Lim M.-I., *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 1-40.
- [294] Jeong L. S., Lee J. A., *Antivir. Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 235-250.
- [295] Boutureira O., Matheu M. I., Díaz Y. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5056.
- [296] Ober M., Müller H., Pieck C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143-18149.
- [297] Singh R., Vince R., *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4642-4686.
- [298] Borthwick A. D., Biggadike K., *Tetrahedron* **1992**, *48*, 571-623.
- [299] Meier C., Ludek O. R., *Synlett* **2005**, 3145-3147.
- [300] Lim B. B., Marquez V. E., Dobyns K. A. *et al.*, *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 1123-1135.
- [301] Pískala A., Šorm F., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2060-2076.
- [302] Domínguez B. M., Cullis P. M., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5783-5786.
- [303] Basel Y., Hassner A., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6368-6380.
- [304] Prileschajew N., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 4811-4815.
- [305] Singleton D. A., Merrigan S. R., Liu J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3385-3386.
- [306] Bach R. D., Canepa C., Winter J. E. *et al.*, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5191-5197.
- [307] Katagiri N., Matsushashi Y., Kokufuda H. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1961-1964.
- [308] Karplus M., Anderson D. H., *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 6-10.
- [309] Karplus M., *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
- [310] Kam B. L., Oppenheimer N. J., *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3268-3272.
- [311] Arnott G. E., *Chapter 8.10 - Reduction of Carboxylic Acids and their Derivatives to Alcohols, Ethers, and Amines, Vol. 8*, 2 Ed. (Ed.: P. Knochel), Elsevier, Amsterdam, **2014**, 368-409.
- [312] Prasanth C. P., Ebbin J., Abhijith A. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 1431-1440.
- [313] Corey E. J., Venkateswarlu A., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
- [314] Rathi A., *Synlett* **2010**, 1140-1141.
- [315] Viti S. M., *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4541-4544.
- [316] Williamson A., *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1850**, *37*, 350-356.
- [317] Heseck D., Lee M., Noll B. C. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2567-2570.
- [318] Stieglitz J., Mc Kee R. H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1517-1519.
- [319] Williams A. A., Darwanto A., Theruvathu J. A. *et al.*, *Biochemistry* **2009**, *48*, 11994-12004.
- [320] Rao S. N., Kollman P., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1611-1617.
- [321] Traube F. R., Schiffers S., Iwan K. *et al.*, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 283-312.
- [322] Schiffers S., Wildenhof T. M., Iwan K. *et al.*, *Helv. Chim. Acta* **2019**, *102*, e1800229.
- [323] Matsuo Y., Macleod R., Uphoff C. *et al.*, *Leukemia* **1997**, *11*, 1469-1477.
- [324] Collins S. J., Gallo R. C., Gallagher R. E., *Nature* **1977**, *270*, 347-349.
- [325] Gallagher R., Collins S., Trujillo J. *et al.*, *Blood* **1979**, *54*, 713-733.
- [326] Asou H., Tashiro S., Hamamoto K. *et al.*, *Blood* **1991**, *77*, 2031-2036.
- [327] Larizza L., Magnani I., Beghini A., *Leuk. Lymphoma* **2005**, *46*, 247-255.
- [328] Arzumanian V. A., Kiseleva O. I., Poverennaya E. V., *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13135-13153.
- [329] Vecchi C., Montosi G., Pietrangelo A., *Hepatol.* **2010**, *51*, 654-659.
- [330] Foster K. A., Oster C. G., Mayer M. M. *et al.*, *Exp. Cell Res.* **1998**, *243*, 359-366.
- [331] Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J. *et al.*, *J. Natl. Cancer. Inst.* **1973**, *51*, 1417-1423.
- [332] Fujishita T., Loda M., Turner R. E. *et al.*, *Oncology* **2003**, *64*, 399-406.
- [333] Zhu Y., Chidekel A., Shaffer T. H., *Crit. Care Res. Pract.* **2010**, *2010*, 1-8.
- [334] Chen W. H., Horoszewicz J. S., Leong S. S. *et al.*, *In Vitro* **1982**, *18*, 24-34.

- [335] Malm M., Saghaleyni R., Lundqvist M. *et al.*, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18996-19010.
- [336] Tremblay R. G., Sikorska M., Sandhu J. K. *et al.*, *J. Neurosci. Methods* **2010**, *186*, 60-67.
- [337] Biedler J. L., Helson L., Spengler B. A., *Cancer Res.* **1973**, *33*, 2643-2652.
- [338] Biedler J. L., Roffler-Tarlov S., Schachner M. *et al.*, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3751-3757.
- [339] Ye L., Swingen C., Zhang J., *Curr. Cardiol. Rev.* **2013**, *9*, 63-72.
- [340] Hagemann S., Heil O., Lyko F. *et al.*, *PLoS One* **2011**, *6*, e17388.
- [341] Gardiner-Garden M., Frommer M., *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 261-282.
- [342] Lander E. S., Linton L. M., Birren B. *et al.*, *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [343] Schlesinger Y., Straussman R., Keshet I. *et al.*, *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 232-236.
- [344] Bennett L. L., Allan P. W., Arnett G. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1045-1051.
- [345] Arnér E. S. J., Eriksson S., *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155-186.
