

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

Einblicke in die RNA-Entwicklung
-
Präbiotische Nukleosid-Synthesen
und
Biomimetische Prozesse

Nathalie Jacqueline Kurrle

aus

München, Deutschland

2025

Eidesstattliche Erklärung

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

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 23.07.2025

(Nathalie Kurrle)

Dissertation eingereicht am	24.07.2025
Erstgutachter/in:	Prof. Dr. Oliver Trapp
Zweitgutachter/in:	Prof. Dr. Andrea Rentmeister
Mündliche Prüfung am	28.11.2025

Kurzzusammenfassung

Die Entwicklung von unbelebter Materie zu den ersten frühen Organismen bis hin zu den komplexen Biosystemen des heutigen Lebens ist nach wie vor ungeklärt. Es wird angenommen, dass aus vereinfachten Vorläufersystemen durch wiederholte Modifikation schließlich die heute beobachtete Komplexität der Biosysteme entstand. In dieser Arbeit wurden die Wöhler-RNA, eine Proto-RNA, die präbiotische Entwicklung von tRNA-Nukleosiden, sowie deren biomimetische Prozesse beleuchtet, um Einblicke in die Entstehung der heutigen Biomoleküle zu erhalten (**Abbildung 1**).

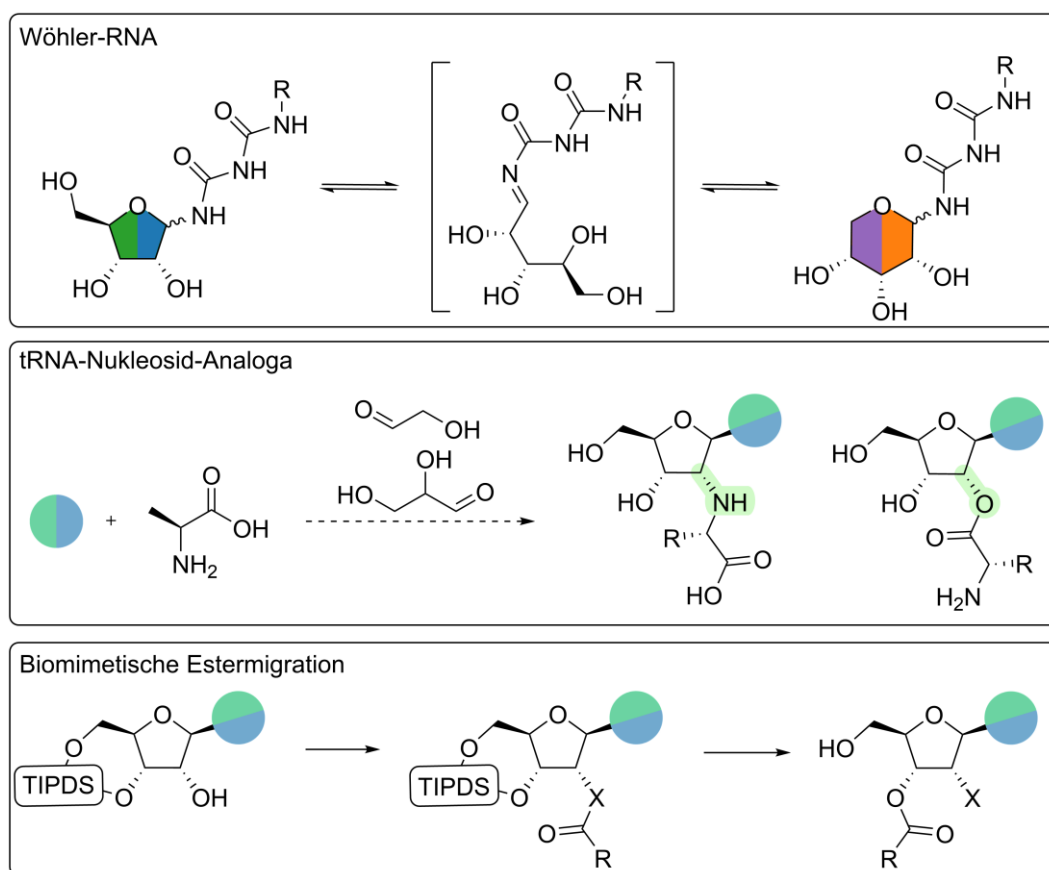


Abbildung 1. Grafische Zusammenfassung der drei behandelten Themen in dieser Arbeit.

Es wurde eine präbiotisch plausible Synthese der Biuret- und Triuret-Nukleoside (Wöhler-RNA) ausgehend von einfachen Aldehyden in Wasser entwickelt. Für die Biuret-Nukleoside wurde neben der Bildung der Furanoside, auch die Entstehung der Pyranoside nachgewiesen. Untersuchungen der Stabilität der Biuret-Furanoside zeigten, dass die Isomerisierungstendenz zu den Pyranosiden mit steigender Temperatur zunimmt. Die Triuret-RNA-Nukleoside wurden als Produkte der

präbiotischen Synthese ausschließlich in ihrer Pyranosidform detektiert. Isomerisierungsexperimente bei erhöhten Temperaturen zeigten eine Zersetzungsanfälligkeit der Furanoside wohingegen die Pyranoside eine enorme Stabilität aufwiesen. Aufgrund der Isomerisierungs- und Zersetzungsneigung der Wöhler-Furanoside sind diese als RNA-Vorläufer zum jetzigen Stand als unwahrscheinlich zu betrachten.

Aufbauend auf der Synthese der Wöhler-RNA wurde eine präbiotische Herstellung von 2'-tRNA-Nukleosiden untersucht. Als plausibler Weg wurde dabei eine Vier-Komponenten-Kondensation aus Nukleobase, Glykol- und Glycerinaldehyd sowie einer Aminosäure erachtet. Je nach Reaktionsverlauf sind dabei sowohl die kanonische (C-verknüpft) als auch die nicht-kanonische (N-verknüpfte) Verbindung von Aminosäure an das Nukleosid möglich. Für die Identifikation der antizipierten Produkte war die Synthese von Referenzstrukturen erforderlich. Unter verschiedensten präbiotischen Bedingungen, selbst unter Einbeziehung von Schutzgruppen, konnte keine erfolgreiche Bildung der gewünschten Produkte nachgewiesen werden. UHPLC-QTOF-MS-Messungen und zusätzliche MSMS-Messungen deuten auf die Bildung von Regioisomeren bei der Reaktion der Aldehyde mit der Nukleobase hin.

In den natürlichen C-verknüpften-tRNA-Nukleosiden kommt es im Verlauf der Proteinbiosynthese zu einer Wanderung gewisser Aminosäuren von der 2'- in die gewünschte 3'-Position. Jene Wanderung wurde in dieser Arbeit unter Laborbedingungen genauer untersucht. Hierfür wurde die biomimetische 2'-3'-Estermigration bei der der fluoridbasierten Desilylierung von 3',5'-TIPDS geschützten, an der 2'-Position mit Aminosäuren veresterten, Nukleosiden genauer beleuchtet. Diese Esterwanderung konnte auf Sulfonsäuren ausgeweitet werden, was eine regio- und stereoselektive Route zu verschiedenen 2'- und 3'-Nukleosidanaloga ermöglicht.

Abstract

The evolution from non-living matter to the complex biosystems of life as we know it *via* the first early organisms is still unclear. It is assumed that the complexity of today's biosystems eventually emerged from simplified precursor systems through repeated modification. In this work, the Wöhler-RNA, a proto-RNA, the prebiotic emergence of tRNA-nucleosides and their biomimetic processes were examined in order to gain insights into the origin of today's biomolecules (**Abbildung 2**).

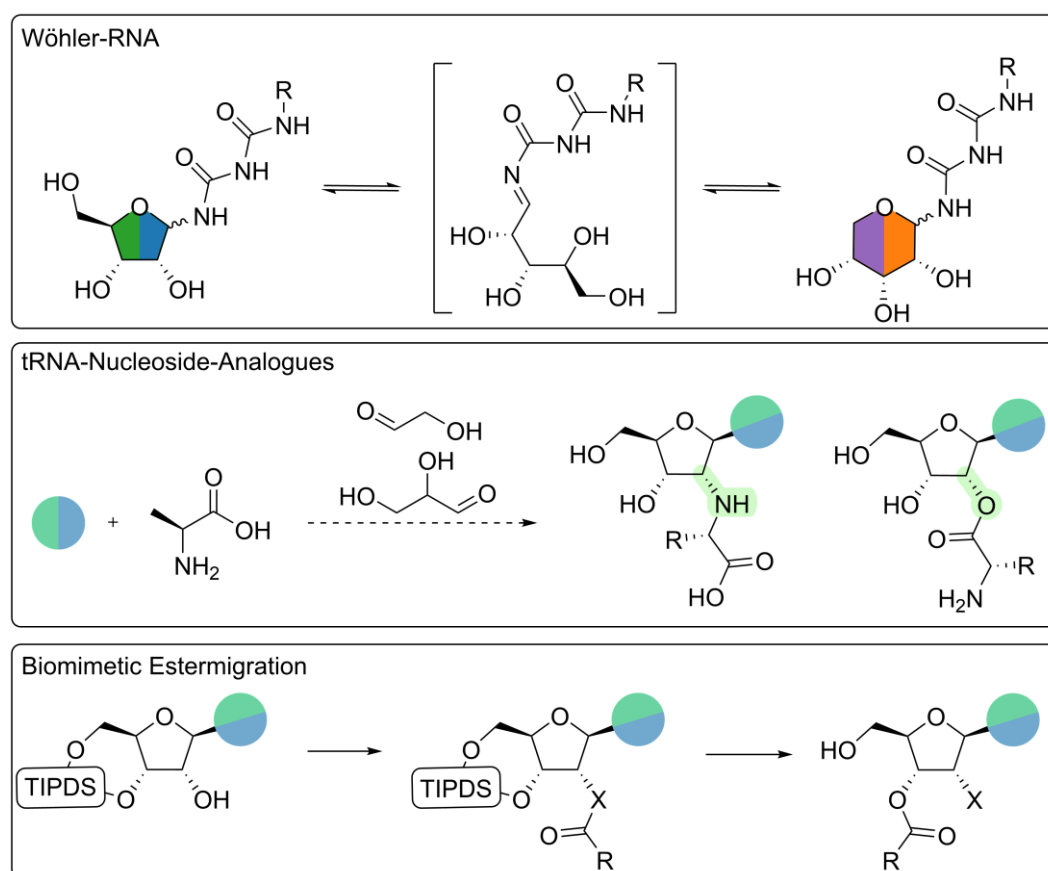


Abbildung 2. Graphical summary of the three topics covered in this work.

A prebiotically plausible synthesis for the biuret- and triuret-nucleosides (Wöhler-RNA) was developed starting from simple aldehydes in water. For the biuret nucleosides not only the formation of the furanosides, but also the formation of the pyranosides was demonstrated. Investigations on the stability of the biuret-furanosides showed that the tendency to isomerise into pyranosides intensifies with increasing temperature. The prebiotic triuret-RNA-nucleoside-synthesis showed exclusive pyranoside formation. Isomerisation-experiments at elevated

temperatures showed that the triuret-furanosides were susceptible to decomposition, whereas the pyranosides exhibited enormous stability. Due to the tendency of the Wöhler-furanosides to isomerise and decompose, they are currently considered unlikely to be RNA-precursors.

Based on the synthesis of the Wöhler-RNA, a prebiotic synthesis of 2'-tRNA-nucleosides was investigated. A four-component condensation of nucleobase, glycol and glyceraldehyde as well as an amino acid was designed for the prebiotic reaction. Depending on the course of the reaction, both the canonical (*C*-linked) and the non-canonical (*N*-linked) amino acid connection to the nucleoside are possible. The synthesis of reference structures was necessary for the identification of the anticipated products. Under various prebiotic conditions, even with protective groups, no successful formation of the desired products could be demonstrated. UHPLC-QTOF-MS-measurements and additional MSMS-measurements indicate the formation of regioisomers in the reaction of the aldehydes with nucleobase.

In the canonical *C*-linked tRNA-nucleosides, certain amino acids migrate from the 2'- to the desired 3'-position during protein biosynthesis. This migration was investigated in more detail under laboratory conditions in this study. Therefore, the biomimetic 2'-3' ester shift was further examined during the fluoride-based desilylation of 3',5'-TIPDS protected nucleosides esterified at the 2'-position with amino acids. The migration could be extended to sulfonic acids, allowing a regio- and stereoselective route to various 2'- and 3'-nucleoside analogues.

Wissenschaftliche Beiträge

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert und auf Konferenzen in Form von Posterpräsentationen vorgestellt.

Publikationen

M. Bechtel, N. J. Kurrle, O. Trapp, *Chem Eur J* **2024**, *30*, e202402055. A Prebiotic Pathway to Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

N. J. Kurrle, C. J. B. Seifert, N. Hampel, T. Rauch, M. Thoma, L. V. Parziale, M. S. R. Ebeling, D. Berthold, O. Trapp, *ChemBioChem* **2025**, e202500395. Synthesis of Nucleoside Derivatives by Biomimetic Ester Migration.

N. J. Kurrle, M. Bechtel, N. Hampel, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2025**, e00046. Prebiotic Investigations and Reaction Network Analysis on the Wöhler-RNA System.

Posterpräsentationen

Molecular Origins of Life Munich, Juli **2024**, München (Deutschland); A Prebiotic Pathway to Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenosin
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
AMP	Adenosinemonophosphat
Äq.	Äquivalente
Ara	Arabinosyl
bA	Adenin
bC	Cytosin
bG	Guanin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Borax	Natriumtetraborat; $\text{Na}_2\text{H}_{20}\text{B}_4\text{O}_{17}$
bU	Uracil
Bz	Benzoyl
C	Cytidin
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cHex	Cyclohexan
CMP	Cytidinmonophosphat

Abkürzungsverzeichnis

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAP	Diamidophosphat
DBU	Diazabicycloundecen
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DMA	<i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ -Dimethyladenosin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
FaPy	Formamidopyrimidin
FLO	Fluoren

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanosin
GA	Glykolaldehyd
Ga	Jahrmilliarde, Giga-Jahr
GlyA	Glycerinaldehyd
GOE	Große Sauerstoffkatastrophe
h	Stunden
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HR	hochaufgelöst
Im	Imidazol
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
LUCA	last universal common ancestor (Urvorfahr)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minuten
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
MSMS	Tandem-Massenspektrometrie
NAD ⁺	Nikotinadenindinukleotid
NaHMDS	Natriumbis(trimethylsilyl)amid
NBOC	2-Nitrobenzyl-Carbonyl

Abkürzungsverzeichnis

NMR	Kernspinresonanz
NOESY	Nukleare Overhauser-Effekt-Spektroskopie
Pent	<i>n</i> -Pentan
PG	Schutzgruppe
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Phe	Phenylalanin
Pp	Phosphatpuffer
ppm	parts per million
Präp. HPLC	Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
QTOF	Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer
quant.	quantitativ
R _f	Retentionsfaktor
Rib	Ribosyl
RNA	Ribonukleinsäure
r.t.	Raumtemperatur
sat.	gesättigt
SEM	2-(Trimethylsilyl)ethoxymethyl
T	Temperatur
t	Zeit
TASF	Tris(dimethylamino)sulfoniumdifluortrimethylsilicat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid

<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEOC	2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
TEOC-OSu	N-[2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyloxy]pyrrolidin-2,5-dion
Tf	Triflat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPDS	1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan
TMS	Trimethylsilan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uridin
UHPLC	Ultra Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
UV	ultraviolett
Val	Valin

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
Wissenschaftliche Beiträge.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Inhaltsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
2 Kenntnisstand.....	5
2.1 Entstehung der Frühen Erde.....	7
2.2 Gegebenheiten auf der Frühen Erde.....	8
2.3 Abiogenese	9
2.3.1 Extraterrestrische Entstehung.....	9
2.3.2 Terrestrische Entstehung.....	11
2.4 Chemische Evolution Hypothesen.....	13
2.4.1 Metabolismus-Hypothese	13
2.4.2 RNA-Welt-Hypothese.....	15
2.5 Nukleosid-Bausteine	16
2.5.1 Nukleobasen	17
2.5.2 Zucker.....	19
2.6 Nukleoside.....	21
2.6.1 RNA-Purin-Nukleoside	21
2.6.2 RNA-Pyrimidin-Nukleoside.....	23
2.6.3 Kombinierte Synthesen der Purin- und Pyrimidin-Nukleoside	25
2.6.4 DNA-Nukleoside.....	27
2.7 Proto-RNA.....	29
2.7.1 Modifikationen am Rückgrat der RNA	30

Inhaltsverzeichnis

2.7.2	Modifikationen der Nukleobasen.....	32
2.8	tRNA.....	34
3	Zielsetzung.....	37
4	Ergebnisse und Diskussion.....	41
4.1	Wöhler-RNA als präbiotisch plausible Proto-RNA?.....	43
4.1.1	Präbiotische Synthese und Referenzsynthesen.....	45
4.1.2	Untersuchung der Isomerisierung.....	59
4.1.3	Wöhler-RNA-Nukleotide.....	68
4.2	Präbiotische Synthese von tRNA-Nukleosiden.....	76
4.2.1	Von RNA-Nukleosiden zu tRNA-Nukleosiden.....	77
4.2.2	Präbiotische Synthese von tRNA-Nukleosiden.....	84
4.2.3	Nukleosid-Referenz-Synthesen.....	107
4.3	Biomimetische Estermigration an Nukleosid-Derivaten.....	116
4.3.1	Untersuchung der Acylwanderung an einfachen Estern.....	117
4.3.2	Wanderung von Aminosäuren.....	123
4.3.3	Entwicklung einer stereo- und regioselektiven Syntheseroute zu modifizierten Nukleosiden.....	132
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	135
6	Experimental.....	145
6.1	General Methods.....	147
6.2	General Procedures.....	155
6.3	Wöhler-RNA.....	156
6.3.1	Synthetic Procedures and Characterisation of Isolated Compounds.....	156
6.3.2	Prebiotic Biuret Reactions.....	184
6.3.3	Prebiotic Triuret Reactions.....	190
6.3.4	Isomerisation.....	191

6.4	tRNA-Nucleosides and Biomimetic Estermigration	194
6.4.1	Synthetic Procedures and Characterisation of Isolated Compounds	194
6.4.2	Prebiotic Reactions	296
7	Anhang	311
7.1.1	NMR Spektren	313
7.1.2	Wöhler-Nukleosid Eichgeraden.....	430
7.1.3	Biomimetische Estermigration DFT Rechnungen	434
8	Danksagung	451
9	Literaturverzeichnis	455

Kapitel 1

Einleitung

Die Entstehung von Leben vor rund 4 Milliarden Jahren ist eine der zentralsten Fragen der Menschheit. Wissenschaftler und Philosophen sind nicht nur auf der Suche nach dem eigenen Ursprung, sondern auch interessiert an außerirdischem und künstlichem Leben. Philosophen hinterfragen den Sinn des Lebens, Physiker widmen sich der Entstehung des Universums und Biologen erforschen die Definition von Leben.

Aufgabe der präbiotischen Chemie ist es, herauszufinden wie nach der Entstehung des Universums erste Moleküle entstehen konnten und sich daraus die heutigen biologischen Systeme entwickelt haben. Die Forschung in diesem Bereich ist schwierig, da das Wissen zu den Gegebenheiten, die zur Zeit der Entstehung des Lebens vorherrschten, sehr dürftig ist. Interdisziplinäre Forschungsgemeinschaften, denen unter anderem Geologen und Astrophysiker angehören, sind deshalb unbedingt erforderlich, um fundierte Aussagen über die Gegebenheiten der frühzeitlichen Erde zu treffen. Von besonderer Bedeutung sind beispielsweise Informationen zur geologischen Beschaffenheit, den vorherrschenden Temperaturen und Energiequellen, sowie dem Vorkommen von Gasen und Molekülen.

Anhand von den Ergebnissen dieser Forschung, wird die Entstehung verschiedener Verbindungen und der ersten Lebensformen untersucht. Aufgrund der großen Anzahl an Möglichkeiten, wie dies geschehen konnte, haben sich verschiedene Hypothesen entwickelt, die sich in einem Kerngedanken einig sind: Es soll ein Weg von anorganischen Strukturen zur ersten lebenden Zelle gefunden werden und möglicherweise darüber hinaus zu den hoch spezifischen Bausteinen des heutigen Lebens.

Die Komplexität des heutigen Lebens, vor allem der Stoffwechselwege, stellt die Wissenschaft noch heute vor ein Rätsel. Zum einen sind diese spezifischen Abläufe eng miteinander verflochten, zum anderen sind die dabei beteiligten Moleküle sehr komplex und bisher noch nicht plausibel selektiv herstellbar. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass vereinfachte Mechanismen existierten, die ein erstes Leben ermöglicht haben. Diese passten sich im Sinne der darwinistischen Evolution immer weiter an ihre Umgebung an, wodurch eine Selektivität und Erhöhung der Komplexität mit der Zeit unumgänglich war. Diese verschiedenen Vorläufersysteme sind von großem Interesse, um bei der Frage nach dem Ursprung des Lebens weitere Fortschritte zu erzielen. Die moderne präbiotische sowie synthetische Chemie und die immer weiter entwickelten Analysemethoden führen zu immer neuen präbiotisch plausiblen Szenarien, wodurch die Klärung der Frage nach der Entstehung des Lebens ein Stück näher rückt.

Kapitel 2

Kenntnisstand

2.1 Entstehung der Frühen Erde

Die erste Frage, die sich aufdrängt, bevor über die Entstehung des Lebens nachgedacht werden kann, ist der Ursprung des Planeten Erde. Vor ca. 13,8 Milliarden Jahren (Ga) begann alles mit dem Urknall. Das Universum dehnte sich aus, Planeten und unser Sonnensystem formten sich.^[1-5] Unsere Erde entstand im Hadaikum vor ca. 4,54 Ga aus dem Staub und den Gasen, die unsere Sonne umgaben (**Abbildung 3**).^[6] Zu Beginn konnte, nach derzeitigem Wissenstand, auf dem aus Magma-Ozeanen bestehenden Erdmantel kein Leben entstehen. Mit der Zeit kühlte die Erde ab und es bildete sich eine Erdkruste, die theoretisch die Entstehung von erstem Leben zugelassen hätte. Allerdings war die damalige Zeit geprägt von Einschlägen anderer Protoplaneten, wodurch die Erdkruste immer wieder aufgeschmolzen wurde, die Erde weiterwuchs und höchstwahrscheinlich jegliche eventuell existierende Lebensform ausgelöscht wurde.^[7-8] Vor ca. 4,47 Ga kam es zu einem letzten großen Einschlag eines Protoplaneten auf der Erde, aus dem unser Mond entstand.^[9] Nachfolgend kühlte sich die Erde immer weiter ab und es kam zur Ansammlung von flüssigem Wasser auf der Erdoberfläche in einem Zeitraum von vor 4,4 – 3,5 Ga.^[10-11]

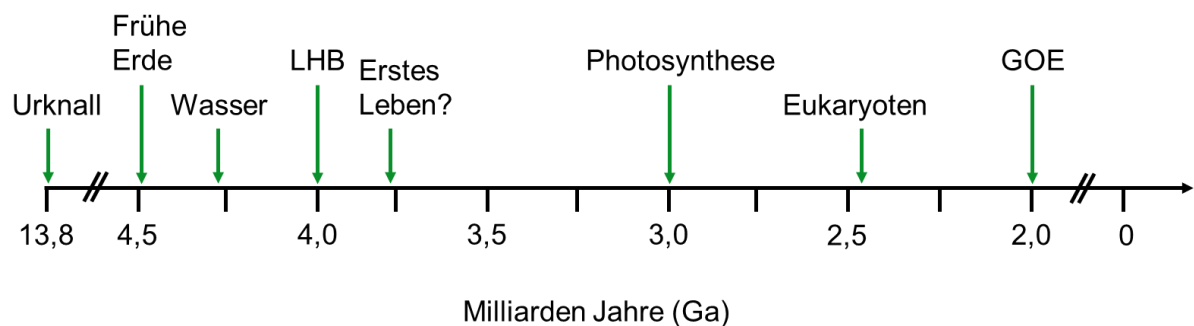


Abbildung 3. Zeitstrahl zur Entstehung der Erde und des Lebens mit besonderem Augenmerk auf relevante Ereignisse zur Zeit der Frühen Erde vor 4,5 – 2,0 Ga.

Hinweise auf Leben aus der eben genannten Zeit wurde in Sedimentablagerungen gefunden, welche durch die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen in wässriger Umgebung entstanden sind.^[12-13] Allerdings gibt es aus der damaligen Zeit nur wenige verwertbare Gesteinsproben, meist Zirkone, und die bisherigen Funde vor allem aus Südchina und Australien zeigen, dass sich die lokalen Gegebenheiten auf der Frühen Erde drastisch unterschieden haben könnten.^[14]

2.2 Gegebenheiten auf der Frühen Erde

Bereits bei der Zusammensetzung der frühen Erdatmosphäre kommt es zu großen Differenzen nicht nur lokal bedingt, sondern auch durch die beständige Weiterentwicklung der Frühen Erde und der Forschung zu diesem Thema. Während der Anfänge der präbiotischen Chemie wurde von einer reduzierenden Atmosphäre ausgegangen, bestehend aus CO , H_2 , CH_4 , und NH_3 .^[15-16] Inzwischen wird eher eine leicht reduzierende bis neutrale Atmosphäre, dominiert von CO_2 , N_2 , und H_2O ,^[17-18] als plausibel angenommen.^[19] Sauerstoff, wahrscheinlich das wichtigste Element unseres heutigen Lebens, existierte zu Beginn der Frühen Erde noch nicht und auch die restlichen heute allgegenwärtigen Gase variieren teilweise enorm.^[20-25] Ein sehr aktiver Vulkanismus führte zur Ausgasung von H_2 , H_2S und SO_2 und das Entstehen von Mikroorganismen, z. B. methanogene Organismen, führte dazu, dass sich die Zusammensetzung der Atmosphäre im Laufe der Zeit veränderte.^[26-27] Für den Zeitraum vor ca. 3.0 – 2.0 Ga konnte erstmals eine Entstehung von O_2 durch Photosynthese von anaeroben Lebewesen, z.B. Cyanobakterien, nachgewiesen werden.^[28] Unter anderem durch die hohe Konzentration an oxidierbaren Stoffen, die mit O_2 reagieren, kam es jedoch zu keinem merklichen Anstieg der O_2 Konzentration. Mit der Zeit (ca. 2.0 – 1.85 Ga) nahm die Konzentration der Reaktionspartner ab und/oder die Population der Cyanobakterien wuchs an. Dies führte zu einer merklichen Anreicherung von O_2 , wodurch die sogenannte große Sauerstoffkatastrophe (great oxygenation event; GOE) eintrat.^[29] Die Zusammensetzung der Erdatmosphäre verändert sich erneut und es entstand eine eher oxidierende Atmosphäre.^[30]

Abgesehen von den vorherrschenden Gasen stellt sich die Frage nach der Beschaffenheit der Oberfläche der Frühen Erde. Es wird angenommen, dass es auf der Erdoberfläche sowie in der oberen Erdkruste flüssiges Wasser gab (4,4 – 3,5 Ga).^[31-33] Dies könnte unter anderem zur Bildung von Ozeanen, Seen und Teichen geführt haben, wodurch eine Abgrenzung der möglichen Reaktionsräume entstehen konnte.

Im Vergleich zur heutigen Zeit war die Gesamtleuchtkraft der Sonne zu dieser Zeit um ca. 25% geringer; die UV-Strahlung war jedoch höher.^[34-35] Nichtsdestotrotz scheint die Temperatur der Frühen Erde zur Zeit der Entstehung des ersten Lebens in einem Bereich von 0 °C – 100 °C gelegen zu haben, eventuell bedingt durch die hohe Menge an isolierenden Treibhausgasen wie CO_2 oder Methan.^[36-39]

2.3 Abiogenese

Der zeitliche Ursprung des ersten Lebens, die Gegebenheiten auf der Frühen Erde und die damit einhergehenden präbiotisch plausiblen Bedingungen konnten eingegrenzt werden. Es stellt sich nun die Frage, wie sich aus anorganischer Materie erste organische Moleküle bilden konnten, die im weiteren Verlauf zur Entstehung der ersten Lebensformen führten. Es existieren zwei verschiedene Hypothesen über den Ursprung der ersten Moleküle auf der Frühen Erde. Zum einen die extraterrestrische Entstehung und zum anderen die terrestrische Entstehung, welche nachfolgend genauer beleuchtet werden.

2.3.1 Extraterrestrische Entstehung

Eine Bildung der präbiotischen Ausgangsmoleküle im Weltraum, zum Beispiel in interstellaren Wolken oder auf anderen Planeten, ist die Hypothese des extraterrestrischen Szenarios. Hierbei könnten die entstandenen Moleküle aus dem Weltraum durch z.B. Meteoriteneinschläge auf die Frühe Erde gelangt sein. Dies könnte zum Beispiel durch das hypothetische Late Heavy Bombardment (LHB), ein Mondkataklysmus vor etwa 4 Milliarden Jahren, geschehen sein.^[40] Verschiedene organische Moleküle konnten bei Analysen von Meteoriten und interstellarer Eisanaloga gefunden werden, was für die mögliche Plausibilität dieses Szenarios spricht.^[41-45]

Genauere Betrachtung dieser Funde legt zu Tage, dass teilweise eine nicht racemische Mischung von Aminosäuren detektiert werden konnte.^[46-47] Dies ist in Bezug auf die Entstehung der Homochiralität von großer Bedeutung. Eine Erklärung dieser Funde könnte das physikalisch-chemische Phänomen des Zirkulardichroismus (CD) sein. Die beiden Enantiomere einer chiralen Verbindung adsorbieren zirkular polarisiertes Licht, das im Weltall entdeckt werden konnte, unterschiedlich stark, wodurch es zu einer ungleichen Zersetzung der beiden Isomere kommt. Infolgedessen kommt es zur Anreicherung eines der beiden Enantiomere, ein sogenannter Enantiomerenüberschuss. Durch Anwendung dieses Phänomens konnte ein Überschuss von 4 % L-Alanin und 3 % D-Leucin erzeugt werden.^[48-49] Dieser Unterschied ist noch nicht groß genug, um die hohe Homochiralereinheit der heutigen Biomoleküle zu erklären. Gekoppelt an diese Anreicherung müsste eine Vervielfältigung, eventuell über ein autokatalytisches System, stattgefunden haben. Andere Ansätze zur Erklärung der Homochiralität erforschen die Kristallisation von Konglomeraten aus racemischen Mischungen oder beinhalten Paritätsverletzungen.^[50-52]

Die Theorie der Entstehung von Leben außerhalb der Erde, welches durch Meteoriten auf die Frühe Erde gebracht wurde, wird auch Panspermie genannt.^[53] Als Kritikpunkt ist anzuführen, dass diese Lebensform zuerst einmal die Bedingungen des Weltalls überleben musste, sowie den Eintritt in die irdische Atmosphäre, gefolgt vom abrupten Einschlag auf der Frühen Erde. Außerdem wird hierbei die Entstehung des Lebens nicht geklärt, sondern an einen anderen Ort verlagert.

2.3.2 Terrestrische Entstehung

Die zweite Hypothese widmet sich dem terrestrischen Szenario, wobei davon ausgegangen wird, dass die Entstehung auf der Frühen Erde selbst stattgefunden hat. Als Energiequellen könnten UV-Strahlung, elektrische Entladungen, Impaktschocks oder hohe Temperaturen gedient haben.^[54]

^{56]} Es werden verschiedene Ort auf der Frühen Erde als präbiotisch plausible Entstehungsorte für einfache organische Moleküle, sowie des ersten Lebens angesehen.

Zum einen existierten gasgefüllte Höhlen bzw. poröse Gesteine, hierbei könnte eine erhöhte Konzentration von Reaktanten eine entscheidende Rolle gespielt haben und die Möglichkeit der mineralischen Katalyse ist gegeben.^[57] Heiße Quellen haben den Vorteil, dass UV-Strahlung für mögliche photochemische Reaktionen vorhanden war, sowie Nass-Trocken-Zyklen plausibel sind.^[58-59] Bei Nass-Trocken-Zyklen kommt es zu einer temporären Austrocknung des Reaktionsraums gefolgt von einer späteren erneuten Füllung des Reaktionsraums. Dieses Phänomen kann zum einen auf den Tag-Nacht-Zyklus, den Jahreszeitenwechsel, den Einfluss von Gezeiten oder dem regelmäßigen Überschwemmen und anschließenden Austrocknen von Gebieten zurückzuführen sein. Durch das Verdunsten des Wassers kommt es zu einer Anreicherung der Reaktanten, sodass auch Reaktionen, die eine hohe Konzentration erfordern, als plausibel angesehen werden. Das zeitweise Fehlen von Wasser kann den Ablauf von Kondensationsreaktionen, die in wässrigen Lösungen thermodynamisch ungünstig sind, erklären.^[59-62] Außerdem können zuvor getrennte Reaktionsräume durch das möglicherweise abrupte schwallartige erneute Auftreten von Wasser miteinander verbunden werden, wodurch neue Reaktionen zwischen unabhängig voneinander gebildeten Molekülen ablaufen können. Die nähere Umgebung von Vulkanen wird auch als plausiblen Entstehungsort angesehen, da es hier durch die Hitze zu einer Energiezufuhr kommt und sehr lokal eine reduzierende Atmosphäre nach einem Vulkanausbruch gegeben ist.^[63-64]

Abgesehen von Orten auf dem Festland, gibt es auch mehrere Orte im Meer, die als plausible Entstehungsorte gelten könnten. Hier ist zum einen die Meeresoberfläche, bei der die vorhandene UV-Strahlung und die Verfügbarkeit von Gasen und Wasser die Vorteile darstellen, zu nennen.^[65] In der Tiefsee in sogenannten Schloten hingegen gibt es keine UV-Strahlung, ein möglicher Vorteil für Reaktanten, die unter UV-Strahlung zerstört werden könnten. Zudem sind dort sehr gleichbleibende Bedingungen gegeben. Des Weiteren kann Katalyse durch Mineralien erfolgen und die Energiegewinnung durch Redox-Reaktionen ist sichergestellt.^[66-68]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es auf der Frühen Erde eine Fülle an möglichen Entstehungsorten mit teilweise sehr unterschiedlichen Bedingungen gab. Somit können an zwei Orten trotz gleichen Ausgangsmolekülen unterschiedliche Reaktionen aufgrund der verschiedenen Gegebenheiten ablaufen. Als Beispiel ist hier die Reaktion zwischen Blausäure (HCN) und Ammoniak (NH₃) zu nennen. Diese führt je nach Wahl der Bedingungen entweder zur Bildung von Harnstoff und Guanidin (hohe Verdünnung und UV-Strahlung) oder es entstehen polymere Strukturen wie die Nukleobasen (hohe Konzentration und Temperatur).^[69-70]

Im frühen 20. Jahrhundert wurde die Idee der Ursuppe entwickelt. OPARIN und HALDANE postulierten, dass die vorhandenen Gase in der Atmosphäre unter Einwirkung von Energiequellen in einem Ozean auf der Frühen Erde miteinander reagiert haben könnten und sich daraufhin erste komplexere organische Moleküle gebildet haben könnten.^[71-72] Als Energiequellen wurden Blitze und/oder UV-Strahlung in Betracht gezogen, wodurch die Gase, vor allem Methan, Wasserstoff, Ammoniak und Wasser miteinander reagieren könnten. Dies steht im Einklang mit DARWINS Idee des kleinen warmen Teiches als Entstehungsort des Lebens.^[73] Das Miller-Urey-Experiment beweist die Möglichkeit der Entstehung der Moleküle auf der Frühen Erde in der nach OPARIN und HALDANE postulierten Ursuppe.^[54, 74-76] Hierbei wurden Bedingungen der Frühen Erde simuliert, indem Wasser erhitzt wurde, sich der entstehende Wasserdampf mit einer reduzierenden Gasatmosphäre mischte und Blitze durch elektrische Entladungen mittels Elektroden dargestellt wurden. Das Wasser-Gasatmosphären-Gemisch kondensierte in der Apparatur und floss zurück in das kochende Wasser. Nach einer Woche konnte die Entstehung von einfachen relevanten Molekülen, z.B. Glycin, Asparaginsäure und Harnstoff, nachgewiesen werden.^[15, 54]

2.4 Chemische Evolution Hypothesen

Heutiges Leben basiert auf sehr spezifischen Interaktionen hoch komplexer Makromoleküle durch eine Verflechtung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und Proteinen. Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass sich diese hochspezialisierten Moleküle direkt gebildet haben. Es wird angenommen, dass die ersten primitiven Lebensformen über ein sehr vereinfachtes autokatalytisches System verfügten. Allerdings sind hier die Beweise rar gesät, weshalb es zur Entwicklung von zwei verschiedenen Hypothesen kam. Bei der einen wird von Stoffwechselkreisläufen durch autokatalytische Reaktion ausgegangen (Metabolismus-Hypothese), bei der anderen sind selbstreplizierende Polymere, die unter anderem Informationen speichern können (RNA-Welt-Hypothese), der Schlüssel für erstes Leben.

2.4.1 Metabolismus-Hypothese

Bei dieser Hypothese (Metabolism-first-hypothesis) stellen die Stoffwechselwege die Voraussetzung für die Entstehung von Leben dar. Der Fokus liegt hierbei auf der Entwicklung einfacher organisierter Reaktion-Systemen, welche zuerst durch die geologische Umgebung katalysiert werden, sich mit der Zeit aber zu einem System entwickeln, das zusätzlich auf organischen Katalysatoren beruht und schlussendlich idealerweise autokatalytisch wird.^[77-79]

Es stellt sich die Frage welche Bedingungen in diesem Zusammenhang erfüllt werden müssen, um theoretisch die Entstehung ersten Lebens zu ermöglichen. Das ist zum einen eine konstante Energiequelle, damit die chemischen Reaktionen dauerhaft ablaufen können, sowie einfache organische Moleküle als Reaktanten. Außerdem müssen die Reaktionen autokatalytisch sein und die Möglichkeit zur chemischen Evolution aufweisen, damit es zu einer Weiterentwicklung beziehungsweise Selektion kommen kann.^[80] Als mögliche Orte der Entwicklung solcher Stoffwechselwege sind unter anderem hydrothermale Schlote im engeren Kreis, da es Analogien zwischen der hier vorherrschenden Redoxchemie und den energiegewinnenden Stoffwechselkreisläufen in autotrophen Organismen gibt.^[81-82]

Beim heutigen Kernstoffwechsel sind eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionstypen vorhanden, welche untersucht werden müssen. Idealerweise kann ein Szenario entwickelt werden, bei dem eine Vielzahl dieser Reaktionen simultan ablaufen kann. Dafür müssen unter anderem Carboxylierungen, Aminierungen, Reduktionen und Oxidationen, Hydrolysen, Isomerisierungen, Phosphorylierungen sowie Aldol Reaktionen betrachtet werden.^[77]

Besonderes Interesse wird auf reduktive CO₂-fixierende Zyklen wie den Acetyl-CoA-Weg gelegt.^[83] Hierbei wird CO₂ und H₂ verbraucht und Acetat sowie Energie gewonnen. Ein weiterer im Fokus stehender Stoffwechselweg ist der Zitronensäurezyklus, bei dem Acetyl-CoA zu CO₂, H₂ sowie Energie abgebaut wird.^[84-85] In einem ersten autotrophen Organismus wie zum Beispiel LUCA (last universal common ancestor)^[86] könnten diese beiden Stoffwechselwege entweder getrennt voneinander oder als kombiniertes Netzwerk genutzt worden sein.

Es gibt auch komplexere kombinierte Netzwerke als Vorschläge, die Vorstufen für die Biosynthese von heute wichtigen Biomolekülen, wie Aminosäuren, Zuckern, Nukleobasen, Lipiden und Pyrrolen, enthalten.^[87] Allerdings sind sich selbst die Befürworter dieser Hypothese uneins, wie weit die Abstraktion von heutigen System führen soll, sowie was die thermodynamischen Triebkräfte und die geologischen Gegebenheiten waren.^[85, 88-91] Somit verbleibt diese Hypothese eine Möglichkeit für die Entstehung des Lebens, es muss allerdings noch weitere Forschung betrieben werden.

2.4.2 RNA-Welt-Hypothese

Leben in der heutigen Zeit beruht auf der orchestrierten Vernetzung von verschiedenen Polymeren mit unterschiedlichen Funktionen. Die DNA ist das Schlüsselmolekül für die Speicherung von genetischen Informationen. Bei der Biosynthese von Proteinen wird die in der DNA gespeicherte Information durch Transkription in RNA transformiert, diese wird bei der Translation mittels Ribosome in Proteine umgewandelt.^[92] Es sind jeweils sehr komplexe Polymere, die eng miteinander zusammenarbeiten und voneinander abhängig sind. Diese Maschinerie ist sehr spezifisch und komplex. Es stellt sich die Frage, wie einfaches Leben entstehen konnte, bei dem diese ausgereiften Systeme noch nicht vorhanden waren.

Die RNA-Welt-Hypothese geht davon aus, dass es früher Lebensformen gab, die ausschließlich auf RNA als universellen Baustein beruht haben.^[93] RNA kann theoretisch die Funktion von allen drei Polymeren ausführen. Sie kann Informationen speichern und auch katalytisch wirken z.B. in Form von Ribozymen.^[94-96] Bei RNA konnte zudem eine Mutationsfähigkeit nachgewiesen werden, was einen wichtigen Punkt für die Evolution von Leben nach Darwin darstellt.^[97]

Als Indizien für dieses Szenario werden die Kofaktoren von Enzymen angesehen. Diese scheinen molekulare Fossilien zu sein, da die Struktur von vielen Kofaktoren aus Nukleotiden (meist 5'-AMP) besteht, z.B. NAD, FAD, CoA, SAM und ATP, oder sich auf diese zurückführen lässt.^[98-99] Mit der Zeit könnte die RNA durch DNA und Proteine ergänzt worden sein.

Die DNA selbst könnte aus der RNA entstanden sein, da sie strukturell sehr nah ist, mit dem Unterschied des Fehlens der 2'-Hydroxygruppe in der Riboseeinheit. Dies führt zu einer erheblichen Erhöhung der Stabilität aufgrund einer robusteren Phosphodiesterbindung wodurch es zu einer zuverlässigeren Informationsspeicherung kommt.^[100] Außerdem wird Thymin anstelle von Uracil in DNA genutzt. Uracil kann leicht in Cytosin umgewandelt werden, wodurch die gespeicherte Information verändert werden könnte. Dies ist bei Thymin nicht der Fall, es handelt sich folglich um eine sichere Form einer zweiten Pyrimidin-Base. Zusätzlich kann Thymin aus Uracil präbiotisch hergestellt werden, ein mögliches weiteres Indiz für die Entwicklung der DNA aus RNA.^[101] Alles in allem gibt es viele Hinweise für eine mögliche Existenz einer Lebensform einzig auf RNA beruhend, es konnte allerdings noch nicht abschließend bewiesen werden.

2.5 Nukleosid-Bausteine

Für die Untersuchung der RNA-Welt-Hypothese und generell dem Ursprung des Lebens ist es elementar sich mit präbiotischen Synthesen von relevanten Bausteinen auseinanderzusetzen. Von großem Interesse sind die einzelnen Monomere der RNA und DNA, die Nukleoside **2a-d** (RNA) und **3a-c,3e** (DNA) (**Abbildung 4**). Diese bestehen aus einer Zuckereinheit, Ribose (RNA) oder Desoxyribose (DNA), und einer Purin- oder Pyrimidin-Nukleobase **1a-e**.

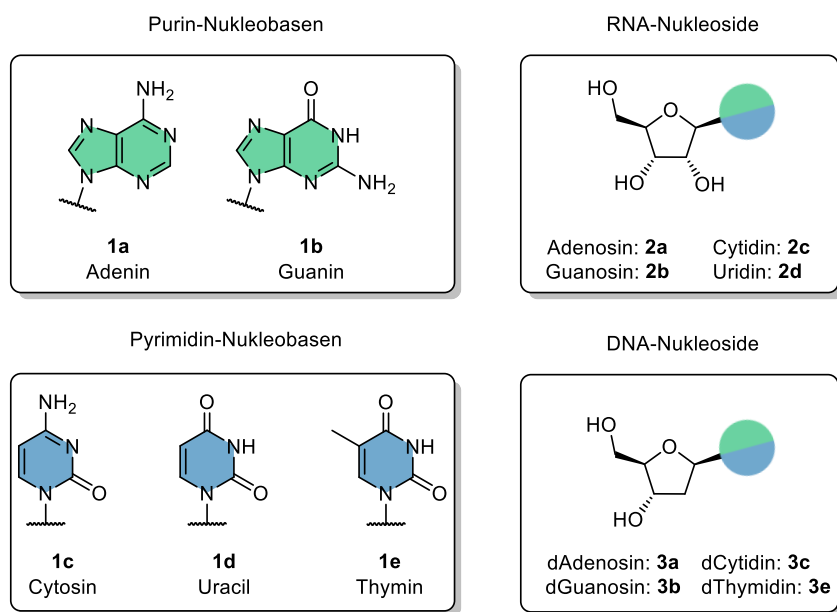


Abbildung 4. Darstellung aller kanonischer Nukleobasen **1a-e** und RNA-Nukleoside **2a-d** sowie DNA-Nukleoside **3a-c** und **3e**.

Als Zielmoleküle sind somit zum einen die Nukleobasen und Zucker von Relevanz und zum anderen die Nukleoside. Einige bisherige Ergebnisse der präbiotischen Herstellung dieser drei Molekülklassen werden nachfolgend genauer behandelt.

2.5.1 Nukleobasen

Die kanonische Purin-Nukleobasen Adenin (**1a**) und Guanin (**1b**) konnten von ORÓ ausgehend von Blausäure synthetisiert werden (**Abbildung 5A**).^[102-104] Durch Polymerisation von HCN und Ammoniakaddition konnte Intermediat **4** gebildet werden aus welchem sich Adenin bildet. Die Bildung von Guanin (**1b**) kann entweder durch die Hydrolyse von **4**, gefolgt von einer Zyklisierung mit Cyanogen oder durch Reaktion von **4** mit Ammoniak und Cyanogen zu Diaminopurin (**5**) mit anschließender Hydrolyse verlaufen.^[105]

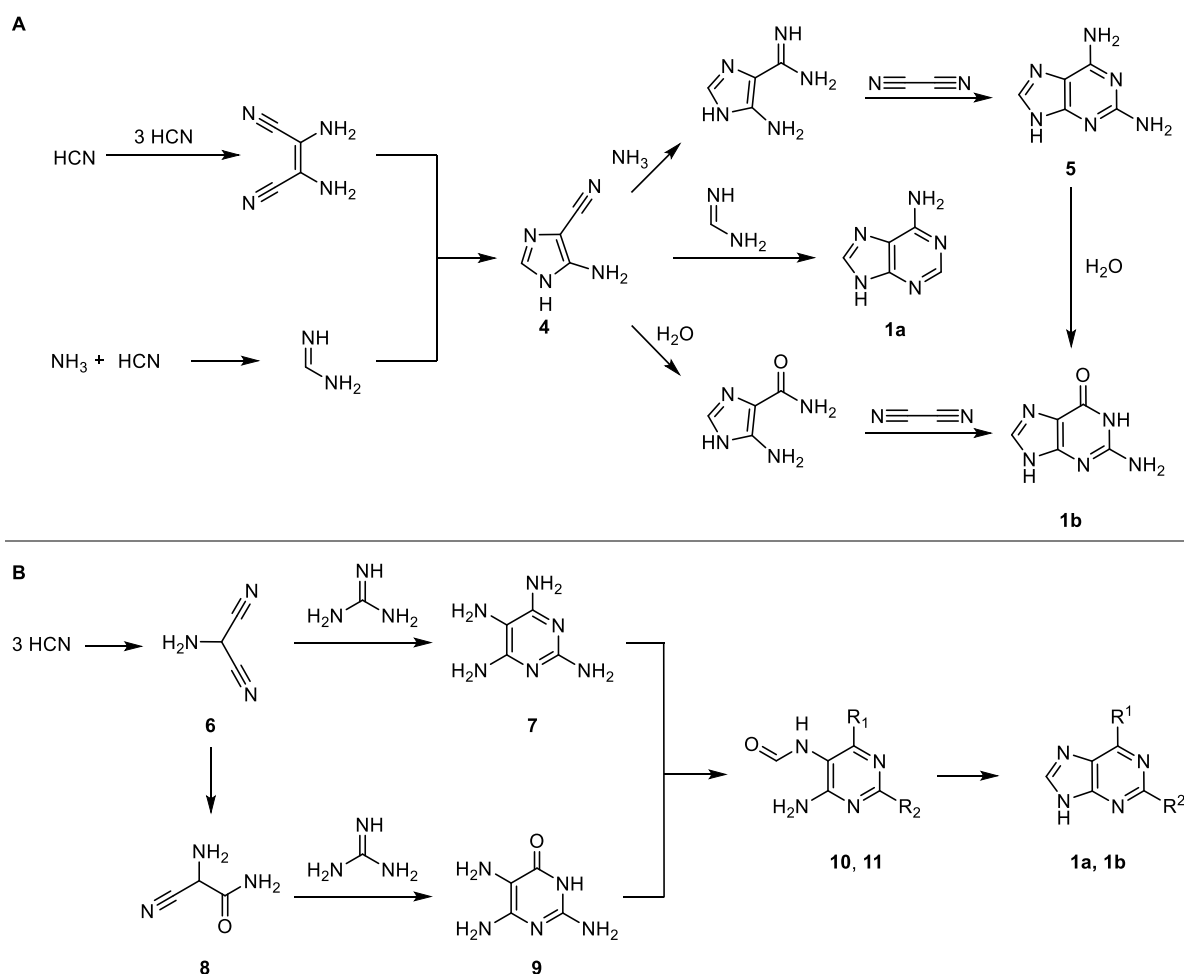


Abbildung 5. Syntheseweg zu den kanonischen Purin-Nukleobasen **1a, b** ausgehend von HCN. **A)** Herstellung nach ORÓ. **B)** Verbesserte Synthese mittels FaPys als reaktive Vorläufer. **1a:** R¹ = NH₂, R² = H; **1b:** R¹ = OH, R² = NH₂.

Alternativ wurde ein weiterer Weg zu den Purin-Nukleobasen **1a,b** von TRAUBE entwickelt (**Abbildung 5B**).^[106-107] Ausgangssubstanz ist Blausäure, die die Herstellung von einfachen Aminonitrilen (**6, 10**) ermöglicht, welche mit Guanidin zu den Aminopyrimidinen **7, 9** umgesetzt

werden können. Durch Formylierung gelangt man zu den Formamidopyrimidine **11**, **12** (FaPys), welche zu **1a**, **b** kondensieren.

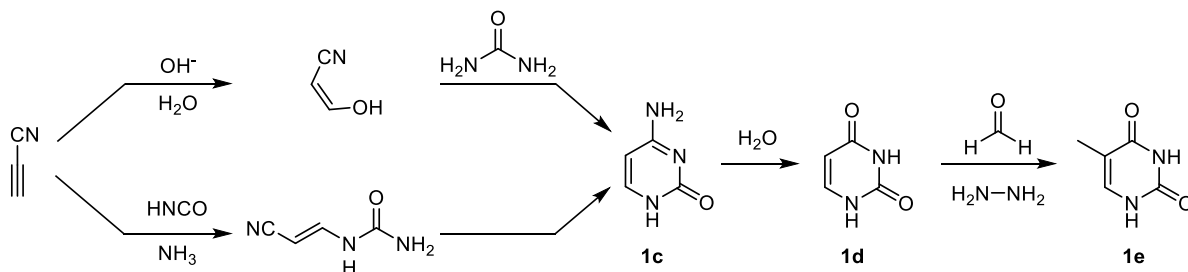


Abbildung 6. Synthese der Pyrimidin-Nukleobasen **1c-e** ausgehend von Cyanoacetylen.