- [346] Nakayama H., Kajikawa S., Shinozuka J. *et al.*, *Histol. Histopathol.* **1999**, *14*, 143-150.
- [347] Gopisetty G., Ramachandran K., Singal R., *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 1729-1740.
- [348] Khan R., Schmidt-Mende J., Karimi M. *et al.*, *Exp. Hematol.* **2008**, *36*, 149-157.
- [349] Adan A., Alizada G., Kiraz Y. *et al.*, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*, 163-176.
- [350] McKinnon K. M., *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, *120*, 5.1.1-5.1.11.
- [351] Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. *et al.*, *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39-51.
- [352] Fadok V. A., De Cathelineau A., Daleke D. L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 1071-1077.
- [353] Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G. *et al.*, *Cytometry* **1992**, *13*, 795-808.
- [354] Syntichaki P., Tavernarakis N., *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 604-609.
- [355] Darzynkiewicz Z., Bedner E., Smolewski P., *Semin. Hematol.* **2001**, *38*, 179-193.
- [356] Grimm S., *Chem. Unserer Zeit* **2003**, *37*, 172-178.
- [357] van Engeland M., Nieland L. J. W., Ramaekers F. C. S. *et al.*, *Cytometry* **1998**, *31*, 1-9.
- [358] Mattes M. J., *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 928-936.
- [359] Thakur S., Cattoni D. I., Nöllmann M., *European Biophysics Journal* **2015**, *44*, 337-348.
- [360] Hickman J. A., *Cancer Metastasis Rev.* **1992**, *11*, 121-139.
- [361] Hidalgo M., Amant F., Biankin A. V. *et al.*, *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 998-1013.
- [362] Ebinger S., Zeller C., Carlet M. *et al.*, *Haematologica* **2020**, *105*, 2855-2860.
- [363] Vick B., Rothenberg M., Sandhöfer N. *et al.*, *PLoS One* **2015**, *10*, e0120925.
- [364] U.S. Food and Drug Administration, *Novel Drug Approvals for 2022*, <<https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2022>> (22.06.2023).
- [365] Najjar A., Karaman R., *Expert Opin. Drug Deliv.* **2019**, *16*, 1-5.
- [366] Stella V. J., *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14*, 277-280.
- [367] Albert A., *Nature* **1958**, *182*, 421-423.
- [368] Connors T. A., *Xenobiotica* **1986**, *16*, 975-988.
- [369] Rooseboom M., Commandeur J. N., Vermeulen N. P., *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 53-102.
- [370] Herman T. F., Santos C., *First-Pass Effect*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), **2024**.
- [371] Boddy A. V., Murray Yule S., *Clin. Pharmacokinet.* **2000**, *38*, 291-304.
- [372] Dubowchik G. M., Walker M. A., *Pharmacol. Ther.* **1999**, *83*, 67-123.
- [373] Begleiter A., *Front. Biosci.* **2000**, *5*, 153-171.
- [374] Franzyk H., Christensen S. B., *Molecules* **2021**, *26*, 1292-1314.
- [375] Sinokrot H., Smerat T., Najjar A. *et al.*, *Molecules* **2017**, *22*, 1736-1753.
- [376] Jornada D., Dos Santos Fernandes G., Chiba D. *et al.*, *Molecules* **2015**, *21*, 42-72.
- [377] Mahato R., Tai W., Cheng K., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 659-670.
- [378] Heaton P. M., *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1986-1988.
- [379] Zasada A. A., Darlińska A., Wiatrzyk A. *et al.*, *Viruses* **2023**, *15*, 1786-1819.
- [380] Kabinger F., Stiller C., Schmitzová J. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28*, 740-746.
- [381] Benkovics T., McIntosh J., Silverman S. *et al.*, *ChemRxiv* **2020**.
- [382] Cao L., Li Y., Yang S. *et al.*, *Sci. Transl. Med.* **2022**, *14*, eabm7621.
- [383] Mackman R. L., Kalla R., Babusis D. *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, **2023**.
- [384] Ahmed S., Imai T., Yoshigae Y. *et al.*, *Life Sci.* **1997**, *61*, 1879-1887.
- [385] Wang D., Zou L., Jin Q. *et al.*, *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8*, 699-712.

- [386] Den Daas I., Tepper P. G., Horn A. S., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1990**, *341*, 186-191.
- [387] Neises B., Steglich W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
- [388] Vig B. S., Lorenzi P. J., Mittal S. *et al.*, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1381-1388.
- [389] Snead D. R., Gopalsamuthiram V., Williams C. *et al.*, *Synlett* **2021**, *32*, 326-328.
- [390] Vig B. S., Huttunen K. M., Laine K. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1370-1385.
- [391] Song X., Lorenzi P. L., Landowski C. P. *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* **2005**, *2*, 157-167.
- [392] Landowski C. P., Lorenzi P. L., Song X. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp.* **2006**, *316*, 572-580.
- [393] Li W., Zhan P., De Clercq E. *et al.*, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 421-444.
- [394] Molineux G., *Pharmacotherapy* **2003**, *23*, 3-8.
- [395] Harris J. M., Chess R. B., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214-221.
- [396] Pasut G., Veronese F. M., *J. Control. Release* **2012**, *161*, 461-472.
- [397] Molineux G., *Cancer Treat. Rev.* **2002**, *28*, 13-16.
- [398] Greenwald R. B., *J. Control. Release* **2001**, *74*, 159-171.
- [399] Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y., *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 601-606.
- [400] Jensen M., Schmidt S., Fedosova N. U. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2407-2417.
- [401] Lai Y.-Y., Shih P.-I., Li Y.-P. *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 5122-5128.
- [402] Labell R. Y., Jacobsen N. E., Gervay-Hague J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 143-149.
- [403] Ratcliffe R., Rodehorst R., *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 4000-4002.
- [404] Zheng B., Li J., Pathirana C. *et al.*, *Org. Process Res. Dev.* **2021**, *25*, 2270-2276.
- [405] Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T. *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- [406] Hecker S. J., Erion M. D., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.
- [407] Pradere U., Garnier-Amblard E. C., Coats S. J. *et al.*, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
- [408] Roy B., Navarro V., Peyrottes S., *Curr. Med. Chem.* **2022**, *30*, 1256-1303.
- [409] Wagner C. R., Iyer V. V., McIntee E. J., *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.
- [410] Anastasi C., Quéléver G., Burlet S. *et al.*, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1825-1843.
- [411] Wiemer A. J., Wiemer D. F., *Chapter 3 - Prodrugs of Phosphonates and Phosphates: Crossing the Membrane Barrier*, Vol. 360, 1 Ed. (Ed.: J.-L. Montchamp), Springer International Publishing, Switzerland, **2015**, 115-160.
- [412] Testa B., Mayer J. M., *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 787-807.
- [413] Warnecke S., Meier C., *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- [414] Meier C., Lorey M., De Clercq E. *et al.*, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- [415] Meier C., Balzarini J., *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 282-292.
- [416] Meier C., Ruppel M. F. H., Vukadinović D. *et al.*, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 89-115.
- [417] Gisch N., Pertenbreiter F., Balzarini J. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8115-8123.
- [418] Meier C., Ducho C., Jessen H. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 197-206.
- [419] Gisch N., Balzarini J., Meier C., *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658-1667.
- [420] Rios Morales E. H., Balzarini J., Meier C., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7245-7252.
- [421] Morales E. H. R., Román C. A., Thomann J. O. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4397-4408.
- [422] Deville-Bonne D., El Amri C., Meyer P. *et al.*, *Antiviral Res.* **2010**, *86*, 101-120.
- [423] Davis A. P., Sheppard D. N., Smith B. D., *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 348-357.
- [424] Cardarelli F., Digiacomo L., Marchini C. *et al.*, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25879-25886.
- [425] Szulc A., Zablocka M., Coppel Y. *et al.*, *New J. Chem.* **2014**, *38*, 6212-6222.
- [426] Zawada Z., Tatar A., Mocilac P. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9891-9895.
- [427] Ma J., Wehrle J., Lorenzen L. *et al.*, American Chemical Society (ACS), **2023**.
- [428] Liu C., Zhang N., *Chapter 13 - Nanoparticles in Gene Therapy: Principles, Prospects, and Challenges*, Vol. 104, 1 Ed. (Ed.: A. Villaverde), Academic Press, London, **2011**, 509-562.
- [429] Gordon S., *Immunity* **2016**, *44*, 463-475.
- [430] Mohamady S., Taylor S. D., *Org. Lett.* **2016**, *18*, 580-583.
- [431] Ripp A., Singh J., Jessen H. J., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2020**, *81*, e108.
- [432] Caton-Williams J., Lin L., Smith M. *et al.*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8142-8144.
- [433] Burgess K., Cook D., *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2060.

- [434] Ludwig J., Eckstein F., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635.
- [435] Camarasa M.-J., *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1885-1889.
- [436] Davis M. E., Brewster M. E., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023-1035.
- [437] Saokham P., Loftsson T., *Int. J. Pharm.* **2017**, *516*, 278-292.
- [438] Stella V. J., Rao V. M., Zannou E. A. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 3-16.
- [439] Nikolausz M., Chatzinotas A., Táncsics A. et al., *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 454-459.
- [440] Sokolov B. P., *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3671-3671.
- [441] Summer H., Grämer R., Dröge P., *J. Vis. Exp.* **2009**, e1485.
- [442] Reha-Krantz L. J., *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.* **2010**, *1804*, 1049-1063.
- [443] Bulock C. R., Xing X., Shcherbakova P. V., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 6035-6041.
- [444] Fishel R., Lee J.-B., *Chapter 12 - Mismatch Repair* (Eds.: F. Hanaoka, K. Sugawara), Springer Japan, Tokyo, **2016**, 305-339.
- [445] Öz S., Raddatz G., Rius M. et al., *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e152.
- [446] Unnikrishnan A., Vo A. N. Q., Pickford R. et al., *Leukemia* **2018**, *32*, 900-910.
- [447] Oakeley E. J., *Pharmacol. Ther.* **1999**, *84*, 389-400.
- [448] Dai Y., Yuan B.-F., Feng Y.-Q., *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 1096-1114.
- [449] Moore L. D., Le T., Fan G., *Neuropsychopharmacol.* **2013**, *38*, 23-38.
- [450] Wagner M., Steinbacher J., Kraus T. F. J. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511-12514.
- [451] Pitt J. J., *Clin. Biochem. Rev.* **2009**, *30*, 19-34.