Bei den Pyrimidin-Nukleobasen handelt es sich nicht um HCN-Polymere, weshalb die Nukleobasen nicht in einem kombinierten Weg hergestellt werden können. Statt HCN als Edukt wird bei den Pyrimidinen Cyanoacetylen als präbiotische Ausgangssubstanz für die Synthese genutzt (**Abbildung 6**). Cyanoacetylen kann zum einen mit Cyanat und Ammoniak, zum anderen mit Harnstoff unter basischen Bedingungen, zu Cytosin (**1c**) reagieren. Durch anschließende Hydrolyse kann **1c** in Uracil (**1d**) überführt werden.^[103, 108-110] Thymin (**1e**) kann nachweislich durch Methylierung von **1d** mit Formaldehyd und Hydrazin gebildet werden.^[111-112]

Ein weiterer wichtiger Baustein der Nukleoside ist die Zuckereinheit. Der erste Schritt im Gebiet der präbiotischen Chemie in Bezug auf die Synthese von Zuckern war die Entdeckung der Formose-Reaktion durch BUTLEROW.^[55] Hierbei reagiert Formaldehyd (**12**) mit Spuren Glykolaldehyds (**13**), beides präbiotisch plausible Aldehyde, autokatalytisch zu verschiedenen komplexen Zuckern (**Abbildung 7A**).^[113-114]

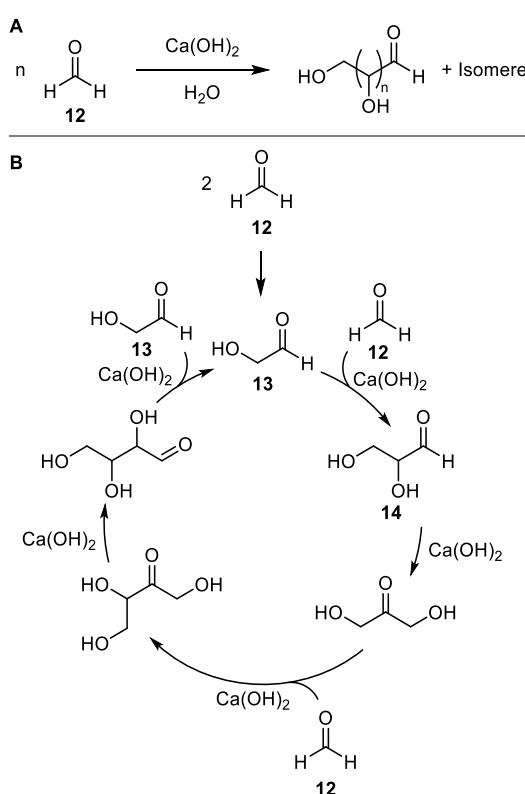


Abbildung 7. A) Allgemeine Reaktionsgleichung der Formose-Reaktion. **B)** Der autokatalytische Formosezyklus der zur Bildung diverser Zuckermoleküle führt.

Damit der Katalysezyklus der Formose-Reaktion anlaufen kann (**Abbildung 7B**), wird außer Glykolaldehyd noch eine Base und ein zweiwertiges Metallion benötigt. Hierfür wird oftmals Calciumhydroxid verwendet. Ohne die Anwesenheit von minimalen Mengen Glykolaldehyds läuft unter den vorherrschenden alkalischen Bedingungen fast ausschließlich die Cannizzaro Reaktion ab. Hierbei kommt es zu einer Disproportionierung von Formaldehyd resultierend in der Bildung von Ameisensäure und Methanol. Sobald Glykolaldehyd vorhanden ist, kommt es zu einem Anlaufen des autokatalytischen Prozesses, der aus einer Vielzahl von Aldol- und Cannizzaro-Reaktionen, sowie Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerungen besteht.^[115-117] Durch die Bildung von Glycerinaldehyd (**14**) und einer Erhöhung der Glykolaldehyd-Konzentration kommt

es zur Entstehung von komplexen Produktmischungen aufgrund der ablaufenden Reaktionen zwischen den gebildeten Aldehyden. Hauptsächlich bestehen diese aus Triosen, Tetrosen, Pentosen, Hexosen und höheren Zucker, sowie verzweigten Zuckern oder Zuckeralkoholen/-säuren.^[118-119] D-Ribose und Desoxyribose sind wichtige präbiotische Moleküle für die Nukleosid-Synthesen. Problematisch ist, dass die Desoxyribose überhaupt nicht durch die Formose-Reaktion gebildet wird und Ribose zwar entsteht, aber nur mit Ausbeuten von unter 1 %.^[118] Eine mögliche Erklärung für die geringe Ausbeute ist die schnelle Zersetzung von Ribose in wässrigen Lösungen,^[120] mit einer Halbwertszeit von drei Stunden bei pH 10,2 und 55 °C.^[121] Im Vergleich zu anderen Pentosen ist die Zersetzung viermal schneller und im Vergleich zu Hexosen ist die Ribose sogar 16-mal instabiler, wodurch sich die gebildete Ribose auch nicht im Laufe der Zeit anreichern könnte.^[121] Außerdem gibt es keine stereoselektive Bildung der D-Ribose, sondern es kommt zur Bildung eines racemischen Gemisches von Pentosen.^[122] Modifizierungen der Formose-Reaktion, wie zum Beispiel mit der Zugabe von Boraten oder Phosphaten, um Pentosen zu stabilisieren, führte zu einer Erhöhung der Ausbeute.^[123-125] Mittels verschiedener Katalysatoren, nennenswert ist die Verwendung von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), konnte die Riboseausbeute auf bis zu 20% gesteigert werden.^[126-130] Eine generell erhöhte Ausbeute von Pentosen konnte erreicht werden, indem anstelle von Formaldehyd direkt von den C2- und/oder C3-Bausteinen, Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd, ausgegangen wird. Diese beiden Aldehyde können alternativ durch Photoreduktion aus einer wässrigen Blausäurelösung hergestellt werden.^[70, 131] Bisher ist es noch nicht gelungen Ribose und insbesondere D-Ribose selektiv in hohen Ausbeuten herzustellen.

2.6 Nukleoside

Die ersten präbiotischen Synthesen der RNA-Nukleoside basieren auf der Verknüpfung der zuvor behandelten Nukleobasen mit Ribose über eine glykosidische Bindung. Weitere Forschung in dieser Richtung brachte alternative Wege hervor. Einige ausgewählte präbiotischen Synthesen der Nukleoside werden nachfolgend genauer beleuchtet.

2.6.1 RNA-Purin-Nukleoside

Der erste präbiotische Weg zu Adenosin (**2a**) wurde durch UV-Bestrahlung einer wässrigen Lösung Adenin- und Riboselösung gefunden werden.^[132] Allerdings waren die Ergebnisse schlecht reproduzierbar und die Ausbeute sehr gering. Das Hauptproblem scheint die Instabilität der Ribose in wässrigen Lösungen darzustellen.

ORGEL umging das Problem, indem er nach der präbiotischen Synthese der Nukleobasen **1a** und **1b** die Glykosylierung mit Ribose in trockenem Zustand durchführte (**Abbildung 8**). Die beiden kanonischen β -Nukleoside **2a** und **2b** konnten mit einer Ausbeute von 4 % bzw. 8 % gebildet werden.^[133]

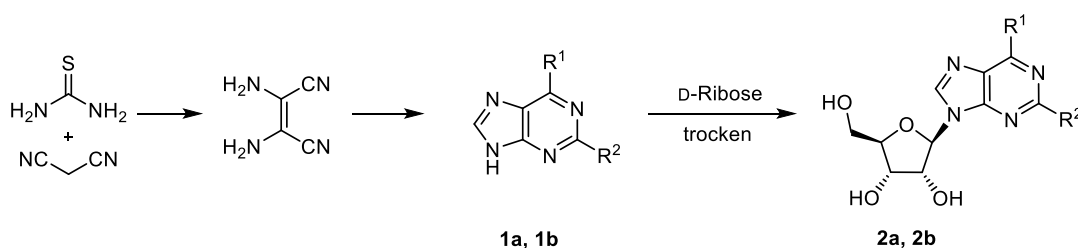


Abbildung 8. ORGELS präbiotische Synthese zu den Purin-RNA-Nukleosiden **2a** und **2b**. **1a/2a** $\text{R}^1=\text{NH}_2$, $\text{R}^2=\text{H}$; **1b/2b** $\text{R}^1=\text{OH}$, $\text{R}^2=\text{NH}_2$.

Beide genannten Synthesen enthalten die Glykosylierung der Nukleobase als Schlüsselschritt. Problematisch ist dabei unter anderem die geringe Nukleophilie der Nukleobasen, wodurch es zu schlechten Ausbeuten kommen kann. Um das Reaktivitätsproblem zu lösen, wurde aktivierte Ribose, z.B. Ribose-1-Phosphat oder Ribose-1,2-cyclisches-Phosphat, eingesetzt.^[134-137] Hierbei konnte beide Male Adenosin gebildet werden und im Falle des zyklischen Edukts sogar die Ausbeute auf 15% gesteigert werden, allerdings konnte bei beiden Wegen Guanosin nicht synthetisiert werden. Diese Probleme, schlechte Ausbeute und/oder nur Adenosin Bildung, konnten von CARELL gelöst werden, indem die Glykosylierung nicht an den fertigen Nukleobasen durchgeführt wird, sondern an Vorläufern. Die zuvor behandelten FaPys **10** und **11** dienen hier als Schlüsselintermediate, die mit Ribose im trockenen Zustand versetzt wurden (**Abbildung 9**).^[106]

Anschließend kommt es zu zwei Ringschlussreaktionen, die die beiden Nukleoside **2a** und **2b** bilden. Da hier reaktivere Vorstufen für die Glykosylierungsreaktion genutzt wurden, konnte die Ausbeute gesteigert werden. Die Formylierung von **7** und **9** zu den FaPys findet unter sauren Bedingungen statt, wohingegen die beiden finalen Ringschlussreaktionen am besten unter alkalischen Bedingungen funktionieren.^[137-138] Dies steht im Widerspruch mit der präbiotischen Plausibilität, da solch drastische Bedingungswechsel während einer Synthese schwer mit den vorherrschenden Bedingungen auf der Frühen Erde vereinbar sind. Dieses Problem wurde später behoben, indem die Reaktion unter Verwendung der präbiotisch plausiblen Nass-Trocken-Zyklen durchgeführt werden konnte.^[139]

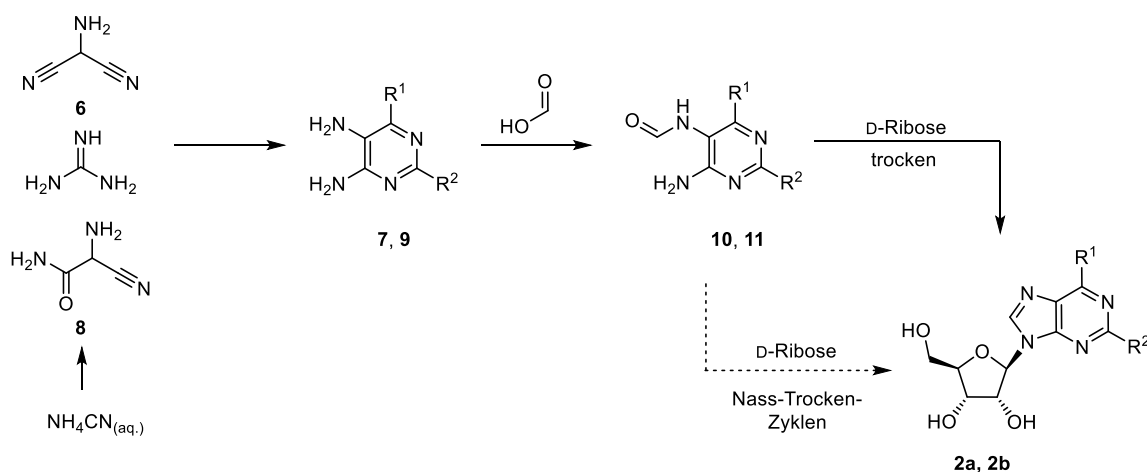


Abbildung 9. Synthese der Purin-Nukleoside **2a** und **2b** mittels FaPy Intermediaten **8** und **9** mit dem finalen Schritt im trockenen Zustand (durchgehender Pfeil) oder mit Nass-Trocken-Zyklen (gestrichelter Pfeil). **2a**: R¹ = NH₂, R² = H; **2b**: R¹ = OH, R² = NH₂.

2.6.2 RNA-Pyrimidin-Nukleoside

Die präbiotische Synthese der Pyrimidin-Nukleoside gestaltete sich schwierig, da die Glykosylierung nach ORGEL, wie zuvor bei den Purinen gezeigt, nicht erfolgreich war.^[133, 140] Es wurde nach einem Weg gesucht, bei dem entweder die Nukleobase und/oder die Ribose schrittweise aufgebaut werden. Dadurch könnten die Probleme der Glykosylierung und der Plausibilität von Ribose umgangen werden. Eine erfolgreiche Synthese wurde von SUTHERLAND demonstriert, bei der Cytidin (**2c**) schrittweise über 2-Aminooxazol (**15**) hergestellt wurde (**Abbildung 10A**).^[141]

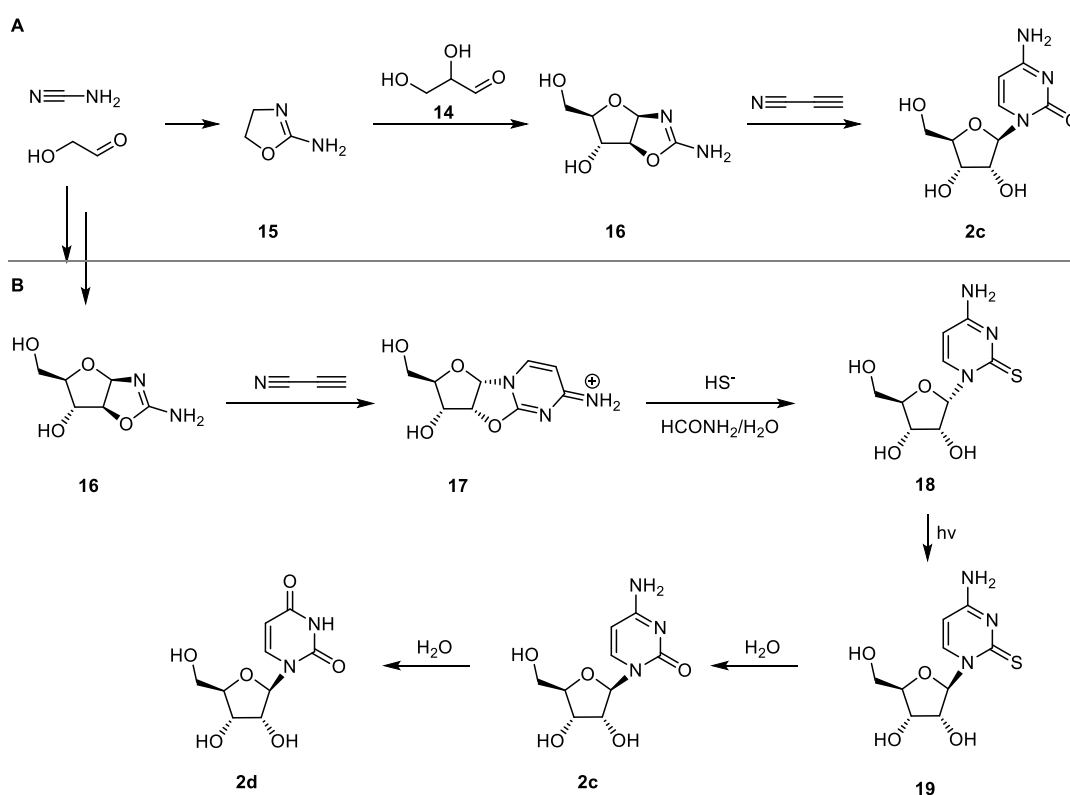


Abbildung 10. A) Bildung von **2c** aus einfachen Aldehyden und Nitrilen. **B)** Verbesserte Synthese zu den Pyrimidin-Nukleosiden **2c** und **2d** mittels Thiolyse und Epimerisierung.

Um Uridin zu erhalten und die generelle Ausbeute zu verbessern, wurde die bereits gezeigte Reaktionsabfolge von SUTHERLAND optimiert (**Abbildung 10B**).^[142-143] Die ersten Reaktionen bleiben unverändert zu **16**, allerdings erfolgt nach der Reaktion zu **17** anschließend eine Thiolyse. Dadurch kommt es zur Bildung des α -Thio-Cytidin Vorläufers **18**, der durch Photoanomerisierung in die β -Version **19** überführt werden kann. Anschließende Hydrolyse führt zur Bildung von **2c** welches durch erneute Hydrolyse in **2d** überführt werden kann.^[143]

Ein von CARELL entwickelter Ansatz zur Herstellung der Pyrimidin-Nukleoside basiert auf Ribose als Edukt (**Abbildung 11**).^[144] Hierbei wird ausgehend von Cyanoacetylen 3-Amino-Isoxazol (**20**) gebildet. Zugabe von Harnstoff und Metallionenkatalyse (Zn^{2+} oder Co^{2+}) führte zur Bildung von Intermediat **21**. Dieses wird mit Borsäure und D-Ribose in einer Trockenreaktion versetzt, um Nukleosid-Vorläufer **22** zu erhalten. Anschließend wird eine kaskadenartige Sequenz in Gang gesetzt. Der Startpunkt ist eine reduktive Öffnung des Isoxazols mit Fe^{2+} und DTT, gefolgt von einer Tautomerisierung, einer intramolekularen Zyklisierung und einer abschließenden Wassereliminierung. Dies führt zur Bildung von Cytidin (**2c**), welches mittels Hydrolyse in Uridin (**2d**) überführt werden kann.

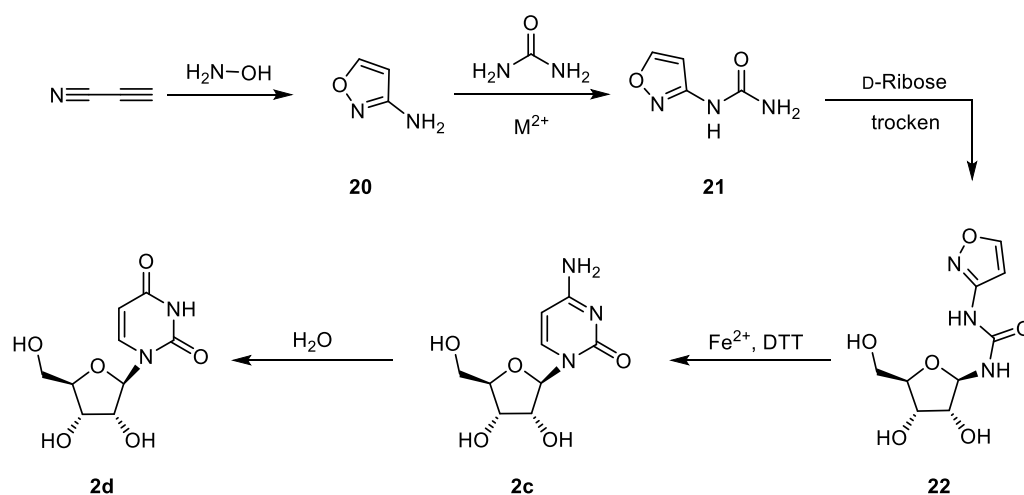


Abbildung 11. Die Pyrimidin-Nukleosid-Synthese mittels D-Ribose und 3-Amino-Isoxazol **20** nach CARELL.

2.6.3 Kombinierte Synthesen der Purin- und Pyrimidin-Nukleoside

Bisher wurden Synthesen beschrieben, die entweder Purin- oder Pyrimidin-Nukleoside bilden. Um ein biologisches System auf der Grundlage von RNA zu entwickeln, wäre es plausibler, wenn es einen kombinierten Syntheseweg gäbe. In den letzten Jahren wurde auf diesem Thema viel Forschung betrieben und CARELL entwickelte eine Synthese zu allen kanonischen RNA-Nukleosiden auf der Grundlage der zuvor entwickelten getrennten Wege mit Cyanoacetylen als gemeinsamen Ausgangsmolekül (**Abbildung 12**).^[145] Die jeweiligen Vorstufen der Purin- und Pyrimidin-Nukleoside (FaPys und Isoxazole) werden unabhängig voneinander gebildet. Einzig eine Verwendung mancher Moleküle/Ionen als Lösungsmittel oder Katalysatoren zeigt hier eine Verflechtung der Reaktionswege. Anschließend kommt es unter einheitlichen Bedingungen zur Kondensation mit Ribose und der anschließenden Bildung der kanonischen Nukleoside **2a-d**. Für die Pyrimidin-Vorstufe **20** wurde eine One-Pot-Reaktion etabliert, bestehend aus der Reaktion von Cyanoacetylen und Hydroxylamin zu **19**, gefolgt von einer Zn^{2+} -katalysierten Reaktion mit Harnstoff. Die hierbei benötigten Zn^{2+} -Ionen werden über den Purin-Syntheseweg gebildet.

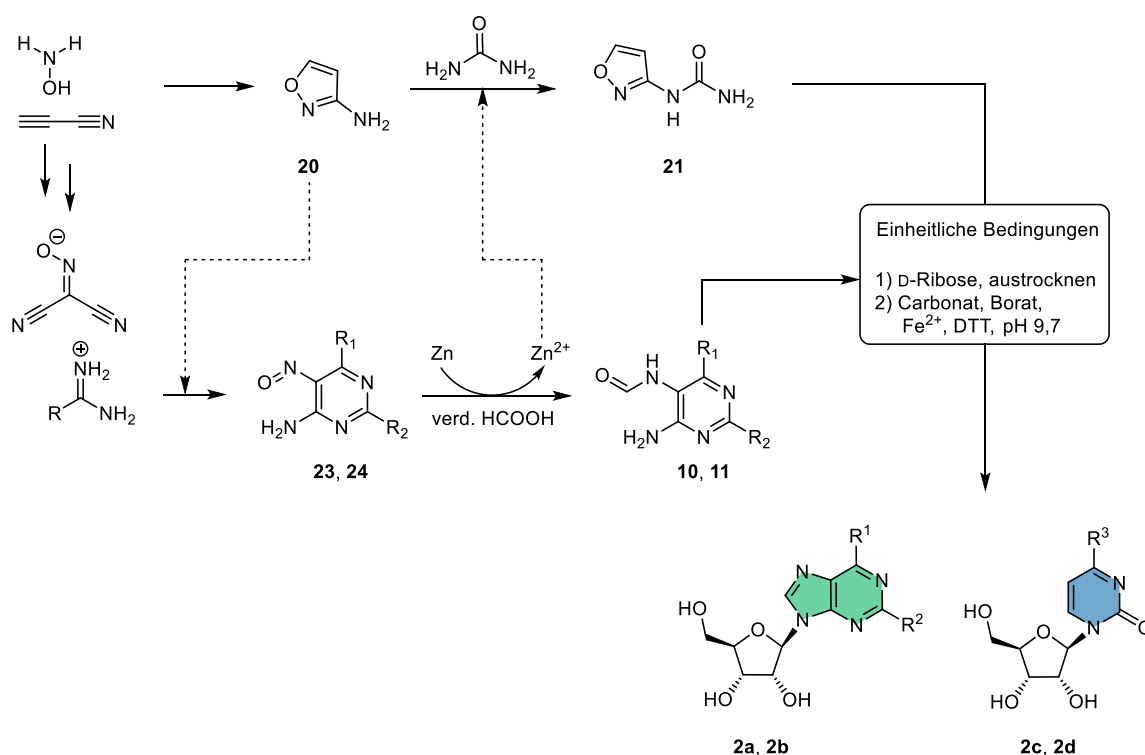


Abbildung 12. Einheitlicher Reaktionsweg zur Bildung von Purin- und Pyrimidin-Nukleosiden **2a-d** von CARELL. **10/23:** $\text{R}^1 = \text{NH}_2$, $\text{R}^2 = \text{H}$; **11/24:** $\text{R}^1 = \text{OH}$, $\text{R}^2 = \text{NH}_2$.

Das zuvor im Pyrimidin-Syntheseweg gebildete Isoxazol **20** fungiert als Lösungsmittel für den ersten Reaktionsschritt auf dem Weg zu den Purin-Nukleosiden **2a** und **2b**. Nach der Bildung von

23, 24 muss H₂O zugesetzt werden, da die nachfolgenden Reaktionen nicht in Gegenwart von Isoxazol ablaufen können. Durch Zugaben von verdünnter Ameisensäure und Zink wird die Reaktion zu **10** und **11** initiiert. Eine Mischung der Vorläufermoleküle (FaPys **10** und **11** bzw. Isoxazol **21**) wird mit D-Ribose versetzt und ein Nass-Trocken-Zyklus wird simuliert. Die nachfolgende Zugabe von H₂O, Carbonat, Borat, Fe²⁺ sowie DTT und das Einstellen des pH-Werts auf 9,7 führt zur Bildung aller vier kanonischen Nukleoside (**2a-d**). Durch diese miteinander verflochtenen Synthesewege ist man der plausiblen, simultanen Herstellung aller kanonischen Nukleoside deutlich nähergekommen. Allerdings sind die Verwendung von Ribose, die teilweise nicht tolerierten Lösungsmittel und die damit einhergehenden Lösungsmittelwechsel die Schwachpunkte dieser Synthese.

2.6.4 DNA-Nukleoside

Auf dem Gebiet der DNA-Nukleoside wurden zwei ähnliche Syntheserouten von SUTHERLAND veröffentlicht (**Abbildung 13**).^[141-142] Bei der ersten Synthese wird als Edukt **25** benutzt, ein Nebenprodukt aus der Synthese zu den RNA-Pyrimidin-Nukleosiden.^[141] Daraus entsteht 2',2'-Thioanhydro-Nukleosid **26** welches mittels photoinduzierter Reduktion unter Zugabe von H_2S 2'-deoxy-2-Thiouridin **27** bildet. Transglykosylierung mit Adenin führt zur Bildung von desoxyAdeonsin (**3a**). Dieser Reaktionsweg ist mit starker Analogie zur enzymatischen Reaktion entwickelt worden.

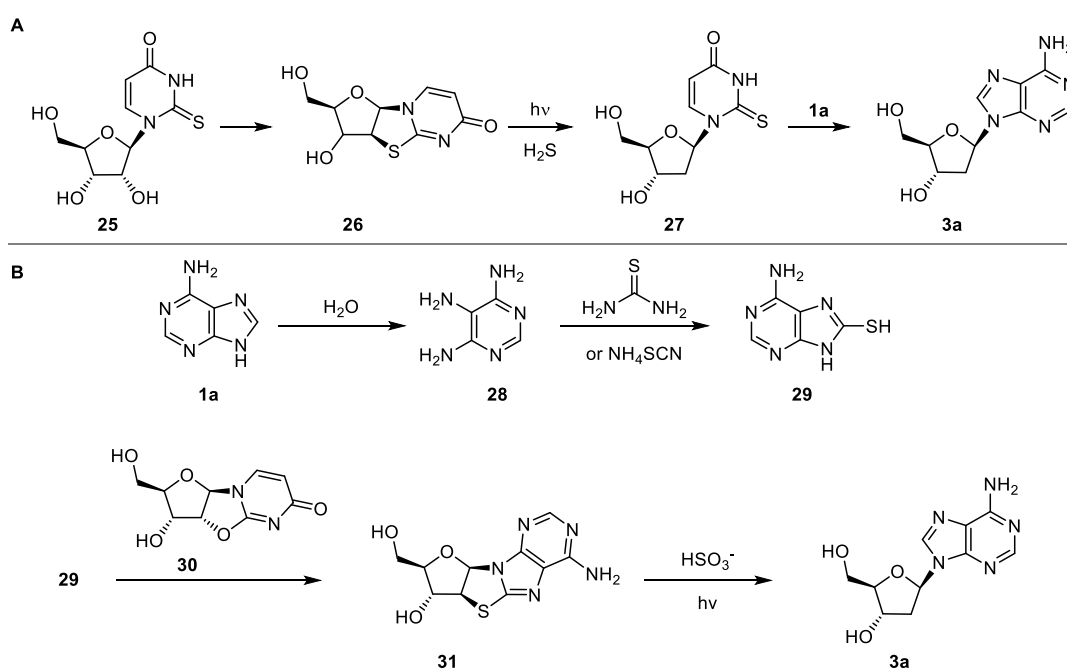


Abbildung 13. Synthesewege zu desoxyAdenosin (**3a**) nach SUTHERLAND. **A)** Herstellung analog zur enzymatischen Reaktion. **B)** Syntheseweg mittels photochemischer Reaktion zu **3a**.

SUTHERLAND entwickelte anschließend eine ähnliche Route, die plausiblere Zwischenstufen enthält (**Abbildung 13B**).^[142] **1a** wird hydrolysiert, sodass Aminopyrimidin **28** entsteht, welches mit Thioharnstoff oder Ammoniumthioacetat zu 8-Mercaptoadenin (**29**) reagiert. Dieses Adenin-Derivat kann nun mit **30** wiederum ein Nebenprodukt der RNA-Pyrimidin-Nukleosid-Synthese, über eine Transglykosylierung zu **31** reagieren. Mittels photochemischer Reduktion konnte desoxyAdenosin (**3a**) erhalten werden. Beide Male konnten Überschneidungen zwischen der RNA- und DNA-Nukleosid-Synthese gefunden werden. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die Entwicklung der DNA aus der RNA sein. Allerdings konnte weder desoxyGuanosin noch die

desoxyPyrimidin-Nukleoside gebildet werden, wodurch die Plausibilität als eher gering einzuschätzen ist.

Im Gegensatz dazu konnte TRAPP eine Route zu allen vier kanonischen DNA-Nukleosiden (**3a-c**, **3e**) nachweisen (**Abbildung 14**).^[146] Als Edukte werden die Nukleobasen, sowie einfache Aldehyde benötigt. **1a-c**, **1e** reagieren mit Acetaldehyd zu den korrespondierenden Vinylspezies **32a-c**, **32e**. Das Reaktivitätsproblem der Nukleobasen wird durch die hohe Reaktivität des Acetaldehyds ausgeglichen. Ein durch die Enaminbildung ermöglichter regioselektiver nukleophiler Angriff an Glycerinaldehyd führt zu Intermediat **31**, welches über eine 5-exo-trig-Zyklisierung zu den DNA-Nukleosiden **3a-c**, **3e** reagiert. Hierbei konnten unter einheitlichen präbiotisch plausiblen Bedingungen sowohl die Purin- als auch die Pyrimidin-DNA-Nukleoside hergestellt werden.

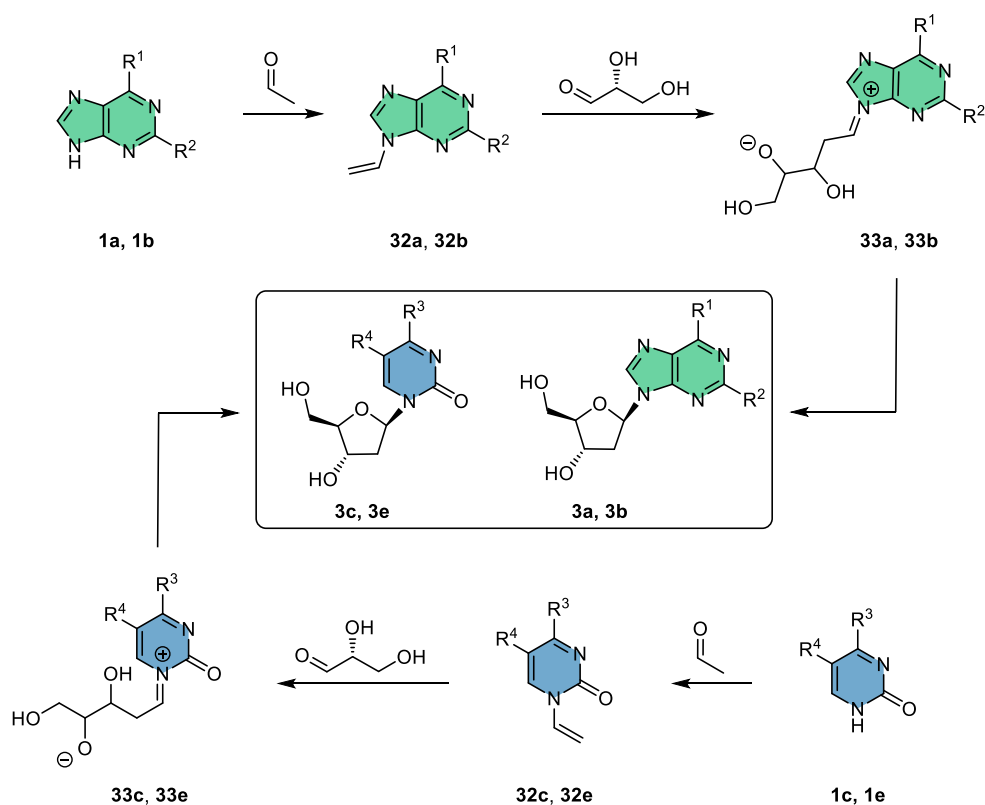


Abbildung 14. Kombinierte DNA-Nukleosid-Synthese von TRAPP zu allen vier kanonischen Nukleosiden **3a-c**, **3e** ausgehend von einfachen Aldehyden und den Nukleobasen **1a-c**, **1e**. **Xa**: $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = \text{H}$; **Xb**: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{NH}_2$; **Xc**: $R^3 = \text{NH}_2$, $R^4 = \text{H}$; **Xe**: $R^3 = \text{OH}$, $R^4 = \text{Me}$.

2.7 Proto-RNA

Das Leben basiert auf komplexen Molekülen wie Proteinen, RNA und DNA (**Abbildung 15**). Die RNA-Welt Hypothese schlägt eine vereinfachte Vorläufer Welt vor, die ausschließlich auf RNA beruhte.^[93, 95, 147-149] Es stellte sich die Frage, wie diese immer noch extrem spezifizierten Moleküle entstehen konnten. Es sind einige präbiotische Wege zu den kanonischen Nukleosiden bekannt,^[141, 145-146, 150-152] aber die Frage bleibt dieselbe: Wie ist diese Komplexität entstanden?

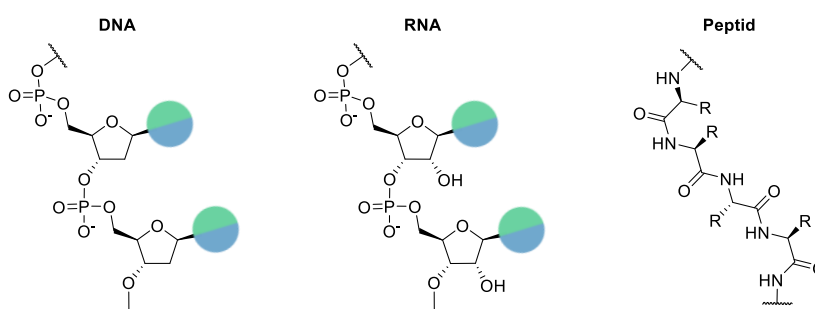


Abbildung 15. Ausschnitt des chemischen Aufbaus der drei Polymere DNA, RNA und Peptid.

Die chemische Evolution der RNA im Laufe der Zeit, beginnend von sehr einfachen RNA-Molekülen hin zu mehr Komplexität und schlussendlich zu den heute bekannten Strukturen, scheint ein plausibles Szenario zu sein. Diese vereinfachten Vorläufer, sogenannte Proto-RNAs, können an drei verschiedenen Stellen, dem Zuckerbaustein, der Phosphodiesterbindung oder den Nukleobasen, modifiziert worden sein. Hierbei können nicht nur einzelne Modifikationen entstanden sein, sondern es kann auch simultan zu einer Veränderung an mehreren Stellen gekommen sein. Dies stellt eine enorme Vielfalt an Möglichkeiten dar, die untersucht werden können. Nicht nur bei der Suche nach dem Ursprung des Lebens wird an nicht kanonischen Nukleinsäuren geforscht. Vor allem in der synthetischen Biologie untersucht man Varianten der RNA. Diese sogenannten XNAs (Xeno-Nukleinsäuren) werden zur Entwicklung von genetischen Speichermaterialien oder für molekulare Medizin genutzt.^[153-154] Einige dieser XNAs sind auch plausible Kandidaten für eine Proto-RNA.^[155] Nachfolgend werden einige Beispiele einer potentiellen Proto-RNA genauer betrachtet.

2.7.1 Modifikationen am Rückgrat der RNA

Mögliche Varianten mit Veränderungen an der Zuckereinheit und/oder an der Phosphodiesterbindung sind in **Abbildung 16** dargestellt. Als einfache abgewandelte präbiotisch synthetisierte Modifikation der RNA (Ribonukleinsäure) wird die **ANA** (Arabinonukleinsäure) gehandelt, bei der Arabinose als Zuckereinheit verwendet wird.^[156] Diese weist eine sehr ähnliche Tertiärstruktur zu RNA und DNA auf und ist weniger labil gegenüber Hydrolyse als RNA.^[157-158] Allerdings werden verschiedene Arabinose-Nukleosid und Nukleotid Derivate als Zytostatika eingesetzt, weshalb sich die Frage stellt wie und warum der Übergang von ANA zu RNA abgelaufen sein könnte.^[159-160] Die sogenannten pyranosyl-RNAs (**p-RNA**) basieren nicht auf Furanosen, sondern auf Pyranosen. Diese Variante ist selektiver in Bezug auf Basenpaarung und formt deutlich stabilere Duplexe als die kanonische RNA. Dies ist allerdings nicht unbedingt gewünscht, da eine zu starke Duplexstabilität zu einer Verringerung der Fähigkeit zur Replikation führen kann.^[161-162] Eventuell war dies Teil der Selektionskriterien, weshalb sich die heute bekannten kanonischen RNAs durchsetzten.

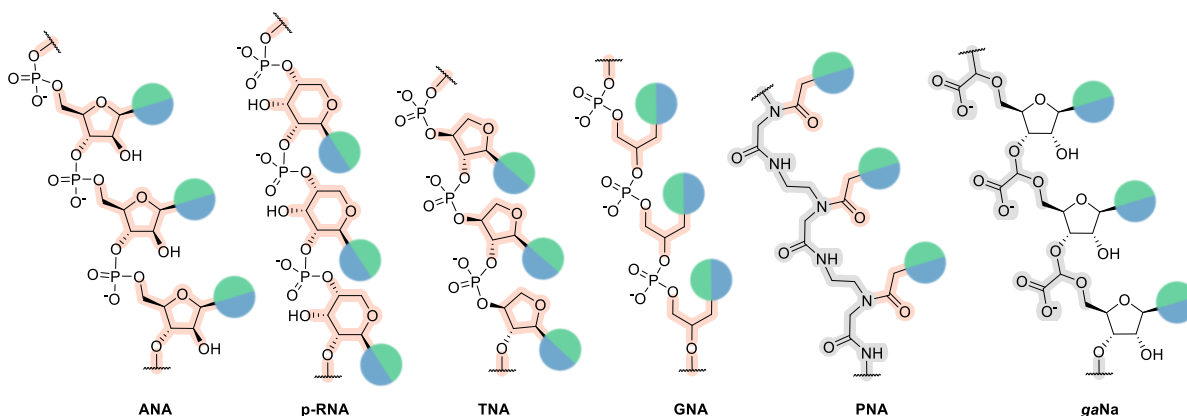


Abbildung 16. Beispiele möglicher Proto-RNAs mit Modifizierungen am Zuckerbaustein (orange Markierung) und/oder der Phosphodiesterbindung (graue Markierung).

Threose-Nukleinsäuren (**TNA**) bestehen aus Threofuranosyl-Einheiten. Dies ist ein C4-Zucker, der als präbiotisch plausibler als Ribose angenommen wird.^[163-165] Diese Variante wurde zuerst nicht als vielversprechender Kandidat gehandelt, da keine sechs kovalenten Bindungen pro Mononukleotideinheit gebildet werden können, wie es bei RNA der Fall ist. Synthese mehrerer **TNAs** und eingehende Untersuchungen bestätigte zunächst diese Vermutung, da für die 3'-2'-verknüpfte β -Variante tatsächlich keine Basenpaarung nachgewiesen werden konnte. Die 3'-2'-verknüpfte α -Variante hingegen zeigt sowohl Watson-Crick-Paarungen mit sich, als auch mit RNA.^[166-167] Diese Kreuzhybridisierung stellt eine elementare Eigenschaft einer Proto-RNA dar,

um einen effektiven Informationstransfer zwischen den unterschiedlichen sich entwickelnden Systemen sicherzustellen.^[163] Bisher wurden nur zyklische Zucker betrachtet, es stellt sich die Frage ob noch einfachere, womöglich prochirale, Nukleotidanaloga über die gleichen Eigenschaften verfügen. Sogenannte Glykol-Nukleinsäuren (**GNA**) wurden bereits früh postuliert und zwischenzeitlich auch synthetisch hergestellt.^[168] Es konnte nicht nur Duplexbildung mit sich selbst beobachtet werden, sondern noch wichtiger die Kreuzhybridisierung mit RNA.^[169-170] Auch azyklische Zucker sind als potentielle Vorläufer möglich, wodurch die zuvor schon sehr vielfältigen Möglichkeiten sich nochmals vermehrt haben.

Die Phosphodiesterbindung vereint die Stabilität gegenüber spontaner Hydrolyse mit der Labilität, um von Enzymen hydrolysiert werden zu können, miteinander. Des Weiteren kommt es aufgrund der negativen Ladung der Phosphate zur Bildung charakteristischer Helices und zur Ausbildung der Watson-Crick-Basenpaarungen.^[171] Als Ersatz für das Phosphat wurde ein Proto-Rückgrat bestehend aus Acetalen vorgeschlagen. Hierfür werden einfache Aldehyde benötigt, die durch die Formose-Reaktion gebildet werden können, welche dann zum Beispiel mit den Alkoholen der Ribose Acetale bilden. Diese Acetal-verknüpften-Nukleinsäuren (**aNa**) sind ebenfalls in der Lage Doppelhelices mit RNA und DNA zu bilden und können abhängig von den jeweiligen Aldehyden ebenfalls negativ geladen sein.^[172-173] Die **gaNa** (Glyoxat-Acetal Nukleinsäuren) sind ein solches Beispiel. Sie können durch Erhitzen von Nukleosiden und Glyoxat, präbiotisch herstellbar aus Glykolaldehyd,^[174] hergestellt werden. Diese zeigen eine erhöhte Stabilität gegenüber Hydrolyse und weisen eine große Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur zu RNA auf.^[175] Ein weitaus abweichenderer Ansatz von den bekannten Strukturen sind die Peptid-Nukleinsäuren (**PNA**). Diese Nukleinsäuren bestehen aus einzelnen *N*-(2-Aminoethyl)Glycin-Einheiten, die sowohl den Zucker als auch das Phosphat in ihrer Funktion ersetzen.^[176-178] Hierbei handelt es sich im Vergleich zu RNA um neutrale Moleküle, wodurch die elektrostatische Abstoßung verringert wird. Watson-Crick-Basenpaarung konnte sowohl mit sich selbst, als auch mit RNA nachgewiesen werden. Alles in allem ist die weitere Entwicklung solcher Systeme notwendig, um mehr Einblick in die mögliche Entwicklung des heutigen Ribose-Phosphat-Systems zu bekommen.

2.7.2 Modifikationen der Nukleobasen

Heute werden vier verschiedene Nukleobasen verwendet (**Abbildung 17A**), aber für einfachere Lebensformen war es vielleicht nicht notwendig, über vier verschiedene Nukleobasen zu verfügen. Vielleicht waren zunächst nur Purin-Purin-Paare vorhanden (**Abbildung 17B**), z. B. Adenin mit Hypoxanthin,^[150] präbiotisch herstellbar durch Desaminierung von Adenin.^[147] Basenpaarung konnte nachgewiesen werden,^[179-181] die gebildeten Duplexe der korrespondierenden Nukleoside Adenosin und Inosin sind jedoch vergleichsweise instabil.^[182] Die ebenfalls aus Purin-Purin-Interaktion bestehenden Paare Guanin - Isoguanin beziehungsweise Diaminopurin - Xantin zeigen ebenfalls Wechselwirkungen und weisen eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu Adenin - Hypoxanthin auf, weshalb sie plausible Alternativen darstellen, um als Vorläufersystem existiert zu haben.^[179-180, 183] Als etwas veränderte Vorläufer (**Abbildung 17C**) wurden Urazol und Guanazol postuliert, die eine hohe Stabilität gegen UV-Strahlung aufweisen und präbiotisch plausibel hergestellt werden können.^[184]

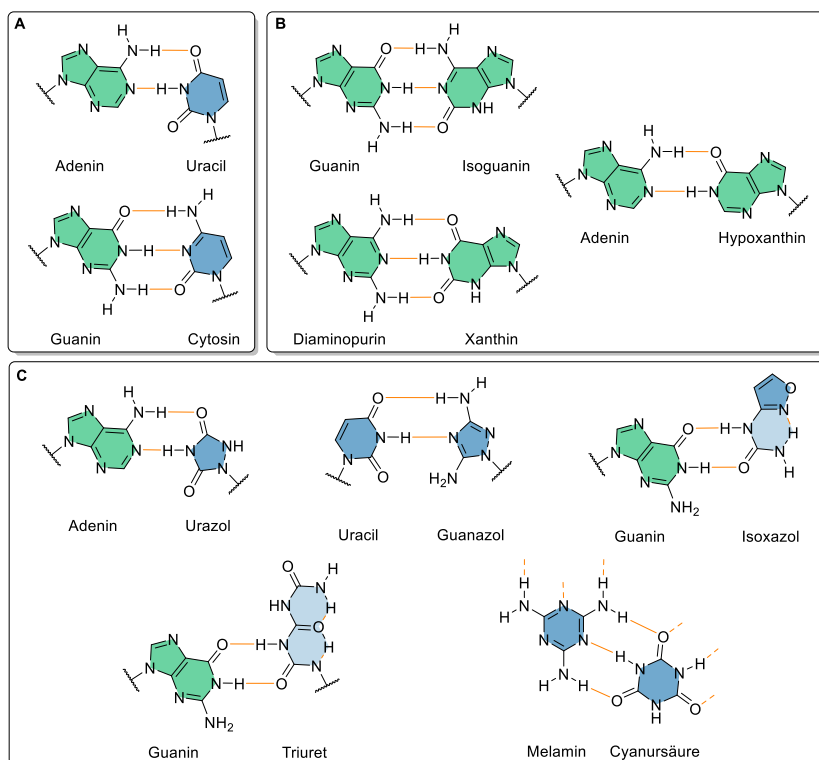


Abbildung 17. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Nukleobasen. **A)** Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den kanonischen RNA Nukleobasen. **B)** Wechselwirkungen zwischen sehr ähnlichen nicht kanonischen Nukleobasen und kanonischen Nukleobasen. **C)** Stärker modifizierte Systeme, die unter anderem mit kanonischen Nukleobasen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen.

Weiter von den kanonischen Nukleobasen entfernt sind Melamin oder 2,4,6-Triaminopyrimidin sowie Barbitursäure oder Cyansäure.^[185-188] Diese zeigen ebenfalls komplementäre Wechselwirkungen und können sich noch dazu zu Polymeren in wässrigen Lösungen anreichern. Als nicht zyklische System für Nukleobasen dienen die Harnstoff-Derivate Biuret und Triuret, da diese durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen eine ähnliche planare Struktur wie die kanonischen Nukleobasen ausbilden. Die Synthese sowohl der Nukleobasen als auch der Nukleoside wird als präbiotisch plausibel erachtet.^[189-190] Das Triuret-Nukleosid verfügt über gute Basenpaarungseigenschaften mit Guanosin und Inosin. Eine weitere interessante Herangehensweise sind die Isoxazol-basierte Nukleoside. Diese fungieren als Vorläuferbasen, die sich innerhalb des gebildeten RNA-Strangs in die kanonische Nukleobase Cytosin umlagern.^[191-192] Des Weiteren wurde eine Basenpaarung mit Guanosin nachgewiesen, die in etwa so stark ist wie die von Uridin zu Guanosin, sodass eine Kreuzhybridisierung möglich ist, bei der mit der Zeit alle Isoxazol-Nukleoside in kanonische Nukleoside umgewandelt werden könnten.^[192]

2.8 tRNA

Bei der Biosynthese wird die genetische Information der DNA in messenger-RNA (mRNA) transkribiert. Anschließend wird bei der Translation die Basenfolge der mRNA mittels eines Ribosoms in eine Aminosäuresequenz übersetzt, welche nach korrekter Faltung ein funktionsfähiges Protein darstellt. In diesem Prozess ist die sogenannte Transfer-RNA (tRNA) von großer Bedeutung.^[193] Diese stellt den Träger dar, der die Aminosäuren zum Ribosom transportiert. Dort kommt es zur Interaktion zwischen dem Anticodon der tRNA mit dem Codon der mRNA durch Wechselwirkungen zwischen den Nukleotiden. Dies ist relevant für den spezifischen Einbau der vorgegebenen Aminosäure in die Peptidsequenz.^[194-196] Kanonische tRNAs bestehen aus circa 76 bis 90 teilweise modifizierten Nukleotiden.^[197] Durchschnittlich sind ca. 15 % der Nukleotide einer tRNA nicht kanonisch, das sind ungefähr 8 Modifikationen pro tRNA.^[198-200] Diese Veränderungen haben unterschiedliche Einflüsse, unter anderem im Bereich der Stabilität und Faltung der tRNA, sowie der Effektivität der Aminosäurebeladung oder der Fehleranfälligkeit bei der Erkennung des korrekten Codons.^[201-202] Einige dieser modifizierten Nukleotide existieren in allen drei Domänen des Lebens, weshalb sie als molekulare Fossilien von LUCA betrachtet werden.^[203-207] Aus chemischer Sicht handelt es sich eher um einfache Veränderungen, wie die Methylierungen an Nukleobasen oder der 2'-Hydroxygruppe der Ribose (**Abbildung 18A**). Es können aber an der Nukleobase auch Isomerisierungen, Reduktionen, Acetylierungen, Thiolierungen oder die Verknüpfung mit einer Aminosäure auftreten.^[200, 208]

Aufgrund intramolekularer Basenpaarungen erinnert die 2-dimensionale Struktur der tRNA an ein Kleeblatt (**Abbildung 18B**). Die verschiedenen Bereiche der tRNA sind der Akzeptorstamm, der D-Arm, der Anticodon-Arm, die V-Schleife und der T-Arm.^[193] Jeder Arm ist unterteilbar in Stamm und Schleife, wobei der Stamm der kurze doppelsträngige Bereich ist und die Schleife die daran anschließende gebogene Einheit. Der Akzeptorstamm ist relevant für die korrekte Bindung der spezifischen Aminosäure an der 3'-CCA Einheit, sowie für die Erkennung durch die Enzyme.^[209] Die nächste Einheit, der D-Arm ist für die Stabilisierung der tertiären Struktur der tRNA zuständig und wurde nach der oftmals vorkommenden modifizierten Dihydrouridine Base in der Schleife benannt.^[210] Die einzelsträngige Schleife des Anticodon-Stamms enthält den Anticodon, eine drei Basen-Einheit, die für die Wechselwirkung mit der Codon-Einheit der mRNA unerlässlich ist. Die Funktion der variablen Schleife (V-Schleife) ist noch nicht eindeutig identifiziert worden. Die Länge dieser Schleife unterscheidet sich teils extrem, abhängig von der zu beladenden Aminosäure und des Organismus.^[211] Für die erleichterte Interaktion mit dem Ribosom ist der T-Arm zuständig,

auch bekannt als TΨC-Arm aufgrund der vorhandenen modifizierten Basen Thymin, Pseudouridin (Ψ) und Cytidin.^[212-213] Am 3'-Ende der tRNA befindet sich die CCA-Akzeptoreinheit an der die zu übertragende Aminosäure am endständigen Adenosin (A76) kovalent gebunden wird.

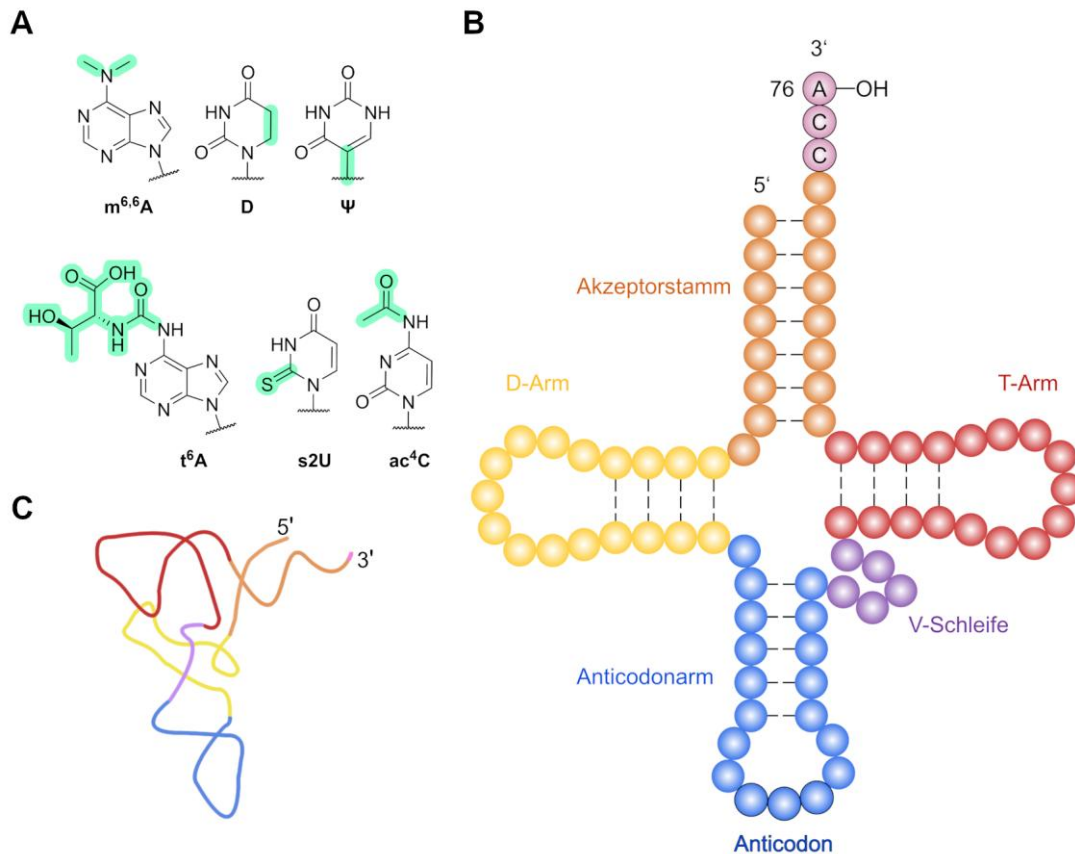


Abbildung 18. **A)** Beispiele für relevante Nukleosid Modifikationen in tRNA. **B)** Schematische Darstellung der 2D-Struktur eines unbeladenen tRNA-Moleküls. **C)** Stark vereinfachte Darstellung der 3D-tRNA-Struktur.