- [452] Dizdaroglu M., *FEBS Lett.* **1992**, *315*, 1-6.
- [453] Wieling J., *Chromatographia* **2002**, *55*, 107-113.
- [454] Turowski M., Yamakawa N., Meller J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13836-13849.
- [455] Kanao E., Kubo T., Naito T. et al., *J. Phys. Chem. C.* **2018**, *122*, 15026-15032.
- [456] Wang S., Cyronak M., Yang E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 701-707.
- [457] Fernandez C. A., Des Rosiers C., Previs S. F. et al., *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 255-262.
- [458] Strzelecka D., Chmielinski S., Bednarek S. et al., *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8931-8942.
- [459] Weimann A., Belling D., Poulsen H. E., *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e7.
- [460] Greindl T., Scherr G., Schneider R. et al., BASF AG DE 197 48 696 A1, **04.11.1997**.
- [461] Ferrús R., Torrades F., *Analyst* **1985**, *110*, 403-406.
- [462] Hans Meerwein E. B., Heinrich Gold, Emanuel Pfeil, Georg Willfang, *J. Prakt. Chem.* **1939**, *154*, 83-156.
- [463] Stieglitz J., Mc Kee P. H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 807-812.
- [464] Beisler J. A., Abbasi M. M., Kelley J. A. et al., *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 806-812.
- [465] Pískala A., Cesneková B., Veselý J., *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1987**, *57*, 57-60.
- [466] Bera A., Bera S., Banerjee D., *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 13042-13058.
- [467] Beisler J. A., Abbasi M. M., Driscoll J. S., *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1230-1234.
- [468] Kelley J. A., Abbasi M. M., Beisler J. A., *Anal. Biochem.* **1980**, *103*, 203-213.
- [469] Abbasi M. M., El-Wassimi M. T., Osman F. H. et al., *J. Prakt. Chem.* **1987**, *329*, 209-216.
- [470] Goddard A. J., Marquez V. E., *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1767-1770.
- [471] Converso A., El Marrouni A., Forster A. et al., Merck Sharp & Dohme Corporation WO/2020/131597 A1, **25.06.2020**.
- [472] Alsharif M. A., Raja Q. A., Majeed N. A. et al., *RSC Adv.* **2021**, *11*, 29826-29858.
- [473] Tsang A. S. K., Jensen P., Hook J. M. et al., *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 655-665.
- [474] Yamamoto S., Sakurai T., Yingjin L. et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 833-837.
- [475] Letourneau J., Jokiel P., Napier E. et al., N.V. Organon WO 2008/033764 A2, **20.03.2008**.
- [476] Fatiadi A. J., *Synthesis* **1976**, 65-104.
- [477] Yang W., Su Z. a., Xu Z. et al., *Appl. Catal., B* **2020**, *260*, 118150-118159.
- [478] Carpino L. A., *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3971-3972.
- [479] Stammers T., Barbeau X., Beaulieu P. et al., Boehringer Ingelheim International GmbH WO 2011/032277 A1, **24.03.2011**.
- [480] Jadhav P. M., Rode A. B., Kótai L. et al., *New J. Chem.* **2021**, *45*, 16389-16425.
- [481] U. Tekale S., S. Kauthale S., A. Dake S. et al., *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 1485-1501.
- [482] Raley J. H., Mullineaux R. D., Bittner C. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3174-3178.

- [483] Teranishi H., Benson S. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2887-2890.
- [484] Cao Y., Liu L., Huang T. *et al.*, *New J. Chem.* **2020**, *44*, 8697-8701.
- [485] Bigeleisen J., Mayer M. G., *J. Chem. Phys.* **1947**, *15*, 261-267.
- [486] Mantsch H. H., Saitô H., Smith I. C. P., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1977**, *11*, 211-272.
- [487] Diehl P., Leipert T., *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 545-557.
- [488] Neronov Y. I., Kaminker D. M., Mukhamadiev K., *Theor. Exp. Chem.* **1975**, *10*, 161-167.
- [489] Bharti S. K., Roy R., *Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5-26.
- [490] Ariza X., Bou V., Vilarrasa J., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3665-3673.
- [491] Matsuda A., Takenuki K., Sasaki T. *et al.*, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 234-239.
- [492] Hilko D. H., Bornaghi L. F., Poulsen S.-A., *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11944-11955.
- [493] Deghati P. Y. F., Bieräugel H., Wanner M. J. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 569-573.
- [494] Serra C., Aragonès C., Bessa J. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7575-7578.
- [495] Romea P., Aragonés M., Garcia J. *et al.*, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7038-7042.
- [496] Deghati P. Y. F., Wanner M. J., Koomen G.-J., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1291-1295.
- [497] Mur V. I., *Russ. Chem. Rev.* **1964**, *33*, 92-103.
- [498] Gopalsamuthiram V., Kadam A. L., Noble J. *et al.*, *Org. Process Res. Dev.* **2021**, *25*, 2679-2685.
- [499] Steiner A., Znidar D., Ötvös S. B. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 6736-6739.
- [500] Marek R., Lycka A., *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 35-66.
- [501] Barbarella G., Bertoluzza A., Tugnoli V., *Magn. Reson. Chem.* **1987**, *25*, 864-868.