Durch tertiäre Wechselwirkungen zwischen dem T- und D-Arm kommt es zur Ausbildung einer L-ähnlichen 3-dimensionalen Struktur (**Abbildung 18C**).^[214-215] Die beiden besonders relevanten Bereiche in Bezug auf die Proteinbiosynthese, die Akzeptoreinheit und der Anticodon-Arm, befinden sich an den unterschiedlichen Seiten des Ls, sodass es an beiden Stellen ungehindert mit Enzymen oder andere Molekülen zur Interaktion kommen kann.

Eine wichtige Gruppe von Enzymen, die mit dem Akzeptorstamm interagieren, sind die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AaRS). Ihre Aufgabe ist die Verknüpfung einer spezifischen Aminosäure mit der passenden tRNA zu katalysieren (**Abbildung 19**).^[216] Dabei kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Esterbindung zwischen der Riboseeinheit von A76 am Akzeptorstamm und einer Aminosäure. Hierfür wird im aktiven Zentrum der AaRS die

Aminosäure unter Verbrauch von ATP zum sogenannten Aminoacyl-Adenylat aktiviert.^[193] Danach kommt es zum nukleophilen Angriff von A76 entweder durch die 2'- oder 3'-Hydroxygruppe auf die aktivierte Carbonyleinheit der Aminosäure.^[216] Die Klasse I AaRS katalysieren die Veresterung an der 2'-Position, wohingegen die Klasse II AaRS, bis auf wenige Ausnahmen, die Veresterung an der 3'-Hydroxygruppe katalysieren.^[217-218] Jede AaRS ist jeweils spezifisch für einzelne tRNAs beziehungsweise Aminosäuren, sodass es, abhängig von der jeweiligen Aminosäure, zur Bildung von reinen 2'- oder 3'-veresterten tRNAs kommt.^[193, 218] Transacetylierung zwischen der 2'- und 3'-Position ist allerdings anschließend in Lösung zu beobachten, wodurch ein Regioisomerengemisch entsteht.^[219]

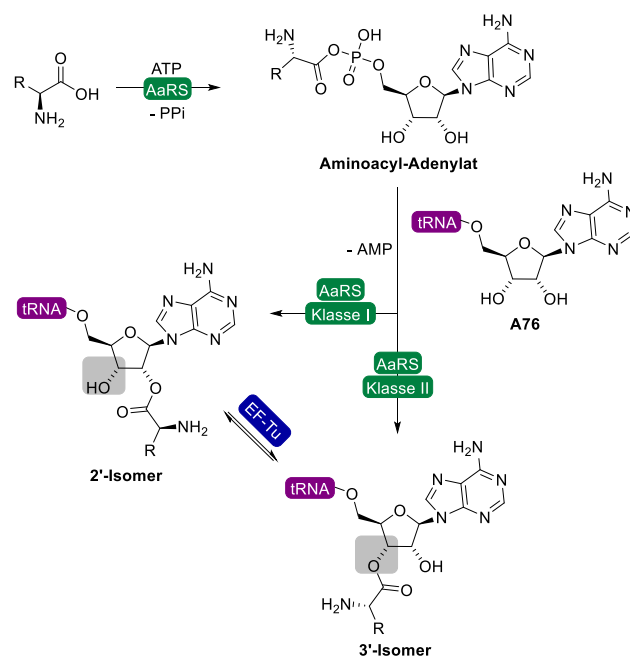


Abbildung 19. Relevante Reaktionen zur Herstellung des veresterten A76 der tRNA als 2'- oder 3'-Isomer katalysiert durch das Enzym AaRS Klasse I oder II.

An der 2'- oder 3'-veresterten tRNA (AA-tRNA) bindet der Elongationsfaktor EF-Tu. Es kommt infolgedessen zur Stabilisierung der 3'-veresterten AA-tRNA und dadurch zu einer Umwandlung des 2'- zum 3'-Isomers.^[220] Die 3'-Variante ist das bevorzugte Isomer für den Einbau der Aminosäure in die Polypeptidkette.^[218] Der Elongationsfaktor EF-Tu transportiert die AA-tRNA zum Ribosom, damit die Translation der mRNA in ein Protein durchgeführt werden kann. EF-Tu schützt außerdem die labile Esterbindung und verhindert die Hydrolyse durch Interaktion mit dem Akzeptorstamm und der Aminosäure.^[221] Aber auch die freie Hydroxygruppe ist relevant für die Biosynthese, da sie bei der Katalyse der Peptidbindung am Ribosom oder bei der Hydrolyse von fehl-acetylierten tRNAs durch diverse Enzyme unterstützt.^[222-225]

Kapitel 3

Zielsetzung

Auf der frühen Erde konnten sich trotz der harschen Bedingungen erste Lebensformen aus unbelebter Materie bilden, aus welchen immer komplexere biologische Systeme entstanden, die sich schließlich bis zu den uns heute bekannten Biomolekülen entwickelten. Bisher konnte kein definitiver Weg identifiziert werden, wie Leben entstanden ist, weshalb die Suche nach präbiotischen Wegen zu Biomolekülen weiterhin ein offenes Forschungsthema ist. Hierbei konnten beispielsweise durch präbiotische Routen zu den kanonischen Nukleosiden oder zum Redox-Kofaktor NAD bereits bedeutende Durchbrüche erzielt werden.^[141, 145-146, 226-227]

Im ersten Teil dieser Arbeit soll deshalb die sogenannte Wöhler RNA, eine mögliche Proto-RNA, intensiver untersucht werden. Die bisherige Synthese bedarf der Verwendung von Ribose,^[190] die als unwahrscheinliches präbiotisches Molekül angesehen wird.^[118, 120, 228-230] Deshalb soll ein Syntheseweg etabliert werden, der die Zuckereinheit *in situ* aufbaut. Außerdem soll die Stabilität der Verbindungen und Selektivität ihrer Bildung unter präbiotischen Bedingungen betrachtet werden, um die Plausibilität des Modells zu erforschen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein tRNA-Nukleosid-Vorläufersystem entwickelt werden, das aus einfachen Aldehyden, sowie den Nukleobasen und Aminosäuren hervorgeht. Dabei soll insbesondere die Verknüpfung der Aminosäure an der Zuckereinheit über ihren C- oder N-Terminus beleuchtet werden. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf der Stereoselektivität beim Aufbau des Zuckerisomers liegen.

Im dritten Teil dieser Arbeit soll die Estermigration in tRNA-Nukleosiden genauer beleuchtet werden. Diese soll an verschiedenen Nukleosiden und Aminosäuren getestet werden, um die in der Natur ablaufenden Prozesse genauer zu betrachten. Außerdem sollen heteroatombasierte Ester auf ihre Wanderungsfähigkeit hin untersucht werden, wodurch die Synthese von einer Bandbreite an der 2'- oder 3'-Position der Zuckereinheit modifizierte Nukleosidomere einfacher zugänglich gemacht werden könnte.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Wöhler-RNA als präbiotisch plausible Proto-RNA?

Wie in Kapitel 2.7.2 erläutert, gibt es eine große Varietät im strukturellen Aufbau möglicher Proto-RNAs. CARELL *et al.* hat einen möglichen Vorläufer, die sogenannte Wöhler-RNA (**B-β5** und **T-β5**) entwickelt, der auf einer nicht zyklischen Harnstoff-basierten Nukleobase (Biuret (**34**) oder Triuret (**35**)) beruht (**Abbildung 20A**).^[190] Es konnte gezeigt werden, dass die präbiotische Synthese durch Reaktion von Ribose mit Biuret oder Triuret im Trockenen unter Zusatz von Borsäure zu den korrespondierenden Nukleosiden (**B-/T-α5** und **B-/T-β5**) führt (**Abbildung 20B**). Bei beiden Synthesen entsteht eine anomere Mischung mit dem α-Isomer als Hauptprodukt. Die Ausbeute für die Biuret-Nukleoside liegt bei 33 % und die Ausbeute für die Triuret-Nukleoside bei 2 %.

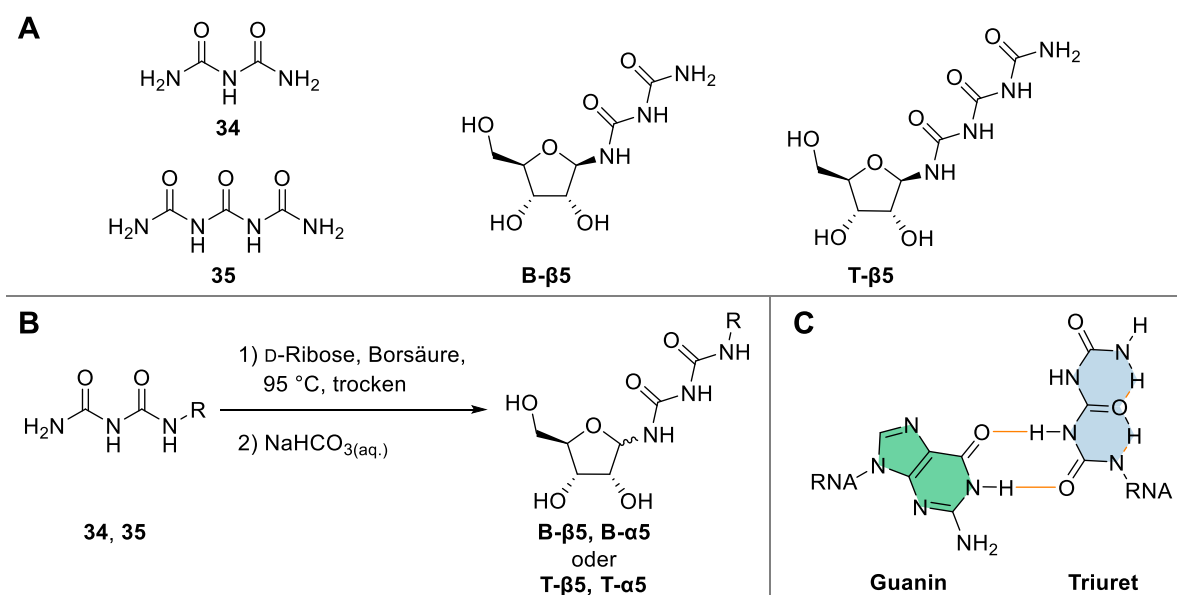


Abbildung 20. **A)** Übersicht über die Nukleobasen und Nukleoside der Wöhler-RNA. **B)** Präbiotische Synthese der Wöhler-RNA-Nukleoside nach CARELL *et al.* R = H (**34**, **Bx-5**), C(O)NH₂ (**35**, **Tx-5**). **C)** Darstellung der Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Guanin und Triuret zweier RNA-Stränge, sowie der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des Triurets.

Des Weiteren konnte mittels NMR-Spektroskopie und thermischer Schmelzkurvenstudien nachgewiesen werden, dass Basenpaarung zwischen dem Triuret-Nukleosid und Guanosin bzw. Inosin existiert (**Abbildung 20C**). Ein Grund dafür könnten die intramolekularen Wechselwirkungen sein, weshalb sich die Nukleobase ähnlich wie zyklische Systeme anordnet. Das Biuret-Nukleosid hingegen ist nicht in der Lage erkennbare Wechselwirkungen mit anderen RNA-Nukleosiden einzugehen. Infolgedessen wird das Triuret-Nukleosid als präbiotisch plausibler Proto-RNA-Kandidat angesehen. Allerdings zeigen die bisherigen präbiotischen Synthesen keine

β -Selektivität und es existieren unidentifizierte Peaks mit übereinstimmender Masse. Die Suche nach einem alternativen Syntheseweg und die Identifizierung aller entstehender Isomere ist von großem Interesse, um die Plausibilität des Systems zu evaluieren.

In dieser Arbeit soll zunächst die präbiotische Synthese mit einer *in-situ* Ribosebildung untersucht werden. Hierfür sollen die benötigten Isomerreferenzstrukturen für die Biuret- und Triuret-Nukleoside hergestellt werden. Anschließend soll die Stabilität der einzelnen Isomere unter präbiotischen Bedingungen genauer untersucht werden.

Die nachfolgenden Ergebnisse wurden zu Teilen in N. J. Kurrle, M. Bechtel, N. Hampel, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2025**, e00046 veröffentlicht.^[231]

4.1.1 Präbiotische Synthese und Referenzsynthesen

Im AK TRAPP wurde eine präbiotische stereoselektive Synthese zu den kanonischen DNA-Nukleosiden entwickelt, bei der die Zuckereinheit aus Acetaldehyd und Glycerinaldehyd (GlyA) *in-situ* an den Nukleobasen aufgebaut wird (**Abbildung 21A**).^[146] Zuerst kommt es zu einer Kondensationsreaktion zwischen der Nukleobase und Acetaldehyd, resultierend in der Bildung eines Imins **36a-c,e**, welches zum korrespondierenden Enamin **32a-c,e** tautomerisiert. Anschließend kommt es zu einem nukleophilen Angriff von **32a-c,e** an GlyA, gefolgt von der kinetisch bevorzugten 5-exo-trig Zyklisierung.

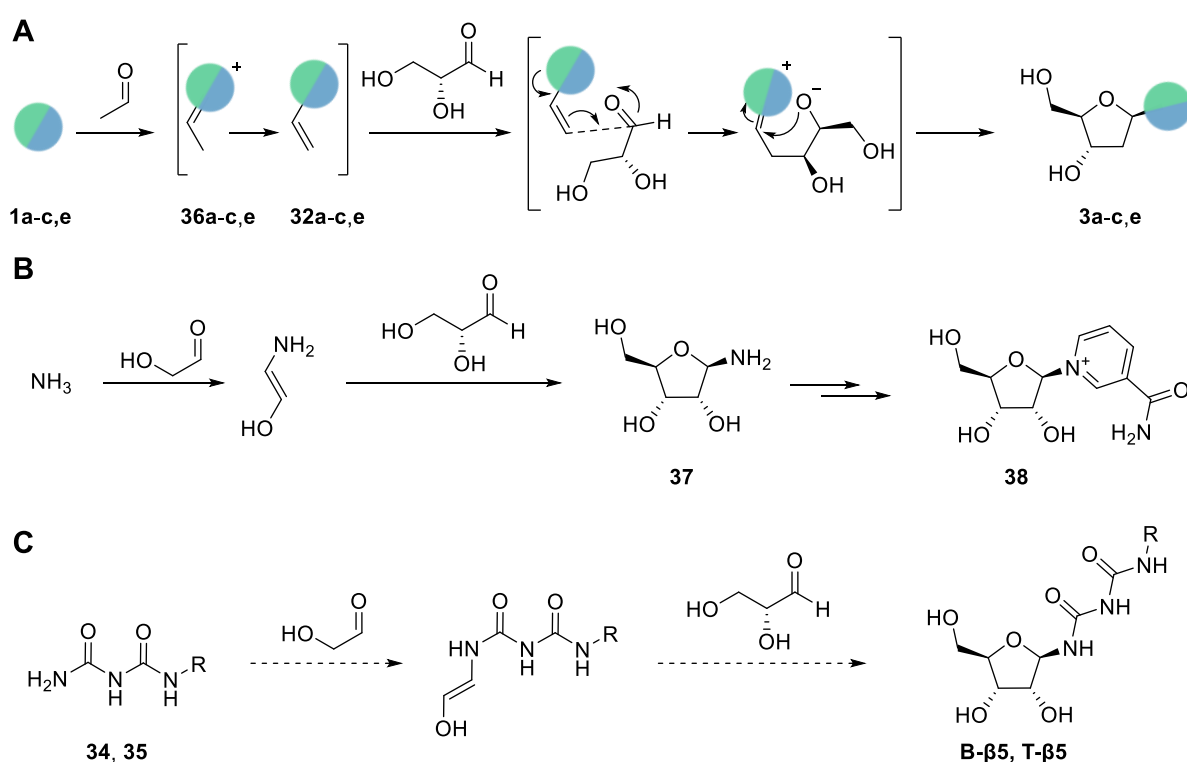


Abbildung 21. **A)** Synthese der kanonischen DNA-Nukleoside nach TRAPP *et al.* mittels *in-situ* Bildung von Desoxyribose aus einfachen präbiotischen Aldehyden in Wasser bei 50 °C.^[146] **B)** Synthese des Nikotinamid-Ribosids (**38**) durch Aufbau der Ribose über GA und GlyA zu Ribosylamin (**37**) in Wasser bei 60 °C. **C)** Antizipierte präbiotische Synthese zu den Wöhler-RNA-Nukleosiden (**Bβ-5**, **Tβ-5**) durch *in-situ* Aufbau der Ribose an **34** oder **35** aus einfachen Aldehyden (GA und GlyA) analog zur Ribosylaminsynthese (**B**). R = H (**34**, **Bx-5**), C(O)NH₂ (**35**, **Tx-5**).

Angelehnt an diese Route wurde eine Synthese zu Ribosylamin (**37**) entwickelt. (**Abbildung 21B**).^[226] Hierbei wurde Acetaldehyd durch Glykolaldehyd (GA) ersetzt, um Ribose anstelle von Desoxyribose zu erhalten. Außerdem wurde anstelle der Nukleobase Ammoniak eingesetzt. Bei der Reaktion zu Ribosylamin kann im Vergleich zur DNA-Synthese die Entstehung von zwei Peaks beobachtet werden, wobei das Hauptprodukt das β-Furanosid darstellt. **37** kann wiederum zu

Ergebnisse und Diskussion

Nicotinamid-Ribosid (**38**) reagieren und stellt damit einen wichtigen Baustein für die präbiotische Synthese des Kofaktors NAD^+ dar.^[226] Angelehnt an diese Synthesen wurde eine präbiotische Entstehung der Wöhler-RNA-Nukleoside (**B β -5**, **T β -5**) mittels Reaktion von Biuret oder Triuret in H_2O mit GA und GlyA antizipiert (**Abbildung 21C**).

Erste Präbiotische Versuche

Zur Validierung wurden die Nukleobase, **34** oder **35**, und die Aldehyde, GA und GlyA, in Wasser gelöst, für vier Tage bei 80 °C gerührt und anschließend mittels UHPLC-QTOF-MS analysiert. Hierbei konnten große Unterschiede zwischen der Reaktion mit Biuret oder Triuret entdeckt werden (**Abbildung 22**). Bei der Biuret-Nukleosid-Synthese konnten nach Massenextraktion mehrere mögliche Produktpeaks im Chromatogramm identifiziert werden, wohingegen bei der Triuret-Nukleosid-Synthese keinerlei Produktformation zu beobachten war. Die Biuret-Nukleosid-Synthese scheint ähnlich wie die von CARELL *et al.* entwickelte Synthese zu verlaufen, da hier ebenfalls mehrere Isomerpeaks beobachtet werden konnten.^[190]

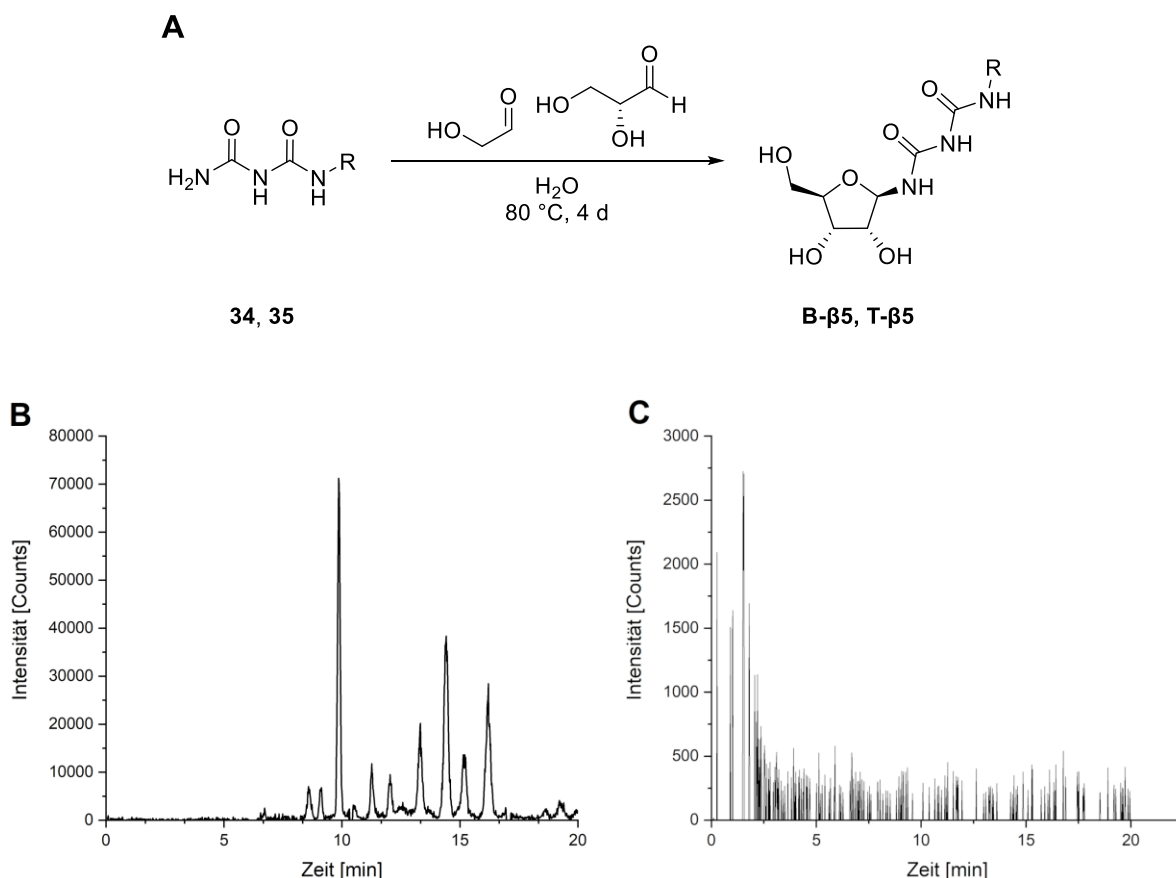


Abbildung 22. **A)** Reaktionsgleichung der angesetzten präbiotischen Reaktionen zu **B-β5** und **T-β5**. **B)** Chromatogramm der erfolgreichen präbiotischen Reaktion von Biuret mit Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd 0,1 M in hochreinem Wasser nach vier Tagen bei 80 °C (Massenfilter $m/z = 258,0645 - 258,0749$). **C)** Chromatogramm der nicht erfolgreichen präbiotischen Reaktion von Triuret mit den beiden Aldehyden GA und GlyA 0,1 M in hochreinem Wasser nach vier Tagen bei 80 °C (Massenfilter $m/z = 301,0695 - 301,0815$). Die Analyse erfolgte jeweils mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode A).

Ergebnisse und Diskussion

Als mögliche Erklärung für die Entstehung mehrerer Isomere im Vergleich zur DNA-Synthese ist der Unterschied des strukturellen Aufbaus der Nukleobasen zu nennen. Bei den Harnstoff-basierten Nukleosiden handelt es sich am anomeren Zentrum um ein sekundäres Amin und nicht wie bei den kanonischen Nukleosiden um ein tertiäres Amin (**Abbildung 23**).

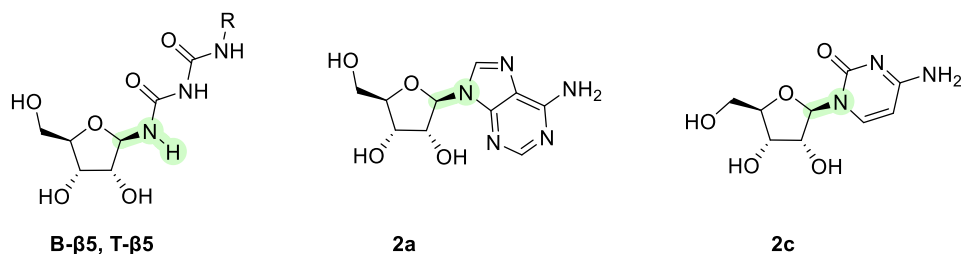


Abbildung 23. Vergleich der Amine am anomeren Zentrum in der Wöhler-RNA und den kanonischen RNA-Nukleosiden.

Aufgrund des sekundärenamins könnte das Molekül besonders anfällig für eine Ringöffnung sein, wodurch eine offenkettige Form entstehen würde. Bei einem erneuten Ringschluss läge keine stereoselektive Kontrolle mehr vor, weshalb es zur Isomerisierung kommen könnte (**Abbildung 24**).

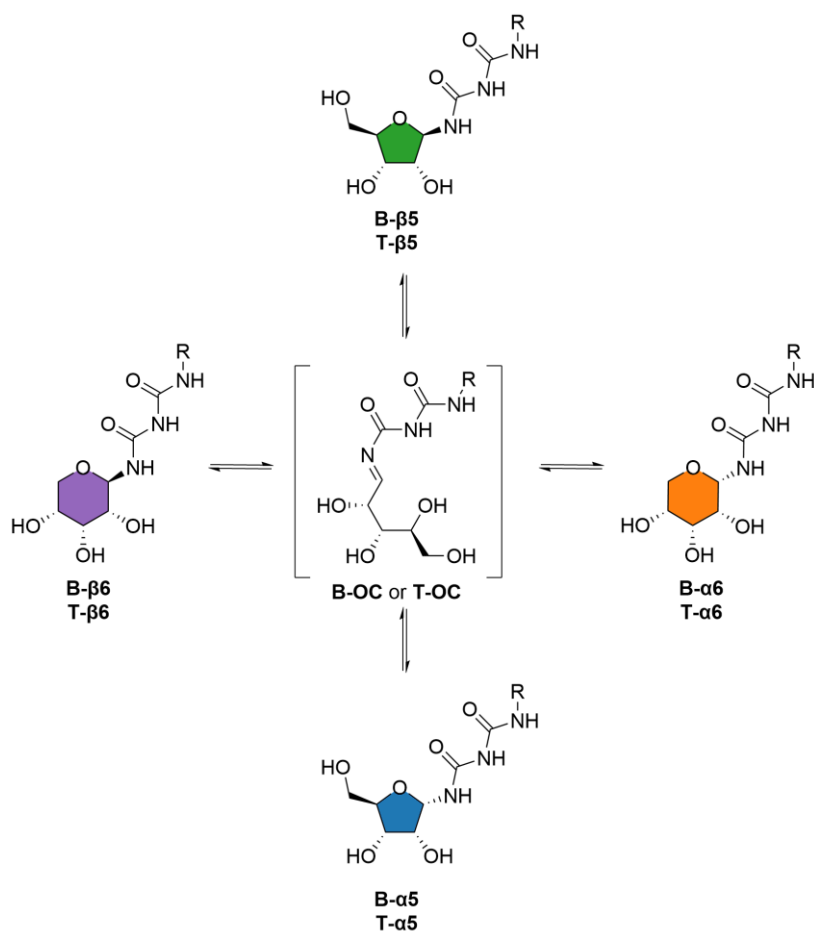


Abbildung 24. Vorschlag zur Umwandlung der Biuret- (**B**-) und Triuret- (**T**-) Furanoside ($-\alpha\text{5}$, $-\beta\text{5}$) und Pyranoside ($-\alpha\text{6}$, $-\beta\text{6}$) über die offenkettige Form ($-\text{OC}$). $\text{R} = \text{H}$ (**B**), $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ (**T**).

Deshalb könnte es trotz stereoselektiver Bildung des β -Furanosids (**B- β5**) anschließend zu einer Umwandlung in andere Isomere kommen. Zucker liegen zumeist in einer Ringform vor, hierbei sind die Furanoside und Pyranoside bevorzugt. Die Furanoside sind für gewöhnlich die kinetischen Produkte und die Pyranoside die thermodynamischen Produkte. Demzufolge, sollte bei den hier betrachteten Nukleosiden die Isomerisierung höchstwahrscheinlich vor allem zum α -Furanosid (**B- α5**) sowie den α - und β -Pyranosiden (**B- α6** , **B- β6**) erfolgen.

Referenzsynthese

Um fundierte Aussagen treffen zu können, muss mittels Koinjektion von Referenzsubstanzen aufgeklärt werden, welche Isomere tatsächlich in der Reaktionsmischung vorliegen. Die Synthese der Referenzen (**Abbildung 25**) erfolgte bis zu den Furanosiden nach einer von CARELL *et al.* entwickelten Route.^[190]

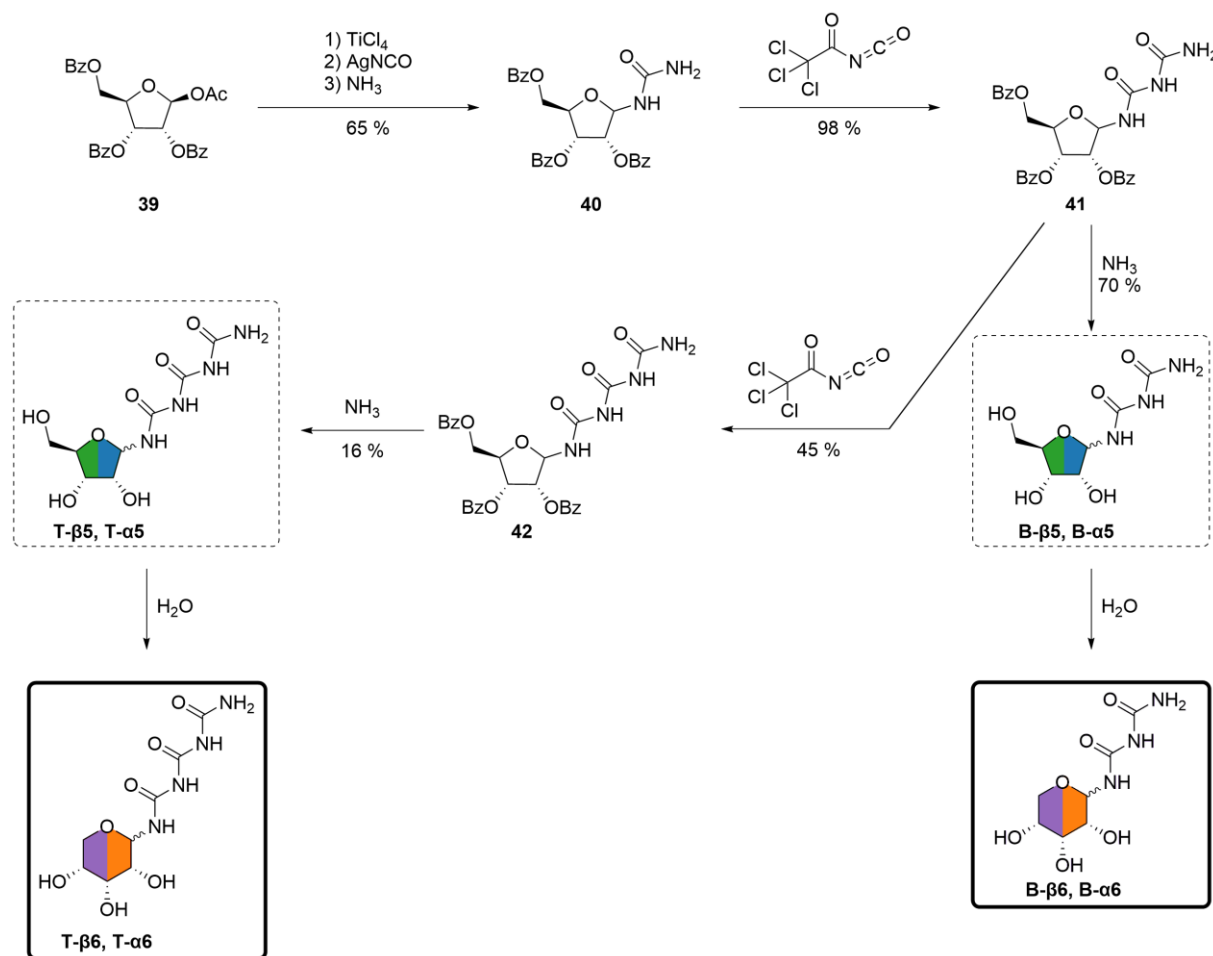


Abbildung 25. Referenzsynthese der Biuret- und Triuret-Furanoside (**B-/T- α 5**, **B-/T- β 5**) mit anschließender Isomerisierung zu den Pyranosiden (**B-/T- α 6**, **B-/T- β 6**).

Ausgehend von **39** konnte benzoylgeschütztes Harnstoff-Ribosid **40** in guter Ausbeute über drei Schritte synthetisiert werden. Reaktion mit Trichloroacetylisocyanat führte zur Bildung von benzoylgeschütztem Biuret-Ribosid **41** in hervorragender Ausbeute. Anschließende Entschützung mit Ammoniak ergab eine diastereomere Mischung der Furanoside **B- α 5** zu **B- β 5** von 6:1, welche mittels Präp. HPLC (Methode J) voneinander getrennt werden konnten. Nachdem als Hauptprodukt **B- α 5** gebildet wurde, wurde dieses eingesetzt, um die Isomerisierung in Wasser

durchzuführen und zu den antizipierten Pyranosiden zu gelangen. Die vier entstehenden Isomere konnten durch Präp. HPLC (Methode J) voneinander getrennt werden. Mittels NMR-Spektroskopie konnten diese als α - und β -Biuret-Furanosid (**B- α 5**, **B- β 5**), sowie α - und β -Biuret-Pyranosid (**B- α 6**, **B- β 6**) identifiziert werden (**Abbildung 26**).

Um die Triuret-Derivate zu synthetisieren, wurde benzoylgeschütztes Biuret-Ribosid **41** mit Trichloroacetylisocyanat versetzt, wodurch benzoylgeschütztes Triuret-Ribosid **42** gebildet werden konnte. Analog zur Biuretvariante erfolgte die Entschützung mit Ammoniak und die anschließende Trennung der Anomere mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie führte zur Isolierung von **T- α 5** und **T- β 5**. Auch hier wurde das α -Furanosid als Hauptprodukt gebildet, mit einem dr von 7:1, weshalb **T- α 5** als Edukt für die Synthese der Triuret-Pyranoside genutzt wurde. Nach 18 h bei 60 °C in hochreinem Wasser konnten durch Präp. HPLC (Methode K) alle vier Isomere isoliert werden. Wie zuvor konnten die Anomere der Furanoside und Pyranoside durch NMR-Spektroskopie (NOESY/Kopplungskonstanten) voneinander unterschieden werden (**Abbildung 26**).

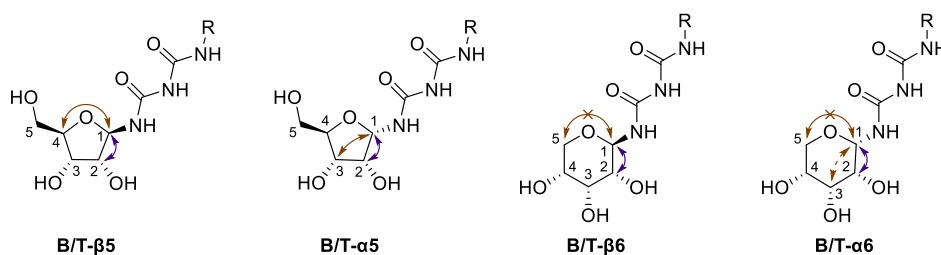


Abbildung 26. Mögliche NOESY-Kopplungen beziehungsweise Kopplungskonstanten 3J die für die eindeutige Zuordnung der Furanosid- und Pyranosid-Anomere relevant sind. Braune Pfeile = NOESY-Kopplungen. Blaue Pfeile = Kopplungskonstante 3J .

Die Furanosid-Isomere konnten durch NOESY-Kopplungen (braune Pfeile) eindeutig zugeordnet werden. Bei **B/T- β 5** ist die Kopplung zwischen H^1 und H^4 charakteristisch, bei **B/T- α 5** konnte auf die eindeutige Kopplung zwischen H^1 und H^3 zurückgegriffen werden. Auch über die Kopplungskonstanten 3J zwischen H^1 und H^2 (blaue Pfeile) kann aufgrund der Karplusbeziehung zwischen dem β - (größere Kopplungskonstante) und α -Isomer (kleinere Kopplungskonstante) unterschieden werden. Bei den Pyranosiden konnte die Unterscheidung nicht anhand des NOESY-Spektrums durchgeführt werden, da die Kopplung über den Sauerstoff zu einer CH_2 -Gruppe keine Aussage zulässt (brauner durchgestrichener Pfeil). Außerdem konnte sowohl bei den Biuret- als auch bei den Triuret-Pyranosiden keine Kopplung zwischen H^1 und H^3 beobachtet werden, die die Zuordnung als α -Isomer (**B/T- α 6**) zugelassen hätte. Als Unterscheidung zwischen den beiden

Ergebnisse und Diskussion

Isomeren wurden erneut die Karplusbeziehung und somit die Kopplungskonstanten 3J des anomeren Protons H^1 zu H^2 genutzt (blaue Pfeile).

Ausführliche Präbiotische Untersuchungen

Mit den Furanosid- und Pyranosid-Referenzen vorliegend, konnte nun die präbiotische Biuret-Nukleosid-Reaktion koinjiziert werden (**Abbildung 27**). Es konnte bewiesen werden, dass sich die α - und β -Biuret-Furanoside (**B- α 5**, **B- β 5**) sowie die α - und β -Biuret-Pyranoside (**B- α 6**, **B- β 6**) bilden. Bei den nicht durch Koinjektion erklärbaren Peaks könnte es sich um Kondensationsprodukte der beiden Aldehyde, Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd, an unterschiedlichen Stellen des Biurets handeln.

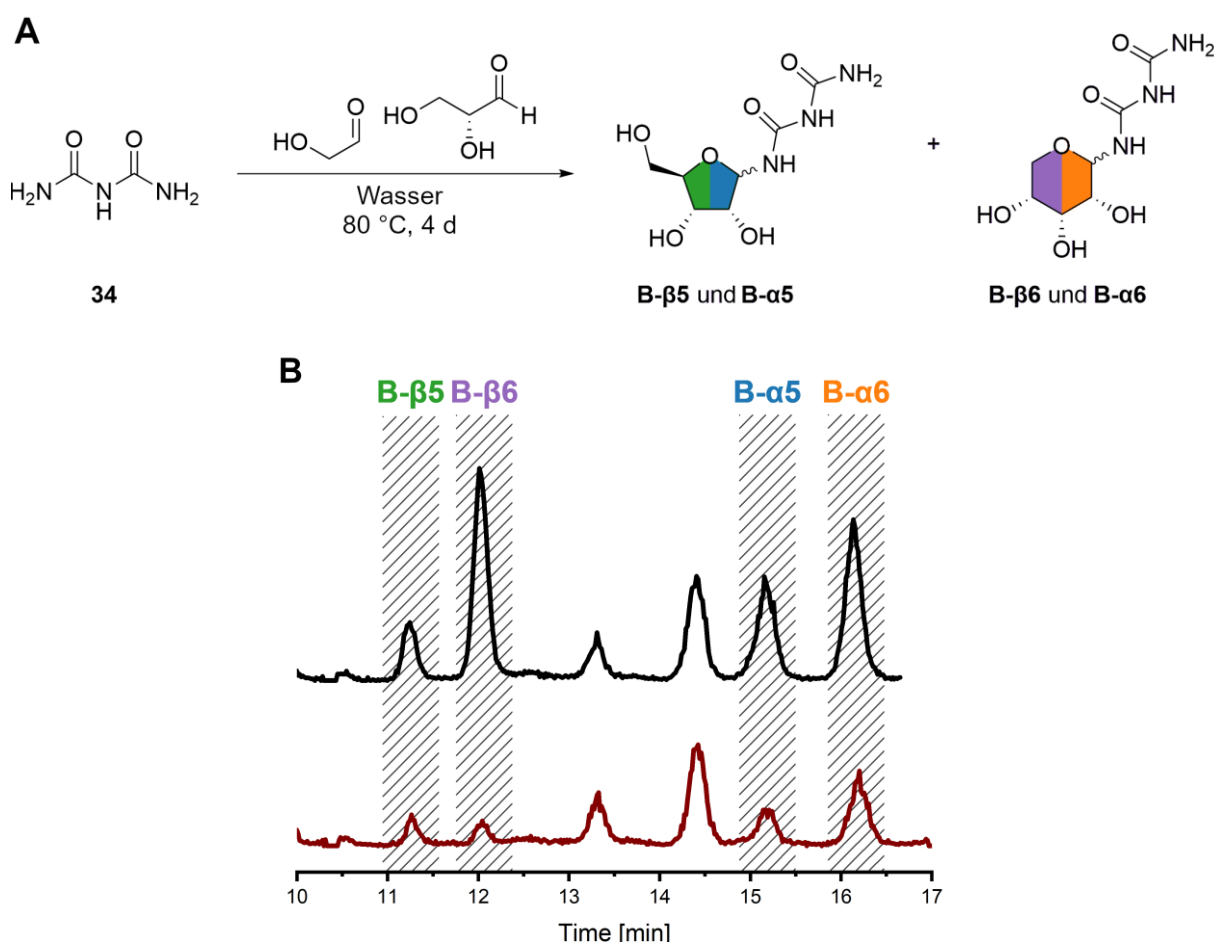


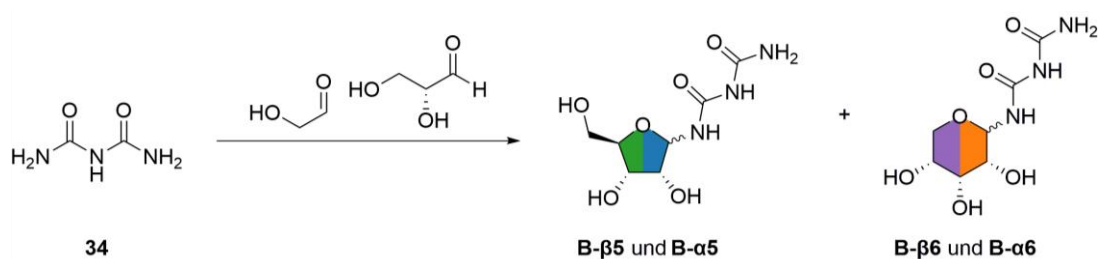
Abbildung 27. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion (**Tabelle 1** Eintrag 1) zu den Biuret-Nukleosiden. **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion (braun, unten) koinjiziert mit allen vier antizipierten Isomeren (**B- α 5**, **B- β 5**, **B- α 6** und **B- β 6**) (schwarz, oben). Analysiert mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode A) (Massenfilter m/z = 258,0645 – 258,0749).

Um die Robustheit der Reaktion zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter der Synthese variiert (**Tabelle 1**). Die Ausgangsreaktion (Eintrag 1), deren Chromatogramm in **Abbildung 27** zu sehen ist, wurde für vier Tage 0,1 M in hochreinem Wasser bei 80 °C gerührt. Die erste Produktbildung konnte bereits nach einem Tag detektiert werden. Alle Edukte wurden zu Beginn

Ergebnisse und Diskussion

im Verhältnis von 1:1 eingesetzt und anschließende Variation der Äquivalente der Aldehyde zeigte keinen großen Einfluss auf die Produktformation (Eintrag 2 - 4). Die Wahl des Lösungsmittels spielt hingegen eine größere Rolle (Eintrag 5 - 10). Die Reaktion läuft fast ausschließlich in Wasser ab. In Spuren konnte Produktbildung bei der Verwendung von Phosphatpuffern (pH 7, 8 oder 9) beobachtet werden, aber in einem MeOH/H₂O Gemisch oder in DMF bzw. ACN konnte nichts detektiert werden. Dies unterstreicht die präbiotische Plausibilität der Reaktion, da auf der Frühen Erde weite Teile der Oberfläche von Wasser bedeckt waren.

Tabelle 1. Übersicht der getesteten Bedingungen der präbiotischen Synthese zu den Biuret-Nukleosiden.



#	Lösungsmittel	c [M]	Temp [°C]	Zeit [d]	Anmerkung	Produktbildung
Ausgangsreaktion						
1	H ₂ O	0,1	80	1;4	1:1:1	Ja; Ja
Äquivalente Biuret:GA:GlyA						
2	H ₂ O	0,1	80	1;4	1:1,5:1,5	Ja; Ja
3	H ₂ O	0,1	80	1;4	1:1,5:3	Ja; Ja
4	H ₂ O	0,1	80	1;4	1:3:3	Ja; Ja
Lösungsmittel						
5	99:1 MeOH:H ₂ O	0,1	80	1;4	-	Nein; Nein
6	ACN	0,1	80	1;4	-	Nein; Nein
7	DMF	0,1	80	1;4	-	Nein; Nein
8	Pp	0,1	80	1;4	pH 7	Spuren; Spuren
9	Pp	0,1	80	1;4	pH 8	Spuren; Spuren

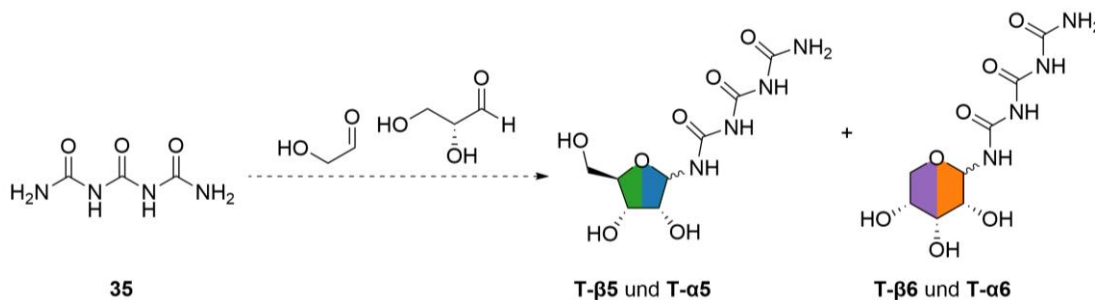
#	Lösungsmittel	c [M]	Temp [°C]	Zeit [d]	Anmerkung	Produktbildung
10	Pp	0,1	80	1;4	pH 9	Spuren; Spuren
Konzentration						
11	-	-	80	1;4	trocken	Nein; Nein
12	H ₂ O	-	80	1;4	Paste (10 µL)	Spuren; Nein
13	H ₂ O	0,05	80	1;4	-	Ja; Ja
14	H ₂ O	0,2	80	1;4	-	Ja; Ja
15	H ₂ O	0,4	80	1;4	-	Ja; Ja
Temperatur						
16	H ₂ O	0,1	60	1;4;9	-	Nein; Ja; Ja
17	H ₂ O	0,1	70	1;4;9	-	Spuren; Ja; Ja
18	H ₂ O	0,1	80	1;4;9	-	Ja; Ja; Ja
19	H ₂ O	0,1	95	1;4;9	-	Ja; Ja; Nein
pH-Wert						
20	H ₂ O	0,1	80	1;4	pH 3	Ja; Ja
21	H ₂ O	0,1	80	1;4	pH 5	Ja; Ja
22	H ₂ O	0,1	80	1;4	pH 7	Ja; Ja
23	H ₂ O	0,1	80	1;4	pH 9	Ja; Ja
24	H ₂ O	0,1	80	1;4	pH 12	Spuren; Spuren
Additive						
25	H ₂ O	0,1	80	1;4	Borax	Nein; Nein
26	H ₂ O	0,1	80	1	Borsäure	Nein
27	H ₂ O	0,1	80	4	MgCl ₂	Ja

Pp = Phosphatpuffer.

Ergebnisse und Diskussion

Veränderung der Konzentration (Eintrag 11 - 15) zeigt eine breite Bande an tolerierten Werten von 0,05 bis 0,4 M. Auch hier zeigt sich wie zuvor, dass die Anwesenheit von Wasser relevant ist für die Produktbildung. Bei Reaktionen im Trockenen oder bei Pastenreaktionen mit sehr wenig Lösungsmittel ist quasi keine Produktformation zu detektieren. Der Einfluss der Temperatur (Eintrag 16 - 19) zeigt, dass bei vermeintlich niedrigeren Temperaturen (60 °C bzw. 70 °C) die Detektion der Produkte erst nach vier Tagen möglich ist, mit steigender Produktzunahme bis zu Tag neun bei 60 °C. Dem gegenüber steht das Verhalten bei höheren Temperaturen (95 °C), da hier bereits nach einem Tag Produktformation nachgewiesen werden konnte, aber nach neun Tagen eine vollständige Zersetzung ermittelt wurde. Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf die Reaktion ist in Form des pH-Wertes möglich. Es zeigt sich eine enorme Toleranz mit einem pH-Wert-Bereich von pH 3 bis pH 9 in dem die Synthese erfolgreich verläuft, einzig pH 12 zeigt nur Spurenbildung der Produkte (Eintrag 20 - 24). Dies ist nicht verwunderlich, da Monosaccharide unter alkalischen Bedingungen oftmals eine starke Tendenz zur Isomerisierung und/oder Zersetzung zeigen.^[232-235] Abschließend wurden verschiedene Additive getestet, Borsäure, Borax und MgCl_2 . Borate sind dafür bekannt, dass sie Ribofuranoside stabilisieren können,^[124] allerdings konnte bei Zugabe von Boraten zur Reaktion beide Male keine Produktbildung detektiert werden. Um die Wechselwirkungen des Biurets zu minimieren und somit bestenfalls die Anzahl nicht identifizierter Peaks zu reduzieren, wurde MgCl_2 als Additiv zugegeben. Es konnte keine merkliche Veränderung im Vergleich zur Ausgangsreaktion beobachtet werden.

Nach diesen gewonnenen Erkenntnissen wurde die Triuret-Nukleosid-Synthese genauer untersucht (**Tabelle 2**). Variation der Äquivalente, eine Erhöhung der Temperatur oder das Einstellen des pH-Werts brachten keinen Erfolg (Eintrag 1 - 5). Bei genauerer Betrachtung der angesetzten Reaktionen wurde beobachtet, dass diese durchgehend als Suspension vorliegen. Im Vergleich dazu liegt bei der Biuret-Nukleosid-Synthese nach wenigen Minuten eine Lösung vor. Deshalb wurde die Löslichkeit von Triuret untersucht und es zeigte sich, dass sich Triuret trotz Erhitzens tatsächlich erst bei einer vierfachen Verdünnung (0,025 M) im Vergleich zur Biuret-Synthese löst. Infolgedessen wurden verschiedene 0,025 M Reaktionen angesetzt und nach drei Tagen analysiert (Eintrag 6 - 9).

Tabelle 2. Übersicht der getesteten Bedingungen für die präbiotische Synthese der Triuret-Nukleoside.

Eintrag	c [M]	Temp. [°C]	Äq.	Zeit [d]	Anmerkung	Produktbildung
1	0.1	80	1:1:1	1;4		Nein; Nein
2	0.1	80	1:1:1	1;4	pH = 8	Nein; Nein
3	0.1	80	1:1,5:1,5	1;4		Nein; Nein
4	0.1	100	1:3:3	1;4		Nein; Nein
5	0.1	80	1:3:3	1;4		Nein; Nein
6	0.025	80	1:4:4	3		Ja
7	0.025	70	1:4:4	3		Ja
8	0.025	60	1:4:4	3		Ja
9	0.025	60	1:4:4	3	pH = 9	Nein

Die Reaktionen bei 60 °C, 70 °C und 80 °C ohne eingestellten pH-Wert führten zur Produktbildung, wohingegen bei Einstellung des pH-Werts auf pH 9 die Reaktion nicht erfolgreich verläuft. Die erfolgreichen Synthesen zeigen nach Analyse mittels UHPLC-QTOF-MS alle sehr ähnliche Chromatogramme. Beispielhaft ist in **Abbildung 28** die Reaktion von Eintrag 6 inklusive Koinjektion der Pyranoside (**A**) sowie ein Chromatogramm mit allen vier möglichen Isomeren gezeigt (**B**). Die Reaktion bildet ausschließlich die Pyranoside als Produkte und die angepasste Reaktionsgleichung ist in **Abbildung 27C** zu sehen. Wie zuvor bei der Biuret-Synthese entstehen auch hier Peaks, die wahrscheinlich das Kondensationsprodukt der Aldehyde an verschiedenen Stellen der Nukleobase sind.

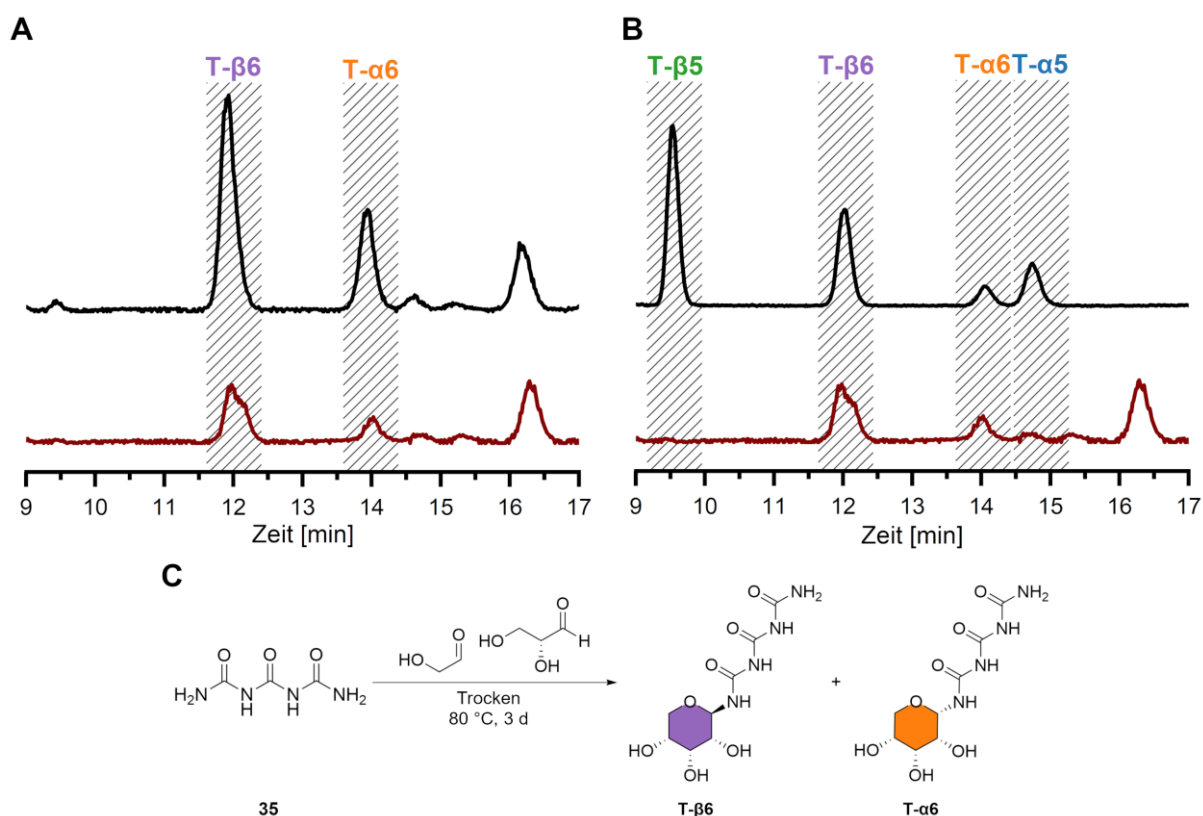


Abbildung 28. A) Chromatogramm der präbiotischen Reaktion zu den Triuret-Nukleosiden (braun, unten) koinjiziert mit den beiden Pyranosiden (**T-α6** und **T-β6**) (schwarz, oben) analysiert mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode A) (Massenfilter $m/z = 301,0695 - 301,0815$). **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion zu den Triuret-Nukleosiden (braun, unten) und Chromatogramm einer Mischung aller vier Isomere (**T-α5**, **T-β5**, **T-α6** und **T-β6**) (schwarz, oben) analysiert mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode A) (Massenfilter $m/z = 301,0695 - 301,0815$). **C)** Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion nach Auswertung der entstehenden Produkte.

4.1.2 Untersuchung der Isomerisierung

Die präbiotische Synthese der Wöhler-RNA-Nukleoside zeigte die Entstehung der Furanoside und Pyranoside für die Biuret-Variante und die ausschließliche Bildung der Triuret-Pyranoside. Nachdem die Reaktion mechanistisch stereoselektiv zum β -Furanosid ablaufen sollte, ist die Vermutung, dass es im Anschluss zu einer Isomerisierung zu den übrigen Isomeren kommt (**Abbildung 29**). Eine Ringöffnung könnte zur Bildung einer offenkettigen Struktur führen, bei der die anschließende Ringschlussreaktion alle vier Isomere bilden kann. Dadurch kann es zur vermehrten Bildung der thermodynamisch stabileren Produkte kommen. Um dies zu bestätigen, wurden verschiedene Untersuchungen in Bezug auf die Umwandlung der Biuret- und Triuret-Nukleoside durchgeführt.

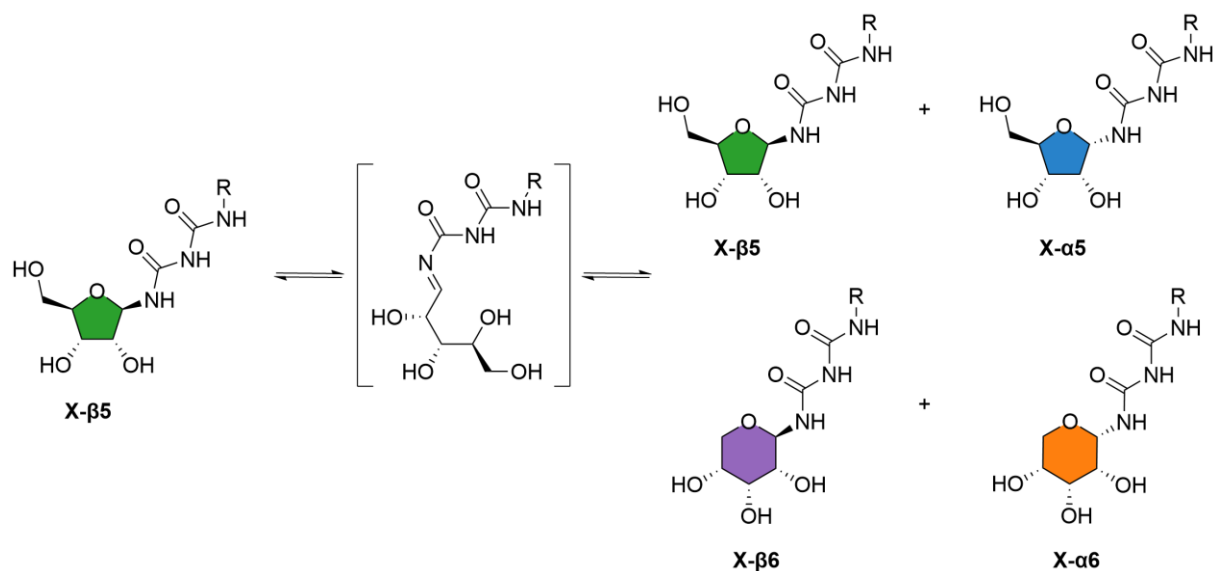


Abbildung 29. Darstellung der angenommenen Ringöffnung nach selektiver Bildung des β -Furanosids gefolgt von einer erneuten Ringschließung, die als Produkt alle vier Isomere bilden kann. X = **T** oder **B**.

Biuret

Die Isomerisierung der Biuret-Furanoside wurde bei verschiedenen Bedingungen genauer untersucht (**Abbildung 30A**). Hierzu wurde entweder das α - oder das β -Isomer in ultrareinem Wasser, das zuvor auf einen gewünschten pH-Wert eingestellt wurde, gelöst und bei einer bestimmten Temperatur für 24 Stunden erhitzt. Die Analyse der Isomerisierung erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS nach zwei, fünf und 24 Stunden. Beispielchromatogramme der durchgeführten Messungen mit der gewünschten Auftrennung aller vier Isomere sind in **Abbildung 30B-D** zu sehen.

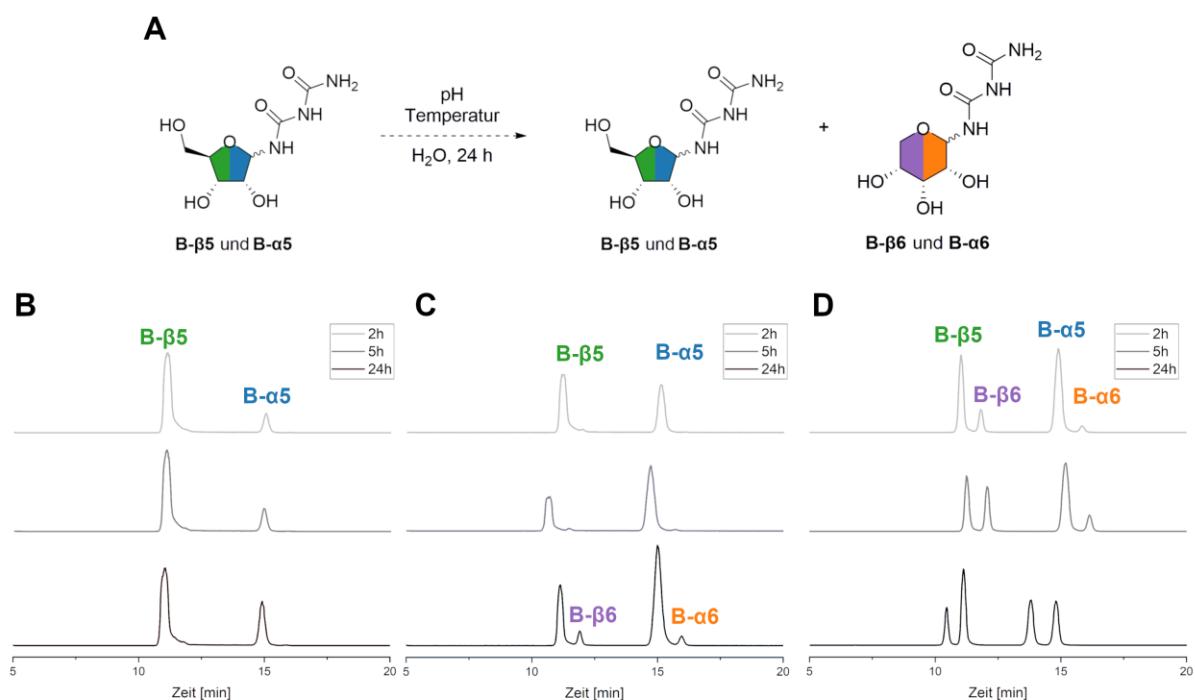


Abbildung 30. **A)** Entworfenes Experiment um die Umwandlung der einzelnen Furanoside zu beobachten und Aufschluss über den Einfluss von Bedingungen zu bekommen. **B)** Chromatogramm der Umwandlung von **B-β5** bei 20 °C und pH 7 nach 2 h (oben, hellgrau), 5 h (Mitte, grau) und 24 h (unten, schwarz). **C)** Chromatogramm der Umwandlung von **B-β5** bei 50 °C und pH 7 nach 2 h (oben, hellgrau), 5 h (Mitte, grau) und 24 h (unten, schwarz). **D)** Chromatogramm der Umwandlung von **B-β5** bei 80 °C und pH 5 nach 2 h (oben, hellgrau), 5 h (Mitte, grau) und 24 h (unten, schwarz). Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode C) (Massenfilter $m/z = 258,0645 - 258,0749$).

Die Verteilung der einzelnen Isomere wurde bestimmt und ist in **Abbildung 31** dargestellt. Bei genauerer Betrachtung der Messergebnisse bei 20 °C (**A**) fällt auf, dass es zu keinem Zeitpunkt zur Bildung der Pyranoside kommt und sich nur eine Anomerisierung zwischen **B-β5** und **B-α5** abspielt. Das α -Furanosid ist das stabilere Furanosid, insbesondere mit steigendem pH-Wert. Nach 24 Stunden bei pH 5 und pH 7 entsteht nur zu 7 % **B-β5**, bei pH 9 nur zu 1 %. Das β -Furanosid

hat sich nach 24 Stunden hingegen bereits zu 23 % bei pH 5, zu 36 % bei pH 7 und zu 40 % bei pH 9 in **B- α 5** umgewandelt.

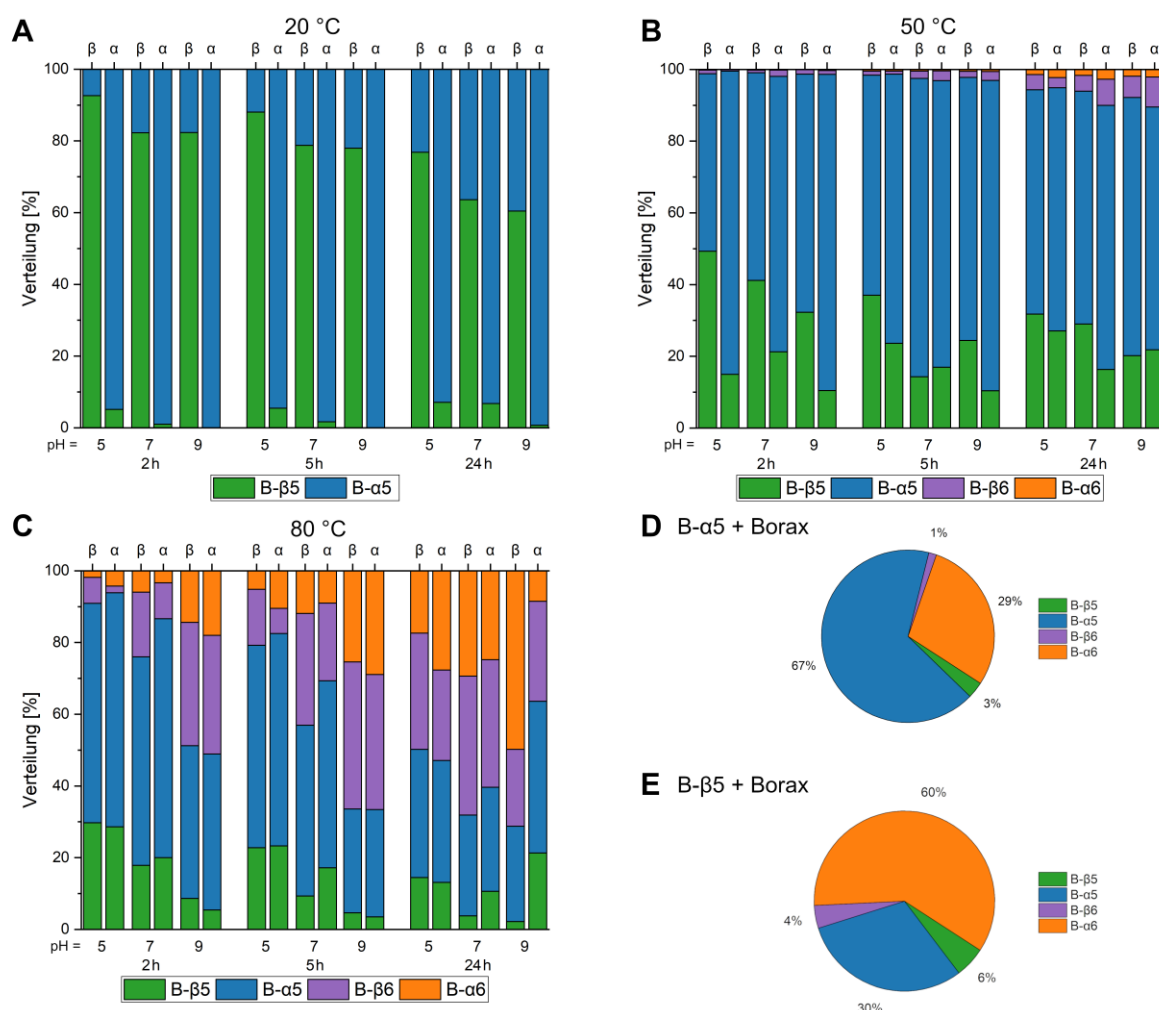


Abbildung 31. Prozentuale Verteilung der Biuret-Nukleosid-Isomere bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten ausgehend von **B- α 5** oder **B- β 5**. **A)** Analyse der Isomerisierung bei 20 °C nach 2 h, 5 h und 24 h. **B)** Analyse der Isomerisierung bei 50 °C nach 2 h, 5 h und 24 h. **C)** Analyse der Isomerisierung bei 80 °C nach 2 h, 5 h und 24 h. **D)** Prozentuale Verteilung der Isomere nach 24 h in einer Boraxlösung ausgehend von **B- α 5**. **E)** Prozentuale Verteilung der Isomere nach 24 h in einer Boraxlösung ausgehend von **B- β 5**. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode C) (Massenfilter m/z = 258,0645 – 258,0749).

Bei 50 °C (**Abbildung 31B**) beginnen die Pyranoside zu entstehen und es kann ein Anstieg der gebildeten Mengen von zwei Stunden zu 24 Stunden beobachtet werden. Die Umwandlung in **B- β 6** scheint bevorzugt zu sein, da es bei allen Messungen die Hauptspezies der Pyranoside darstellt und **B- α 6** erst bei den Messungen nach 24 Stunden merklich in Erscheinung tritt. Die Umwandlung in die Pyranoside scheint generell unabhängig vom eingesetzten Furanosid zu sein und auch der pH-Wert hat nur einen geringen Einfluss auf die Isomerisierung. Mit steigender Reaktionsdauer nimmt die Menge an Pyranosiden zu und die Verteilung der Furanoside scheint

sich anzunähern. Die Furanoside sind auch bei 50 °C nach 24 Stunden die dominierende Spezies (>85 %), allerdings besteht die gesamte Mischung nur noch zu ca. 25 % aus dem gewünschten β -Isomer.

Die Messungen bei 80 °C (**Abbildung 31C**) nach zwei Stunden zeigen keinen Einfluss des Startisomers, da sich die Verteilungen sehr ähneln. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Menge der gebildeten Pyranoside zu, ca. 50 % bei pH 9 gegen ca. 20 % bei pH 5, und wie zuvor ist **B- β 6** zumeist das Hauptisomer. Nach fünf Stunden sind die Pyranoside die dominierende Spezies bei pH 9, wohingegen sie bei pH 7 ca. 35 % und bei pH 5 nur ca. 20 % ausmachen. Zu den Messungen nach 24 Stunden bei 80 °C ist anzumerken, dass umso höher der pH-Wert ist, umso stärker eine allgemeine Zersetzung zu beobachten ist. Bei pH 9 ist ein enormer Einbruch der Intensität zu verzeichnen. Im Durchschnitt sind die Pyranoside die dominierende Spezies nach 24 Stunden, es variiert allerdings, ob das α -Isomer oder das β -Isomer vermehrt gebildet wurde. Bei allen Bedingungen ist **B- α 5** die Hauptspezies der Furanoside.

Nachdem der Einfluss von Boraten auf die Stabilität von Ribofuranosiden bekannt ist,^[124] wurde die Umwandlung bei pH 7 und 80 °C in einer Borax-haltigen Lösung untersucht (**Abbildung 31D** und **E**). Hierbei wurde nur eine Messung nach 24 Stunden durchgeführt. Ausgehend von **B- β 5** bildet sich vor allem **B- α 6**, wohingegen **B- α 5** eine deutlich geringere Isomerisierung aufweist, verglichen mit der Reaktion ohne Borax. Konträr zur erwarteten Verschiebung der Verteilung zugunsten der Furanoside konnte eine Verschiebung zugunsten der α -Isomere beobachtet werden.

Die markanteste Erkenntnis der Isomerisierungsuntersuchungen ist die erstmalige Entstehung der Pyranoside bei höheren Temperaturen (ab 50 °C) und verstärkt bei höheren pH-Werten, sowie die auch bei niedrigeren Temperaturen ablaufende Anomerisierung der Furanoside. Außerdem zeigen die Messungen bei 80 °C eine sehr schnelle Umwandlung innerhalb der ersten beiden Stunden.

Um den raschen Verlauf der Isomerisierung bei 80 °C zu verfolgen, wurde jedes Isomer einzeln in hochreinem Wasser bei pH 7 gelöst und für die ersten beiden Stunden im 10 Minutentakt gemessen, gefolgt von Messungen im 30-Minuten Intervall. Die Ergebnisse der UHPLC-QTOF-MS-Analysen sind im zeitlichen Verlauf in **Abbildung 32** zu finden.

B- β 5 als Startisomer anomerisiert innerhalb der ersten zehn Minuten zu einem beträchtlichen Teil zu **B- α 5**. Danach nimmt die Konzentration der Furanoside zugunsten der Konzentration der Pyranoside beständig ab, die nach circa zwei Stunden die Hauptspezies bilden. Diese Ergebnisse

erklären den Ausgang der präbiotischen Biuret-Nukleosid-Synthese, bei der alle vier Isomere detektiert werden konnten. Der Verlauf der Isomerisierung von **B- α 5** ähnelt dem von **B- β 5**, da zuerst eine Anomerisierung zu beobachten ist, gefolgt von der Bildung der Pyranoside. Die Furanoside verhalten sich folglich recht ähnlich, einziger relevanter Unterschied ist die erhöhte Zersetzung ausgehend vom α -Isomer. Es scheint eine kinetische Hemmung vorzuliegen, weshalb die Bildung der thermodynamisch stabileren Pyranoside erst mit fortschreitender Dauer zu Tage tritt. In beiden Fällen ist das **B- β 6**-Isomer die Hauptspezies.

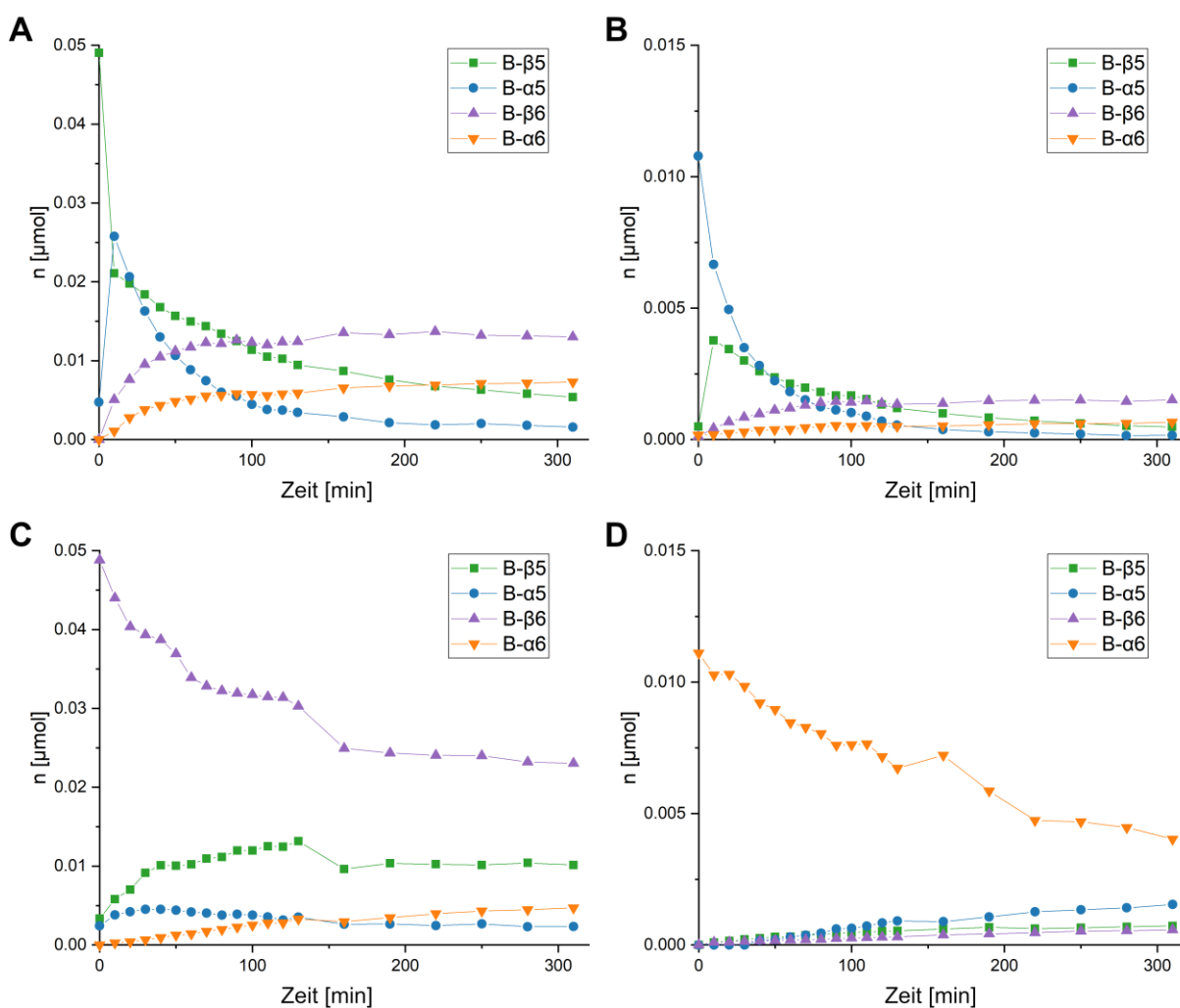


Abbildung 32. **A)** Zeitlicher Verlauf über 5 h der Isomerisierung von **B- β 5** bei pH 7 und 80 °C. **B)** Zeitlicher Verlauf über 5 h der Isomerisierung von **B- α 5** bei pH 7 und 80 °C. **C)** Zeitlicher Verlauf über 5 h der Isomerisierung von **B- β 6** bei pH 7 und 80 °C. **D)** Zeitlicher Verlauf über 5 h der Isomerisierung von **B- α 6** bei pH 7 und 80 °C. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode B) (Massenfilter $m/z = 258,0645 - 258,0749$).

Die Umwandlung der Pyranoside zeigt einen abweichenden Verlauf zu dem der Furanoside. Sowohl **B- β 6** als auch **B- α 6** bleiben durchweg die Hauptspezies, wobei eine Umwandlung in alle anderen Isomere zu beobachten ist. Die Isomerisierung von den Pyranosiden zu den Furanosiden

ist folglich auch möglich. Interessanterweise ist bei Start von **B-β6** das korrespondierende Furanosid **B-β5** die Hauptspezies der Furanoside, wohingegen bei Einsatz von **B-α6** als Edukt **B-α5** das Hauptfuranosid darstellt.

Es scheint nicht nur ein Intermediat vorzuliegen, wie zuerst angenommen, sondern es scheinen mehrere verschiedene Strukturen an der Umwandlung beteiligt zu sein. Ein Vorschlag, welche Wege bei der Isomerisierung ablaufen könnten, ist in **Abbildung 33** dargestellt.

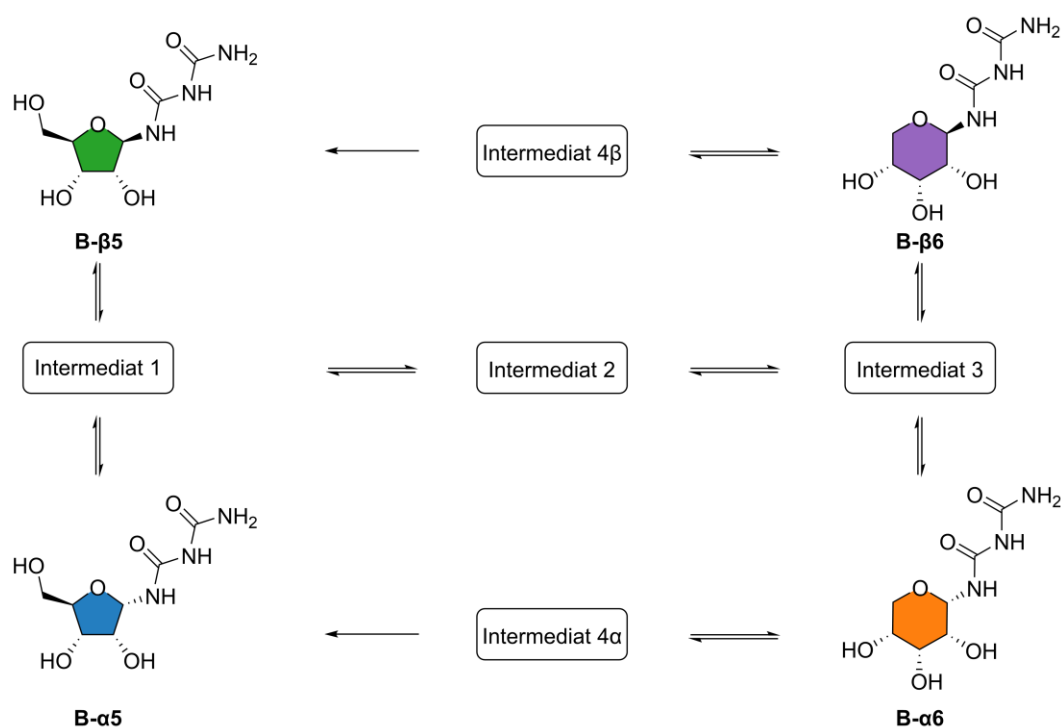


Abbildung 33. Darstellung des entworfenen Isomerisierungswegs über verschiedene Zwischenstufen.

Die Anomerisierung der Furanoside könnte über Intermediat 1 ablaufen. Dieses Intermediat könnte strukturell dem zu bildenden 5-Ring gleichen und abhängig von der cis/trans Stellung des Enamins zu beiden Produkten führen könnte. Die Bildung der Pyranoside aus den Furanosiden, resultiert in der Entstehung von **B-β6** als Hauptisomer. Dies spricht für einen gemeinsamen Weg der Furanoside zu den Pyranosiden über ein gemeinsames Intermediat. Dieser könnte ausgehend von Intermediat 1, über ein Intermediat 2, welches wahrscheinlich eine eher offenkettige Form darstellt, zu Intermediat 3 führen. Dieses Intermediat 3 könnte ein vorangeordnetes Pyranosid sein, bei dem es abhängig von der cis/trans Stellung zur Bildung der α - oder β -Form kommen könnte. Über dieses Intermediat 3 könnte sich mit der Zeit vermehrt **B-β6** aus den Furanosiden sowie durch Anomerisierung aus **B-α6** bilden. Da die Untersuchungen ausgehend von den Pyranosiden

zeigten, dass das korrespondierende Furanosid jeweils das verstärkt gebildete Furanosid darstellt, sollte es einen alternativen Weg geben, der nicht über die Intermediate 1 – 3 verläuft, da ansonsten eine gleiche Produktverteilung entstehen müsste. Deshalb wurde die Anwesenheit von Intermediat 4 β und 4 α antizipiert. Ob der Weg auch von den Furanosiden zu den Pyranosiden abläuft, lässt sich mit den bisherigen Daten nicht belegen.

Triuret

Das Isomerisierungsverhalten der Triuret-Nukleoside (**T-β5**, **T-α5**, **T-β6** und **T-α6**) sollte bei pH 7 und 80 °C untersucht werden, um eine Vergleichbarkeit mit den Biuret-Derivaten zu gewährleisten. Es wurde in einem 20-Minutentakt gemessen, da die Trennung der einzelnen Isomere nur mit einer Methode über 20 Minuten gewährleistet werden konnte. Begonnen wurde mit der Untersuchung der Isomerisierung von **T-β5** (**Abbildung 34**). Es trat eine schnelle Zersetzung des Edukts innerhalb der ersten 20 Minuten ein, weshalb die Reaktion nach 160 Minuten abgebrochen wurde. Dieses Ergebnis erklärt die Abwesenheit von **T-β5** in der Produktmischung der präbiotischen Synthese.

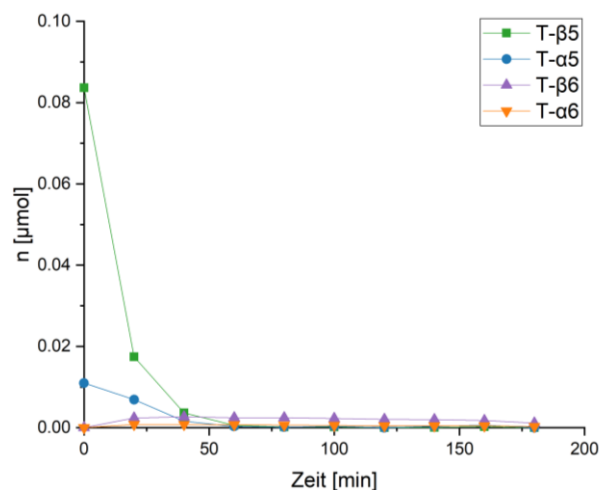


Abbildung 34. Versuch der zeitlichen Messung der Isomerisierung von **T-β5** bei 80 °C und pH 7. Analysiert mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode C) (Massenfilter $m/z = 301,0695 - 301,0815$).

Infolgedessen wurde die Temperatur auf 60 °C reduziert, um weitere Einblicke in das Isomerisierungsverhalten zu erhalten und die Zersetzung zu umgehen. Die Ergebnisse der einzelnen Isomere sind in **Abbildung 35** veranschaulicht.

Ausgehend von **T-β5** ereignet sich zuerst die Anomerisierung zu **T-α5** innerhalb der ersten 20 Minuten gefolgt von einer starken Zersetzung anstelle der erwarteten Isomerisierung in die Pyranoside, die nur zu einem äußerst geringen Teil entstehen. Das Verhalten von **T-α5** unter diesen Bedingungen zeigt eine noch höhere Instabilität als das β-Isomer. Die Anomerisierung zeigt sich schwach, wird aufgrund der enormen Zersetzung fast vollständig unterdrückt und die Pyranoside können sich in diesem kurzen Zeitfenster kaum bilden. Die Pyranoside zeigen gegenteiliges Verhalten. Sowohl **T-β6** als auch **T-α6** scheinen bei diesen Bedingungen außerordentlich stabil zu sein und zeigen kaum Zeichen von Zersetzung oder Isomerisierung während dieser Messperiode.

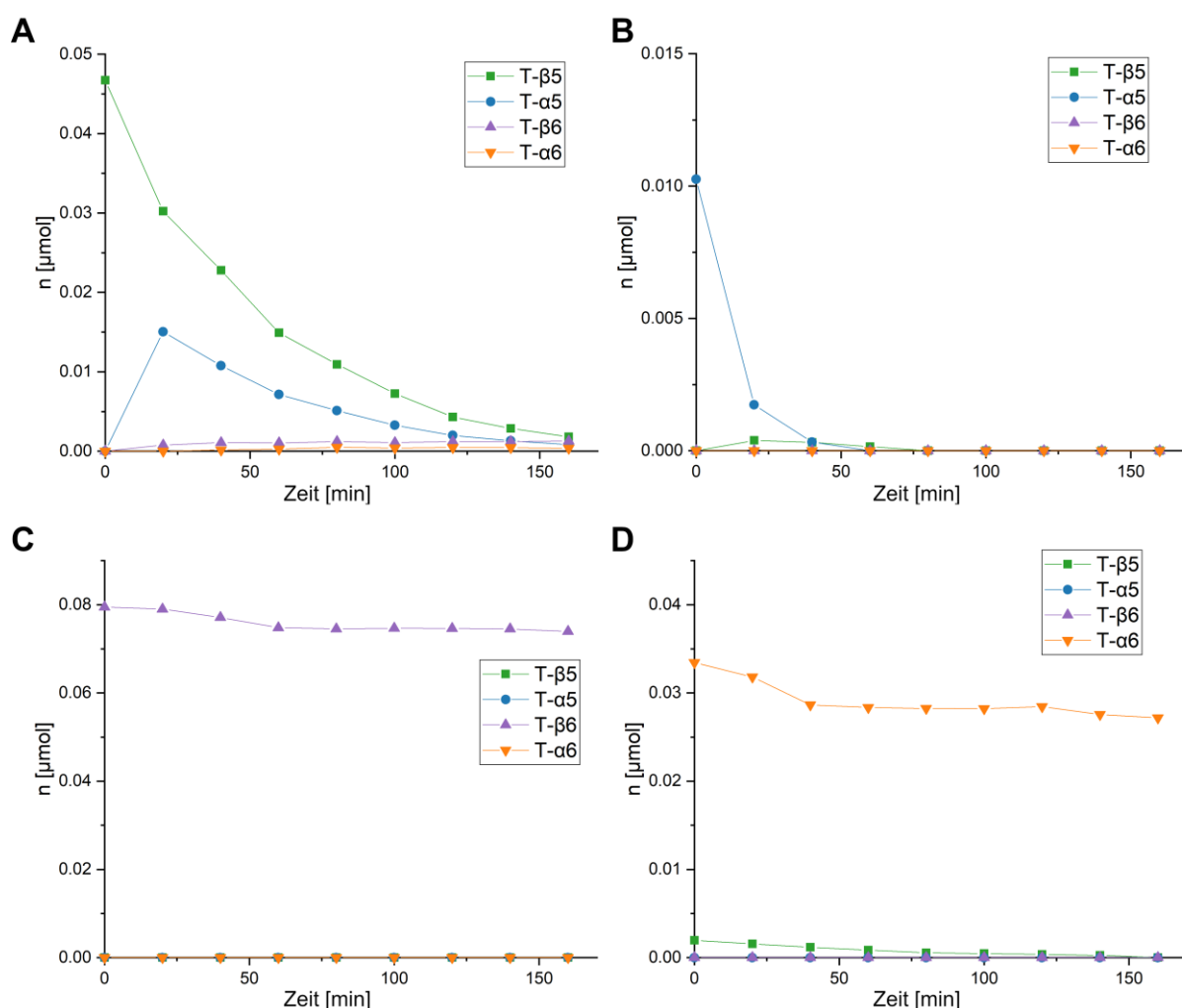


Abbildung 35. A) Zeitlicher Verlauf der Isomerisierung von **T-β5** bei pH 7 und 60 °C während der ersten 160 Minuten. B) Zeitlicher Verlauf der Isomerisierung von **T-α5** bei pH 7 und 60 °C während der ersten 160 Minuten. C) Zeitlicher Verlauf der Isomerisierung von **T-β6** bei pH 7 und 60 °C während der ersten 160 Minuten. D) Zeitlicher Verlauf der Isomerisierung von **T-α6** bei pH 7 und 60 °C während der ersten 160 Minuten. Analysiert mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode C) (Massenfilter $m/z = 301,0695 - 301,0815$).

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der ausschließlichen Detektion der Pyranoside in der präbiotischen Reaktion. Nach der Bildung von **T-β5** erfolgt zu einem geringen Teil eine Isomerisierung zu den Pyranosiden und zu einem großen Teil die Zersetzung. Aufgrund der außergewöhnlichen Stabilität der Pyranoside reichern diese sich mit der Zeit langsam an.

Wie zu Beginn erwähnt, konnte für **T-β5** die Wechselwirkung mit anderen Nukleosiden in einem RNA-Strang nachgewiesen werden, was es zu einem präbiotisch plausiblen Proto-RNA-Kandidaten werden ließ. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse, insbesondere der schnellen Zersetzung beziehungsweise Anomerisierung, scheinen die Furanoside keine präbiotische Relevanz als RNA-Vorläufer zu haben.

4.1.3 Wöhler-RNA-Nukleotide

Ein möglicher Weg, die Instabilität der Triuret-Furanoside zu umgehen, könnte die Entwicklung einer präbiotischen Synthese der 5'- β -Furanosid-Nukleotide sein. Falls diese eine höhere Stabilität aufweisen, könnte die Wöhler-RNA wieder als präbiotisch plausibler Vorläufer angesehen werden.

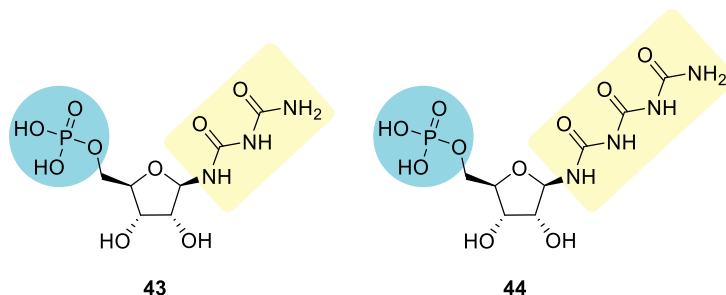


Abbildung 36. Struktur der Biuret- und Triuret- β -Nukleotide **43** und **44**.

Begonnen wurde mit der nicht präbiotischen Synthese von **43** und **44**, um deren Verhalten in wässrigen Lösungen zu untersuchen. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit des Biuret-Nukleosids konzentrieren sich die Synthesen zunächst auf die Herstellung des Biuret-Nukleotids **43**. Sobald ein Syntheseweg etabliert wurde, kann über diesen das Triuret-Nukleotid **44** hergestellt werden. Der zugänglichste Weg zu Nukleotiden ist die Phosphorylierung der korrespondierenden Nukleoside. Das Problem hierbei ist die Selektivität, da neben der gewünschten 5'-Position auch die 2'- und 3'-Hydroxygruppen phosphoryliert werden könnten. OUCHI *et al.* entwickelte eine Methode um trotz ungeschützter 2'- und 3'-Hydroxygruppen selektiv 5'-AMP herzustellen.^[236] Hierbei wird POCl₃ in ACN mit Pyridin in spezifischen Verhältnissen vorgelegt, gefolgt von der Zugabe des Nukleosids, bevor nach vier Stunden Reaktionszeit Wasser zugegeben wird für die abschließende Hydrolyse. Dies wäre der einfachste Weg, um zu **43** zu gelangen. Es wurde eine Testreaktion an Adenosin durchgeführt, die laut Analyse mittels UHPLC-QTOF-MS selektiv 5'-AMP hervorbrachte. Die Reaktion wurde analog mit dem Biuret-Nukleosid **B- β 5** durchgeführt (**Abbildung 37A**), verlief allerdings nicht erfolgreich. Zum einen war die Ausbeute sehr schlecht, zum anderen schienen mehrere Phosphorylierungsprodukte zu entstehen, die sich auch mittels Präp. HPLC nur schlecht trennen lassen würden, da sie mit den zusätzlich entstandenen Eduktisomeren überlappen. Der Ansatz der direkten Phosphorylierung mit POCl₃ wurde verworfen und stattdessen die Verwendung eines Phosphoramidits anvisiert. Dieses sollte idealerweise besonders sterisch anspruchsvoll sein, damit als Hauptreaktionsstelle die freier zugängliche 5'-Position bevorzugt wird. Hierfür wurde Phosphoramidit **45** durch Reaktion von

PCl_3 mit FLO-Me-OH und Diisopropylamin hergestellt.^[237] Die Reaktion des Phosphoramidits **45** mit einer diastereomeren Mischung der Biuret-Nukleoside **B-5** mit Tetrazol und anschließender Oxidation mittels TBHP führte zu keiner Produktbildung (**Abbildung 37B**).

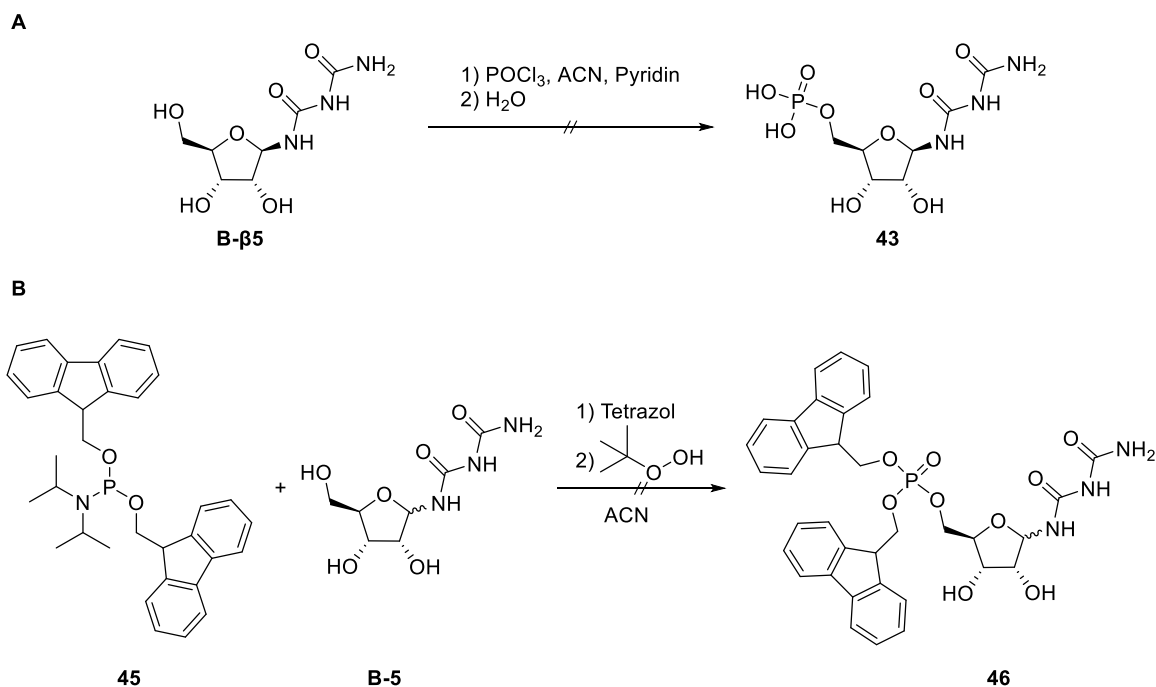


Abbildung 37. Versuche der selektiven 5'-Phosphorylierung des Biuret-Furanosids **B-5** ohne Schutzgruppe an den 2'- und 3'-Hydroxygruppen. **A)** Reaktion mit POCl_3 als Phosphorylierungsreagenz.^[236] **B)** Phosphoramidit **45** als Phosphorylierungsmittel gefolgt von der anschließenden Oxidation mit TBHP.^[237]

Aufgrund der nicht erfolgreichen Versuche der direkten Phosphorylierung des Biuret-Nukleosids wurde eine andere Syntheseroute, inspiriert von einer bereits bekannten Synthese von CARELL *et al.*, entworfen. Hier liegen die 2'- und 3'-Hydroxygruppen geschützt vor, sodass die Phosphorylierung selektiv an der 5'-Position ablaufen sollte. Die relevanten Zwischenstufen und Schritte sind in **Abbildung 38** zu sehen. Startpunkt ist wie bei der Biuret-Nukleosid-Synthese vollständig geschützte Ribose **39**. Die 2'-, 3'- und 5'-Hydroxygruppen sind benzoylgeschützt, weshalb im Verlauf der Synthese eine Umschüttung erfolgen muss, um eine Orthogonalität der verwendeten 5'-Schutzgruppe im Vergleich zur 2'- und 3'-Position sicherstellen zu können. Zudem sollte vor der Phosphorylierung zuerst die Biureteinheit mittels Reaktion mit Isocyanat aufgebaut werden. Nach erfolgreicher Synthese von **47** kann dann selektiv die 5'-Position entschützt und phosphoryliert werden, um zu **48** zu gelangen. Der finale Schritt, die Entschüttung der sekundären Alkohole, sollte dann das gewünschte Biuret-Nukleotid **43** ergeben.

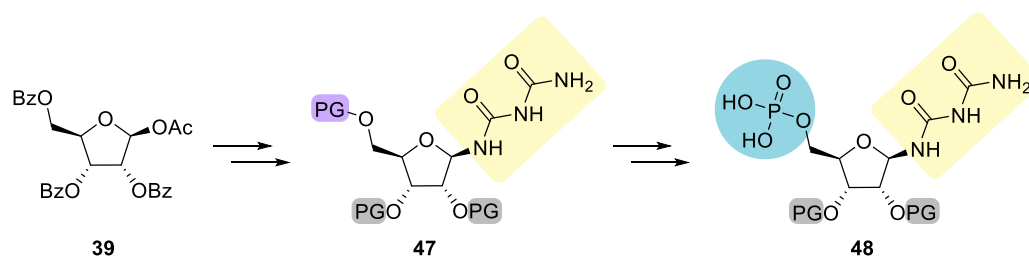


Abbildung 38. Darstellung der relevanten Zwischenstufen der geplanten Syntheseroute, um die selektive Phosphorylierung der 5'-Position zu gewährleisten. PG = Schutzgruppe.

Als 5'-Hydroxy-Schutzgruppe wird die Verwendung von DMT, abspaltbar im Säuren, und für die sekundären Hydroxygruppen der Einsatz einer Silyschutzgruppe, durch Fluoride entschützbar, anvisiert. Als erster Schritt wurde **39** unter Verwendung von TMS-Azid und $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in das korrespondierende Azid **49** überführt und anschließend mit Natriummethanolat zu **50** entschützt (**Abbildung 39**). Beide Reaktionen verlaufen quantitativ und benötigen keine säulenchromatographische Aufreinigung. Sowohl die selektive 5'-DMT Schützung zu Azid-Ribosid **51** sowie die anschließende TBDMS-Schützung der sekundären Alkohole in 2'- und 3'-Position zu **52** verliefen mit exzellenten Ausbeuten. Bei beiden Reaktionen wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht. Bei der DMT-Schützung wurden Reaktionen ohne zusätzliche Base (26 % Ausbeute), mit DMAP als zusätzlicher Base (87 % Ausbeute) sowie mit AgNO_3 (92 % Ausbeute) durchgeführt. Bei der TBDMS-Schützung führt eine erste Reaktion mit TBDMS-Cl und Imidazol zu einer Ausbeute von 36 %. Verwendung von Iod und Methylimidazol konnte die Ausbeute auf 99 % anheben. Reduktion des Azids **52** zu Amin **53** unter Verwendung von Palladium auf Kohle mit Wasserstoff und Umsetzen des unaufgereinigten Produkts mit TMS-Isocyanat führte zur Bildung des 5'-DMT-2',3'-TBDMS-Harnstoff-Ribosid-Derivats **54**.

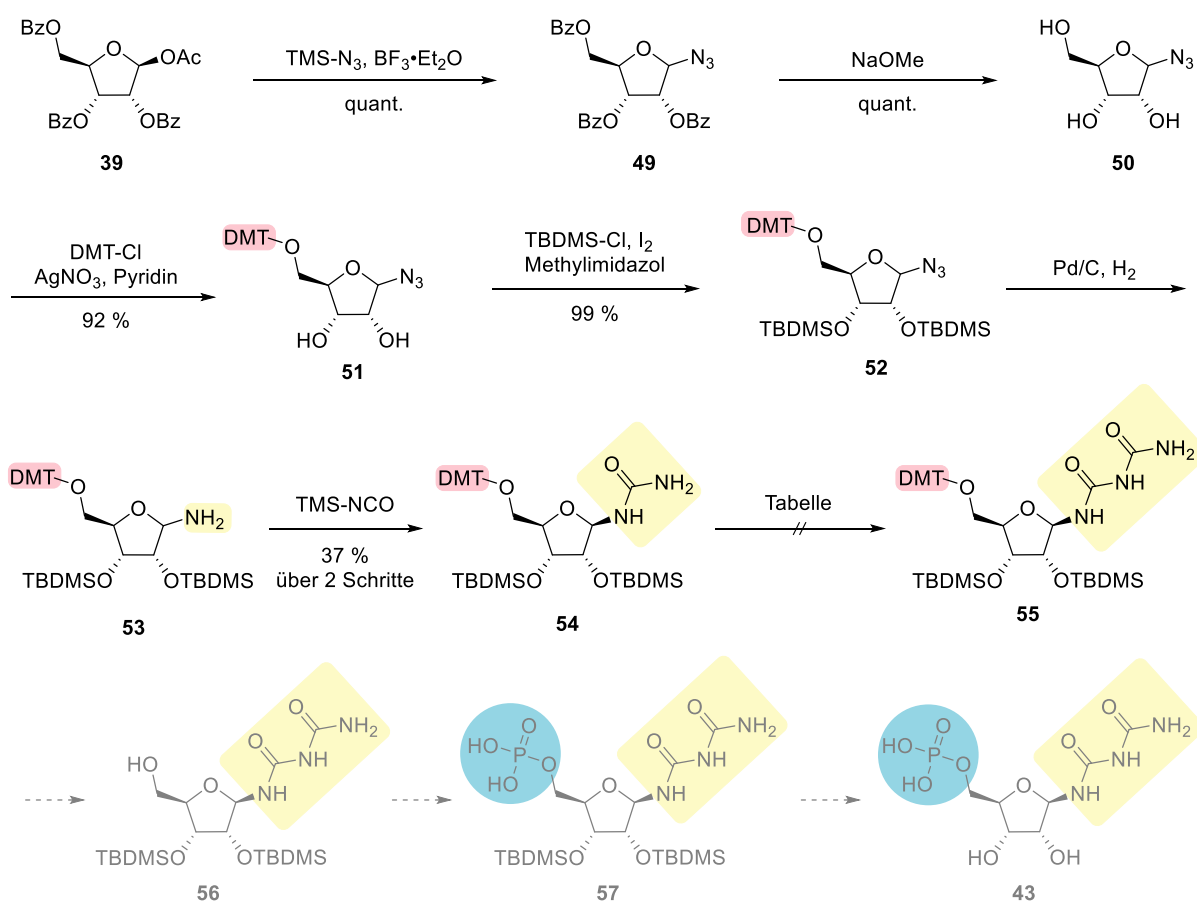
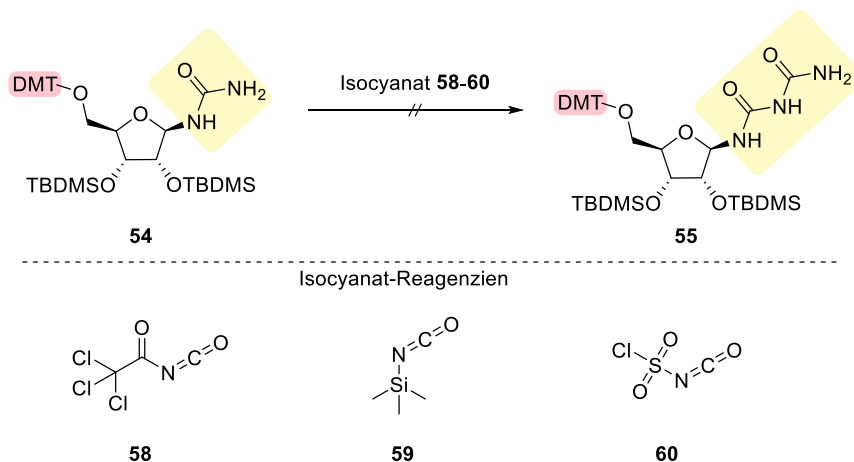


Abbildung 39. Entworfenen Syntheseroute zu 5'-Biuret-Nukleotid **43** über 5'-DMT-2',3'-TBDMS-geschütztes Biuret-Ribosid **55**.