- [502] Heiss M., Borland K., Yoluç Y. *et al.*, *Chapter 18 - Quantification of Modified Nucleosides in the Context of NAIL-MS*, Vol. 2298, 1 Ed. (Ed.: M. McMahon), Springer US, New York, **2021**, 279-306.
- [503] Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1017-1031.
- [504] Gosling J. P., *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 1408-1427.
- [505] Bayer E. A., Wilchek M., *Chapter 1 - The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology*, Vol. 26, 1 Ed. (Ed.: D. Glick), John Wiley & Sons, New York, **1980**, 1-45.
- [506] Wilchek M., Bayer E. A., *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
- [507] Dundas C. M., Demonte D., Park S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9343-9353.
- [508] Le Trong I., Wang Z., Hyre D. E. *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 813-821.
- [509] Weber P. C., Ohlendorf D. H., Wendoloski J. J. *et al.*, *Science* **1989**, *243*, 85-88.
- [510] Hendrickson W. A., Pähler A., Smith J. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 2190-2194.
- [511] Green M. N., *Chapter 5 - Avidin and streptavidin*, Vol. 184, 1 Ed. (Ed.: M. Wilchek), Academic Press, Burlington, **1990**, 51-67.
- [512] Holmberg A., Blomstergren A., Nord O. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 501-510.
- [513] Avery G., *Ann. Clin. Biochem.* **2019**, *56*, 424-430.
- [514] Huisgen R., *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 742-754.
- [515] Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [516] Breugst M., Reißig H. U., *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 12389-12404.
- [517] Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [518] Himo F., Lovell T., Hilgraf R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- [519] Berg R., Straub B. F., *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715-2750.
- [520] Hou J., Liu X., Shen J. *et al.*, *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 489-501.
- [521] Lutz J.-F., Zarafshani Z., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 958-970.
- [522] Xi W., Scott T. F., Kloxin C. J. *et al.*, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 2572-2590.
- [523] Kolb H. C., Sharpless K. B., *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- [524] Koyama Y., Nakano T., *Chem. Lett.* **2016**, *45*, 1018-1020.
- [525] Alder R. W., Phillips J. G. E., Huang L. *et al.*, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2005**, 1-9.
- [526] Bernardo P. H., Wan K.-F., Sivaraman T. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6699-6710.
- [527] Zubradt M., Gupta P., Persad S. *et al.*, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 75-82.
- [528] Wells S. E., Hughes J. M. X., Haller Igel A. *et al.*, *Chapter 32 - Use of dimethyl sulfate to probe RNA structure in vivo*, Vol. 318, 1 Ed. (Ed.: D. W. Celander), Academic Press, Burlington, **2000**, 479-493.

- [529] Domingo O., Hellmuth I., Jaschke A. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 5275-5283.
- [530] Münzel M., Lercher L., Müller M. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e192-e192.
- [531] Ogilvie K. K., *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799-3807.
- [532] Chen Y., Dubrovskiy A., Larock R. C., *Org. Synth.* **2012**, *89*, 294-306.
- [533] Molander G. A., Nichols P. J., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6040-6043.
- [534] Fletcher S., *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2948-2950.
- [535] Fukuyama T., Jow C.-K., Cheung M., *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373-6374.
- [536] Hughes D. L., *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 127-164.
- [537] Castro B. R., *Chapter 1 - Replacement of Alcoholic Hydroxyl Groups by Halogens and Other Nucleophiles via Oxyphosphonium Intermediates*, Vol. 29, 1 Ed. (Ed.: W. G. Dauben), John Wiley & Sons, New York, **1983**, 1-162.
- [538] Stewart R., Harris M. G., *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 3807-3814.
- [539] Nuli M. V., Sandhya P., Begum A. *et al.*, **2023**.
- [540] Cho J. H., Kim B. M., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1273-1276.
- [541] Salvatore R. N., Nagle A. S., Schmidt S. E. *et al.*, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1893-1896.
- [542] Latscha H. P., Kazmaier U., *Kapitel 35 - Derivate der Carbonsäuren*, 4 Ed., Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2016**, 565-576.
- [543] Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.
- [544] Kalayanov G., Pinho P., Westerlind H. *et al.*, Medivir AB US 2016/0271160 A1, **15.04.2016**.
- [545] Fletcher S., Shahani V. M., Lough A. J. *et al.*, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4621-4632.
- [546] Darnbrough S., Mervic M., Condon S. M. *et al.*, *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 3273-3280.
- [547] Porcheddu A., Giacomelli G., Piredda I. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5786-5797.
- [548] Markiewicz W. T., Groger G., Rosch R. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3672-3680.
- [549] Pulido J., Sobczak A. J., Balzarini J. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 191-203.
- [550] Galli C., *Org. Prep. Proced. Int.* **1992**, *24*, 285-307.
- [551] Lota G., Fic K., Frackowiak E., *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 38-41.
- [552] Barnett L., Bender S., Cox S. *et al.*, Novartis AG; Aduro Biotech INC. WO 2020/092617 A1, **07.05.2020**.
- [553] Chandra T., Broderick W. E., Broderick J. B., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28*, 1016-1029.
- [554] Wright M. H., Sieber S. A., *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 681-708.
- [555] Yang Y., Hahne H., Kuster B. *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* **2013**, *12*, 237-244.