Die anschließende Reaktion zum Biuret-Ribosid-Derivat **55** gestaltete sich als schwierig. In Anlehnung an eine Vorschrift von CARELL *et al.* mit teils veränderten Schutzgruppen wurde Trichloroacetylisocyanat mit Pyridin in THF verwendet.^[190] Dies führte nicht zur gewünschten Produktbildung. Infolgedessen wurden bei dieser Reaktion verschiedene Bedingungen getestet (**Tabelle 3**). Eintrag 1 stellt die Ausgangsreaktion dar. Als erstes wurde mit einem neu bestellten Isocyanatreagenz die Reaktion erfolglos wiederholt (Eintrag 2). Anschließend wurde die Reaktionsdauer von einer Stunde auf 18 Stunden erhöht, in Anlehnung an die zuvor verwendeten Reaktionszeiten der Isocyanatreaktion zu **54** (Eintrag 3). Da auch dies nicht zur Produktbildung führte, wurden die Bedingungen der Reaktion bei der Synthese der Biuret-Furanoside angewendet (Eintrag 4) und die Äquivalente von Pyridin variiert (Eintrag 5).

Tabelle 3. Getestete Bedingungen für die Synthese von **55** aus **54**.



Eintrag

Bedingungen

- | Eintrag | Bedingungen |
|---------|---|
| 1 | Isocyanat 58 (4.0 äq.), Pyridin (6.0 äq.), THF, r.t., 1 h |
| 2 | Neues Isocyanat 58 (4.0 äq.), Pyridin (6.0 äq.), THF, r.t., 1 h |
| 3 | Isocyanat 58 (4.0 äq.), Pyridin (6.0 äq.), THF, r.t., 18 h |
| 4 | Isocyanat 58 (4.0 äq.), THF/DCM 2:1, r.t., 18 h |
| 5 | Isocyanat 58 (4.0 äq.), Pyridin (0.1 äq.), THF, r.t., 3 h |
| 6 | Isocyanat 58 (4.0 äq.), Dibutylzinndilaurat, THF, r.t., 3 h |
| 7 | Isocyanat 58 (4.0 äq.), Pyridin (6.0 äq.), Dibutylzinndilaurat, THF, r.t., 3 h |
| 8 | Isocyanat 59 (4.0 äq.), Pyridin (6.0 äq.), THF, r.t., 1 h |
| 9 | Isocyanat 60 (4.0 äq.), Pyridin (6.0 äq.), THF, r.t., 1 h |

Als nächstes wurde Dibutylzinndilaurat, das für die Verwendung als Katalysator bei der Herstellung von Polyisocyanaten bekannt ist, der Reaktion zugesetzt. Weder die Reaktion ohne, noch die Reaktion mit Pyridin (Eintrag 6, 7) waren erfolgreich. Abschließend wurden noch zwei andere Isocyanatreagenzien getestet, einmal das TMS-Isocyanat, das bereits in der Synthese der Furanoside verwendet wurde, sowie das Chlorosulfonylisocyanat. Aber auch hier konnte kein Produkt isoliert werden. Alle Reaktionen zeigen laut DC Analyse kein Edukt mehr, des Weiteren entsteht sehr schnell eine rote Lösung nach Zugabe der Reaktanten, ein Indiz für eine zumindest teilweise Entschützung der DMT-Gruppe. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Produkte statt **55** gebildet wurden.

Da ohne erfolgreiche Synthese von **55** die Route nicht weiterverfolgt werden konnte, musste ein alternativer Weg entworfen werden. Als Hauptproblem wurde die DMT-Schutzgruppe ausgemacht, weshalb der neu entworfene Synthesepfad eine Umschüttung der 5'-Position von DMT auf Benzoyl vorsieht (**Abbildung 40**). Bis zu **52** erfolgte die Synthese analog zur zuvor verfolgten Route (**Abbildung 39**).

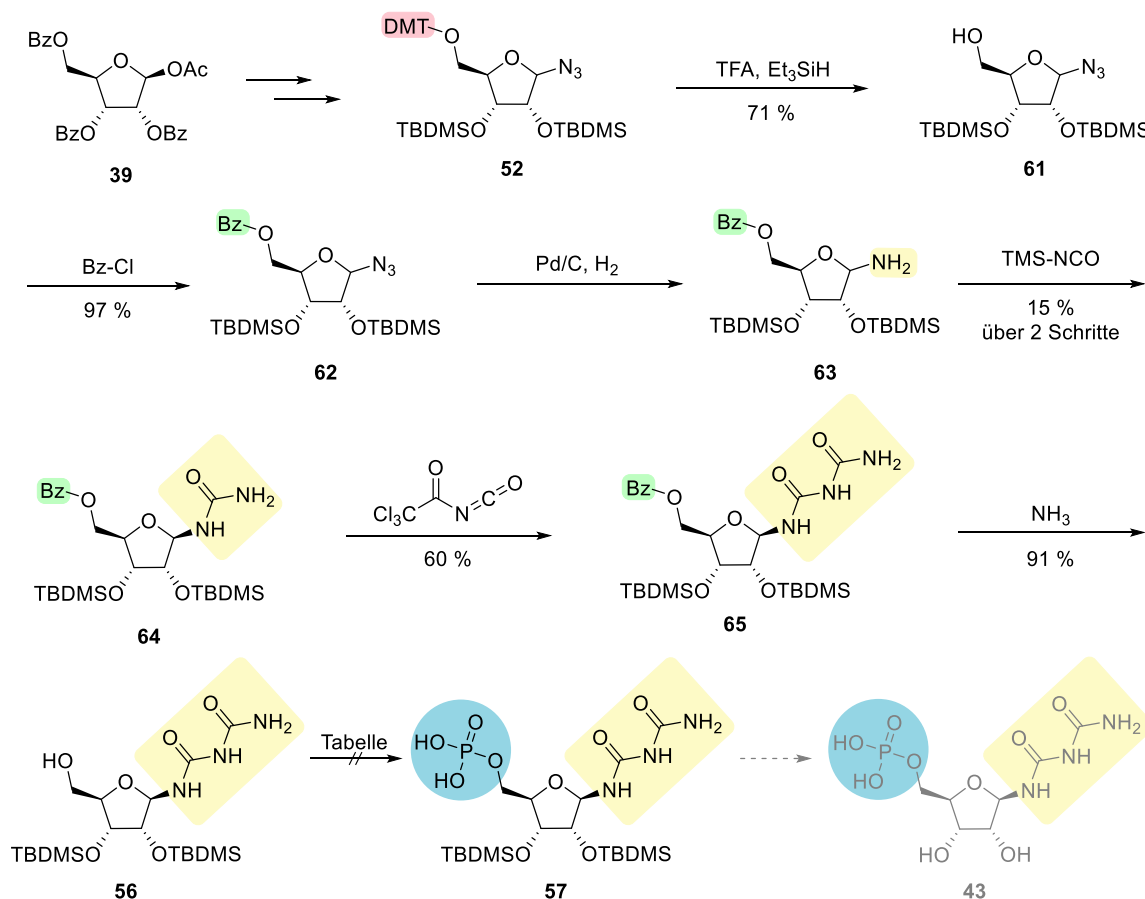


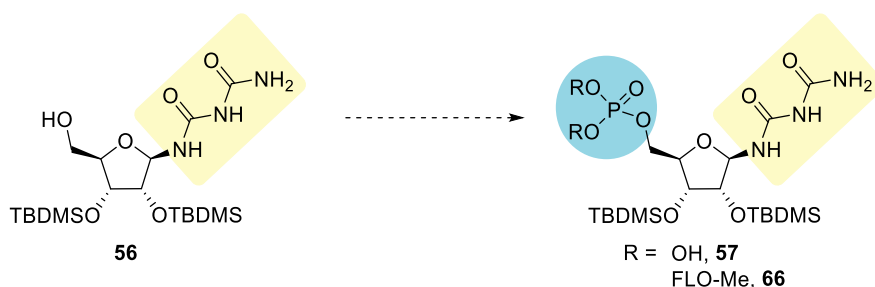
Abbildung 40. Angepasste Syntheseroute zu **43** über 5'-Bz-geschütztes Biuret-Ribosid **65** statt 5'-DMT-geschütztes **55**.

Die DMT-Entschüttung zu **61** lief unter Verwendung von Trifluoressigsäure und Triethylsilan in DCM ab und die anschließende Benzoylschüttung lieferte **62** in exzellenter Ausbeute. Die Reduktion zu Amin **63** gefolgt von der Reaktion mit TMS-Isocyanat führte zur Bildung des 5'-Bz-2',3'-TBDMS-geschützten Harnstoff-Ribosid **64** in schlechter Ausbeute. Der gescheiterte Schritt der Syntheseroute zuvor, die Reaktion mit Trichloroacetylisocyanat zum Biuret-Nukleosid, verlief in diesem Fall erfolgreich zu **65** mit 60 % Ausbeute. Entschüttung der 5'-Position mit Ammoniak in Methanol lieferte **56**, sodass die Phosphorylierung getestet werden konnte. Mehrere Versuche wurden unternommen, um **57** zu synthetisieren (**Tabelle 4**). **56** wurde mit POCl₃, Imidazol und

Ergebnisse und Diskussion

Triethylamin in Acetonitril versetzt (Eintrag 1), doch laut HRMS-ESI-Messung nach dem Aufarbeiten bildete sich nicht das gewünschte Produkt. Stattdessen war anstelle zweier Hydroxygruppen ein Imidazol an der Phosphatgruppe gebunden und der anschließende Hydrolyseversuch zu **57** schlug fehl. Da sich mit POCl_3 die gewünschte Phosphor-Sauerstoffbindung bildete, wurde eine Synthese mit POCl_3 und Triethylamin ohne Imidazol durchgeführt (Eintrag 2). Dies verlief nicht erfolgreich, weshalb die Phosphorylierung mittels Phosphoramidit **45** und Tetrazol sowie direkter Oxidation zu **66** untersucht wurde (Eintrag 3), ebenfalls ohne Erfolg.^[238]

Tabelle 4. Getestete Bedingungen für die Phosphorylierung zu **57**, **66**.



Eintrag

Bedingungen

- | Eintrag | Bedingungen |
|---------|---|
| 1 | POCl_3 (3,0 äq.), Imidazol (10 äq.), NEt_3 (15 äq.), ACN, 30 min, r.t. |
| 2 | POCl_3 (5,0 äq.), NEt_3 (5,0 äq.), ACN, 30 min, r.t. |
| 3 | FLO-Me-Phosphoramidit 45 (3,7 äq.), Tetrazol (2,8 äq.), H_2O_2 , ACN, 1 h, r.t. ^[238] |

Aufgrund der anhaltenden Schwierigkeiten wurde an Harnstoff-2',3'-TBDMS-Ribosid **67** die Phosphorylierung mit verschiedenen Phosphoramiditen untersucht. Begonnen wurde mit der DMT-Entschützung zu **67** analog zur Biuretvariante **56** (**Abbildung 41**). Die nachfolgende Phosphorylierungsreaktion wurde mit drei unterschiedlichen Phosphoramiditen durchgeführt, die sich an den verwendeten Hydroxy-Schutzgruppen des Phosphoramidits unterscheiden, sowohl in der Sterik als auch in den Entschützungsbedingungen. Benutzt wurde zum einen **45**, sowie die beiden käuflich erworbenen Phosphoramidite **72** und **73**. Die Reaktion zu **68** mit **45** konnte keine Produktformation hervorbringen. Bei den Reaktionen mit **72** und **73** konnte bei beiden Reaktionen nach der Aufarbeitung mittels HRMS-ESI-Messung die Produktmasse identifiziert werden. Infolgedessen wurden versucht das Produkt durch Säulenchromatographie zu isolieren. Bei der Reaktion zu **70** konnte laut NMR kein sauberes Produkt trotz wiederholter Aufreinigung erhalten werden. Die Isolation von **69** verlief erfolgreich mit 42 % Ausbeute.

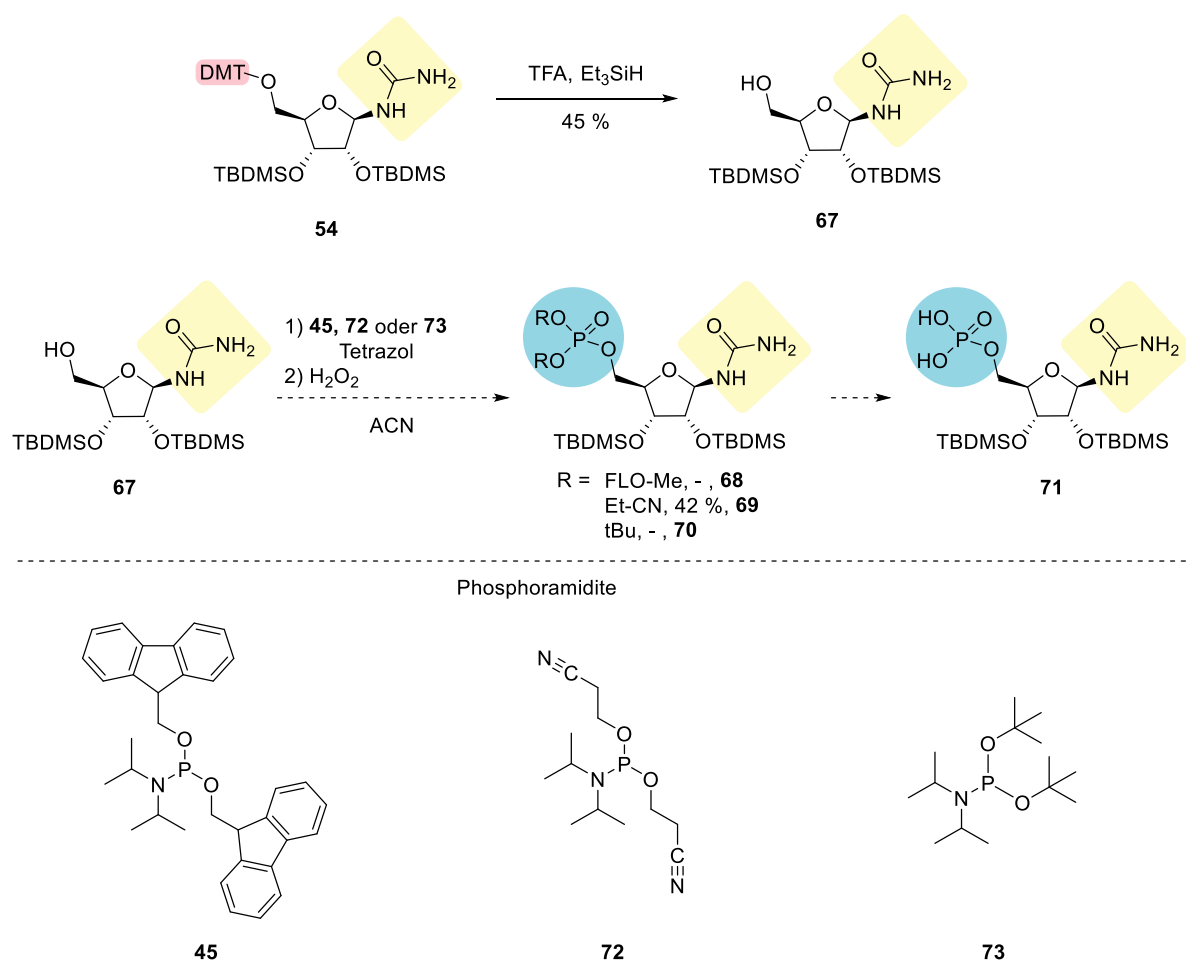


Abbildung 41. Synthese von **67** und Phosphorylierungsversuche mittels Phosphoramidite **45**, **72** und **73** um **71** herzustellen.

Allerdings konnte bisher die Reaktion nicht am Biuret- beziehungsweise Triuret-Derivat durchgeführt, sowie die Entschützung der Phosphatgruppe und die abschließende 2',3'-TBDMS-Entschützung nicht getestet werden.

4.2 Präbiotische Synthese von tRNA-Nukleosiden

Dieses Thema wurde gemeinsam mit CHRISTOPH SEIFERT bearbeitet und wurde zu Teilen in ChemBioChem veröffentlicht.^[239]

Die Entwicklung und Untersuchung von Proto-RNA-Systemen, wie im Kapitel 4.1 behandelt, ist von großem Interesse. In heutigen Lebensformen spielt neben der RNA auch die tRNA eine zentrale Rolle in der Biosynthese. Es stellt sich die Frage, ob es über die Zeit tRNA-Vorläufermodelle gab, die die gleiche oder eine ähnliche Funktion ausgeführt haben und sich aus den RNA-Nukleosiden entwickelten. Deshalb sollte die präbiotische Synthese von möglichen tRNA-Nukleosid-Analoga genauer betrachtet werden. Nachfolgend werden zuerst die Ergebnisse der RNA-Nukleosid-Synthese erläutert, gefolgt von der Entwicklung der tRNA-Analoga und deren Untersuchung (**Abbildung 42**). Hierbei sollen die C- und N-verknüpften tRNA-Nukleoside präbiotisch aufgebaut und mittels UHPLC-QTOF-MS-Messungen nachgewiesen werden.

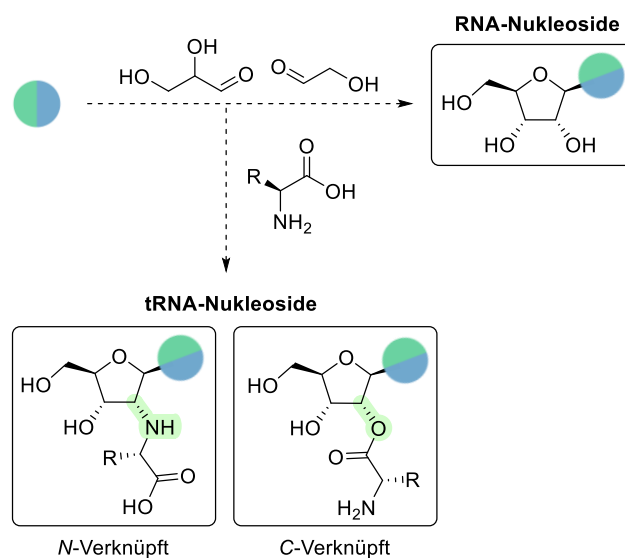


Abbildung 42. Übersicht über die im folgenden Kapitel relevante Strukturen und die geplante Synthese eben dieser.

4.2.1 Von RNA-Nukleosiden zu tRNA-Nukleosiden

In Anlehnung an die DNA-Synthese (**Abbildung 43A**) und dem erfolgreichen Aufbau von Ribose zur Wöhler-RNA (**B**) sowie der Bildung von Ribosylamin (**C**) wurde die Synthese der RNA-Nukleoside (**2a-d**) mittels Glykolaldehyd (GA) und Glycerinaldehyd (GlyA) untersucht (**D**). Durch die Verwendung von GA anstelle von Acetaldehyd wird ein weiteres Stereozentrum in der 2'-Position eingeführt. Der Mechanismus der Bildung der Nukleoside aus den Nukleobasen **1a-d** und Aldehyden GA und GlyA liefert die Möglichkeit, dass sich neben den gewünschten RNA-Ribosyl-Nukleosiden auch die Arabinosyl-Nukleoside (**75a-d**) bilden könnten (**E**).

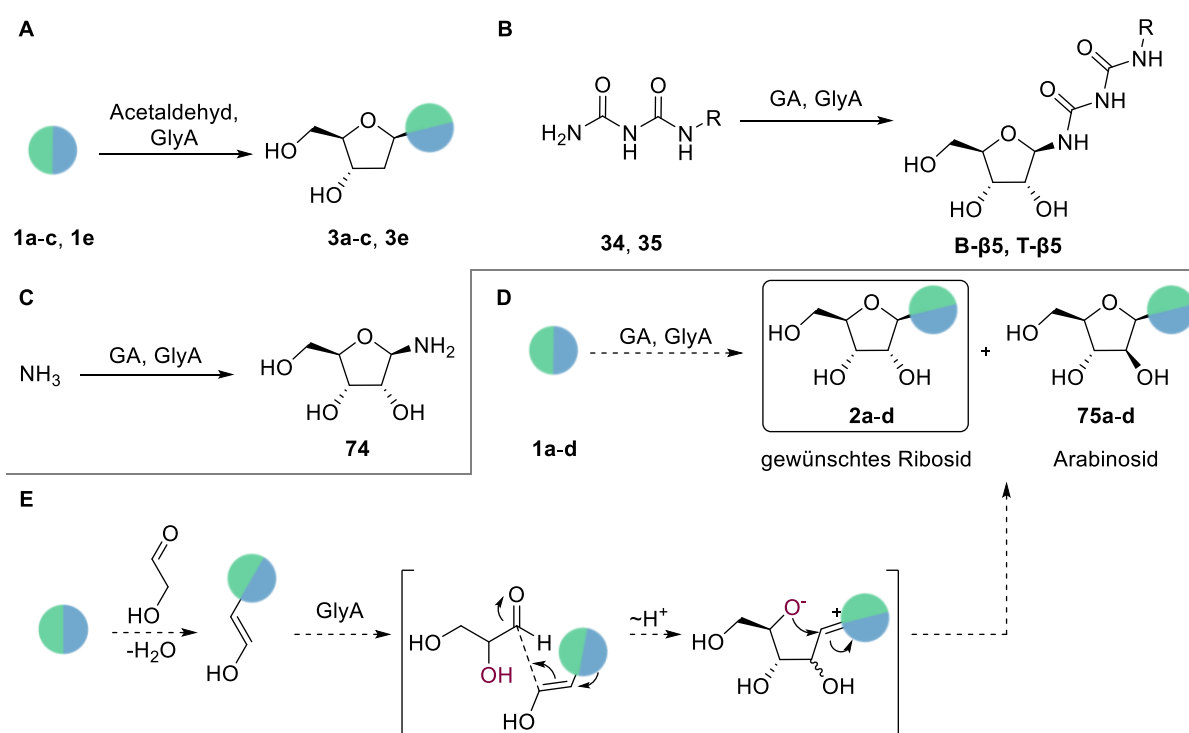


Abbildung 43. DNA-Nukleosid-Synthese mit Acetaldehyd und Glycerinaldehyd (**A**) und die davon inspirierte Herstellung der Wöhler-RNA-Nukleoside (**B**) und Ribosylamin (**C**) mit Glykolaldehyd. Daran angelehnte die antizipierte Synthese der kanonischen RNA-Nukleoside, mit der Arabinosylform als Nebenprodukt (**D**). Möglicher Mechanismus der Bildung der Nukleoside aus GA und GlyA (**E**). R = H (**34, B-β5**), C(O)NH₂ (**35, T-β5**).

Verschiedene Bedingungen für die präbiotischen Reaktionen zu den RNA-Nukleosiden wurden getestet und eine detaillierte Auflistung der einzelnen getesteten Reaktionen ist in Kapitel 6.4.2 zu finden. Der erste modifizierte Parameter ist die Lösungsmittelwahl, hier wurden Reaktionen in H₂O, DMF, MeOH oder einer 99:1 MeOH/H₂O Mischung durchgeführt. Außerdem wurde die Temperatur variiert – 50 °C, 65 °C, 80 °C und 100 °C – und es wurden Borax, ZnCl₂, CuCl₂, Na₂HPO₄, NaOAc sowie Imidazol als Additive getestet. Verschiedene pH-Werte – 3, 5, 7, 9 und 12 – sowie unterschiedliche Reaktionszeiten – 1 d, 4 d, 7 d und 15 d – wurden untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von Adenin konnte die Bildung von Adenosin nachgewiesen werden, sowie die Bildung von Vidarabin (**75a**) (**Abbildung 44**). Außerdem entstand eine Vielzahl zusätzlicher nicht identifizierter Isomere.

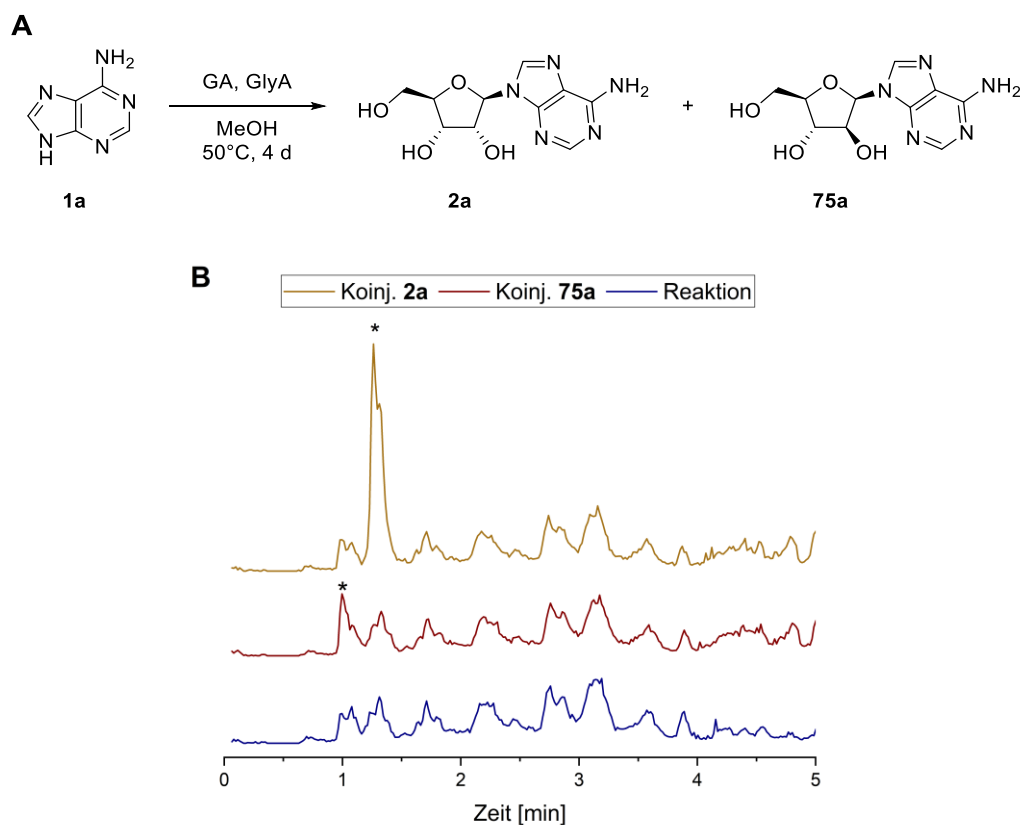


Abbildung 44. **A)** Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion zu Adenosin. **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau (unten). Koinjektion der präbiotischen Reaktion mit Vidarabin (**75a**) in braun (Mitte) und Koinjektion mit Adenosin (**2a**) in gelb (oben). Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode D, Massenfilter $m/z = 268,1013 - 268,1067$). * = Peak der Referenz.

Die Entstehung der drei anderen kanonischen Nukleoside konnte nicht nachgewiesen werden. Es scheint zur Bildung verschiedener Isomere gekommen zu sein. Beispielhaft ist das Chromatogramm der Reaktion zu Guanosin in **Abbildung 45** zu sehen.

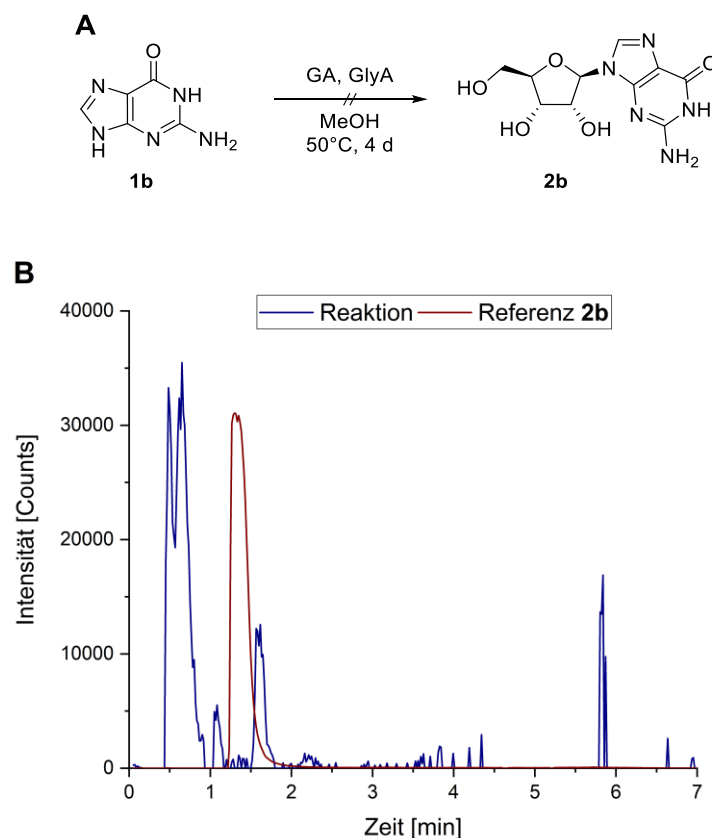


Abbildung 45. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion zu Guanosin (**2b**). **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau, hinterlegt mit einer Messung von Guanosin (**2b**) in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode D, Massenfilter $m/z = 284,0961 - 284,1017$).

Der Einfluss von komplementärer Basenpaarung auf die Bildung der Nukleoside während der präbiotischen Reaktion wurde untersucht, um zum einen eine höhere Selektivität für Adenosin zu erreichen, sowie eine erfolgreiche Synthese der anderen Nukleoside zu entwickeln. Hierfür wurden bei einem Experimentenset die komplementären Ribosyl-Nukleoside zu den Reaktionen zugesetzt (z.B. Adenin, GA, GlyA und Uridin) und bei einem anderen Set die Arabinosyl-Nukleoside (z.B. Adenin, GA, GlyA und Arabinosyl-Uridin). Beides führte nicht zur selektiven Bildung von Adenosin und nicht zu einer erfolgreichen Synthese der übrigen Ribosyl-Nukleoside (**Abbildung 46**). Die Reaktionen wurden bei verschiedenen Temperaturen – r.t., 30 °C, 50 °C und 80 °C – und mit oder ohne Borax Zusatz getestet. Der Einsatz der beiden komplementären Nukleobasen, um einen simultanen Aufbau der Zuckereinheit zu erreichen, war ebenfalls nicht erfolgreich (z.B.

Ergebnisse und Diskussion

Uracil und Adenin, GA, GlyA). Auch das Vorlegen von Nukleobase mit dem komplementärem Nukleosid (z.B. Adenin und Uridin) und anschließendem Rühren für eine Stunde, gefolgt von der Zugabe der Aldehyde, lieferten keine Verbesserung.

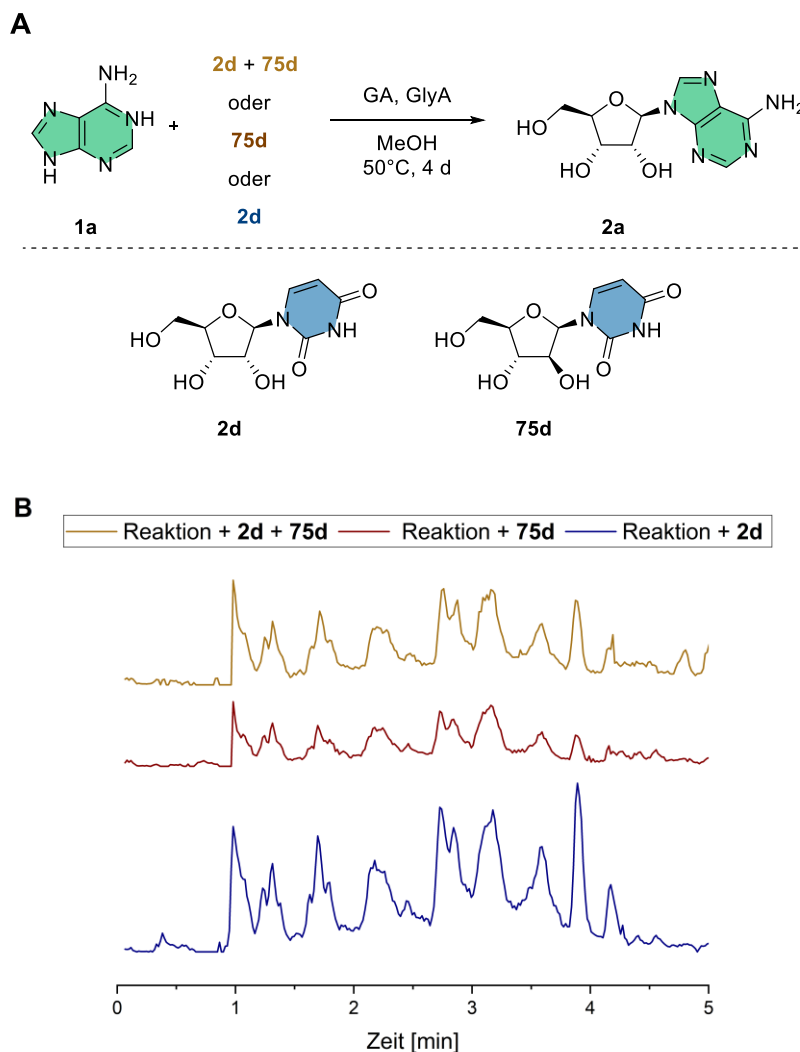


Abbildung 46. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion zu Adenosin (**2a**) mit komplementären Nukleosiden. **B)** Chromatogramm der Reaktion in blau enthält Uridin (**2d**, unten), Reaktion in braun enthielt die Arabinosylform von Uridin (**75d**, Mitte) und die Messung in gelb enthielt beide Isomere (**2d**, **75d**, oben). Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode D, Massenfilter $m/z = 268,1013 - 268,1067$).

Bisher wurden alle Reaktionen in Lösung untersucht, in der Präbiotik sind aber auch Nass-Trocken-Zyklen ein plausibles Szenario. Dies sollte bei einer Reaktion zu Adenosin mit Adenin, GA und GlyA durch eine Abfolge von Austrocknen und erneuter Lösungsmittelzugabe simuliert werden. Es konnte die Entstehung eines Hauptprodukts detektiert werden anstelle einer komplexen Mischung an Produkten verglichen mit der Reaktion in Lösung (**Abbildung 47**). Koinjektion mit Adenosin zeigte, dass es sich hierbei nicht um Adenosin handelte.

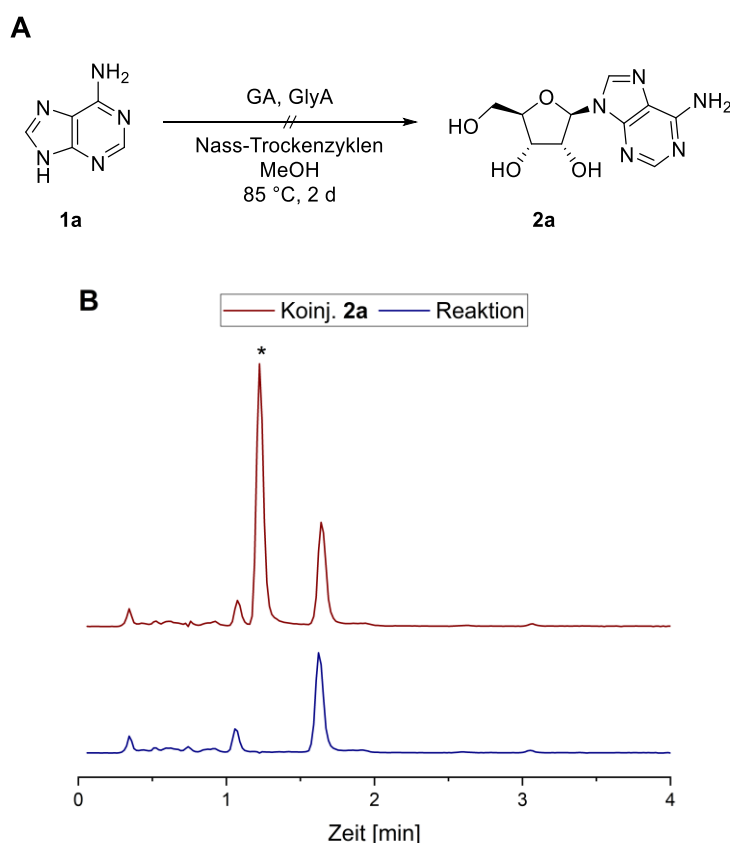


Abbildung 47. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion zu Adenosin (**2a**) unter Verwendung von Nass-Trockenzyklen. **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau und koinjiziert mit Adenosin in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode D, Massenfilter $m/z = 268,1013 - 268,1067$). * = Peak der Referenz.

Um weitere Informationen über die mögliche Struktur dieses Isomers zu erlangen, wurden MSMS-Messungen der Reaktion sowie von Adenosin durchgeführt. Die Fragmentierung von Adenosin zeigte ein übersichtliches Bild mit ausschließlich der Produktmasse (**77**), sowie der Fragmentierung zu Adenin (**76**). Die Riboseeinheit fragmentierte demzufolge nicht. Das in der Reaktion gebildete Produkt hingegen wies neben Adenin und der Produktmasse weitere Fragmente auf. Dies könnte für eine Kondensation der Aldehyde an unterschiedlichen Stellen des Adenins, z.B. am N⁹-Atom oder am primären Amin des C⁶-Atoms, sprechen (**83**). Mögliche Strukturen zu den gefundenen Massefragmenten sind in **Abbildung 48** dargestellt. An welchen Stellen die Aldehyde tatsächlich verknüpft sind, konnte nicht abschließend geklärt werden und alle Strukturen sind ausschließlich theoretisch mögliche Vorschläge. Das Fragment **80** zeigt das Kondensationsprodukt von GlyA an Adenin und **79** zeigt eine mögliche Fragmentierung eben dieses. Eine noch stärkere Fragmentierung der kondensierten Aldehyde weisen die Fragmente **78** und **81** auf, die formell so aussehen, als ob eine Kondensation mit Acetaldehyd vorliegt. Das klarste Indiz gegen die Bildung

eines Riboserings im Produkt ist die gefundene Masse von **82**. Die mögliche Struktur zeigt das Vorliegen der beiden Aldehyde an unterschiedlichen Stellen des Adenins. Dies alles spricht klar gegen die Bildung von Ribose, da bei Adenosin unter den gleichen Bedingungen der MSMS-Messungen keine Fragmentierung der Ribose beobachtet werden konnte.

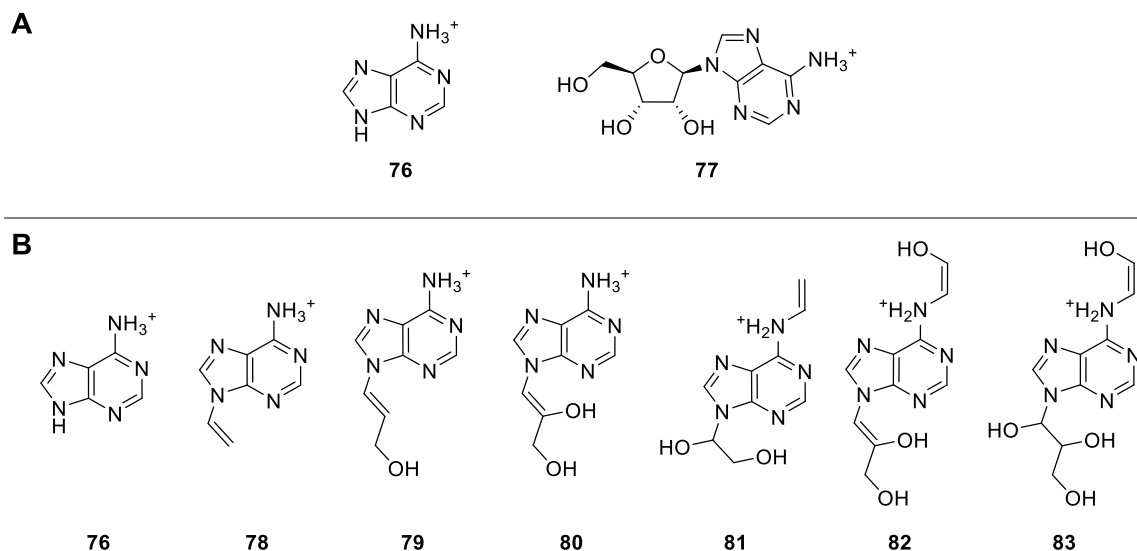


Abbildung 48. Theoretisch mögliche Strukturen der gefundenen Fragmentmassen der MSMS-Messungen von Adenosin (**A**) und des Produkts der präbiotischen Reaktion zu Adenosin durch Nass-Trocken-Zyklen (**B**).

Die Probleme bei der RNA-Synthese könnten auf die Tautomerie des Enols **84a-d** zu Aldehyd **85a-d** zurückzuführen sein (**Abbildung 49A**). Sobald dieser Schritt erfolgt ist, könnte es zur Reaktion mit Nukleophilen kommen. Bei Reaktionen in Wasser oder Methanol kommt es zwangsläufig zur Bildung von Hydraten beziehungsweise Voll- oder Halbacetalen (**86a-d** / **87a-d**), die auch mittels HRMS-ESI nachgewiesen werden konnten.

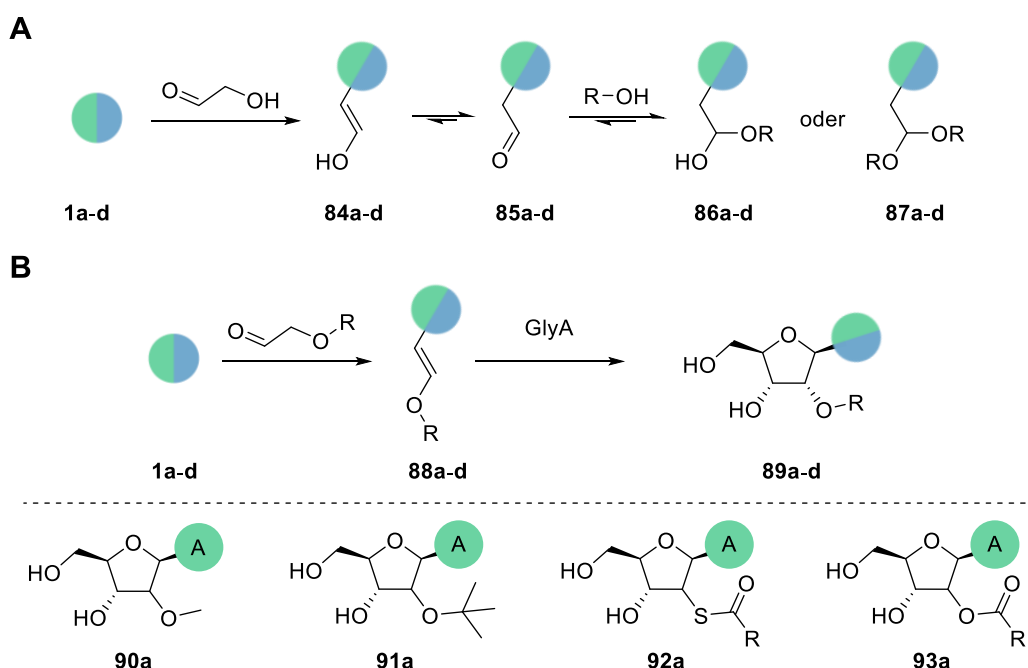


Abbildung 49. A) Synthese des Enols **84a-d** und die Tautomerie gefolgt von der Reaktion mit Nukleophilen zu Halb- oder Vollacetalen. **B)** Einsatz von Nukleophilen oder geschütztem Glykolaldehyd, um die Tautomerie zu unterbinden/zu steuern und die daraus resultierenden Nukleoside am Beispiel von Adenosin.

Nach Bildung der Halbacetale könnte eine Eliminierungsreaktion wieder zur Bildung eines Enols beziehungsweise Enamins führen, das mit GlyA zu einem 2'-modifizierten Nukleosid reagieren könnte (**B**). Wenn die Reaktion in Alkoholen, MeOH oder *t*-BuOH, durchgeführt wird, könnten so **90a** und **91a** synthetisiert werden, die idealerweise in Adenosin überführt werden könnten (**B**). Es konnte allerdings keine erfolgreiche Synthese des kanonischen Nukleosids beobachtet werden. Auch die Verwendung von anderen Nukleophilen, wie Thioessigsäure oder Thiobenzoessäure wodurch Nukleosid **92a** gebildet werden könnte, führte nicht zur gewünschten Produktbildung. Alternativ könnte GA bereits als Carboxylat- (Boc- oder Acetyl-, **93a**) geschützt eingesetzt werden, sodass nach Bildung des Nukleosids die Schutzgruppe entfernt werden kann. Die Synthese von Acetyl- beziehungsweise Boc-geschütztem Glykolaldehyd verlief nicht erfolgreich, weshalb dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde.

4.2.2 Präbiotische Synthese von tRNA-Nukleosiden

Die Modifikation der Nukleoside in der 2'-Position erinnert an das in tRNA vorkommende Adenosin A76, das in der 3'-Position mit einer Aminosäure verestert ist (**Abbildung 50A**). Inspiriert von dieser Struktur, wurde die Modifikation mit einer Aminosäure in der 2'-Position entworfen. Hierbei kann die Aminosäure entweder C-verknüpft oder N-verknüpft an die Zuckereinheit gebunden sein (**Abbildung 50B**).

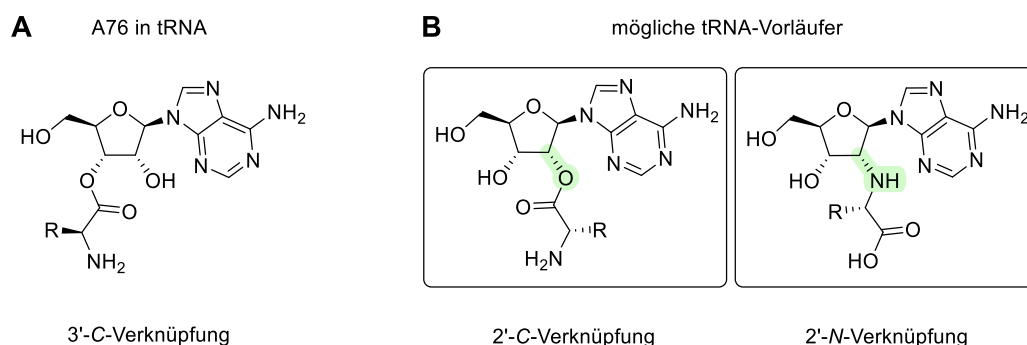


Abbildung 50. **A)** Adenosin A76 der tRNA, das mit einer Aminosäure in der 3'-Position verestert ist. **B)** Mögliche Vorläufer der heutigen tRNA mit der Modifikation in der 2'-Position über den C- oder N-Terminus der Aminosäure.

Diese Strukturen sollten über die Reaktion von Nukleobase (**1a-d**), GA, GlyA und einer Aminosäure herstellbar sein. Mechanistisch unterscheidet sich die Bildung der beiden Vorläufer voneinander (**Abbildung 51**). Bei der Synthese der N-Verknüpfung sollte zuerst die Kondensation der Nukleobase mit GA ablaufen, gefolgt von der anschließenden Tautomerie des Enols (**84a-d**) zum Aldehyd **85a-d**. Kondensation mit einer Aminosäure sollte zu Imin **94a-d** führen, welches zu Enamin **95a-d** tautomerisieren kann. Durch Reaktion mit GlyA könnte es zum Ringschluss kommen, sodass in der gebildeten Zuckereinheit eine Aminosäure über den N-Terminus in der 2'-Position gebunden vorliegt (**96a-d**).

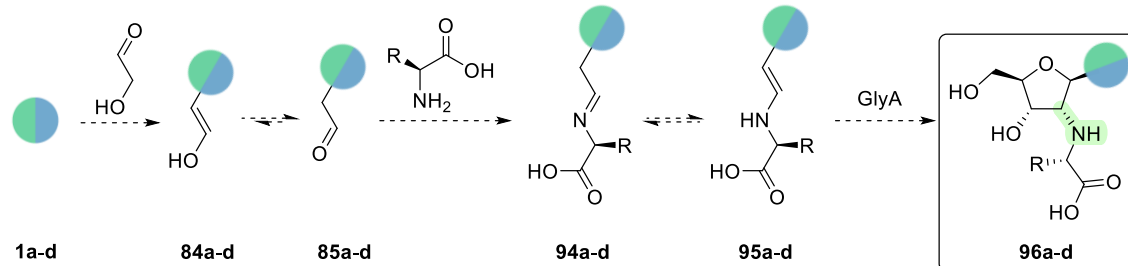
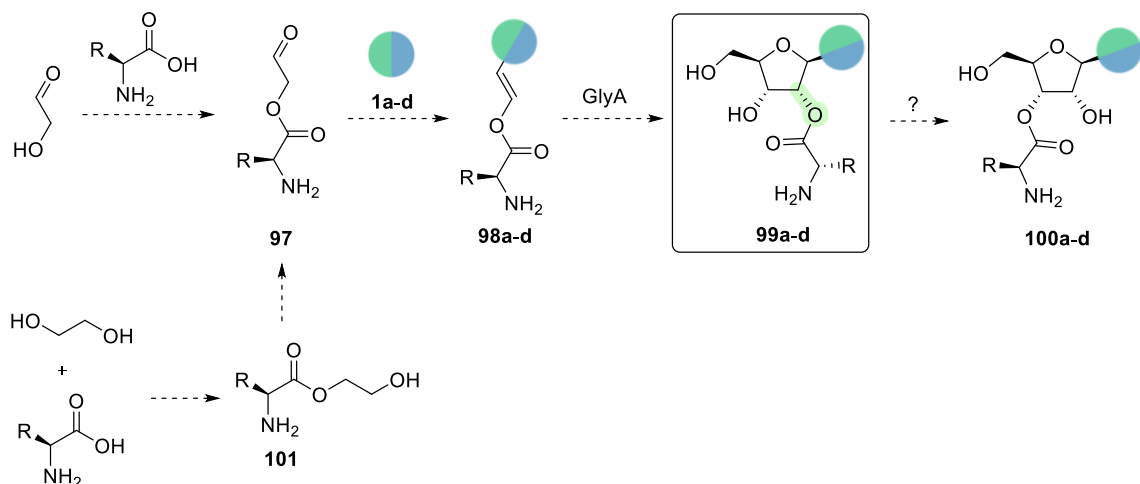
N-Verknüpf:**C-Verknüpf:**

Abbildung 51. Darstellung der antizipierten Reaktionen zu den C- und N-verknüpften tRNA-Nukleosid-Analoga mit den Nukleobasen, GA und GlyA, sowie einer Aminosäure. R = Rest einer kanonischen Aminosäure.

Bei der C-verknüpften Variante sollte es zuerst zur Veresterung und damit Schützung des Glykolaldehyds mit einer Aminosäure kommen (**97**). Falls dies aufgrund von Nebenreaktionen des Aldehyds unter anderem mit dem Amin der Aminosäure nicht erfolgreich ist, könnte die Aminosäure mit Glykol verestert werden (**101**). Durch Oxidation sollte dies in **97** überführbar sein, wodurch eine anschließende Kondensation mit der Nukleobase (**1a-d**) zur Bildung von Enamin **98a-d** führen sollte. Reaktion von **98a-d** mit GlyA sollte zum Ringschluss mit der Aminosäure in der 2'-Position (**99a-d**) führen. Möglicherweise können Bedingungen gefunden werden, die die Wanderung der Aminosäure zur 3'-Position (**100a-d**) ermöglichen, sodass unter anderem die Entstehung des in der Natur vorkommenden Adenosin A76 präbiotisch erklärt werden könnte.

Für einen eindeutigen Nachweis der Bildung der antizipierten Produkte mittels UHPLC-QTOF-MS, mussten Referenzstrukturen synthetisiert werden. Die Herstellung eben dieser ist in Kapitel 4.2.3 erläutert. Nachfolgend werden die Ergebnisse der präbiotischen Synthese der N- und C-verknüpften Nukleoside beschrieben. Die ausführlichen Bedingungen der präbiotischen Reaktionen sind in Kapitel 6.4.2 zusammengefasst.

N-Verknüpfung

Es sollte die präbiotische Synthese eines möglichen *N*-verknüpften tRNA-Vorläufersystems untersucht werden (**Abbildung 52**). Als Bausteine wurden Adenin, Alanin, sowie GA und GlyA verwendet.

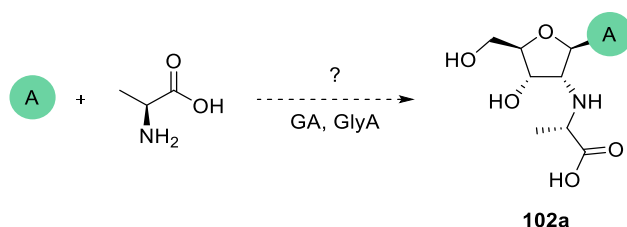


Abbildung 52. Geplante Untersuchung der Synthese von 2'-*N*-verknüpften tRNA-Nukleosid-Analoga (z.B. **102a**).

Die Analyse der Produkte sollte mittels UHPLC-QTOF-MS erfolgen, weshalb die Referenzstrukturen **102a** und **103a** synthetisiert wurden (**Abbildung 53**). Bei der Arabinosyl-Variante wurde nicht nur die Verknüpfung mit L-Alanin (**103a**), sondern auch mit D-Alanin (**104a**) hergestellt. Außerdem konnte **105a** und **106a** mit einer Aminfunktion anstelle der Aminosäure in der 2'-Position synthetisiert werden. Die genaue Synthese der Strukturen ist in Kapitel 4.2.3 genauer erläutert.