- [556] Sibbersen C., Lykke L., Gregersen N. *et al.*, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12098-12100.
- [557] Niphakis M. J., Cravatt B. F., *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 341-377.
- [558] Wang S., Tian Y., Wang M. *et al.*, *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 353-361.
- [559] Rix U., Superti-Furga G., *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616-624.
- [560] Chen X., Wang Y., Ma N. *et al.*, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 72-84.
- [561] Thakur S., Sinhari A., Jain P. *et al.*, *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1006304-1006325.
- [562] Smith C. I. E., Zain R., *Annu. Rev. Pharmacol.* **2019**, *59*, 605-630.
- [563] Chavda V. P., Hossain M. K., Beladiya J. *et al.*, *Biologics* **2021**, *1*, 337-356.
- [564] Michelson A. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632-2638.
- [565] Letsinger R. L., Mahadevan V., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.
- [566] Abramova T., *Molecules* **2013**, *18*, 1063-1075.
- [567] Lashkari D. A., Hunnicke-Smith S. P., Norgren R. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 7912-7915.
- [568] Shen X., Corey D. R., *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1584-1600.
- [569] Deleavey G. F., Damha M. J., *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937-954.
- [570] Sharma V. K., Watts J. K., *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 2221-2242.
- [571] Reese C. B., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.
- [572] Letsinger R. L., Lunsford W. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655-3661.
- [573] Beaucage S. L., Caruthers M. H., *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [574] Herdewijn P., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 297-310.

- [575] Greene T. W., *Chapter 9 - Protection for the Phosphate Group*, 4 Ed. (Ed.: P. Wuts), John Wiley & Sons, Hoboken, **2006**, 934-985.
- [576] Roy S., Caruthers M., *Molecules* **2013**, *18*, 14268-14284.
- [577] Kosuri S., Church G. M., *Nat. Methods* **2014**, *11*, 499-507.
- [578] Andrus A., Kuimelis R. G., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2000**, *1*, 10.13.11-10.13.16.
- [579] Hughes R. A., Ellington A. D., *CSH Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a023812.
- [580] ATDBio, *Solid phase oligonucleotide synthesis*, <<https://atdbio.com/nucleic-acids-book/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>> (17.10.2023).
- [581] Schulhof J. C., Molko D., Teoule R., *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 51-54.
- [582] Nukaga Y., Oka N., Wada T., *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2753-2762.
- [583] Guzaev A. P., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2013**, *53*, 3.1.1-3.1.60.
- [584] Schulhof J. C., Molko D., Teoule R., *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 397-416.
- [585] Zlatev I., Manoharan M., Vasseur J. J. et al., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2012**, *50*, 1.28.21-21.28.16.
- [586] Pon R. T., *Chapter 19 - Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis, Vol. 20*, 1 Ed. (Ed.: S. Agrawal), Humana Press, Totowa, **2000**, 465-496.
- [587] Ravikumar V. T., Kumar R. K., Olsen P. et al., *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 399-410.
- [588] Pon R. T., Yu S., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3327-3330.
- [589] Schcuere-Larsen C., Rosenbohm C., Jørgensen T. J. D. et al., *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 67-80.
- [590] Caruthers M. H., *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 1420-1427.
- [591] Casini A., Storch M., Baldwin G. S. et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 568-576.
- [592] Song L. F., Deng Z. H., Gong Z. Y. et al., *Front Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 689797-689809.
- [593] Marasco C. J., Sufirin J. R., *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6363-6365.
- [594] Taj S. A. S., Narayanan S., Meenakshi S. S. et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 1024-1033.
- [595] Romero-Pérez S., López-Martín I., Martos-Maldonado M. C. et al., *Org. Lett.* **2020**, *22*, 41-45.
- [596] Kobertz W. R., Essigmann J. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5960-5961.
- [597] Kiesman W. F., McPherson A. K., Diorazio L. J. et al., *Nucleic Acid Ther.* **2021**, *31*, 93-113.
- [598] Hirschbein B. L., Fearon K. L., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 55-61.
- [599] Rossberg M., Lendle W., Pfeleiderer G. et al., *Chlorinated Hydrocarbons*, 1 Ed., Wiley VCH, Weinheim, **2006**.
- [600] Zaharani L., Johan M. R. B., Khaligh N. G., *Org. Process Res. Dev.* **2022**, *26*, 3126-3129.
- [601] Krotz A. H., Rentel C., Gorman D. et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 767-775.
- [602] Ellington A., Pollard J. D., *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **1998**, *42*, 2.11.11-12.11.25.
- [603] Krečmerová M., Holý A., Pískala A. et al., *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1069-1077.
- [604] Reddy M. P., Farooqui F., Hanna N. B., *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8929-8932.
- [605] Johnsson R. A., Bogojeski J. J., Damha M. J., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2146-2149.
- [606] Reddy M. P., Hanna N. B., Farooqui F., *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1589-1598.
- [607] Kachalova A. V., Stetsenko D. A., Romanova E. A. et al., *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2409-2416.
- [608] Yang H., Tang J. A., Greenberg M. M., *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 5441-5448.
- [609] Gillet L. C. J., Alzeer J., Schärer O. D., *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1961-1969.
- [610] Schröder A. S., Steinbacher J., Steigenberger B. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 315-318.