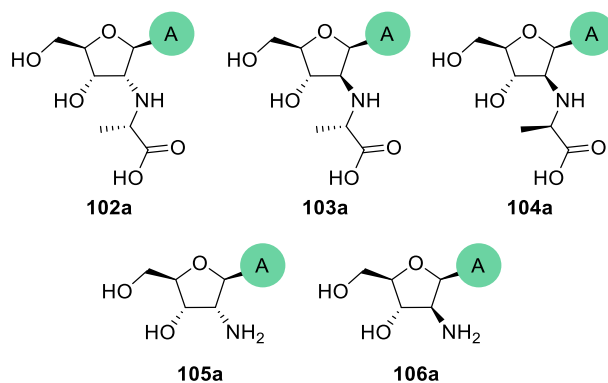


Abbildung 53. Hergestellte Referenzen für die Koinjektion der präbiotischen Reaktionen.

Die entworfene präbiotische Syntheseroute basiert auf mehreren aufeinanderfolgenden Schritten (**Abbildung 54**). Um die möglichen Nebenreaktionen mit zusätzlichen funktionellen Gruppen der Aminosäure zu Beginn zu umgehen, wurde Alanin als einfache Aminosäure verwendet.

N-Verknüpf:

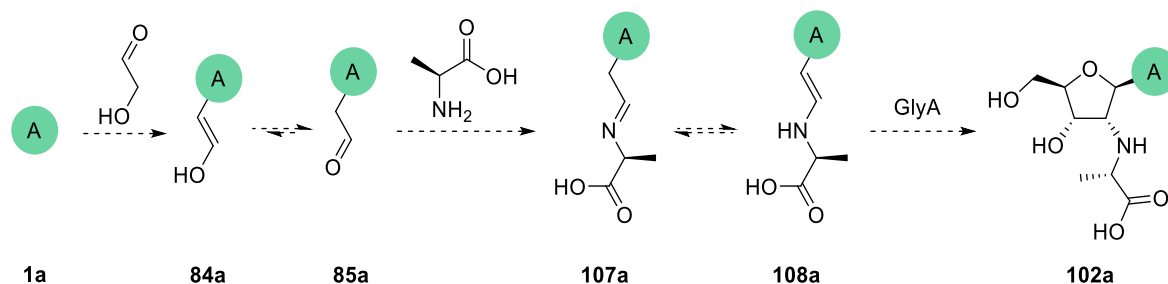


Abbildung 54. Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte der präbiotischen Reaktion, die zur Bildung von **102a** führen sollen.

Zuerst sollte es zur Bildung des Enamins **84a** durch Kondensation von Adenin und Glykolaldehyd kommen. Aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie sollte es zur Bildung von **85a** kommen, das wiederum über eine Kondensationsreaktion mit Alanin Imin **107a** bilden sollte. Durch die Tautomerie zu Enamin **108a**, kann es anschließend zu einem nukleophilen Angriff am Glycerinaldehyd kommen. Dies ergibt eine offenkettige Zuckereinheit, die nach einem Ringschluss zum Furanosid das gewünschte Produkt **102a** hervorbringen sollte.

Erste präbiotische One-Pot Versuche mit Adenin, GA, GlyA und L-Alanin bei 50 °C in H₂O, MeOH/H₂O 99:1 oder im Trockenen, zeigten keine Produktbildung. In **Abbildung 55** ist, beispielhaft für alle Ansätze, die Messung der Reaktion von Adenin, GA, GlyA und L-Alanin im Trockenen bei 50 °C nach drei Tagen mit einer Messung der Referenzstruktur **102a** dargestellt.

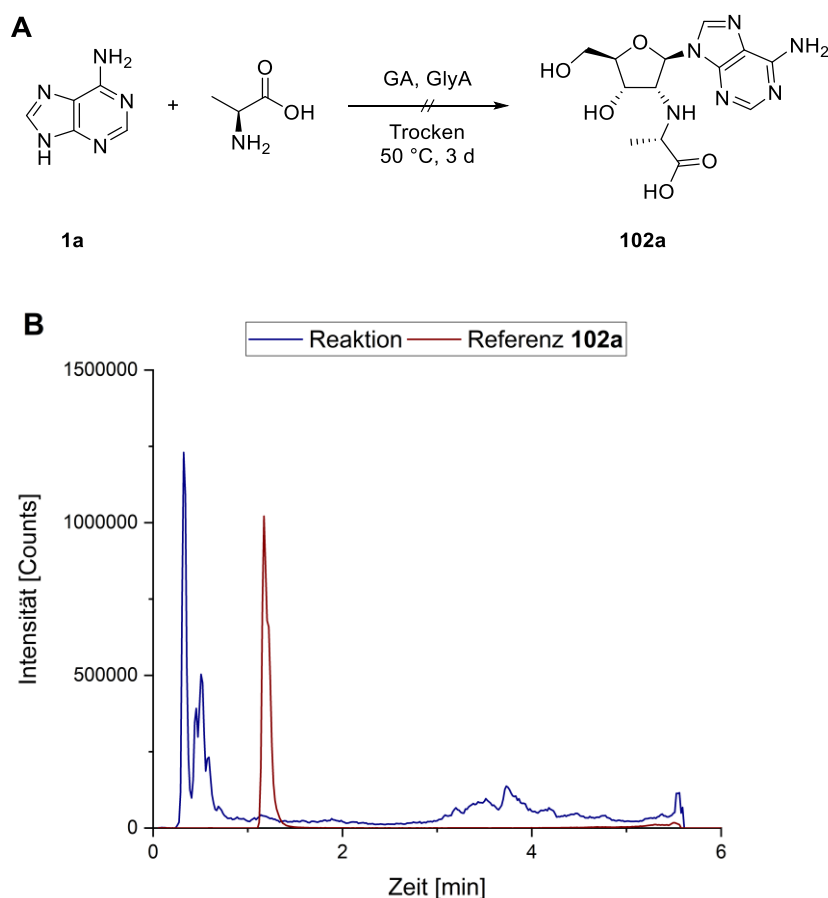


Abbildung 55. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion von Adenin, GA, GlyA und L-Alanin im Trockenen nach 3 d. **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau. Messung der Referenz **102a** in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode D, Massenfilter $m/z = 339,1377 - 339,1445$).

Um die Detektion der Produkte zu vereinfachen und aufzuklären, ob die beiden letzten Schritte, die Kondensation der Aminosäure zu **108a** und die Ringschlussreaktion zu **102a**, funktionieren, wurde eines der vorgeschlagenen Zwischenprodukte, **85a**, synthetisch hergestellt (**Abbildung 56**). Hierfür wurde Adenin mit 2-Brom-1,1-diethoxy-ethan (**109**) und K_2CO_3 erhitzt und Vollacetal **110a** konnte hergestellt werden. Entschützung von **110a** mit HCl führte zur erfolgreichen Synthese von **85a** in Form des HCl Salzes (**A**).

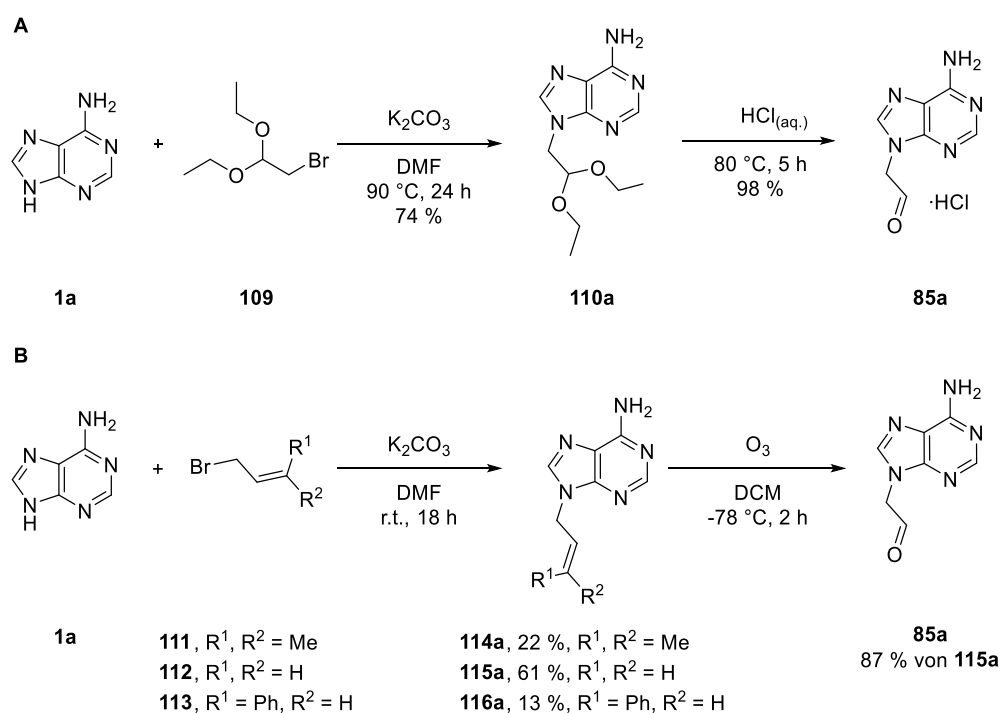


Abbildung 56. A) Synthese von **85a** als HCl Salz ausgehend von Adenin über Vollacetal **110a**. **B)** Alternative Herstellung von **85a** durch Ozonolyse.

Um das Vorhandensein von HCl in der präbiotischen Probe zu umgehen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein alternativer Syntheseweg zu **85a** mittels Ozonolyse etabliert (**B**). Das Produkt der Ozonolyse **85a** ist nicht säulbar, da bei der Verwendung von protischen Lösungsmitteln das Problem der Hydrat- bzw. Halbacetalbildung zu Tage tritt. Deshalb wurden drei verschiedenen Alkene getestet, um zum einen die höchste Ausbeute im ersten Schritt als auch in der Ozonolyse zu identifizieren und eventuell eine bessere Aufreinigung ermöglichen zu können. Hierfür wurde Adenin mit den Alkenen **111**, **112** oder **113** mit K₂CO₃ in DMF versetzt und es konnten die Produkte **114a**, **115a** und **116a** isoliert werden. Allerdings sind die Ausbeuten der Synthesen teils sehr schlecht. Die anschließende Ozonolyse verläuft teilweise nicht vollständig und nur bei Verwendung von **115a** konnte ein sauberes Produkt (**85a**) isoliert werden.

Für die präbiotischen Versuche wurde **85a** zuerst als HCl Salz und später als die freie Verbindung eingesetzt. Es wurden sowohl One-Pot Reaktionen als auch die schrittweise Zugabe der Reaktanten, vor allem GlyA, getestet (**Abbildung 57**).

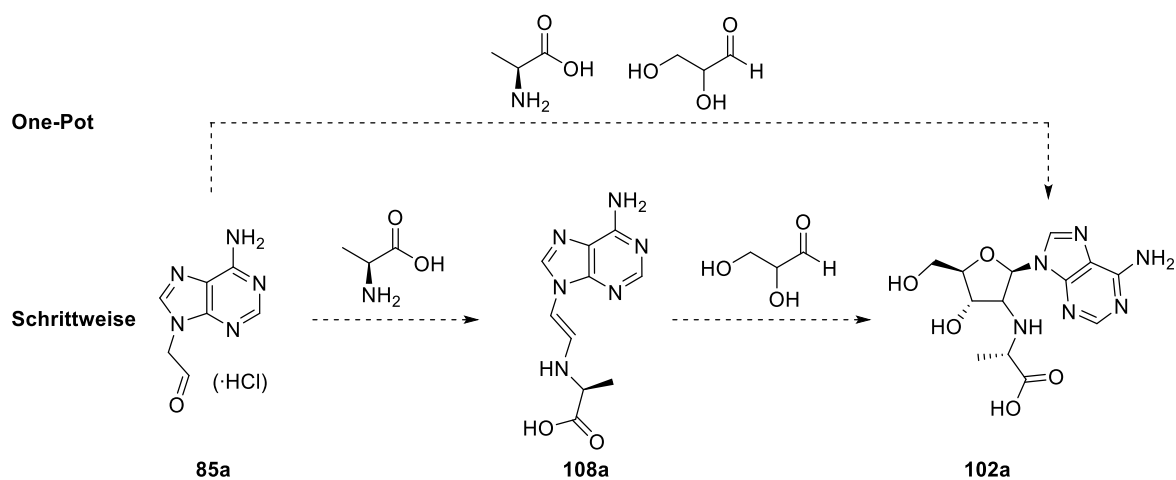


Abbildung 57. Präbiotische Syntheseroute ausgehend von Adenin-Aldehyd **85a** als One-Pot Reaktion oder mit schrittweiser Zugabe von L-Alanin und GlyA.

Als Lösungsmittel wurden H_2O , MeOH, MeOH/ H_2O 99:1 und DMF getestet und die Temperatur der durchgeführten Reaktionen betrug $50\text{ }^\circ\text{C}$. Bei den One-Pot Reaktionen wurden als Additive AgNO_3 , Na_2CO_3 und NaOAc untersucht, sowie eine Variation der Stöchiometrie der Reaktanten und das Einstellen des pH-Werts auf 7 und 11 getestet. Eine Messung einer One-Pot Reaktion sowie der Referenz **102a** ist in **Abbildung 58** dargestellt.

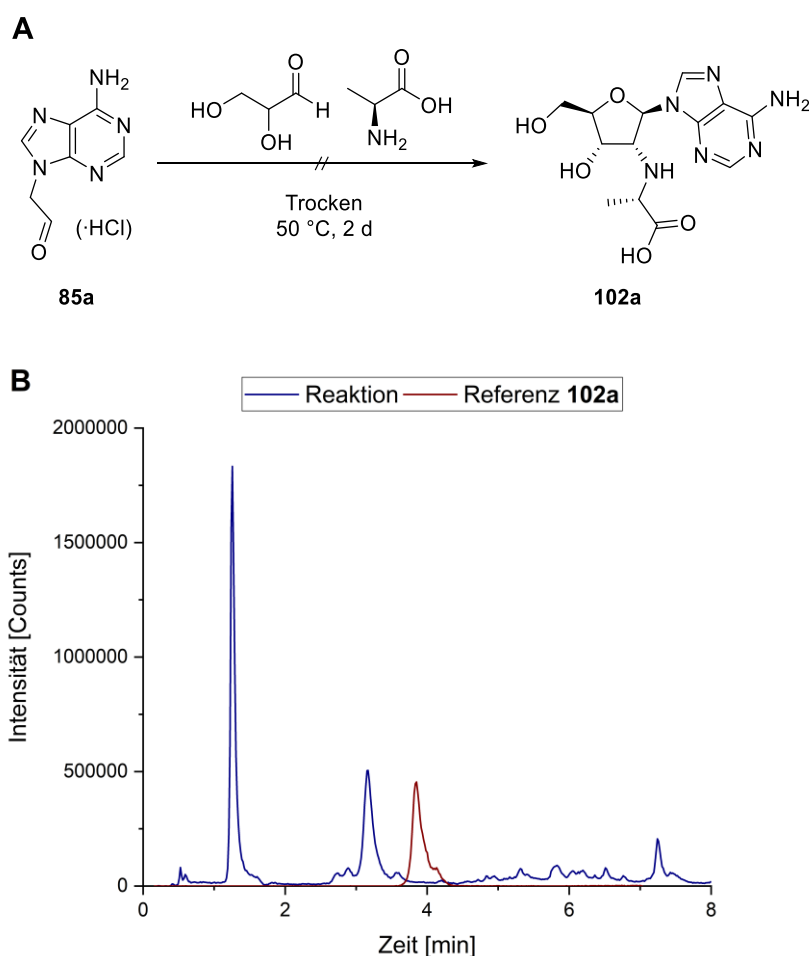


Abbildung 58. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion von **85a**, GlyA und L-Alanin im Trockenen bei 50 °C nach zwei Tagen. **B)** Chromatogramm der Reaktion in blau. Messung der Referenz **102a** in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode H, Massenfilter $m/z = 339,1377 - 339,1445$).

Außerdem sollte der Einfluss der Chiralität der Aminosäure genauer betrachtet werden, indem L-Alanin, D-Alanin oder eine diastereomere Mischung zugegeben wurde. Doch auch hier konnte keine Produktbildung detektiert werden.

Bei den Ansätzen mit der schrittweisen Zugabe von Alanin und GlyA wurden die Äquivalente und der Zeitpunkt der Zugabe von GlyA variiert. Außerdem wurde der pH-Wert auf pH 7 und 11 eingestellt. Teilweise konnte die Produktmasse mittels HRMS-ESI detektiert werden, doch die Analyse mittels UHPLC-QTOF-MS der relevanten Proben konnte keine Produktbildung nachweisen (**Abbildung 59**). Es scheinen sich folglich verschiedene Isomere zu bilden. Dies könnte der Fall sein, wenn der Ringschluss noch nicht stattgefunden hat oder Glycerinaldehyd an einer anderen Position im Molekül reagiert hat.

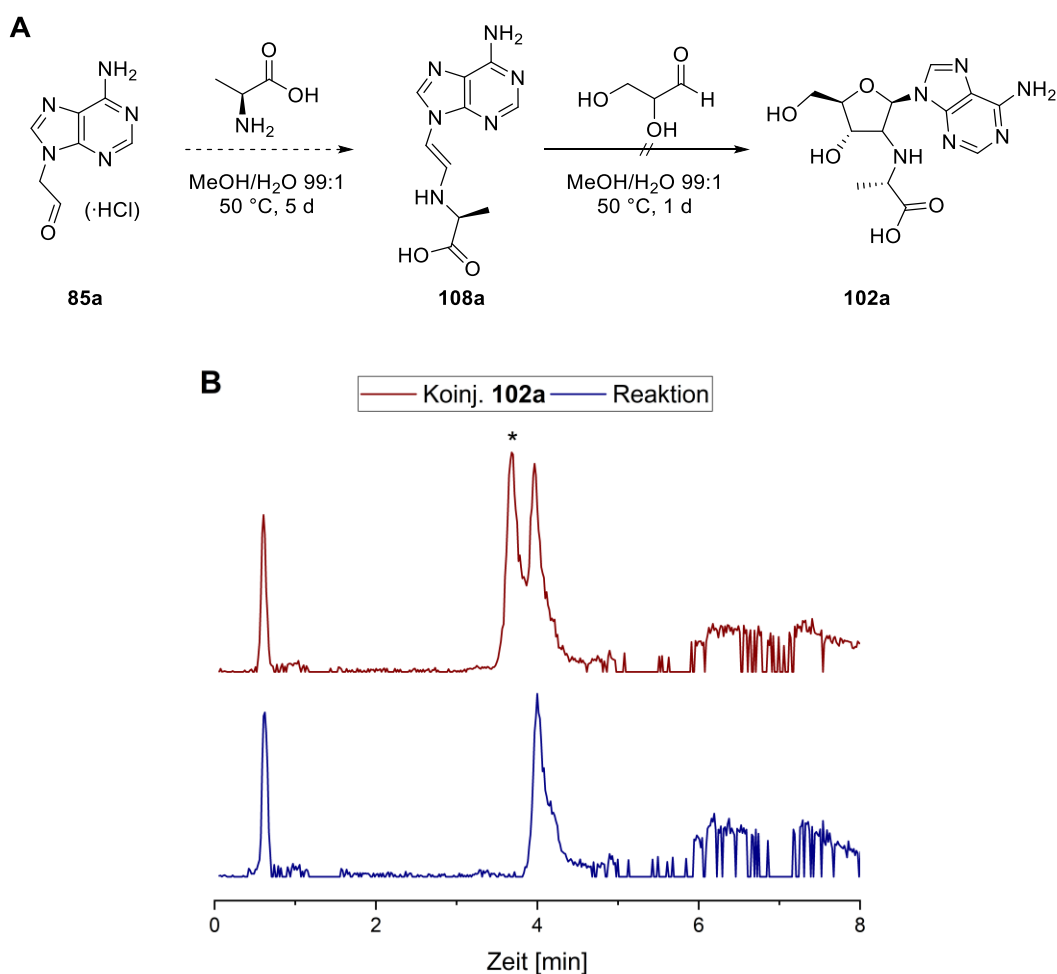


Abbildung 59. A) Reaktion der präbiotischen Reaktion von Adenin-Aldehyd **85a** und L-Alanin mit Zugabe von GlyA nach fünf Tagen in MeOH/H₂O 99:1 bei 50 °C gemessen einen Tag nach Zugabe von GlyA. **B)** Chromatogramm der Reaktion in blau (unten). Koinjektion der präbiotischen Reaktion mit Referenz **102a** in braun (oben). Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode H, Massenfilter $m/z = 339,1377 - 339,1445$). * = Peak der Referenz.

Für ein *proof-of-concept* wurde ein vereinfachtes Modellsystem getestet. Anstelle einer Aminosäure wurde Ammoniak der Reaktion zugesetzt, um die Bildung von **105a** oder **106a** nachzuweisen (**Abbildung 60**). Es konnte erneut keine Produktbildung detektiert werden.

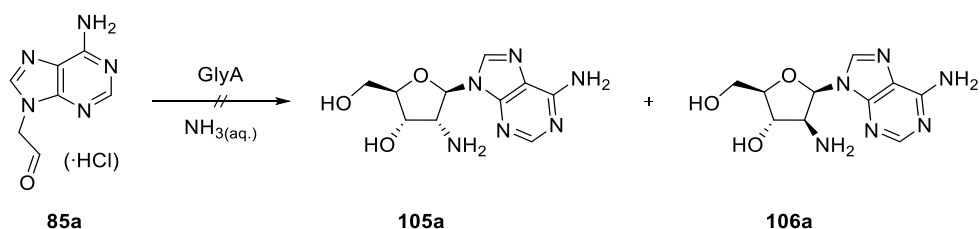


Abbildung 60. Bildung von **105a** oder **106a** als vereinfachtes System, um das Konzept der Reaktionen zu bestätigen.

C-Verknüpfung

Es sollte die präbiotische Synthese eines möglichen 2'-C-verknüpften tRNA-Vorläufersystems untersucht werden und ob eine Wanderung der Aminosäure in die 3'-Position, wie in A76 in der Natur vorkommend, möglich ist (**Abbildung 61**).

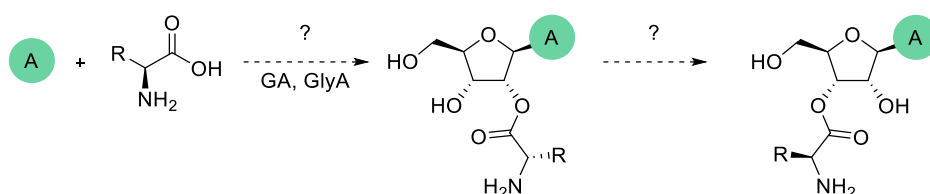
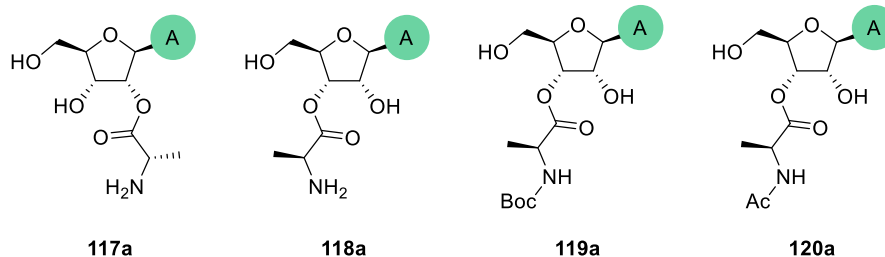


Abbildung 61. Übersicht der geplanten Untersuchungen: Zuerst die Bildung des 2'-tRNA-Nukleosid-Analogon, gefolgt von der möglichen Wanderung der Aminosäure in die 3'-Position.

Die Analyse der Produkte sollte mittels UHPLC-QTOF-MS erfolgen, weshalb Referenzstrukturen synthetisiert wurden. Bei der Synthese der auf Adenosin basierten Referenzsubstanzen konnte die Wanderung der Aminosäure von der 2'- in die 3'-Position der Ribosylform während der Desilylierung mit HF·Pyridin beobachtet werden. Nachfolgend ist die 2'-Variante bei den präbiotischen Reaktionen gezeichnet, es könnte aber auch zu einer Wanderung in die 3'-Position kommen, die in der Natur bevorzugt wird. Es konnten die Strukturen mit *N*-ungeschütztem L-Alanin als Regioisomerengemisch in der 2'-(**117a**) und 3'-(**118a**)-Form synthetisiert werden. Bei den *N*-geschützten-L-Alanin-Nukleosiden **119a** und **120a** konnte als Hauptprodukt die 3'-Variante hergestellt werden. Teilweise konnten Spuren einer zweiten Spezies bei UHPLC-QTOF-MS-Messungen beobachtet werden, hierbei sollte es sich um die 2'-Variante handeln. Bei der Synthese der Vidarabin-Derivate **121a** und **122a** konnte erfolgreich das 2'-Isomer isoliert werden.

Ribosyl-Derivate:



Arabinosyl-Derivate:

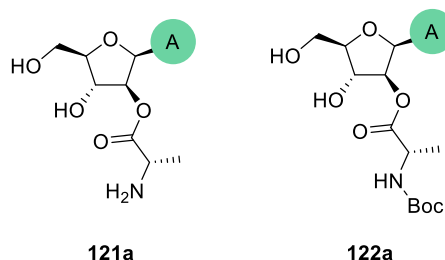


Abbildung 62. Hergestellte Referenzen für die antizipierten Produkte der präbiotischen Reaktionen.

Da bei der C-terminalen Verknüpfung eine direkte One-Pot Reaktion aus den einzelnen Bausteinen, Adenin, Alanin, GA und GlyA, für die präbiotische Synthese nicht möglich ist, muss zunächst eine vorherige Veresterung der Aminosäure mit Glykolaldehyd erfolgen. Hierfür wurde *N*-Boc-L-Ala-OH (**123**) mit 2-Brom-1,1-diethoxy-ethan (**109**) und Cs_2CO_3 in DMF erhitzt (**Abbildung 63**). Das erhaltene Vollacetal **124** konnte unter sauren Bedingungen zum L-Alanin-Glykolaldehydester **125** entschützt werden. Abhängig von der Wahl der Säure liegt **125** entweder als TFA- oder als HCl-Salz vor.

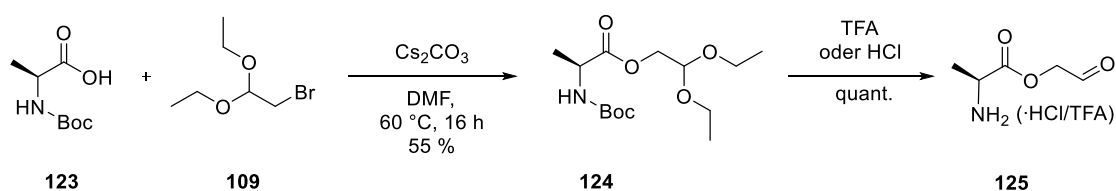


Abbildung 63. Synthese des L-Alanin-Glykolaldehydesters **125** ausgehend von *N*-Boc-L-Alanin-OH (**123**).

Ausgehend von **125** wurden präbiotische Reaktionen angesetzt, um die Synthese von **117a** zu erreichen. Hierbei wurden wie zuvor bei der N-terminalen-Verknüpfung sowohl One-Pot Reaktionen als auch Reaktionen mit schrittweiser Zugabe von Adenin und GlyA untersucht (**Abbildung 64**).

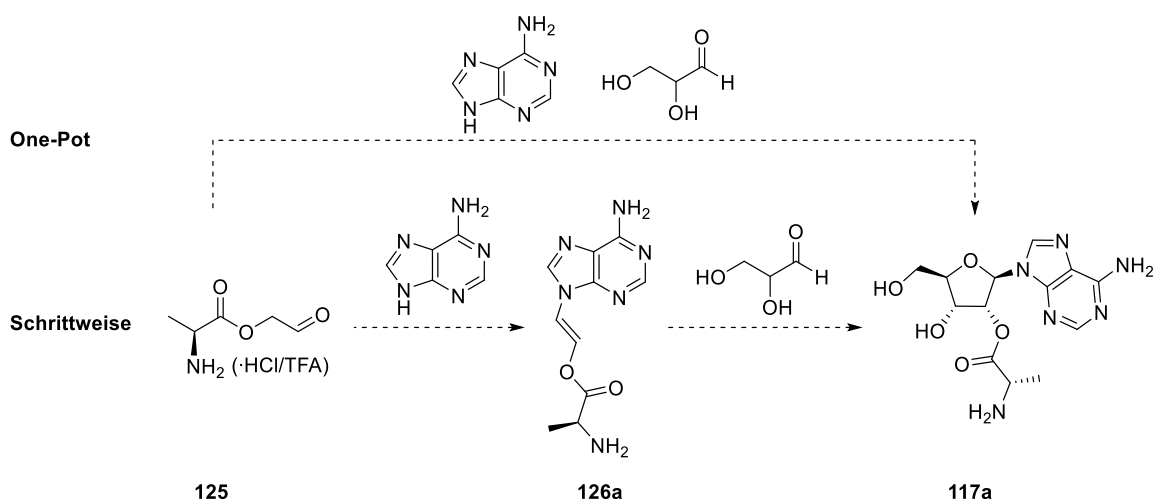


Abbildung 64. Präbiotische Syntheseroute ausgehend von L-Alanin-Glykolaldehydester **125** als One-Pot Reaktion oder mit schrittweiser Zugabe von Adenin und GlyA.

Bei den One-Pot Reaktionen wurden als Lösungsmittel DMF, MeOH/H₂O 99:1 verwendet und auch Reaktionen ohne Lösungsmittel wurden getestet. Als Additive wurden NaOAc, Na₂HPO₄ oder Imidazol eingesetzt und die Reaktionen liefen bei 50 °C ab. Bei der schrittweisen Zugabe von Adenin gefolgt von GlyA wurden NaOAc, Na₂HPO₄, NaHCO₃ oder Imidazol zugegeben und als Temperaturen wurden r.t. und 50 °C getestet. Die Stöchiometrie und die zeitliche Zugabe von GlyA wurden variiert und die Reaktionen liefen in MeOH und DMF ab oder wurden ohne Lösungsmittel durchgeführt. Analyse mittels HRMS-ESI zeigte die Entstehung der Produktmasse in manchen Reaktionen doch Überprüfung durch UHPLC-QTOF-MS zeigte keine Übereinstimmung mit den Referenzsubstanzen (**127a**). Dies lässt darauf schließen, dass sich Isomere gebildet haben müssen (**Abbildung 65**). So können zum Beispiel die Aldehyde an unterschiedlichen Stellen des Adenins reagiert haben (**129a**) und/oder es liegt eine offenkettige Form vor (**128a**).

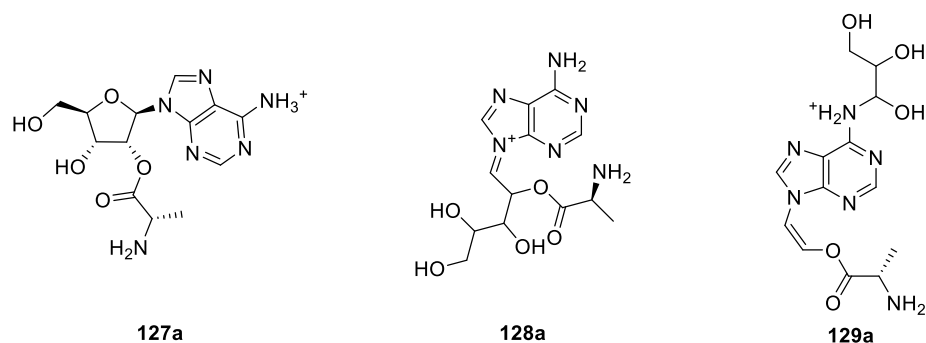


Abbildung 65. Gewünschte Produktstruktur **127a** und zwei andere mögliche Isomere mit identischer Masse.

Ergebnisse und Diskussion

Ein weiteres Problem in der Herstellung von **127a** kann die Verwendung von **125** als Salz sein. Das Vorhandensein von HCl/TFA in den präbiotischen Proben ist nicht gewollt und deren Einfluss auf die Reaktion konnte bisher nicht geklärt werden. Außerdem ist die Entfernung dieser Ionen problematisch, da sich in protischen Lösungsmitteln Hydrate oder Halbacetale bilden, wodurch u.a. die Verwendung von Ionentauschern nicht möglich war. Deshalb wurde eine Synthese zu verschiedenen *N*-geschützten L-Alanin-Glykolaldehydestern **131** mittels Ozonolyse von **130** entworfen (Abbildung 66).

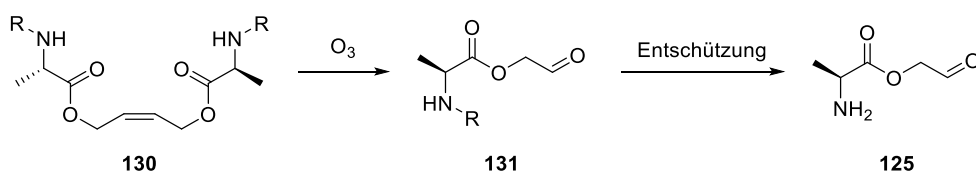


Abbildung 66. Synthese von **125** mittels Ozonolyse und anschließender Entschützung des Amins.

Die jeweiligen Schutzgruppen sollten durch unterschiedliche Bedingungen bzw. Einsatz von verschiedenen Reagenzien entfernbar sein, um ein breites Feld an Möglichkeiten zur Herstellung von **125** zu ermöglichen. Untersucht wurde zuerst die Synthese der Boc-, Cbz-, Acetyl- und Fmoc-geschützten Derivate (**131m-p**) (Abbildung 67), da somit saure, alkalische sowie reduktive Entschützungsbedingungen getestet werden können. Außerdem gilt die Acetyl-Schutzgruppe als präbiotisch plausibel.^[240-241] Der erste Schritt ist die Veresterung der *N*-geschützten L-Alanine (**132m-p**) mit 2-Buten-1,4-diol (**133**) unter Verwendung von EDCI und DMAP.

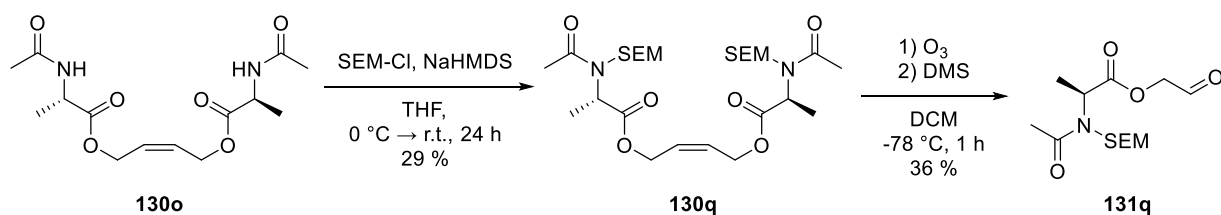
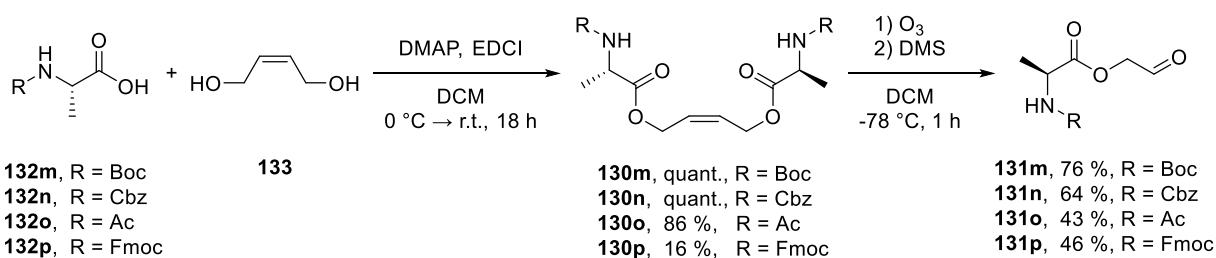


Abbildung 67. Syntheseweg der Boc-(**131m**)-, Fmoc-(**131p**)-, Acetyl-(**131o**)-, Cbz-(**131n**)- und Acetyl-SEM-(**131q**)-geschützten L-Alanin-Glykolaldehydestere. R = Aminschutzgruppe.

Bei der Ozonolyse wurde eine reduktive Aufarbeitung der Sekundärozonide mit DMS gewählt, um die entsprechenden Aldehyde zu erhalten. Die Reaktion verlief nur mit der Boc-, Cbz- und Fmoc-Schutzgruppe erfolgreich (**131m,n,p**). Bei der Acetyl-geschützten Variante (**131o**) konnte eine Überoxidation des Produkts beobachtet werden. Eine mögliche Ursache könnte die vergleichsweise geringe Größe der Acetylgruppe sein, weshalb SEM als zusätzliche Schutzgruppe am Amin eingeführt wurde (**130q**). Die Ozonolyse eben dieses ergab den doppelt geschützten L-Alanin-Glykolaldehydester **131q**. Weitere Untersuchungen der Ozonolyse von **130n** zeigten, dass längeres Durchblubbern von Sauerstoff bzw. eines Schutzgases, um überschüssiges O₃ vor der Zugabe von DMS zu verdrängen, die Überoxidation verhindert. Somit konnten alle ursprünglich geplanten *N*-geschützten L-Alanin-Glykolaldehydester **131m-p** erhalten werden.

Die möglichen Entschützungsbedingungen der bisher synthetisierten Ester beschränken sich auf saure oder basische, sowie reduktive Bedingungen. Um ein breiteres Spektrum an Entschützungsmöglichkeiten zu ermöglichen, sollten weitere *N*-geschützte L-Alanin-Glykolaldehydester hergestellt werden. Als weitere interessante Schutzgruppen wurde TEOC, abspaltbar mit Fluoriden, und NBOC eine photolytisch instabile Gruppe angesehen. Gestartet wurde die Synthese ausgehend von **130m**, das durch Boc-Entschützung und Entfernung des HCl-Salzes in das freie L-Alanin-Alken **130r** überführt werden konnte, an welchem nun die gewünschten Schutzgruppen installiert werden konnten (**Abbildung 68**).

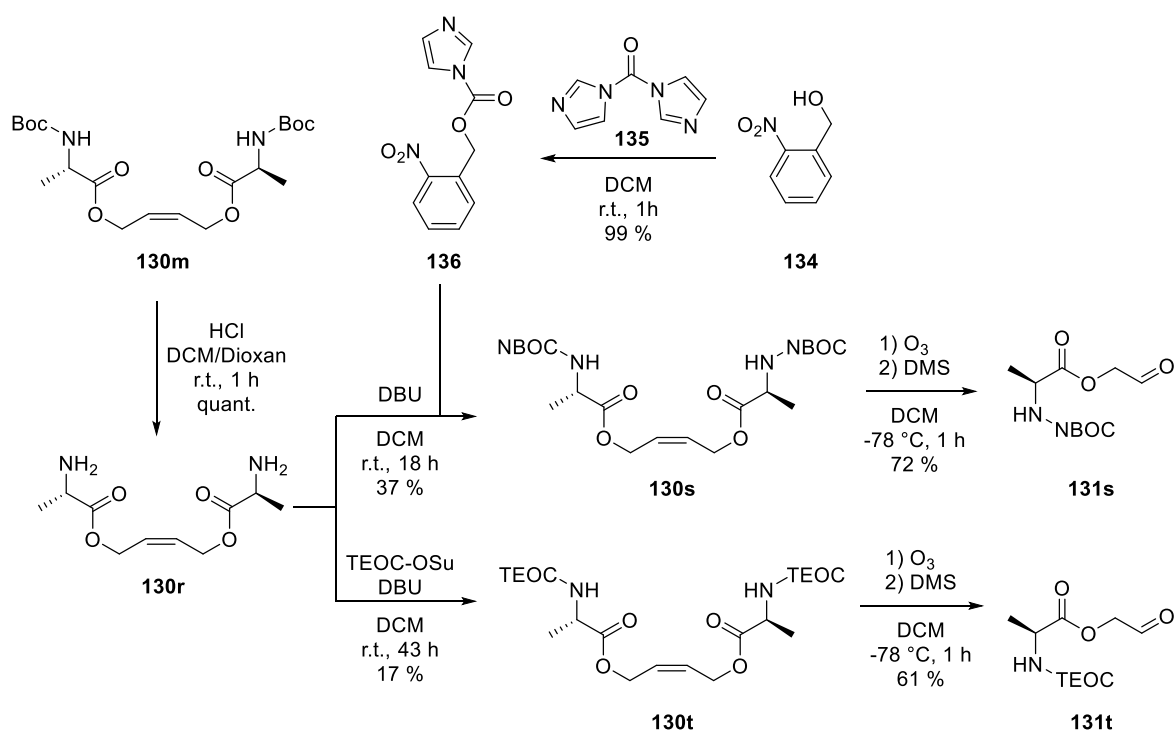


Abbildung 68. Syntheseweg der TEOC-(**131t**)- und NBOC-(**131s**)-geschützten L-Alanin-Glykolaldehydester.

Für die NBOC-Schutzgruppe musste das Reagenz **136** durch Reaktion von 2-Nitrobenzylalkohol (**134**) und CDI (**135**) hergestellt werden, bevor die Schützung von **130r** mit eben diesem sowie NaH und [18]Krone-6 durchgeführt werden konnte. Bei der Einführung der TEOC-Schutzgruppe wurde 1-[2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyloxy]pyrrolidin-2,5-dion (TEOC-OSu) und DBU verwendet. Die anschließende Ozonolyse verlief mit beiden Schutzgruppen problemlos in guter Ausbeute.

Nach erfolgreicher Synthese der *N*-geschützten L-Alanin-Glykolaldehydestern **131m-q,s,t** konnte mit der Entschützung der Amine begonnen werden (**Abbildung 69**). Die Boc-Entschützung (**131m**) unter sauren Bedingungen mit HCl verlief erfolgreich, allerdings handelt es sich bei dem erhaltenen Produkt erneut um das HCl-Salz. Die Entschützungen unter basischen Bedingungen, Acetyl (**131o**) oder Fmoc (**131p**) mit Piperidin und NEt_3 , zeigten keine erfolgreiche Produktformation. Bei der reduktiven Cbz-Entschützung (**131n**) konnte ebenso kein Produkt isoliert werden. Hier funktionierte die Entschützung, allerdings zyklisierte das erhaltene Produkt sofort zum korrespondierenden Imin und wurde mit Pd/C und H_2 reduziert. Bei der photolytischen Abspaltung der NBOC-Gruppe (**131s**) bei 365 nm konnte keine Produktformation beobachtet werden und eine alternative Herstellung von **125** über die Ozonolyse des ungeschützten L-Alanin-Alkens **130r**, verlief nicht erfolgreich. Die Entschützung von **131t** mit TBAF als

Fluoridquelle führte nicht zur Produktbildung, weshalb die Entschützung von **131q** nicht weiter untersucht wurde. Bei diesem Substrat wären zwei Entschützungen erforderlich und sowohl die Acetyl-Entschützung als auch die Entschützung von Silylschutzgruppen waren bisher nicht erfolgreich.

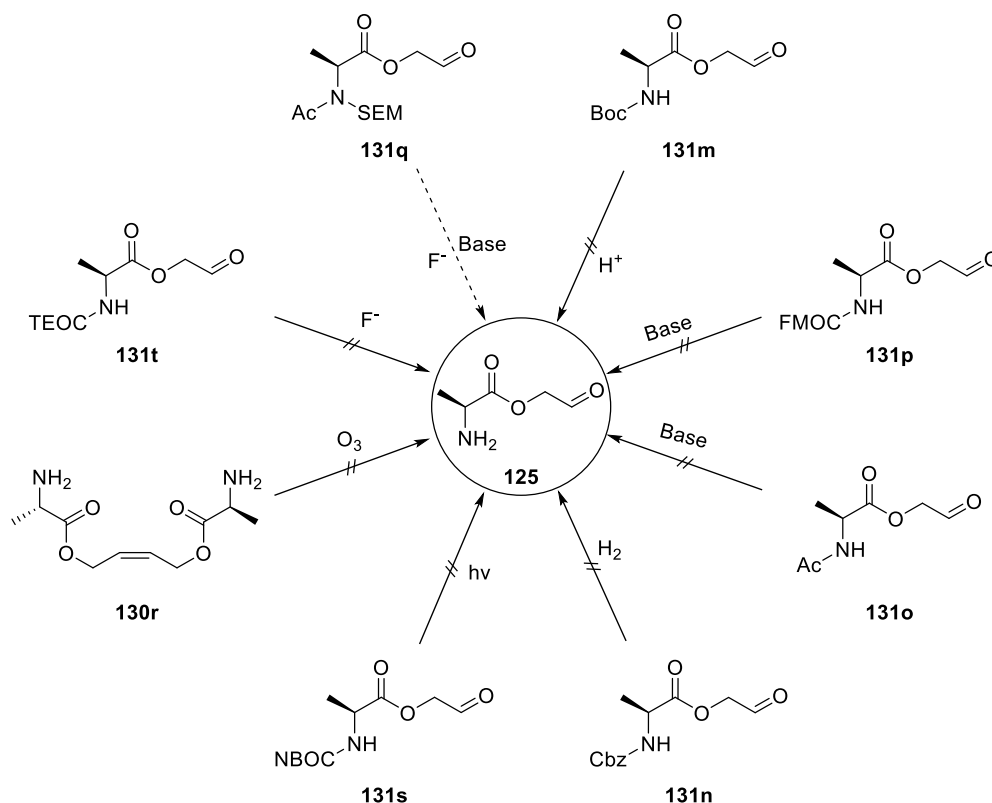


Abbildung 69. Herstellungsmöglichkeiten von **125** durch Entschützung von unterschiedlich geschützten L-Alanin-Glykolaldehydestern (**131**) unter verschiedenen Bedingungen oder durch Ozonolyse von **130r**.

Die Versuche **125** ohne Salze herzustellen wurden eingestellt, da auch die bisherigen präbiotischen Versuche nicht vielversprechend wirkten.

Ein Problem der präbiotischen Reaktionen, abgesehen von der Anwesenheit von Salzen, könnte die freie Aminfunktion sein. Dies könnte zu unerwünschten Nebenreaktionen wie zum Beispiel der intramolekularen Ringschlussreaktion zwischen dem Amin und der Aldehydfunktion führen. Deshalb wurde die entworfene Synthese mit *N*-geschützten L-Alanin-Glykolaldehydestern durchgeführt, um herauszufinden, ob die antizipierten Reaktionen bei Vereinfachung der Aminosäure theoretisch möglich sind.

131m und **131o** wurden als geschützte Varianten von **125** eingesetzt. **131o** könnte eine präbiotisch plausible Verbindung sein und **131m** wurde ausgewählt, da die Referenzsynthesen von **102a** über

Ergebnisse und Diskussion

die *N*-Boc-geschützte Variante synthetisiert wurden und somit bereits die benötigten Referenzsubstanzen vorhanden waren. Des Weiteren wurde neben Adenosin (**2a**) auch Nebularin (**2f**) und *N*⁶,*N*⁶-Dimethyladenosin (DMA) (**2g**) eingesetzt, um den Einfluss der primären Amingruppe der Nukleobase auszuschließen (**Abbildung 70**).

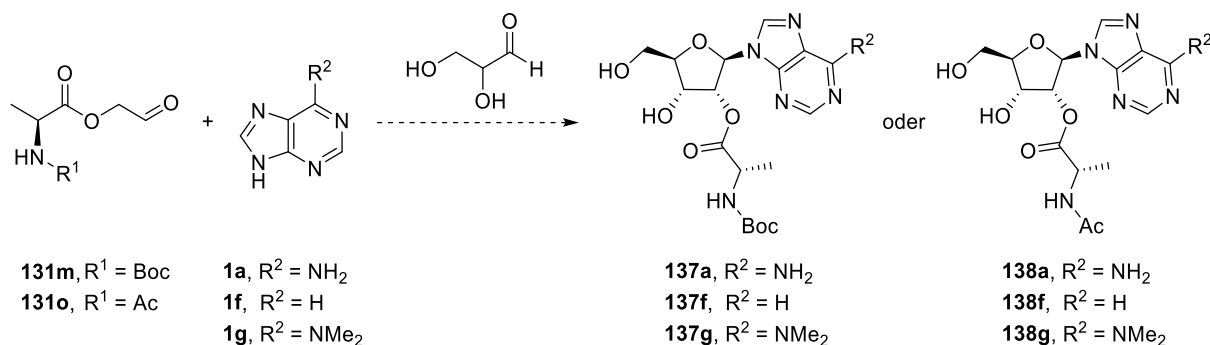


Abbildung 70. Synthese zu vereinfachten und geschützten tRNA-Vorläufer-Nukleosiden. Adenin: $R^2 = \text{NH}_2$, (**137a**, **138a**); Purin: $R^2 = \text{H}$, (**137f**, **138f**); *N*⁶,*N*⁶-Dimethyladenin: $R^2 = \text{NMe}_2$, (**137g**, **138g**).

Nachdem bei den Versuchen zuvor die Reaktionen bei 50 °C und als Pastenreaktionen oder im Trockenen die vielversprechendsten Ergebnisse hervorbrachten, wurden diese Bedingungen auch hier angewendet. *N*-Boc-L-Alanin-Glykolaldehydester **131m** wurde mit GlyA und Adenin oder Purin bei 50 °C im Trockenen gerührt, wohingegen bei *N*⁶,*N*⁶-Dimethyladenin als Nukleobase die Temperatur auf 80 °C erhöht wurde. Auch die schrittweise Zugabe von zuerst **131m** mit Adenin und dann GlyA nach einigen Tagen wurde untersucht. Die Versuche mit *N*-Ac-L-Alanin-Glykolaldehydester **131o** liefen ebenfalls bei 50 °C im Trockenen ab, wobei die Reaktionen mit *N*⁶,*N*⁶-Dimethyladenin und Purin zusätzlich als Pastenreaktionen durchgeführt worden sind.

In **Abbildung 71** ist das Ergebnis der Reaktion von *N*-Boc-L-Alanin-Glykolaldehydester **131m** mit Adenin und GlyA im Trockenen bei 50 °C nach drei Tagen gezeigt.

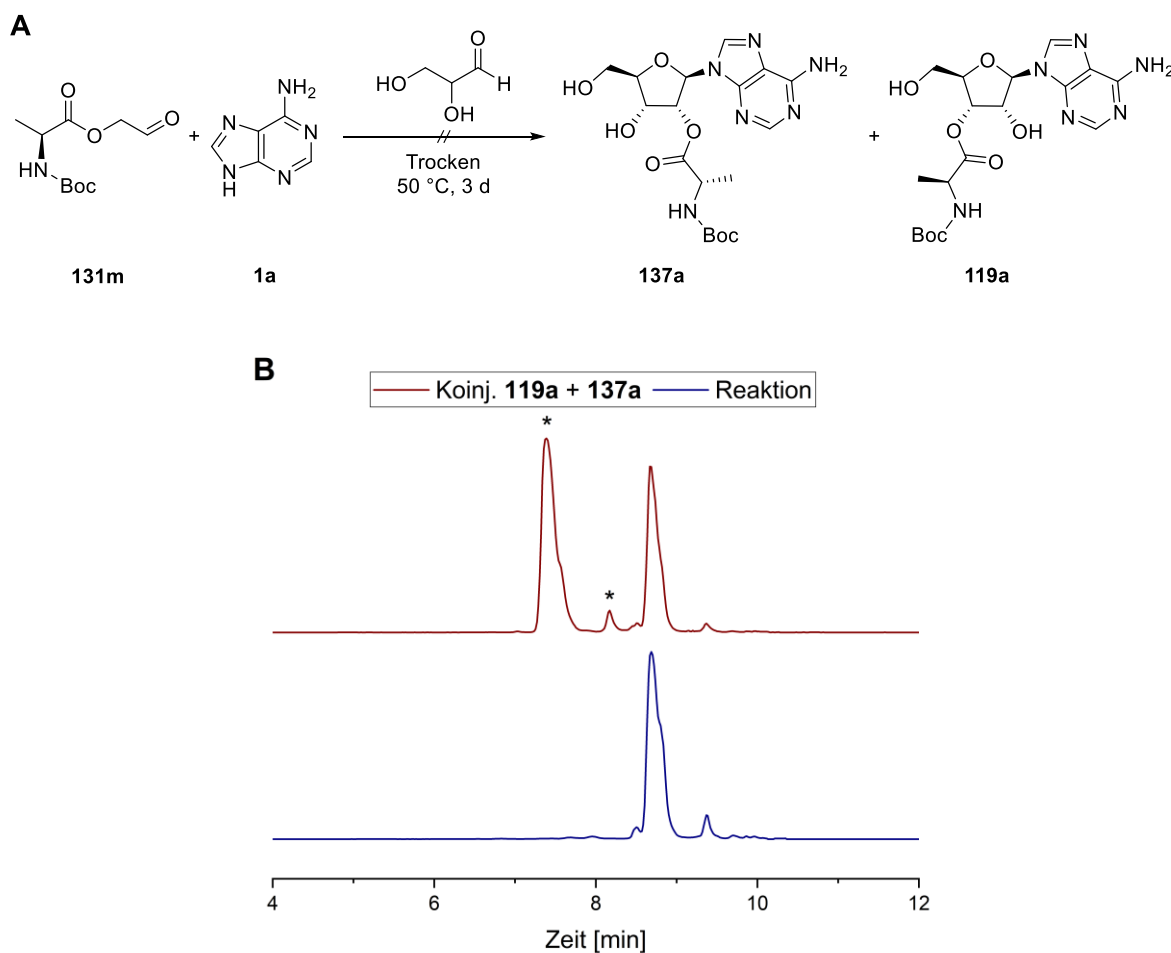


Abbildung 71. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion von **131m** mit Adenin und GlyA im Trockenen bei 50 °C nach drei Tagen. **B)** Chromatogramm der Reaktion in blau. Koinjektion der Reaktion mit **137a** und **119a** in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode G, Massenfilter $m/z = 439,1892 - 439,1980$). * = Peak der Referenz.