- [611] Bartosik K., Debiec K., Czarnecka A. et al., *Molecules* **2020**, *25*, 3344-3380.
- [612] Surzhikov S. A., *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e29.
- [613] Polushin N. N., Morocho A. M., Chen B.-C. et al., *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 639-645.
- [614] Polushin N. N., Cohen J. S., *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5492-5496.
- [615] Azhayev A. V., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 787-800.
- [616] Guzaev A. P., Manoharan M., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2380-2381.
- [617] Wang Z., Olsen P., Ravikumar V. T., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 259-269.
- [618] Seeberg E., Eide L., Bjørås M., *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 391-397.
- [619] Hitomi K., Iwai S., Tainer J. A., *DNA Repair* **2007**, *6*, 410-428.

- [620] Izumi T., Wiederhold L. R., Roy G. *et al.*, *Toxicology* **2003**, *193*, 43-65.
- [621] Wood R. D., *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 135-167.
- [622] Krokan H. E., Standal R., Slupphaug G., *Biochem. J.* **1997**, *325*, 1-16.
- [623] Orta M. L., Höglund A., Calderón-Montaña J. M. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9108-9120.
- [624] Drohat A. C., Maiti A., *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8367-8378.
- [625] Tretyakova N. Y., Groehler A., Ji S., *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1631-1644.
- [626] Stingele J., Bellelli R., Boulton S. J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 563-573.
- [627] Pommier Y., Huang S.-Y. N., Gao R. *et al.*, *DNA Repair* **2014**, *19*, 114-129.
- [628] Yang S. W., Burgin A. B., Huizenga B. N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 11534-11539.
- [629] Stracker T. H., Petrini J. H. J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 90-103.
- [630] Lopez-Mosqueda J., Maddi K., Prgomet S. *et al.*, *eLife* **2016**, *5*, e21491.
- [631] Stingele J., Habermann B., Jentsch S., *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 67-71.
- [632] Fulmer G. R., Miller A. J. M., Sherden N. H. *et al.*, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
- [633] Nomenclature I.-I. C. o. B., *Biochemistry* **1970**, *9*, 4022-4027.
- [634] *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37.

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Nuklein- und Aminosäuren sowie deren Modifikationen wurden entsprechend den Empfehlungen der IUPAC Kommission der biochemischen und chemischen Nomenklatur^[633-634] durchgeführt, während SI Einheiten nicht im Abkürzungsverzeichnis angegeben sind. Zusätzlich wurden folgende Abkürzungen in dieser Arbeit genutzt:

2-HG	2-Hydroxyglutarsäure
ABA	Affinitäts-basierter Ansatz
abs.	absolut / trocken
Ac	Acetyl- / Acetylierung
ACRC	<i>acidic repeat-containing protein</i>
ADD	ATRX-DNMT3-DNMT3L
Ado	Adenosyl-
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AKT	Protein-Kinase B
AMA	Ammonium Methylamin
AML	akute myeloische Leukämie
AP	apurin/apyrimidin
APC	Allophycocyanin
APE	<i>apurinic/apyrimidinic endonuclease</i>
APL	akute promyelocytische Leukämie
APOBEC	<i>apolipoprotein B RNA editing enzyme catalytic polypeptide</i>
Äq.	Äquivalent
Ar	aromatisch
Ara	Arabinosyl-
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
AXL	Rezeptor Tyrosin-Kinase
B	Beliebige DNA-Base
BAH	<i>bromo adjacent homology</i>
BCI	<i>B-cell lymphoma</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BLI	Biolumineszenz <i>in vivo</i> Imaging
Bn	Benzyl-
Boc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
bp	Basenpaar
br.	breit
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	<i>N, O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
BTT	5-(Benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
Bu	Butyl-
Bz	Benzoyl-
c	carba, carbacyclisch
CCCP	<i>compound-centric chemical proteomics</i>

CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDA	Cytidin-Deaminase
CDI	1, 1'-Carbonyldiimidazol
CEDCI	2-Cyanoethyl <i>N,N</i> -Diisopropylchlorphosphoramidit
ChIP-Seq.	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing</i>
Ci	Citrullinierung
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
cNT	<i>concentrative nucleoside transporter</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPBA	Chlorperbenzoesäure
CPG	<i>controlled pore glass</i>
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i>
CuAAC	<i>copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
CXCL	CXC-Motiv-Chemokinligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
CYC	Cytochrom C
CycloSal	Cyclosaligenyl-
d	day / deoxy / Doublett
DART	<i>diffusing alpha emitters radiation therapy / dual affinity retargeting</i>
DBU	1, 8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	<i>dichloroacetic acid</i>
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCK	Deoxycytidin-Kinase
DCM	Dichlormethan
DCTD	Deoxycytidylat-Deaminase
dd	doppelt destilliert
DDQ	2, 3-Dichloro-5, 6-dicyano-1, 4-benzoquinon
DEAD	Diethylazodicarboxylat
Dec	Decitabin
Dia	Diastereomer
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPAT	Diisopropylammonium tetrazolid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMAP1	<i>DNA methyltransferase 1-associated protein 1</i>
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT/DMTr	4, 4'-Dimethoxytrityl