Hierbei fällt auf, dass nach Masseextraktion der präbiotischen Reaktion ein sehr markanter Peak vorhanden ist, der für eine selektive Formation eines Isomers spricht. Koinjektion dieser Reaktion mit einer Mischung aus der 2'- und 3'-Ribosyl-Referenz zeigte, dass es sich hierbei nicht um eines der gewünschten Produkte handelte.

Ergebnisse und Diskussion

Die Reaktion von *N*-Ac-L-Alanin-Glykolaldehydester **131o** mit Adenin und GlyA im Trockenen bei 50 °C nach drei Tagen zeigte eine Bildung von drei Peaks mit einer Retentionszeit von um die sechs Minuten (**Abbildung 72**). Koinjektion mit einer Mischung der 2'-und 3'-Form (**138a**, **120a**) zeigte, dass sich auch hier nicht die antizipierten Isomere gebildet haben.

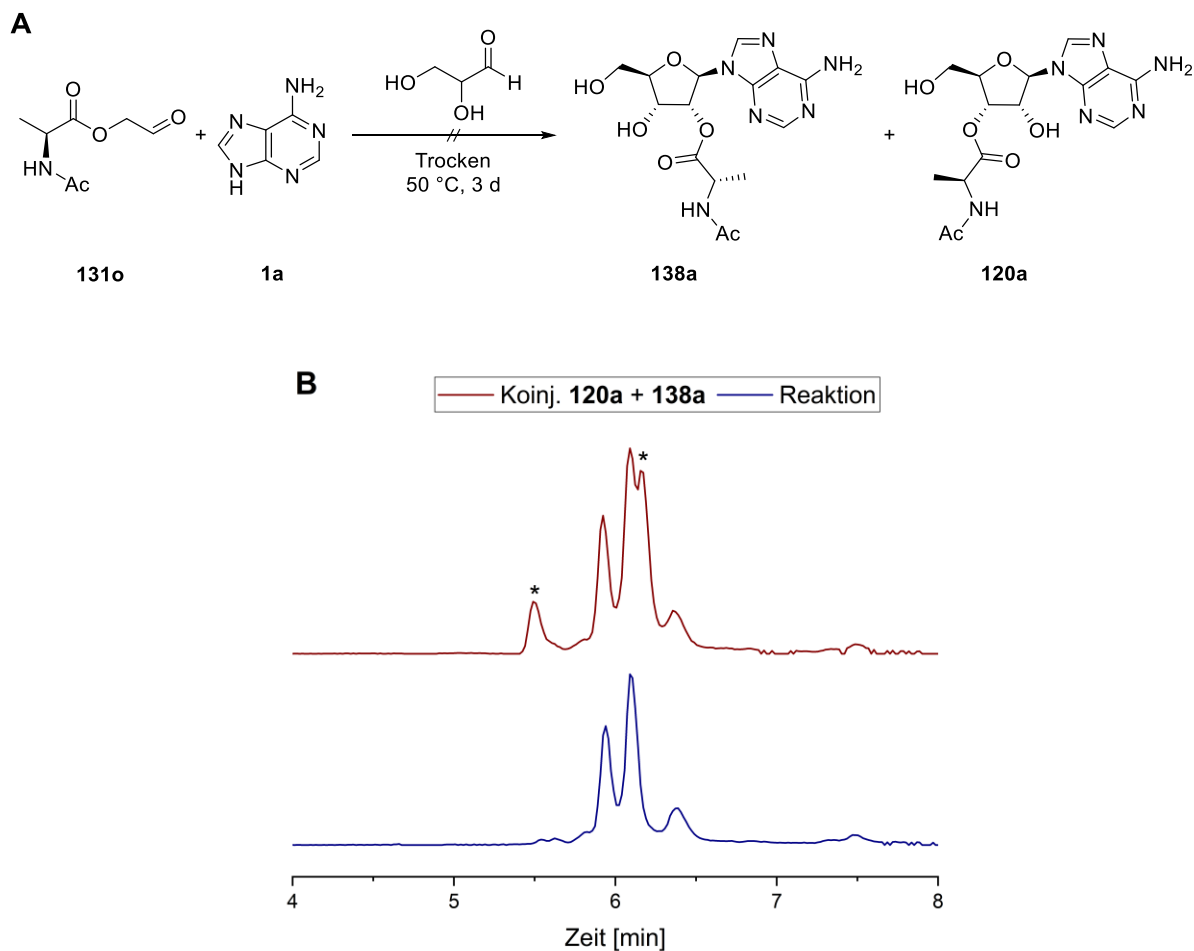


Abbildung 72. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion von **131o** mit Adenin und GlyA bei 50 °C im Trockenen nach einem Tag. **B)** Chromatogramm der Reaktion in blau. Koinjektion der Reaktion mit **138a** und **120a** in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode H, Massenfilter $m/z = 381.1478 - 381.1555$). * = Peak der Referenz.

Bei einer erneuten Wiederholung der Reaktion mit *N*-Boc-L-Alanin-Glykolaldehydester **131m** und Messung der Reaktion nach einem Tag erschien ein ähnlicher Peak, der allerdings eine Schulter aufwies (**Abbildung 73**). Koinjektion mit **122a** zeigte keine Übereinstimmung, aber die Zugabe von **119a** und **137a** zeigte die gleiche Retentionszeit eines Peaks mit der Referenz. Dies ist ein Indiz für die erfolgreiche Bildung der 2'- oder der 3'-Variante.

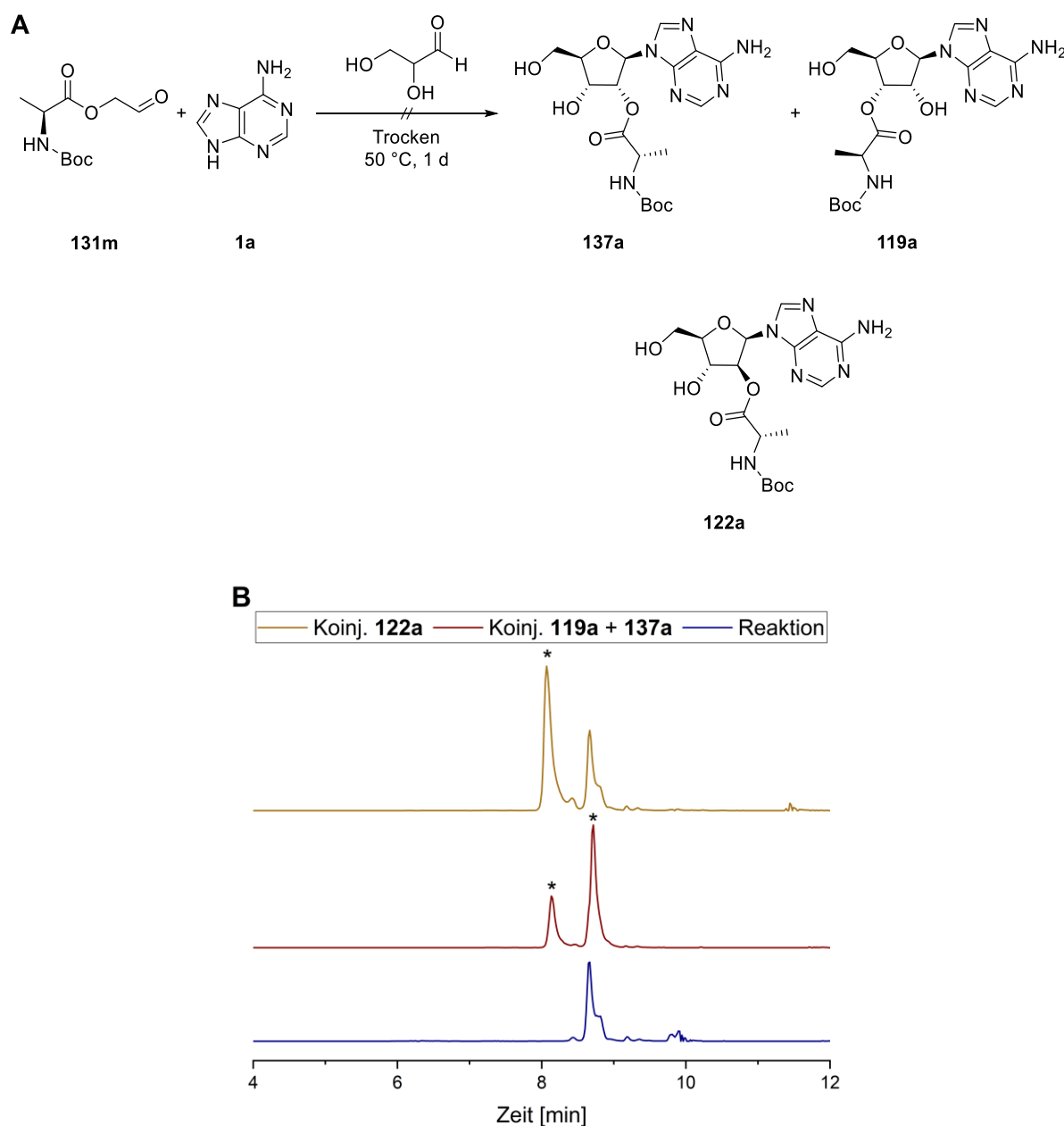


Abbildung 73. Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion von **131m** mit Adenin und GlyA bei 50 °C im Trockenen nach einem Tag. Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau. Koinjektion der Reaktion mit einer 2'- und 3'-Mischung (**119a**, **137a**) in braun. Koinjektion der Reaktion mit **122a** in beige. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode G, Massenfilter $m/z = 439,1892 - 439,1980$). * = Peak der Referenz.

Ergebnisse und Diskussion

Um die Produktbildung auf eine weitere Weise verifizieren zu können, wurden MSMS-Messungen sowohl bei der Reaktionslösung als auch bei den synthetisch hergestellten Referenzen durchgeführt. Hierbei fiel auf, dass sich die Fragmentierungsmuster stark unterschieden. Bei der synthetisch hergestellten Referenz konnten als Hauptfragmentierungsprodukte Adenin (**76**), ein Boc-intern-fragmentiertes Produkt (**139**) und die Produktmasse (**140**) identifiziert werden (**Abbildung 74A**). Der vorhandene Ribosering blieb folglich unangetastet und fragmentierte nicht in Aldehyde oder Kondensationsprodukte. Diese nicht vorhandene Fragmentierung der Ribose konnte auch bei MSMS-Messungen der kanonischen Nukleosiden beobachtet werden.

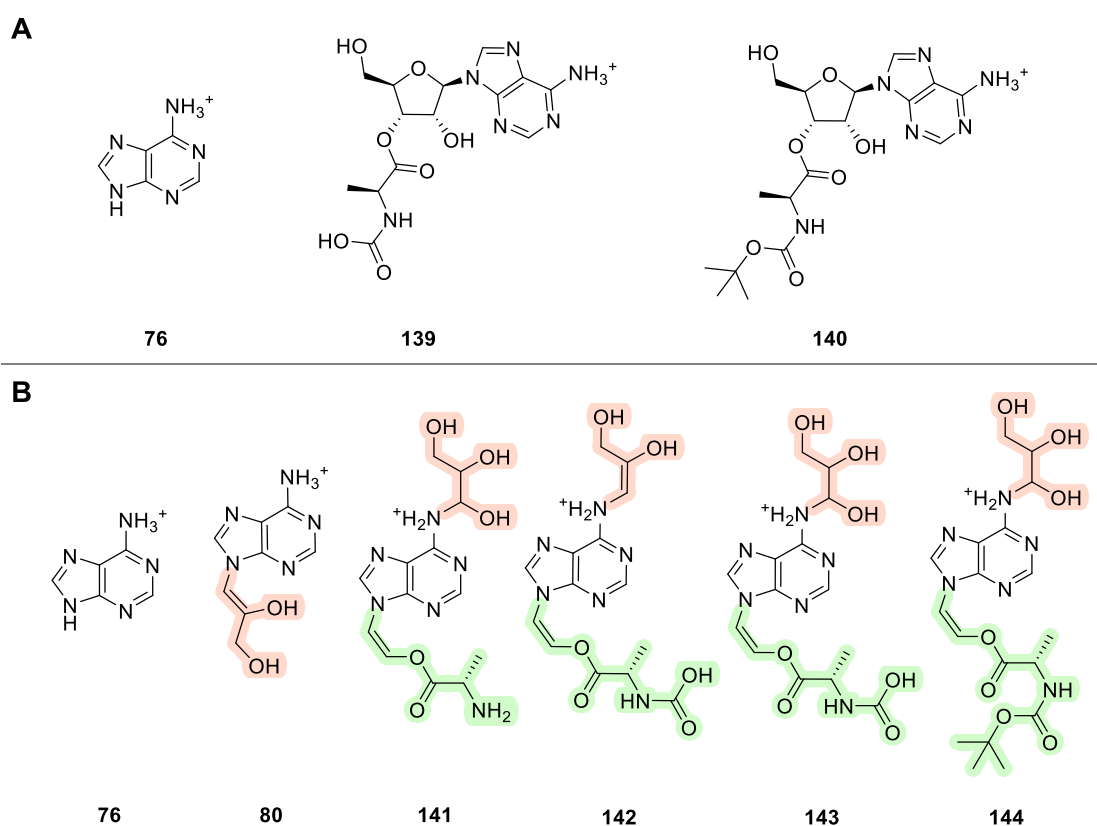


Abbildung 74. Vorgeschlagene Strukturformeln zu den gefundenen Fragmentierungsmassen der Referenz (**A**) und dem relevanten Peak der präbiotischen Reaktion (**B**). GlyA-Reste = orange, auf **125** beruhende Teile = grün.

Die Fragmentierung des Peaks der präbiotischen Reaktion wies neben den beiden auch in der Referenz zu findenden Massen (**76**, **139**), sowie der Produktmasse (**140**), noch weitere Fragmente auf. Die Massen, die mit einem theoretisch möglichen Strukturvorschlag identifiziert werden konnten, sind in **Abbildung 74B** dargestellt. **80** zeigt die Bildung eines Fragments, das am Adenin noch ein kondensiertes GlyA beinhaltet. Dieses Fragment konnte bei der Referenz nicht beobachtet werden. Aufbauend auf der Struktur **80** wurde die Masse von **141** identifiziert, dass

neben GlyA auch **125** beinhaltet. Der weitere Fund der Masse von **142** deutet ebenso wie die Masse von **80** und **141** auf die Kondensation der Aldehyde an verschiedenen Stellen der Nukleobase hin, anstelle des gewünschten Ringschlusses zur Ribose. Auch für die übereinstimmenden Massen mit der Referenz sind andere Isomere als **139** und **140** möglich, wie zum Beispiel **143/144**, die mit den zuvor erwähnten Fragmenten **80** und **141** ein schlüssiges Bild ergeben. Deshalb ist davon auszugehen, dass trotz gleicher Retentionszeit, nicht das gewünschte Produkt **140** gebildet wurde.

Um die Möglichkeit einer Kondensation der Aldehyde an der freien Aminogruppe des Adenins zu unterbinden, wurden, wie oben erwähnt, Reaktionen mit Purin und N^6,N^6 -Dimethyladenin durchgeführt. Bei der Reaktion von Purin (**1f**) mit **131m** und GlyA konnte nicht nur ein Peak mit der gewünschten Masse identifiziert werden, sondern deutlich mehr Peaks beobachtet werden (**Abbildung 75A**). Koinjektion mit **119f** und **137f** zeigte, dass die Verwendung von Purin anstelle von Adenin, nicht nur zur vermehrten Bildung diverser Isomere führte, sondern zeigte auch eine Übereinstimmung eines Peaks in der Retentionszeit mit der Referenz.

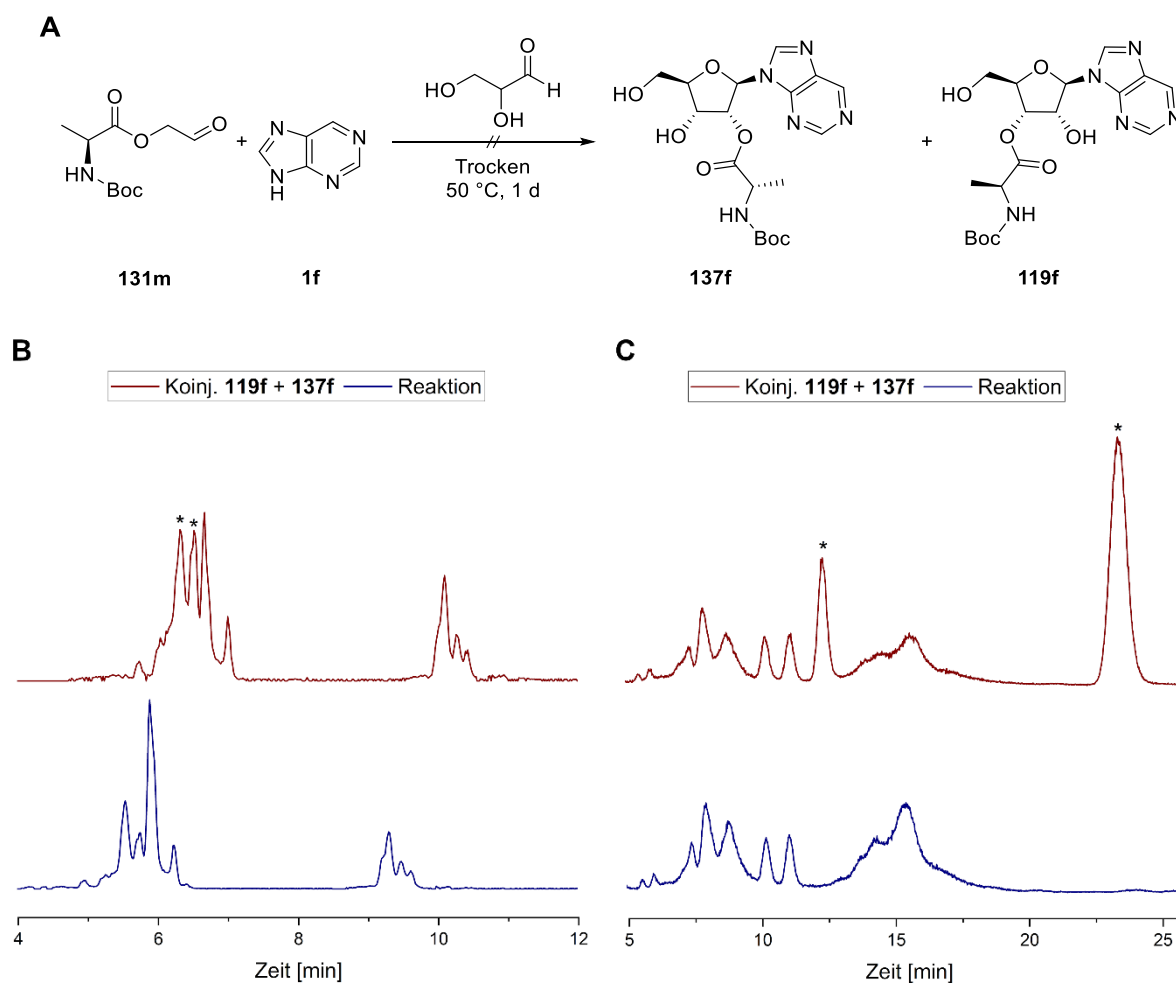


Abbildung 75. A) Reaktionsgleichung der präbiotischen Reaktion von **131m** mit Purin und GlyA im Trockenen bei 50 °C nach einem Tag. **B)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau. Koinjektion der Reaktion mit einer 2'- und 3'-Mischung (**119f**, **137f**) in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode E, Massenfiter $m/z = 424,1785 - 424,1869$). **C)** Chromatogramm der präbiotischen Reaktion in blau. Koinjektion der Reaktion mit einer 2'- und 3'-Mischung (**119f**, **137f**) in braun. Die Analyse erfolgte mittels UHPLC-QTOF-MS (Methode F, Massenfiter $m/z = 424,1785 - 424,1869$). * = Peak der Referenz.

Da die Peaks nicht vollständig Baseline getrennt waren, wurden verschiedene anderer Methoden und Säulen getestet, um eine bessere Trennung zu erhalten. Bei der Verwendung einer isokratischen Methode auf derselben Säule, konnte entdeckt werden, dass bei Zugabe der 2'-, 3'-Referenz-Mischung (**119f**, **137f**) zwei neue Peaks entstanden. Das bedeutet, dass die zuvor beobachtete Übereinstimmung der Retentionszeiten an einer nicht ausreichenden Trennleistung der Säule bei der zuvor verwendeten Methode lag.

4.2.3 Nukleosid-Referenz-Synthesen

Aufgrund der geplanten präbiotischen Synthesen zu tRNA-Monomeren, wurden verschiedene Referenzsubstanzen benötigt, die nicht kommerziell erwerbbar waren. Sowohl die *N*- als auch die *C*-verknüpften tRNA-Nukleosid-Analoga mussten synthetisiert werden. Retrosynthetische Betrachtung der *N*-verknüpften-Form (**102a**, **103a**) zeigt, dass es aus zwei Molekülen aufgebaut werden kann (**Abbildung 76**) – Zum einen aus einem *C*-terminal geschützten Alanin (**145**) und zum anderen aus einem Nukleosid, das in 5'- und 3'-Position geschützt ist und in der 2'-Position eine Abgangsgruppe (X) besitzt (**146a**). Dies lässt sich wiederum aus den freien Nukleosiden, Adenosin (**2a**) oder Vidarabin (**75a**), herstellen. Die *C*-verknüpfte-Form (**117a**, **121a**) lässt sich ebenso in zwei Moleküle zerlegen. Zum einen in ein *N*-terminal geschütztes Alanin (**147**) und in ein 5'- und 3'-geschütztes Nukleosid mit einer freien Hydroxygruppe in der 2'-Position (**148**). Dieses sollte aus den ungeschützten Nukleosiden, Adenosin (**2a**) oder Vidarabin (**75a**), synthetisierbar sein. Beide Varianten sind also auf das freie Nukleosid und einem *C*- beziehungsweise *N*-terminal geschützten Alanin zurückzuführen.

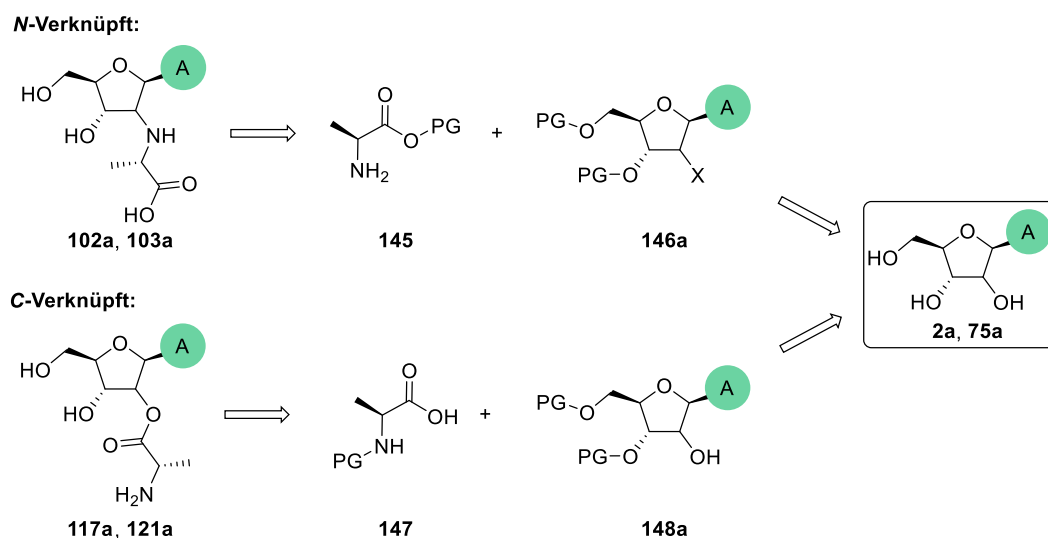


Abbildung 76. Retrosynthese der *N*- und *C*-verknüpften tRNA-Nukleosid-Vorläufer in der Ribosyl- und Arabinosylform. PG = Schutzgruppe.

N-Verknüpfung

Die Synthese der *N*-verknüpften Aminosäure-Nukleoside beginnt mit einer Silyl-Schätzung der 5'- und 3'-Hydroxygruppen der Nukleoside **2a** und **75a** (**Abbildung 77**). Hierfür sollte TIPDS benutzt werden, da hierbei eine verbrückte Schätzung der 3',5'-Hydroxygruppe erfolgt wodurch selektiv die 2'-Hydroxygruppe ungeschützt bleibt. Dies ist der Fall, da die erhöhte Reaktivität der primären Hydroxygruppe in der 5'-Position dazu führt, dass nach direkter Schätzung eben dieser nur der Ringschluss mit der 3'-Hydroxygruppe zu einem Achtring möglich ist.

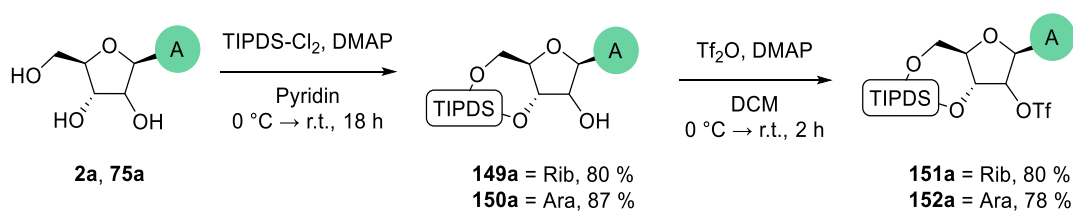


Abbildung 77. Synthese der TIPDS-Nukleosid-Triflate **151a** und **152a**. Rib = Ribosid; Ara = Arabinosid.

Die Schätzung erfolgte unter Verwendung von TIPDS-Cl₂ und DMAP in Pyridin und verlief in beiden Fällen in sehr guter Ausbeute zu **149a** und **150a**. Als Abgangsgruppe in der 2'-Position wurde die Triflatgruppe ausgewählt, die durch Reaktion der TIPDS-Nukleoside mit Triflatanhydrid und DMAP in DCM in sehr guten Ausbeuten installiert werden konnte. Somit konnten ausgehend von Adenosin und Vidarabin die 3',5'-TIPDS-Nukleosid-2'-Triflate **151a** und **152a** hergestellt werden.

Anschließend sollte die Aminosäure in der 2'-Position eingeführt werden (**Abbildung 78**). Erste Versuche mit **152a** sowie L-Alanin-*t*Bu-Ester **153** und DBU in DCM oder ACN waren nicht erfolgreich. Als Problem konnte die Eliminierung des Triflats, identifiziert durch HRMS-ESI Messungen, unter diesen verwendeten Bedingungen ausgemacht werden.

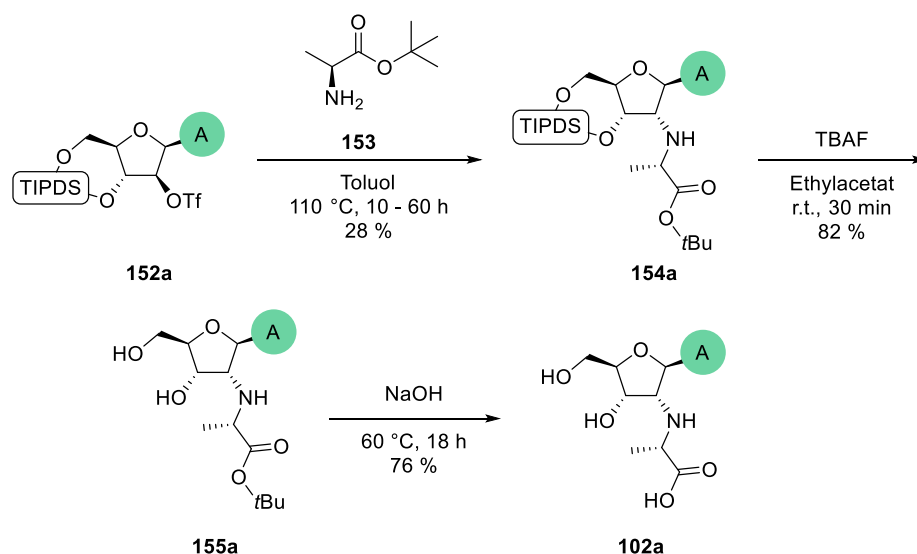


Abbildung 78. Synthese des Adenosin-Derivats **102a** ausgehend von Triflat **152a**.

Deshalb wurde zuerst die Menge an DBU von 3,2 zu 2,0 zu 1,2 Äq. reduziert. Da weiterhin das Eliminierungsprodukt entstand, sowie andere Nebenprodukte, wurde auf DBU als Base komplett verzichtet. Stattdessen wurde die Reaktion mit Triethylamin und Toluol bei einer erhöhten Temperatur getestet. HRMS-ESI Messungen verifizierten die Bildung der Produktmasse, doch nach wie vor dominierte das Eliminierungsprodukt. Deshalb wurde die Reaktion ohne Base in Toluol bei 110 °C getestet und zeigte je nach Ansatzgröße nach einigen Stunden bis einigen Tagen die Bildung von **154a** in schlechten Ausbeuten. Die Desilylierung mit TBAF in Ethylacetat verlief quantitativ und die abschließende Verseifung des *tert*-Butyl-Esters **155a** mit NaOH verlief in guten Ausbeuten, sodass *N*-verknüpftes-2'-L-Alanin-Adenosin **102a** erhalten werden konnte.

Die gleichen Reaktionsbedingungen, keine Base in Toluol, führten bei **151a** als Edukt wiederholt nicht zur erfolgreichen Synthese des gewünschten Produktes (**Abbildung 79**). Als Problem der Reaktion von **151a** zu **156a** wurde zum einen die mögliche sterische Hinderung durch die veränderte Stereoinformation der Triflatgruppe in der 2'-Position identifiziert, aus der sich eine mögliche Abschirmung der Reaktionsstelle durch die Nukleobase ergibt. Außerdem sind Aminosäuren generell eher unreaktive Nukleophile, sodass der nukleophile Angriff der relativ großen Aminosäure mit der *t*Bu-Schutzgruppe deutlich erschwert wird. Folglich wurde eine alternative Syntheseroute zu **103a** entworfen (**Abbildung 79**).

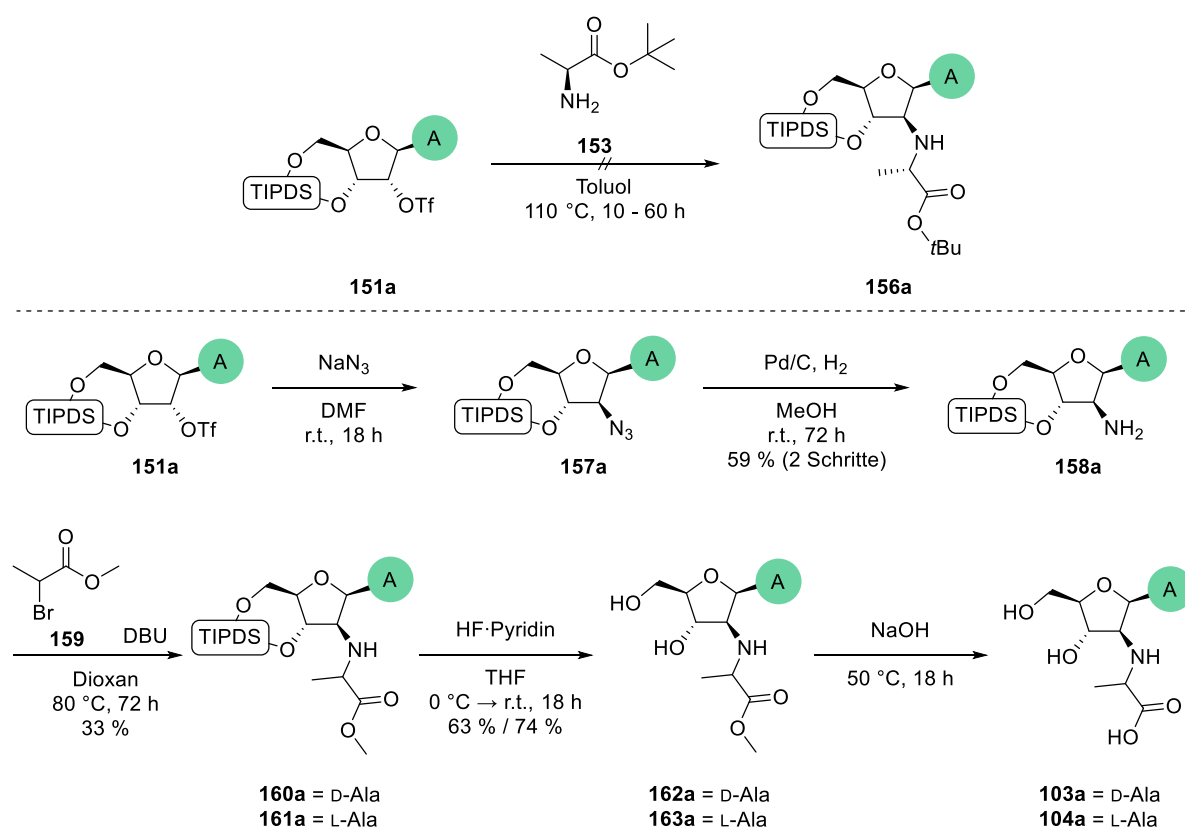


Abbildung 79. Alternativer Syntheseweg des Vidarabin-Derivat **103a** über Amin **158a**.

Da an der Sterik der Position nichts verändert werden kann, wurden die reaktiven Zentren der Moleküle getauscht, sodass der nukleophile Angriff von einer modifizierten Zuckereinheit erfolgt. Hierfür wurde 3',5'-TIPDS-Adenosin-2'-Triflat **151a** mit NaN_3 in 3',5'-TIPDS-Vidarabin-Azid **157a** überführt, das direkt mit Pd/C und H_2 zum korrespondierenden Amin **158a** reduziert werden konnte. Die nächste Reaktion stellt den Schlüsselschritt der Synthese dar. **158a** soll mit Methyl-2-Brompropionat **159** reagieren um **160a** zu bilden. Hierbei reagiert anders als zuvor bei der Synthese zu **154a** das Nukleosid als Nukleophil und es wurde mit dem Methylester anstelle des *t*-Bu-Esters eine kleinere Säure-Schutzgruppe gewählt. Zu Beginn wurde Nukleosid **158a** mit racemischem Methyl-2-Brompropionat **159** in Toluol bei 60 °C mit DBU getestet. Dies zeigte eine schlechte allgemeine Löslichkeit und keine Produktformation, weshalb DMSO und Dioxan als alternative Lösungsmittel getestet wurden. Bei der Reaktion in Dioxan mit DBU bei 80 °C konnten die beiden Diastereomere **160a** und **161a** isoliert werden. Hierbei handelt es sich um D- und L-Alanin in der 2'-Position verknüpft. Die beiden abschließenden Entschützungs-schritte, zuerst die Entsilylierung (**162a**, **163a**), gefolgt von der Verseifung des Methylesters konnten erfolgreich für beide Isomere durchgeführt werden (**103a**, **104a**). **103a** konnte folglich nach einem Umweg über das Vidarabin-

Amin **158a** synthetisiert werden. Dadurch sind beide Isomere **102a** und **103a** der gewünschten Referenzsubstanz erfolgreich synthetisiert worden.

Trotz erfolgreicher Synthese wurde eine andere Route zu **102a** untersucht. Diese sollte ebenso wie bei der Vidarabin-Form über das Nukleosid-Amin führen, damit einheitliche Synthesebedingungen für beide Isomere gegeben sind. Getestet wurde ausgehend von Vidarabin-Triflat **152a** bis zum Hauptschritt der Synthese, die Reaktion zu **166a** mit Methyl-2-Brompropionat **159** (Abbildung 80). Die Entschützungen wurden nicht mehr durchgeführt, da sie bereits für die Vidarabin-Isomere **102a** und **103a** gezeigt wurden.

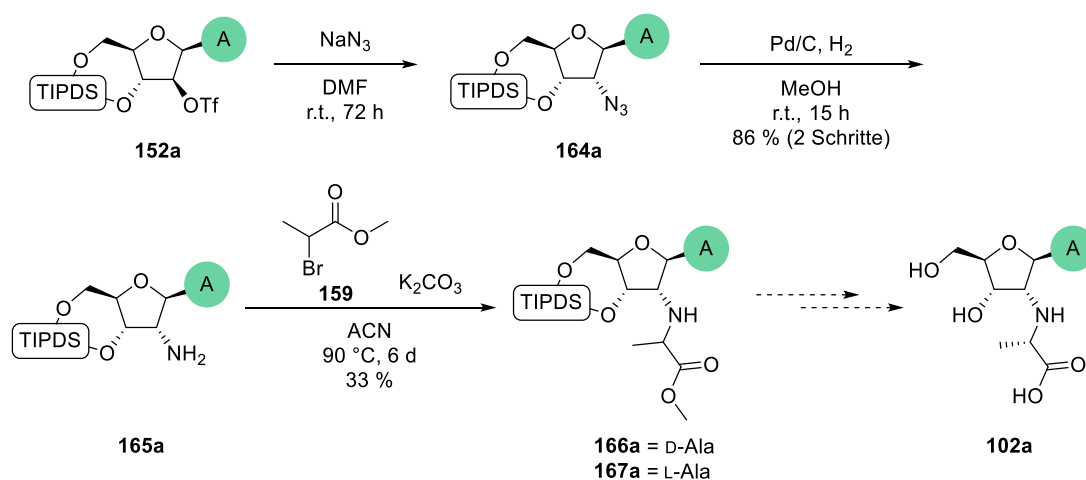


Abbildung 80. Alternativer Syntheseweg zu **102a** über die Nukleosid-Amin-Route wie bei **103a** entwickelt.

Die Reaktion des Triflat **152a** mit Natriumazid zu **164a** und die darauffolgende Reduktion zum Amin **165a** mit Pd/C und H_2 erfolgte in sehr guter Ausbeute. Der Kernschritt, die nukleophile Substitution zu **166a** mit K_2CO_3 in ACN, verlief in niedriger Ausbeute bei einer Reaktionszeit von sechs Tagen. Es wurden die beiden D- und L-Alanin Diastereomere **166a** und **167a** erhalten. Es konnte demonstriert werden, dass der entwickelte Syntheseweg über die Nukleosid-Amine **165a** und **158a** bei beiden Isomeren die Herstellung der N-Verknüpfung der Zuckereinheit mit der Aminosäure ermöglicht.

Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von den 3',5'-TIPDS-Nukleosid-2'-Aminen **165a** und **158a** sollten die vereinfachten Vorläufer **105a** und **106a** als Referenzstrukturen synthetisiert werden (**Abbildung 81**). Durch Reaktion der beiden Stereoisomere **165a** und **158a** mit HF·Pyridin konnten die Amine **105a** und **106a** isoliert werden.

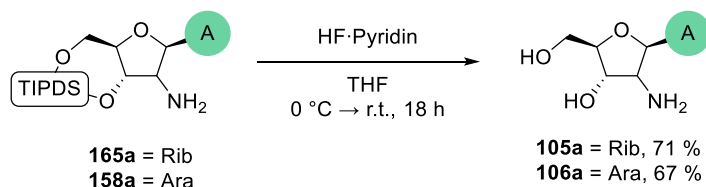


Abbildung 81. Synthese der Referenzstrukturen **105a** und **106a**. Rib = Ribosid, Ara = Arabinosid.

C-Verknüpfung

Ebenso wie die *N*-verknüpften-Aminosäure-Nukleoside können auch die *C*-verknüpften-Formen auf die freien Nukleoside und geschützten Aminosäuren zurückgeführt werden. Für die beide Isomere **118a** und **121a** können die gleichen Bedingungen der Synthese angewendet werden (**Abbildung 82**). Der erste Schritt ist die verbrückte Schützung der 5'- und 3'-Hydroxygruppe mit TIPDS-Cl und DMAP in Pyridin zu **149a** und **150a**. Die Veresterung der 2'-Hydroxygruppe über die *in-situ* Herstellung des Säurechlorids des Alanins oder über eine Fischerveresterung mit Schwefelsäure war nicht erfolgreich. Die Anwendung der Bedingungen der STEGLICH-Veresterung mit *N*-Boc-Ala-OH, EDCI und DMAP führten zu **168a** und **169a** in quantitativer Ausbeute. Die Desilylierung mit HF-Pyridin führte zu zwei unterschiedlichen Reaktionsverläufen für die Ribosyl- und Arabinosyl-Derivate.

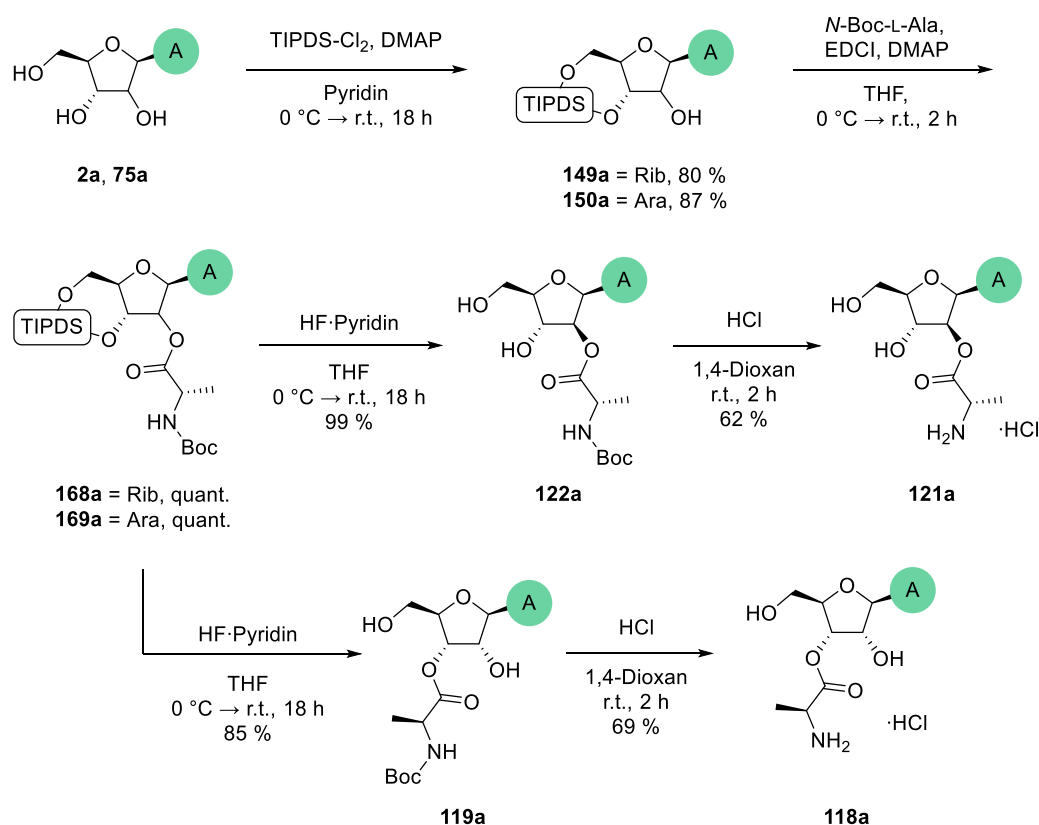


Abbildung 82. Synthese zu den *C*-verknüpften Referenzen **118a** und **121a**. Rib = Ribosid; Ara = Arabinosid.

Bei **169a**, der Arabinosyl-Variante, verlief die Reaktion wie geplant und das 2'-veresterte Produkt **122a** konnte isoliert werden. Bei der Entschützung von **168a**, der Ribosyl-Form, konnte als Produkt nicht das 2'-veresterte, sondern das 3'-veresterte Nukleosid **119a** erhalten werden. Dies ist einer intramolekularen Wanderung der Aminosäure unter den Bedingungen der Entsilylierung zu

zuschreiben. Bei beiden Isomeren verliefen die Entschützungen in exzellenter bis sehr guter Ausbeute. Als letzter Schritt erfolgte die *N*-Boc-Entschützung des Alanins mit HCl in Dioxan bei r.t. für zwei Stunden. Sowohl **118a** als auch **121a** konnten in guten Ausbeuten als HCl-Salz erhalten werden.

Für die Arabinosylform konnte die 2'-veresterte Variante **121a** erfolgreich synthetisiert werden, bei der Ribosylform konnte aufgrund des Migrierens des Esters nur die 3'-veresterte Variante **118a** synthetisiert werden. Da es unklar ist, ob auch bei der präbiotischen Reaktion von einer Wanderung auszugehen ist, sollte auch bei der Ribosylform die 2'-Variante **117a** synthetisiert werden. Deshalb wurden alternative Entschützungsverfahren untersucht. Silylschutzgruppen können auch unter sauren Bedingungen abgespalten werden, wenn auch nicht so gut und selektiv wie mit Fluoriden. Durch die Verwendung von sauren Bedingungen könnte außerdem eine gekoppelte Entschützung von Silylschutzgruppe und *N*-Boc-Schutzgruppe stattfinden. Reaktion von **168a** mit HCl in Dioxan führte zur Bildung einer bisher nicht trennbaren Mischung der Regioisomere **117a** und **118a** in geringer Ausbeute (**Abbildung 83**). Da das 3'-Isomer **118a** selektiv durch Entschützung mit HF·Pyridin isoliert werden konnte, kann bei UHPLC-QTOF-MS-Messungen zwischen den Isomeren unterschieden werden.

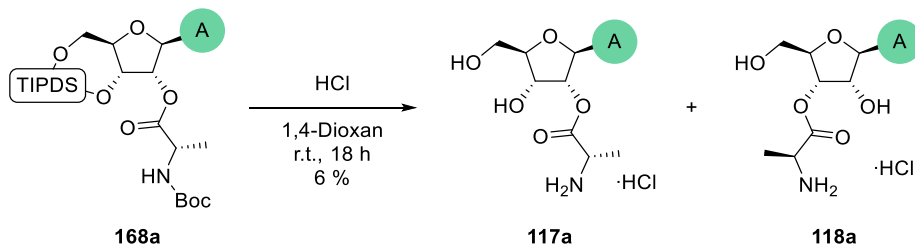


Abbildung 83. Alternative Synthese um **117a** als Referenz zu erhalten.

Als weitere Referenzen wurden die *N*-geschützten-L-Alanin-Riboside benötigt. *N*-Boc-geschütztes-Alanin-Adenosin **119a** wurde auf der Route zu **118a** über die schrittweise Entschützung erfolgreich synthetisiert (**Abbildung 82**). Deshalb wurde die Synthese des *N*-Acetyl-geschützten Derivats **120a** analog durchgeführt (**Abbildung 84**). Begonnen wurde mit der Veresterung von **149a** zu **170a** mit *N*-Ac-L-Ala-OH unter Verwendung von EDCI und DMAP in sehr guter Ausbeute. Die anschließende TIPDS-Entschützung mit HF·Pyridin führte zur erfolgreichen Bildung von **120a**.

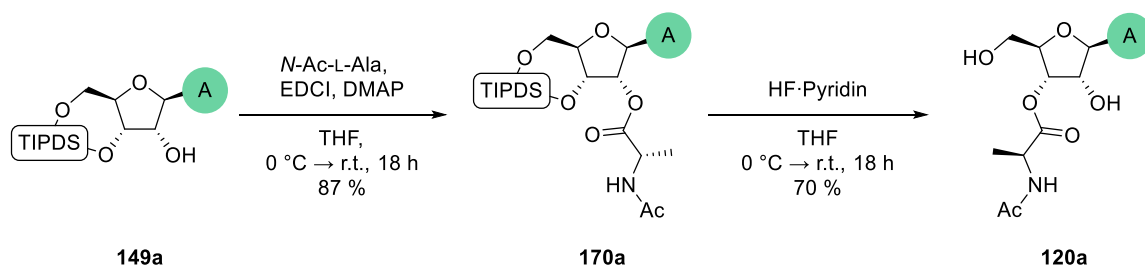


Abbildung 84. Synthese der *N*-Acetyl-geschützten 3'-Variante **120a**.

Die Synthesen der auf DMA und Nebularin basierten Referenzstrukturen sind nach Herstellung der freien Nukleoside analog zur Herstellung der Adenosin-Derivate durchgeführt worden. Die genaue Synthese ist in Kapitel 4.3.2 genauer erläutert.

4.3 Biomimetische Estermigration an Nukleosid-Derivaten

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in N. J. Kurrle, C. J. B. Seifert, N. Hampel, T. Rauch, M. Thoma, L. V. Parziale, M. S. R. Ebeling, D. Berthold, O. Trapp, *ChemBioChem* **2025**, e202500395 veröffentlicht.^[239]

In der zuvor behandelten Synthese der Referenzstrukturen konnte eine Wanderung einer veresterten Aminosäure von der 2'- zur 3'-Position des Ribosyl-Nukleosids identifiziert werden. Inspiriert davon, sollte die Esterwanderung an Nukleosiden genauer untersucht werden (**Abbildung 85**). Hierfür sollte zunächst eine effiziente Syntheseroute zu Nukleosid-Estern entwickelt werden. Anschließend soll die Wanderung von einfachen, auch heteroatombasierten Estern, z.B. Acetyl oder Thioacetat, genauer betrachtet werden, gefolgt von der Evaluation des Einflusses der Desilylierungsbedingungen sowie der Untersuchung der Wanderung von Aminosäuren an kanonischen und nicht kanonischen Nukleosiden. Abschließend soll eine breitanwendbare regio- und stereoselektive Syntheseroute zu an der Zuckereinheit modifizierten Nukleosiden entwickelt werden.

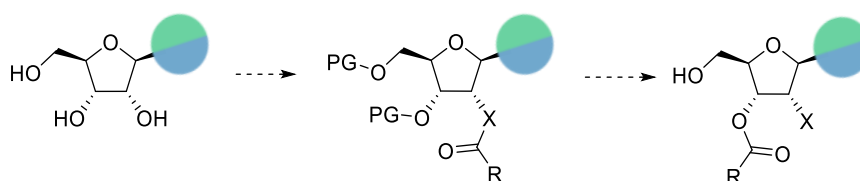


Abbildung 85. Übersicht über die Untersuchung der Acylwanderung beginnend von ungeschützten Nukleosiden. X = O oder andere Heteroatome; PG = Schutzgruppe.

4.3.1 Untersuchung der Acylwanderung an einfachen Estern

Begonnen wurde mit einem Adenosin-basierten Modellsystem bei dem als Ester ein Acetylrest benutzt wurde. Die Synthese verlief über eine verbrückte Silylschätzung der 5'- und 3'-Hydroxygruppe mit TIPDS-Cl zu **149a** in sehr guter Ausbeute. Bei der Verwendung von Essigsäureanhydrid als Reagenz zur Herstellung von **171a**, konnte eine Mehrfachacetylierung beobachtet werden, weshalb ein alternativer Weg gesucht wurde. Die Veresterung der 2'-Hydroxygruppe von **149a** nach STEGLICH mit Essigsäure, EDCI und DMAP führte zur Bildung von **171a** in ausgezeichneter Ausbeute. Nach Entschätzung der Silylgruppe mit HF·Pyridin wurde ein Regioisomerengemisch der 2'- und 3'-veresterten Nukleoside **173a** und **174a** erhalten (**Abbildung 86**), das mittels 2D-NMR Spektroskopie unterschieden werden konnte.

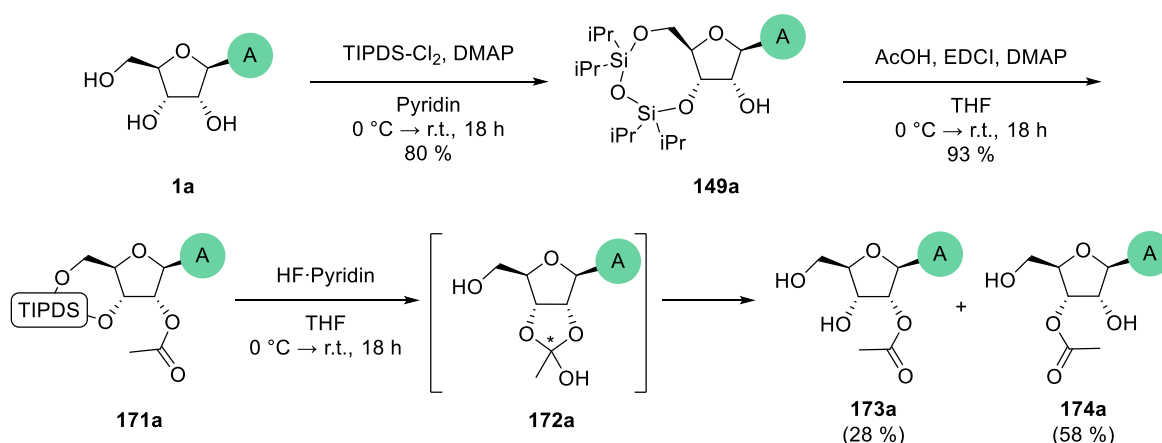


Abbildung 86. Synthese von 2'- und 3'-Acetyl-Adenosin **173a** und **174a** mittels Entsilylierung von **171a**.