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
DPC	DNA-Protein Crosslink
ds	<i>double stranded</i>
E	Ethyl-
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
eNT	<i>equilibrative nucleoside transporter</i>

EPI	Epiblast
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl-
ETT	5-(Ethylthio)-1H-tetrazol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EWG	<i>electron withdrawing group</i>
FA	<i>formic acid</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FEN1	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT	<i>fms related receptor tyrosine kinase</i>
g	genomisch
GAS6	<i>growth arrest specific</i>
H	Histon
h	human
HAT	Histon-Acetyltransferase
HD	Histidin-Aspartat
HDAC	Histon-Deacetylase
HMA	<i>hypomethylating agent</i> / hypomethylierende Arzneimittel
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	<i>high resolution</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
<i>i</i>	<i>iso</i>
ICM	<i>inner cell mass</i>
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IPA	Isopropylalkohol
IR	Infrarotspektroskopie
ITGA5	<i>integrin subunit alpha</i>
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
Icaa	<i>long chain alkyl amino</i>
Lit.	Literatur
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	Molar
m	Masse / Multipllett
M	Masse / Mega / Methyl-
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>

MBD	methyl-CpG bindende Domäne
MBP	methyl-CpG bindende Proteine
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Me	Methyl / Methylierung
MeCP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
MP	Metabolit Pool
MRE	<i>meiotic recombination</i>
MRN	hMRE11–hRAD50–Nibrin
MS	Massenspektrometrie / Molsieb
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MW	<i>molecular weight</i>
N	Normal (Konzentration)
<i>n</i>	<i>normal</i>
NBS1	<i>nijmegen breakage syndrome protein 1</i>
NCoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
Nd	Neodym-dotiert
NDPK	Nukleosid Diphosphat-Kinase
NEB	<i>New England BioLabs Inc.</i>
NMI	<i>N-Methylimidazol</i>
NMPK	Nukleosid Monophosphat-Kinase
NMR	<i>nucleic magnetic resonance</i>
NT	Nukleosid Transporter
Nu	Nukleosid
NuRD	<i>nucleosome remodeling deacetylase</i>
OCTN1	<i>novel organic cation transporter</i>
OEG	Oligoethylenglycol
ON	Oligonukleotid
p	Pentett / Phosphat
P	Phosphat- / Phosphorylierung
PA	Phosphoramidit
Pac	Phenoxyacetyl-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i>
PD	<i>programmed cell death receptor</i>
PD-L	<i>programmed cell death ligand</i>
PDX	<i>patient-derived Xenograft</i>
PEG	Polyethylenglycol
PES	Primer-Extension-Studie
Ph	Phenyl
PI3K	<i>phosphoinositide kinase</i>
pK _A	Säurekonstante
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
Pol	Polymerase
PP _i	<i>inorganic pyrophosphate</i>

ppm	<i>parts per million</i>
Pr	Propyl-
PrE	primitives Endoderm
PS	Polystyrol
Q	Quadrupol, Hydroquinon-O, O'-Diessigsäure
q	Quartett
R	Rest
r	ribosomal
rad	Radiant
RAD50	DNA repair protein
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosacroma</i>
RAS	<i>rat sacroma virus</i>
RCM	<i>ring closing metathesis</i>
Red	Reduktion
Red-Al	Natrium-bis(2-methoxyethoxy)-aluminiumhydrid
Ref.	Referenz
R _f	Retentionsfaktor
RF-C	Replikationsfaktor C
RFTS	<i>replication focus targeting sequence</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNR	Ribonukleotidreduktase
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Synthese
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosylmethionin / steril α Motif
SAMHD1	Triphosphat-Hydrolase
SET	<i>suppressor of variegation, enhancer of zeste, and trithorax</i>
si	<i>small interfering</i>
SILIS	<i>stable isotope heavy labelled internal standard</i>
SMUG	<i>single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase</i>
SNF	<i>sucrose non-fermentable</i>
SPRTN	Spartan-Protein
SRA	SET und RING-Finger assoziiert
ss	<i>single stranded</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SWI	<i>switching defective</i>
T	Tesla
t	Triplett / Zeit
t	<i>tert-</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAN	Tetrabutylammoniumnitrat
TBS	<i>tert-Butyldimethylsilyl-, 2, 4, 6-Triisopropylbenzol-sulfonyl-</i>
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase

TDP	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase
TE	Trophoblast
TEAA	Triethylammoniumacetat
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
Tf	Triflat
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TFAA	<i>Trifluoro acetic acid anhydride</i>
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan / Trimethylsilyl-
TOF	<i>time of flight</i>
TP	Tumorprotein, Triphosphat
TPS	2, 4, 6-Triisopropylbenzenesulfonyl-
t _R	Retentionszeit
TRG	<i>Target Recognition Domain</i>
Ts	Tosyl-
TSG	Tumor Suppressor Gen
ü. N.	über Nacht
Ub	Ubiquinierung
UCK	Uridine-Cytidin-Kinase
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UHRF1	<i>ubiquitin like with phd and ring finger domains 1</i>
UV	Ultraviolet
Wss1	<i>weak suppressor of SMT3</i>
wt	<i>weight</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing 1</i>
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat
z	Ladungszahl
ZBTB4	<i>Zinc Finger and BTB (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac) Domain</i>
ZGA	zygotische Genom Aktivierung
α-KG	α-Ketoglutarat
δ	chemische Verschiebung