Es fand keine vollständige Wanderung statt, aber das Verhältnis der beiden Isomere liegt auf der Seite des gewanderten 3'-Produkts **174a** (**173a**:**174a** = 33:67). DR. DINO BERTHOLD führte im Rahmen der Publikation dieses Themas DFT-Rechnungen durch.^[239] Diese zeigen, dass das 3'-Isomer **174a** eine erhöhte Stabilität von 15.8 kJ/mol im Vergleich zum 2'-Isomer **173a** in THF aufweist. Dies ist gleichbedeutend mit einer Gleichgewichtskonstante von 0,0171 oder einem Verhältnis von 1:586 von 2'-:3'-Ester. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von SAKAMOTO *et al.* sollte die Wanderung *via* einem zyklischen Intermediat **172a** ablaufen.^[242] In diesem hier vorliegenden Fall wird somit ein weiteres Stereozentrum eingeführt (markiert mit einem Stern). Abhängig von der absoluten Konfiguration des Orthoesters ist dieses Intermediat 0,3 oder 4,1 kJ/mol instabiler als das 2'-Isomer **173a**. Diese Ergebnisse der DFT-Rechnungen stimmen mit den experimentellen Beobachtungen überein und zeigen, dass sich mit längerer Zeit in Lösung das Gleichgewicht weiter zu **174a** verschieben sollte.

Ergebnisse und Diskussion

Um die Entschützung und die damit verbundene Wanderung genauer zu untersuchen, wurde die Reaktion in einem NMR-Experiment beobachtet (**Abbildung 87**). Hierbei wurde **171a** in einem HF-resistenten NMR-Inlet in THF- d_8 vorgelegt und nach Zugabe von HF-Pyridin wurden wiederholt ^1H -NMRs bei 20 °C gemessen.

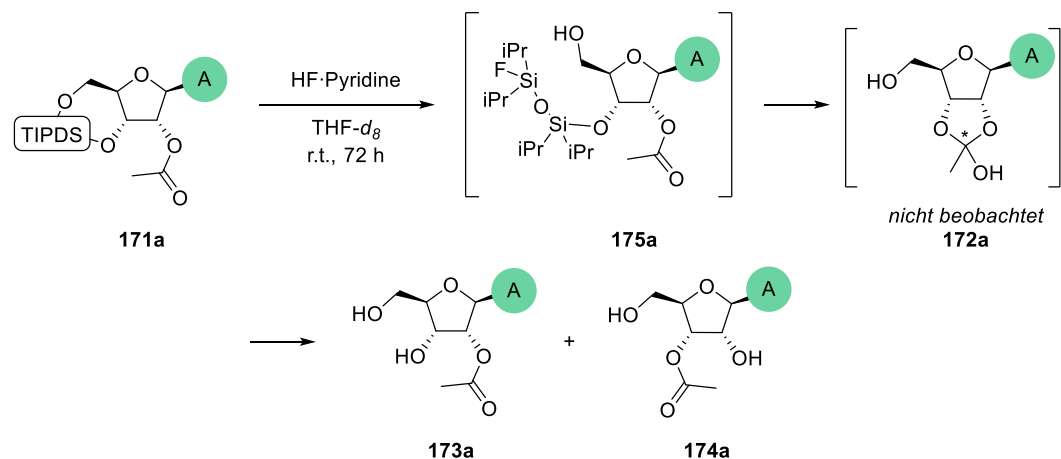


Abbildung 87. NMR-Experiment, um die Wanderung der Acetylgruppe zu verfolgen.

Für die erste Stunde erfolgten die Messungen im 10 Minuten Takt, für die nächsten zwei Stunden alle 30 Minuten, gefolgt von stündlichen Messungen für neun Stunden und endend mit Messungen im drei Stunden Takt bis zu einer gesamten Messdauer von 72 Stunden. Zusätzlich wurden während der Messungen Aliquote entnommen und mittels HRMS-ESI analysiert. Hierbei konnte eine weitere Spezies identifiziert werden, das teilweise silylentschützte Intermediat **175a**. Es wird angenommen, dass es aufgrund der geringeren sterischen Hinderung zuerst zu einer Entschützung der 5'-Position kommt, was zur Bildung von **175a** führt. Das von SAKAMOTO *et al.* vorgeschlagene Intermediat **172a** konnte nicht beobachtet werden.^[242]

Die Unterscheidung der beiden Isomere **173a** und **174a** im NMR erfolgte über die HMBC-Kopplung des Carbonylkohlenstoffs der Acetylgruppe (C^9) zum jeweiligen Proton am veresterten Kohlenstoff des Zuckers (2' oder 3', H^4) (**Abbildung 88**).

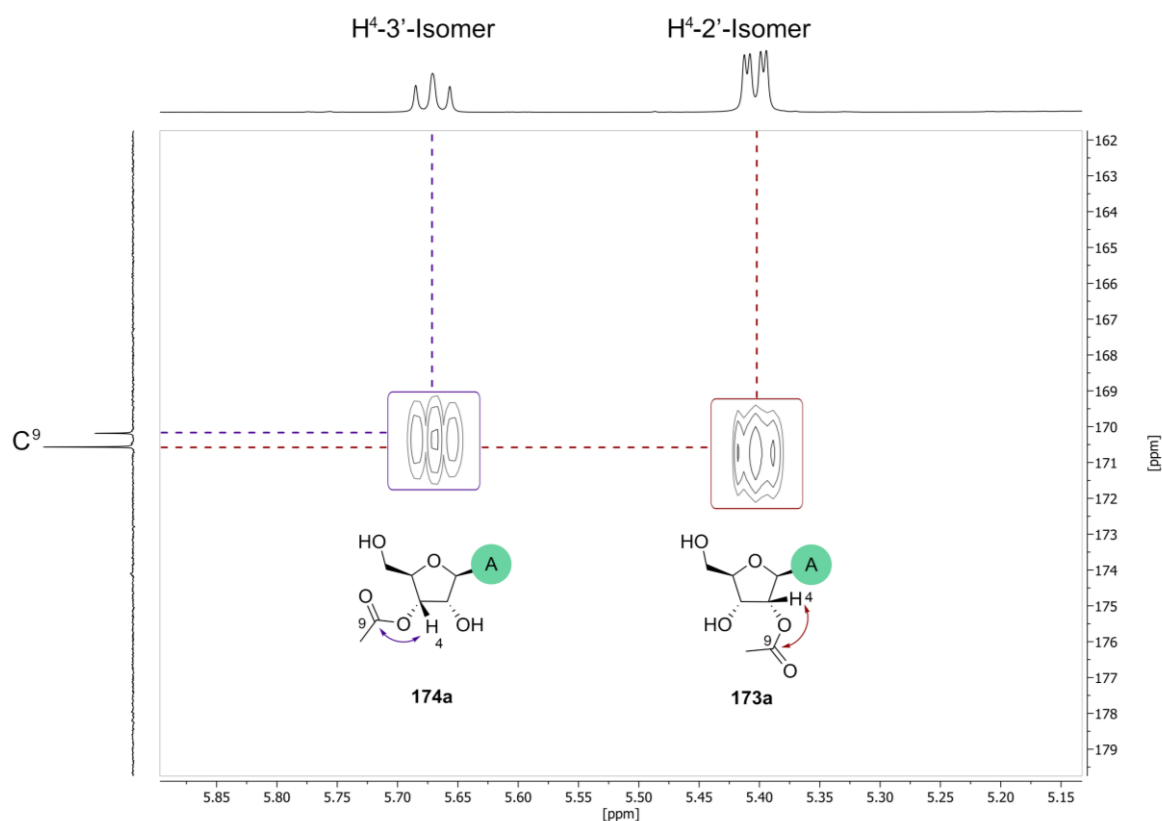


Abbildung 88. Darstellung der Unterscheidung von **173a** und **174a** mittels Kopplung im HMBC.

Die Integrale der Acetylprotonen (alle ca. bei 2.10 ppm) der identifizierbaren Moleküle wurden analysiert und der zeitliche Verlauf der Reaktion während der ersten ca. 22 h wurde in **Abbildung 89** dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die Teilentschützung des Edukts **171a** zu Intermediat **175a** sehr schnell abläuft und nach ca. einer Stunde kein Edukt mehr vorhanden ist. Eine ebenfalls schnelle Bildung des 2'-Isomers **173a** ist zu beobachten, das nach ca. 10 Stunden den höchsten Wert erreicht. Nach ca. einer Stunde, wenn **171a** vollständig abreagiert ist, kommt es zur langsamen Wanderung der Acetylgruppe und der damit verbundenen Bildung von **174a**, die sehr konstant ab ca. einer Stunde abläuft. Es scheint, dass nach ca. 10 Stunden in etwa so viel Migration von 2' zu 3' abläuft wie auch Bildung von **173a** durch Entschützung von **175a** stattfindet, da die Menge von **173a** in etwa stagniert und die Bildung von **174a** über **173a** stattfinden müsste. Das Verhältnis der Regioisomere liegt hier deutlich auf der Seite des 2'-Isomers, anders als bei der zuvor im Kolben durchgeführten Entschützensreaktion. Das 3'-Isomer **174a** stellt das thermodynamische Produkt dar, welches aufgrund der geringeren Temperaturen im NMR-Raum langsamer gebildet wurde. Ein weiterer Grund für das veränderte Verhältnis könnte die mangelnde Durchmischung der

Ergebnisse und Diskussion

Reaktionslösung im NMR-Röhrchen sein. Mit längerer Zeit verschob sich das Verhältnis der beiden zugunsten des 3'-Isomers.

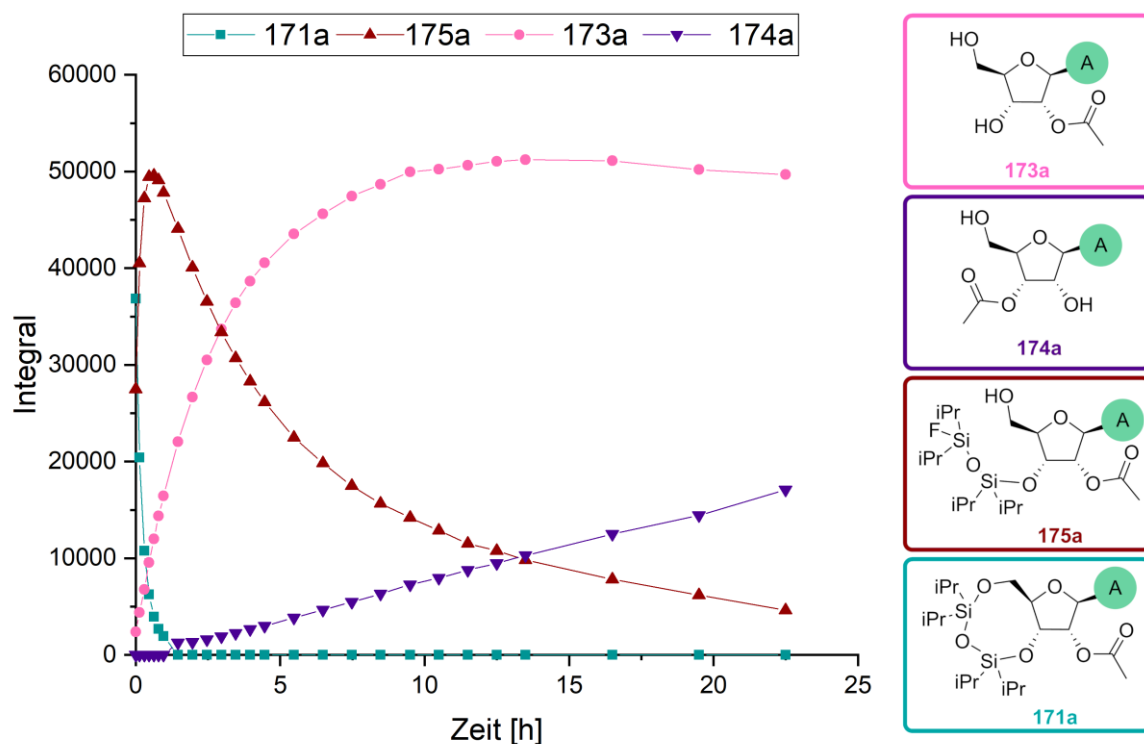


Abbildung 89. Zeitlicher Verlauf der Entsilylierung von **171a** mit HF-Pyridin in THF- d_8 während der ersten ca. 22 h. Die Wanderung der verhältnismäßig kleinen Acetylgruppe sollte an einem Substrat mit veränderten elektronischen und sterischen Eigenschaften getestet werden. Deshalb wurde 2'-Thioacetat-Adenosin **176a** synthetisiert. Aufgrund des formalen Austauschs des Sauerstoffs mit Schwefel, der die Esterbindung zum Zucker bildet, kann, um **176a** zu synthetisieren, keine normale Veresterung durchgeführt werden. Stattdessen muss der Weg über eine Substitutionsreaktion der Hydroxygruppe führen, welche zuvor in eine Abgangsgruppe überführt wird. Aufgrund dessen wurde **75a** als Edukt verwendet, da es bei der S_N2 -Reaktion zu einer Inversion kommt (**Abbildung 90**). Im ersten Schritt erfolgte die TIPDS-Silylschützung zu **150a** in ausgezeichneter Ausbeute, gefolgt von der Umwandlung der 2'-OH Gruppe in ein Triflat. Hierfür wurden Triflatanhydrid und DMAP verwendet, um **152a** in sehr guter Ausbeute zu erhalten. Die Substitutionsreaktion des Triflats verlief mit Thioacetat in DMF in exzellenter Ausbeute von 94 %, sodass **176a** als Edukt für die Entsilylierung vorlag.

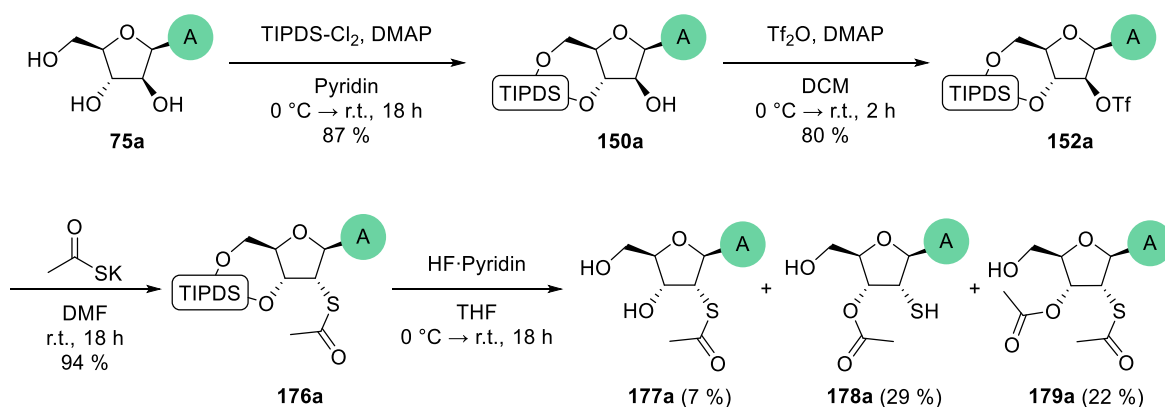


Abbildung 90. Synthese von **176a** und anschließende Entsilylierung zu **177a**, **178a** und **179a**.

Die Verwendung von HF-Pyridin führte zur Bildung der erwarteten Regioisomere **177a** und **178a**, analog zur zuvor gezeigten Acetylwanderung. Diese ist folglich nicht nur auf Sauerstoff-Ester beschränkt. Das Verhältnis lag auch hier auf der Seite des 3'-Isomers (**178a:177a** = 81:19) und die Regioisomere konnten, wie auch bei **173a** und **174a**, nicht voneinander getrennt werden, aber mittels HMBC-Kopplung unterschieden werden. Es konnte allerdings noch eine dritte Spezies bei dieser Reaktion isoliert und identifiziert werden. Die Bildung von **179a** beweist, dass nicht nur eine intramolekulare Acylwanderung stattfand, sondern es lief auch eine intermolekulare Migration ab. Dies könnte auf die erhöhte Nukleophilie des Thiols zurückzuführen sein, wodurch es nach der intramolekularen Wanderung der Acetylgruppe in die 3'-Position zu einem nukleophilen Angriff an einer Acetylgruppe eines anderen veresterten Adenosins kam.

Nachdem die Migration an einem Schwefelbasierten-Ester nachgewiesen werden konnte, wurde als nicht Kohlenstoff-basierter Ester die Phosphatgruppe auf ihre Wanderungseigenschaften untersucht. Hierfür sollte 2'-AMP ausgehend von 3',5'-TIPDS-geschütztem Adenosin (**149a**) hergestellt werden (**Abbildung 91**).

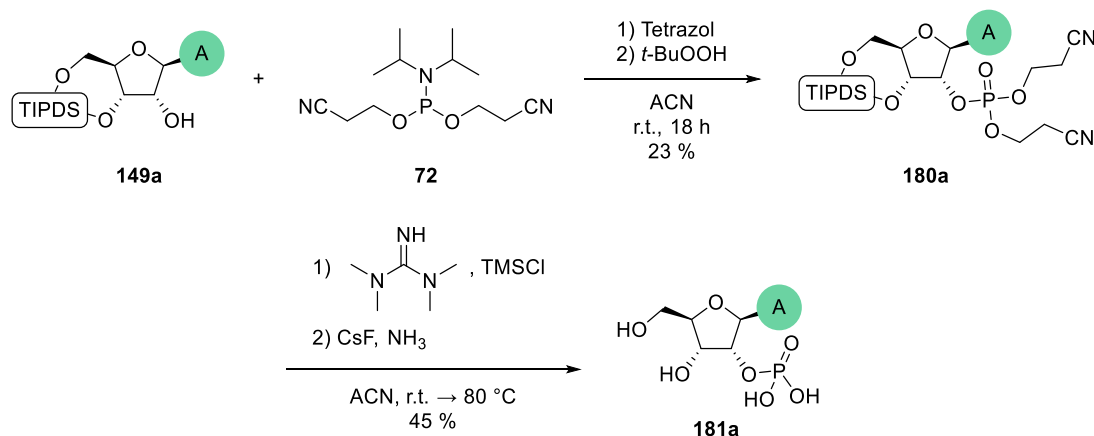


Abbildung 91. Synthese von **181a** ausgehend von **149a** mittels Phosphoramidit **72** und One-Pot-Entschützung der Phosphat- und Silylgruppe von **180a**.

Die hierfür verwendete Syntheseroute ist an eine von POWNER *et al.* entworfene Synthese zu 2'-CMP angelehnt.^[227] Die Einführung der Phosphatgruppe in der 2'-Position erfolgte mittels Verwendung des Phosphoramidits **72** mit Tetrazol und anschließender Oxidation mit *t*-BuOOH zu **180a**. In einer One-Pot-Reaktion konnte zuerst die Phosphatgruppe mit Tetramethylguanidin und TMS-Cl entschützt werden. Die verbleibende TIPDS-Schutzgruppe konnte anschließend durch Zugabe von CsF und Ammoniak entfernt werden. UHPLC-QTOF-MS-Messungen von **181a** mit Koinjektion von 3'-AMP und einer Mischung aus 2'- und 3'-AMP, sowie NMR-Spike-Experimente (**Abbildung 92**) zeigte keine Wanderung der Phosphatgruppe.

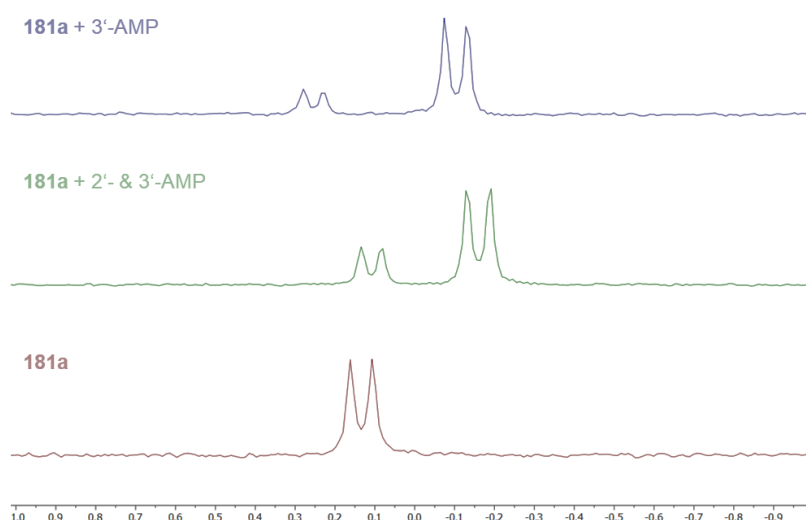


Abbildung 92. ³¹P-NMR-Messungen des hergestellten 2'-AMP (**181a**) mit und ohne Zusatz von Referenzsubstanzen (3'-AMP und eine Mischung von 2'-AMP und 3'-AMP). Messung der hergestellten Verbindung **181a** (rot, unten); Messung der hergestellten Verbindung **181a** nach Zugabe einer Mischung von 2'-AMP und 3'-AMP (grün, Mitte); Messung der hergestellten Verbindung **181a** nach Zugabe von 3'-AMP (blau, oben).

4.3.2 Wanderung von Aminosäuren

Nach der Untersuchung verschiedener Heteroatom-basierte Ester, wurde die Wanderung von Aminosäuren verstärkt betrachtet. Im Kapitel 4.2.3 konnte die Wanderung eines *N*-Boc-geschützten Alanins an Adenosin (**119a**) bei der Entsilylierung beobachtet werden. Die beobachtete vollständige Wanderung in die 3'-Position sollte weiter untersucht werden. Deshalb wurde die Silyl-geschützte Vorstufe **168a** synthetisiert (**Abbildung 93**).

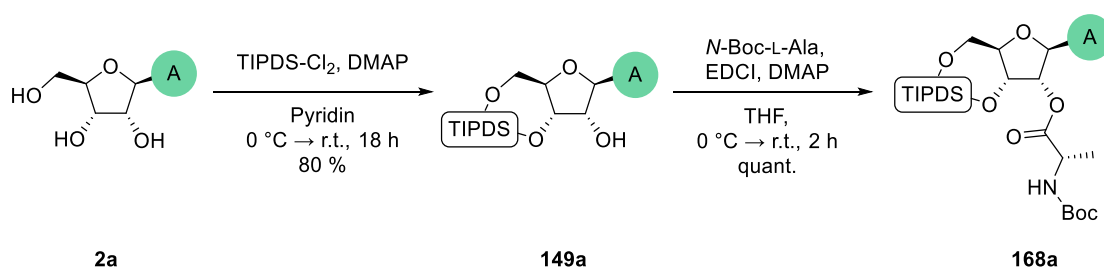
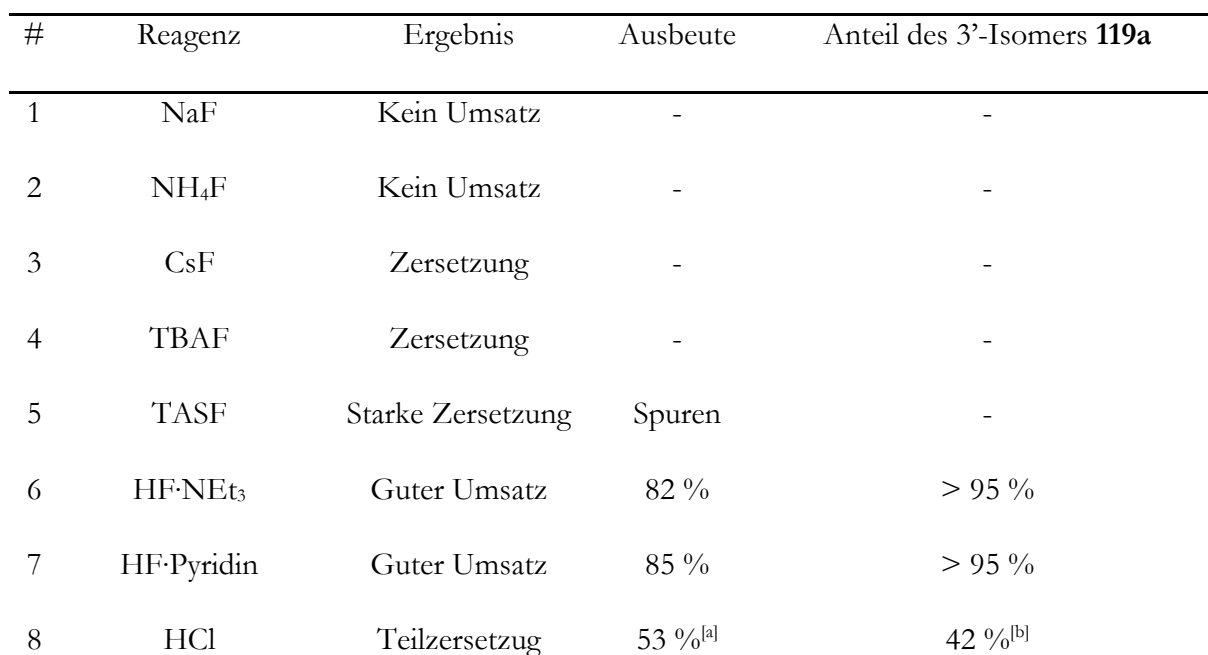


Abbildung 93. Synthese zu **168a** ausgehend von Adenosin.

Begonnen wurde mit der Silylschätzung von Adenosin zu **149a**, gefolgt von einer Veresterung der 2'-Position mit *N*-Boc-L-Ala-OH nach STEGLICH Bedingungen. Anhand dieses Systems wurde eine Vielzahl von Entschützungsbedingungen getestet, um deren Einfluss auf die Migration zu untersuchen (**Tabelle 5**).

Tabelle 5. Überblick über die untersuchten Desilylierungsmethoden an **168a**.



NaF in MeOH bei r.t. (Eintrag 1) zeigte ebenso wie die Verwendung von NH_4F (Eintrag 2) keinen Umsatz. Einsatz von CsF mit Ammoniak in MeOH unter reflux (Eintrag 3), in Anlehnung an die Entschüttung von **180a**, lieferte ausschließlich Zersetzung zu Adenin und Adenosin. Dies zeigt, dass die Esterbindung zwischen Adenosin und Alanin instabiler ist als die Esterbindung des Phosphats zum Adenosin. Ebenso negativ verlief die Verwendung von TBAF (Eintrag 4), egal ob als Feststoff ($\text{TBAF}\cdot\text{H}_2\text{O}$) oder als Lösung (1 M in THF) eingesetzt. TASF als Entschüttungsreagenz in THF bei r.t. zeigte auch eine hochgradige Zersetzung, es konnte allerdings in unter 5 % Ausbeute Produkt isoliert werden. Hiervon konnte aufgrund der geringen Menge das Verhältnis der Isomere nicht bestimmt werden. $\text{HF}\cdot\text{NEt}_3$ in THF führte zu einer Ausbeute von 82 % mit 3'-Isomer **119a** als Hauptprodukt (Eintrag 6). Das zur Entschüttung eingesetzte Reagenz besteht aus HF mit einer tertiären Stickstoffbase, ebenso wie das bereits zuvor

verwendete HF·Pyridin (Eintrag 7) und auch die Resultate der beiden Reaktionen ähneln sich stark. Dies könnte zum einen für die katalytische Wirkung der Stickstoffbase bei der Wanderung sprechen, zum anderen für milde Entschützungsbedingungen mit HF, die eben nicht zur Zersetzung führen. Die Durchführung der Reaktion mit HF·Pyridin bei -30 °C führte zu keiner Veränderung in der Migration laut NMR, einzig die Reaktionsgeschwindigkeit der Entschätzung wurde verringert. Zusätzlich wurde anstelle einer Fluoridquelle HCl in Dioxan (Eintrag 8) als saure Bedingung getestet. Dies führte zu einer teilweisen Zersetzung, sowie zur Bildung verschiedener Produkte (**Abbildung 94**).

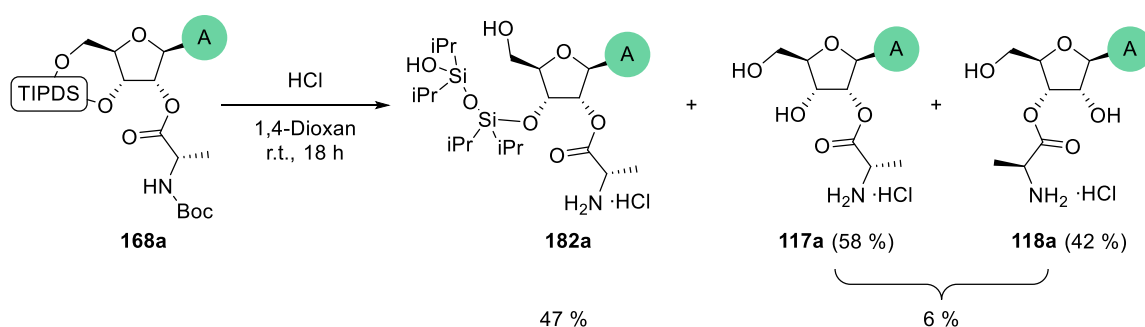


Abbildung 94. Die Entsilylierung von **168a** mit HCl in Dioxan lieferte ein teilsilylentschütztes Produkt **182a**, sowie die beiden komplett entschützten Isomere **117a** und **118a**.

Das gewünschte Produkt **119a** konnte durch die in Eintrag 8 verwendeten Bedingungen nicht isoliert werden, da durch die sauren Bedingungen die Boc-Gruppe abgespalten wurde. Als Hauptprodukt konnte das teilsilylentschützte Produkt **182a** isoliert werden. Es wird davon ausgegangen, dass es aufgrund der geringeren sterischen Hinderung zuerst zu einer Entschätzung der 5'-Position kommt. Dies konnte allerdings mittels NMR-Spektroskopie nicht eindeutig nachgewiesen werden. Als weitere Produkte konnten die beiden komplett entschützten Regioisomere **117a** und **118a** in schlechter Ausbeute isoliert werden. Hierbei lag das Verhältnis der beiden Verbindungen auf der Seite des 2'-Isomers (58:42 **117a**:**118a**). Dies führte zur Vermutung, dass entweder die Boc-Schutzgruppe durch ihren sterischen Anspruch die Wanderung maßgeblich zum 3'-Isomer initiiert oder die Stickstoffbasen in den HF-Reagenzien katalytisch wirken. Für den sterischen Anspruch der Boc-Gruppe sprechen die Ergebnisse der Acetyl-Migration, da hier die deutlich kleinere Acetylgruppe ebenfalls nicht vollständig zur 3'-Position (2'-**173a**:3'-**174a** = 33:67) wandert. Um den Einfluss der Stickstoffbase zu untersuchen, wurde teilentschütztes **182a** mit HF·Pyridin versetzt (**Abbildung 95**). Es konnte **117a** und **118a** als Regioisomerengemisch in exzellenter Ausbeute erhalten werden. Das Verhältnis der beiden Isomere lag mit 17:83 auf der Seite des 3'-Isomers **118a**. Dies zeigt, dass sowohl die Sterik als auch der Einsatz einer

Ergebnisse und Diskussion

Stickstoffbase die Wanderung des Esters beeinflussen. Der Einfluss der Stickstoffbase scheint zu überwiegen, wenn man die Reaktion mit HCl (**Abbildung 94**) und die hier gezeigte Entschützung von **182a** vergleicht. Ohne Pyridin liegt ein Verhältnis von 58:42 (2'-**117a**:3'-**118a**) vor, mit Pyridin verschiebt es sich zu 17:83 (2'-**117a**:3'-**118a**).

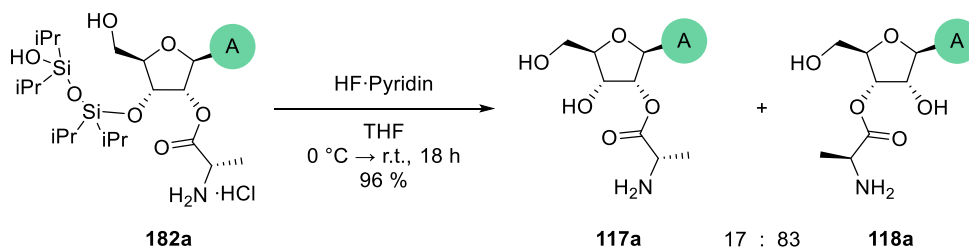


Abbildung 95. Entsilylierung von **182a** nach zu voriger HCl-Entschützung.

Der Aspekt der Sterik wurde mit DFT-Rechnungen im Rahmen der Publikation dieses Themas von DR. DINO BERTHOLD genauer betrachtet.^[239] Hierbei wurden die Boc-geschützten Isomere **137a** und **119a** sowie die ungeschützten Isomere **117a** und **118a** in THF verglichen. Es zeigte sich, dass in beiden Fällen das 3'-Isomer stabiler ist als die 2'-Variante, für **119a:137a** betrug der Unterschied 24,7 kJ/mol und für **118a:117a** 20,3 kJ/mol. Bei der Boc-Schutzgruppe ist der Unterschied zwischen den beiden Isomeren um 4 kJ/mol größer, wodurch auch der Einfluss der Sterik auf die Wanderung weiter belegt wird. Verglichen mit der experimentellen Untersuchung der ungeschützten Variante zeigt sich, dass sich das zu erwartende Gleichgewicht nach der Entschützung mittels HCl noch nicht eingestellt hat, wohingegen die Katalyse von Pyridin zu einer schnelleren Verschiebung des Gleichgewichts führt.

117a und **118a** entsprechen je nach verwendeter Aminosäure den in der tRNA vorkommenden Adenosin-basierten Nukleosiden. In der Natur wird abhängig von der Aminosäure entweder direkt das 3'-Isomer gebildet oder nachträglich das 2'-Isomer in das 3'-Isomer umgewandelt, welches anschließend in der Proteinbiosynthese verwendet werden kann.^[193, 218-220] Das Verhalten der anderen kanonischen Nukleoside, abgesehen von Adenosin, sollte untersucht werden, um herauszufinden, ob es chemische Gründe gibt, warum in der Proteinbiosynthese nur Adenosin Verwendung findet (**Abbildung 96**). Hierfür wurden alle Nukleoside in sehr guter Ausbeute, abgesehen von Guanosin, 3',5'-TIPDS geschützt (**152a-d**). Die anschließende Veresterung zu **171a-d** verlief ebenfalls bei allen Nukleosiden außer Guanosin in sehr guter Ausbeute. Die schlechteren Ausbeuten für die Guanosin-Derivate lassen sich auf die allgemein bekannten Löslichkeitsprobleme von Guanosin zurückführen.^[243-244] Der Entsilylierungsschritt mit HF·Pyridin

führte zur vollständigen Wanderung des *N*-Boc-*L*-Alanins zur 3'-Position in allen kanonischen Nukleosiden **119a-d**.

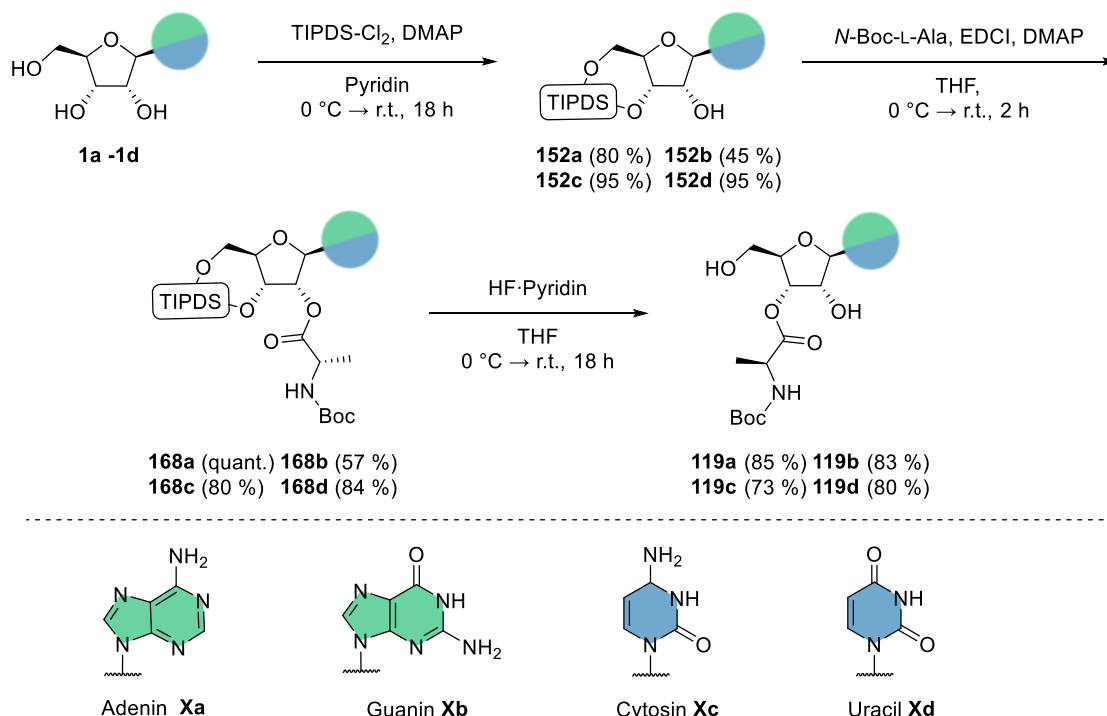


Abbildung 96. Einheitlicher Syntheseweg aller Nukleoside zum 3'-Isomer **119a-d**. a = Adenosin, b = Guanosin, c = Cytidin, d = Uridin.

Mit diesen positiven Ergebnissen wurde anschließend die Wanderung der Aminosäure ohne *N*-Boc-Schutzgruppe untersucht, da diese Strukturen die in der Natur vorkommenden Moleküle widerspiegeln. Hierfür wurde, wie bei Adenosin bereits demonstriert, HCl in Dioxan als Entschützungsreagenz gewählt (**Abbildung 97**). Es sollte analog zuerst zur Abspaltung der Boc-Gruppe kommen und anschließend zu einer Entschützung der Silylgruppe. Cytidin-basiertes **168c** lieferte als Produkte eine Mischung der komplett entschützten Regioisomere **118c** und **117c** im Verhältnis 60:40. Bei **168b** und **168d** konnten nur die teilentschützten Produkte **182b** und **182d** isoliert werden. Diese wurden nachfolgend mit HF-Pyridin vollständig entschützt, um eine Aussage über die mögliche Wanderung treffen zu können. Das Guanosin-Derivat **182b** zeigte, wie bereits in den Reaktionen zuvor große Löslichkeitsprobleme, die dafür sorgten, dass kein Produkt isoliert werden konnte. Bei der Entschützung von **182d** konnte eine vollständige Migration zum 3'-Isomer **118d** festgestellt werden.

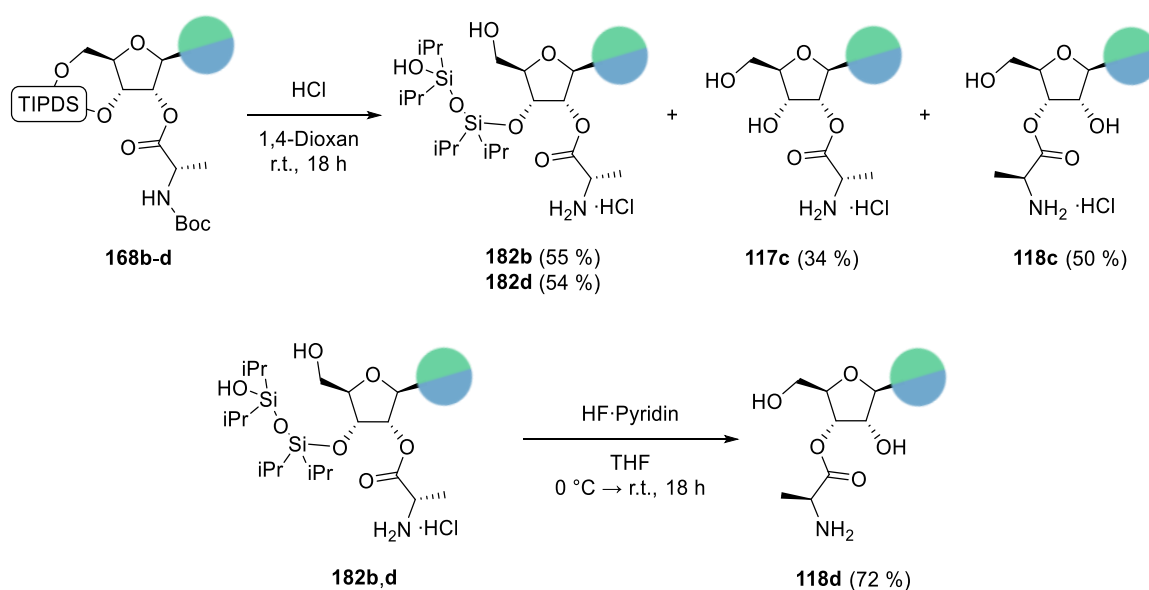


Abbildung 97. Reaktion der kanonischen Nukleoside **168b-d** mit HCl zu **182b,d** sowie **117c** und **118c,d**.

Da alle verwendete Nukleobasen primäre oder sekundäre Amine enthalten, stellte sich die Frage, ob diese aufgrund einer möglichen Wechselwirkung (dreidimensionale Anordnung) mit den Estern einen Einfluss auf die Wanderung haben. Nebularin, bestehend aus Purin als Nukleobase, und N^6,N^6 -Dimethyladenosin (DMA), bestehend aus N^6,N^6 -Dimethyladenin, wurden ausgewählt, um die Migration ohne primäre Amine zu untersuchen. Bei der Synthese zu den 3',5'-TIPDS-geschützten *N*-Boc-L-Ala-veresterten-Nukleosiden **168f** und **168g** mussten zuerst die freien Nukleoside hergestellt werden (**Abbildung 98**). Die Synthese zu Nebularin wurde mit der Deaminierung von **183a** mit *tert*-Butylnitrit in THF bei 60 °C begonnen. Die anschließende Deacetylierung der Hydroxygruppen von **184f** durch Ammoniak in Methanol lieferte Nebularin (**2f**) in sehr guter Ausbeute. Das DMA-Nukleosid (**2g**) konnte durch Reaktion von 6-Chloroadenosin (**185**) mit Dimethylamin und NEt_3 in DMF in guter Ausbeute isoliert werden.

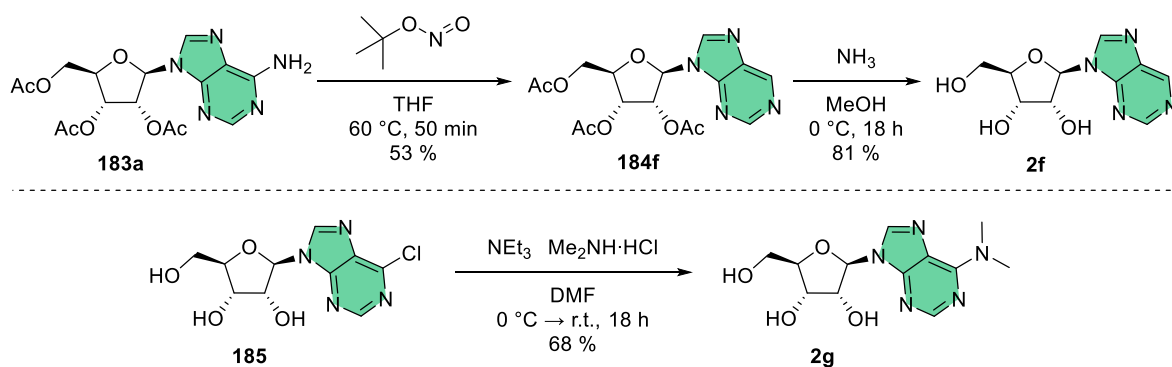


Abbildung 98. Synthese der ungeschützten Nukleoside **2f** und **2g**.

Mit den beiden freien Nukleosiden **2f** und **2g** konnte die etablierte Route zu den 3',5'-TIPDS-geschützten und *N*-Boc-*L*-Ala-veresterten Nukleosiden **168f** und **168g** begonnen werden (**Abbildung 99**). TIPDS-Schätzung von **2f,g** zu **149f,g** und anschließende Veresterung mit *N*-Boc-*L*-Ala-OH lieferte **168f,g**. Die anschließende Desilylierung führte in beiden Fällen zur vollständigen Wanderung der Aminosäure in die 3'-Position (**118f,g**) ebenso wie zuvor bei Adenosin (**118a**) beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Amine in den Nukleobasen keinen Einfluss auf die Migration des Esters haben.

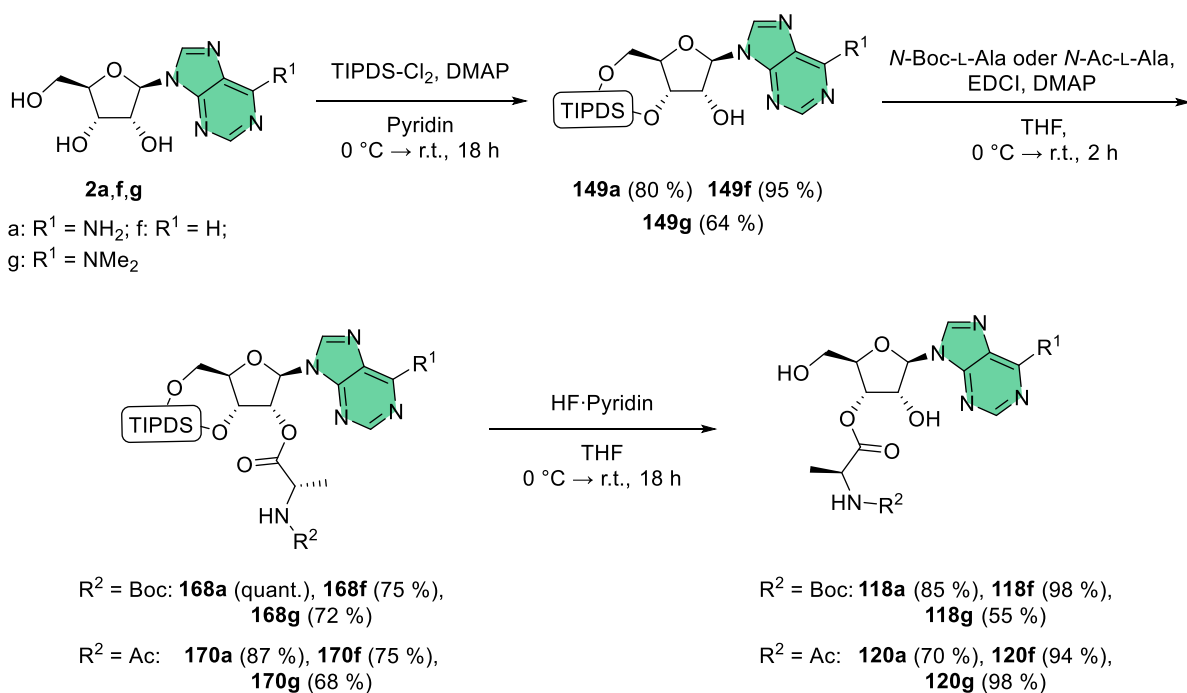


Abbildung 99. Synthese der *N*-Boc- oder *N*-Acetyl-geschützten 3'-Nukleoside **118a**, **118f**, **118g** und **120a**, **120f**, **120g**. **Xa** = Adenosin, $R^1 = \text{NH}_2$; **Xf** = Nebularin, $R^1 = \text{H}$; **Xg** = N^6,N^6 -Dimethyladenosin, $R^1 = \text{NMe}_2$.

Ein weiterer Punkt, der untersucht werden sollte, ist der Einfluss der Schutzgruppe der Aminosäure. Die Boc-Gruppe ist vergleichsweise sperrig, weshalb die Acetyl-Schutzgruppe untersucht werden sollte. Diese Schutzgruppe ist deutlich kleiner und ist des Weiteren präbiotisch plausibler, sodass diese Strukturen auch für die präbiotischen Untersuchungen des vorherigen Kapitels relevant waren. Das Verhalten von *N*-Acetyl-*L*-Alanin wurde an Adenosin, Nebularin und DMA untersucht. Die Synthese erfolgte analog zu den *N*-Boc-*L*-Ala-Derivaten, mit der 3',5'-TIPDS-Schätzung der Nukleoside zu **149a,f,g** gefolgt von der Veresterung mit *N*-Ac-*L*-Ala-OH zu **170a,f,g** (**Abbildung 99**). Entsilylierung zeigte ebenfalls die ausschließliche Entstehung des 3'-Isomers bei allen drei Nukleosiden (**120a,f,g**). Außerdem wurde **149a** mit *N*-Boc-*L*-Val-OH zu **186a** und mit *N*-Boc-*L*-Phe-OH zu **187a** verestert und anschließend mit HF-Pyridin entschützt,

Ergebnisse und Diskussion

um das Verhalten von anderen Aminosäuren an Adenosin zu untersuchen (**Abbildung 100**). Wie zuvor konnte auch hier die vollständige Wanderung der Aminosäuren zu **188a** und **189a** beobachtet werden. Dies ist aufgrund der erhöhten Sterik von Valin und Phenylalanin im Vergleich zu Alanin nicht weiter verwunderlich. Die verringerte Ausbeute der Veresterung zu **186a** und **187a** (78 % und 85 %) im Vergleich zur Verwendung von *N*-Boc-Ala-OH (quant.) könnte auch auf die erhöhte sterische Komplexität zurückzuführen sein.

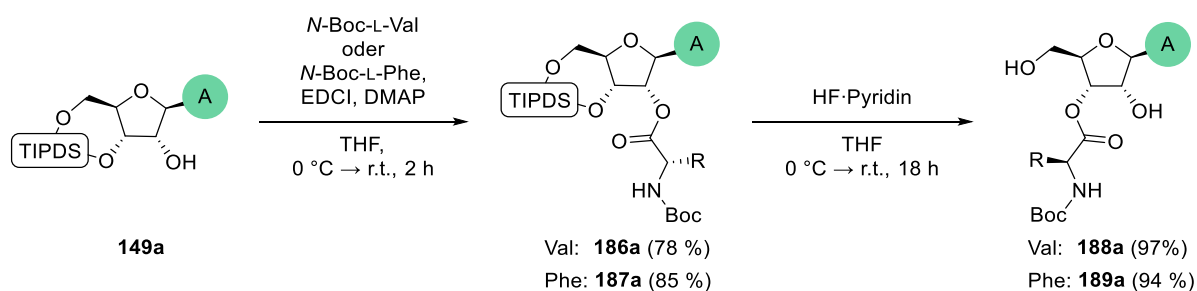


Abbildung 100. Synthese der *N*-Boc-L-Valin- und *N*-Boc-L-Phenylalanin-Derivate **188a** und **189a**. **186a/188a** (Val): R = -iPr, **187a/189a** (Phe): R = -Bn.

Bisher wurde die Stereochemie der 2'- und 3'-Hydroxygruppen zueinander noch nicht betrachtet. Im Falle der bisher verwendeten Ribose weisen die beiden in der Estermigration involvierten Hydroxygruppe die gleiche Stereoinformation auf. Bei Arabinose hingegen ist die Stereoinformation der beiden Hydroxygruppen entgegengesetzt. Deshalb wurde anhand von Vidarabin (**75a**), die Arabinosylform von Adenosin, der Einfluss der räumlichen Nähe der beiden Hydroxygruppen untersucht (**Abbildung 101**). Hierfür wurde **75a** 3',5'-TIPDS-geschützt und anschließend mit *N*-Boc-L-Ala-OH in exzellenter Ausbeute zu **169a** verestert. Die Entsilylierung lieferte in diesem Fall nicht das 3'-Isomer, sondern ausschließlich das nicht gewanderte 2'-Isomer **122a**. Dieses Ergebnis steht in klarem Kontrast zu den bisherigen an Adenosin durchgeführten Reaktionen, die allesamt eine Wanderung zum 3'-Isomer aufwiesen. Anschließende Boc-Entschützung zu **121a** zeigte ebenfalls keine Anzeichen einer Wanderung. Nachdem unter Verwendung von Pyridin mit HF keine Migration beobachtet werden konnte, wurde an **121a** der Einfluss anderer Stickstoffbasen untersucht. Inspiriert von den von SAKAMOTO *et al.* verwendeten Bedingungen, wurden sowohl DBU als auch NEt₃ in ACN benutzt, um die Wanderung zu katalysieren. Die Reaktionen wurden entweder mittels NMR oder UHPLC-QTOF-MS verfolgt.^[242] Auch bei diesen Experimenten konnten keine Zeichen einer Migration zu **190a** detektiert werden. Dies zeigt, dass die Konstellation der beiden Hydroxygruppen zueinander für die Estermigration

relevant ist. Diese Beobachtung könnte ein Selektionsmerkmal der Ribose über die Arabinose in der frühen Entwicklung der heutigen biochemischen Strukturen und Prozesse darstellen.

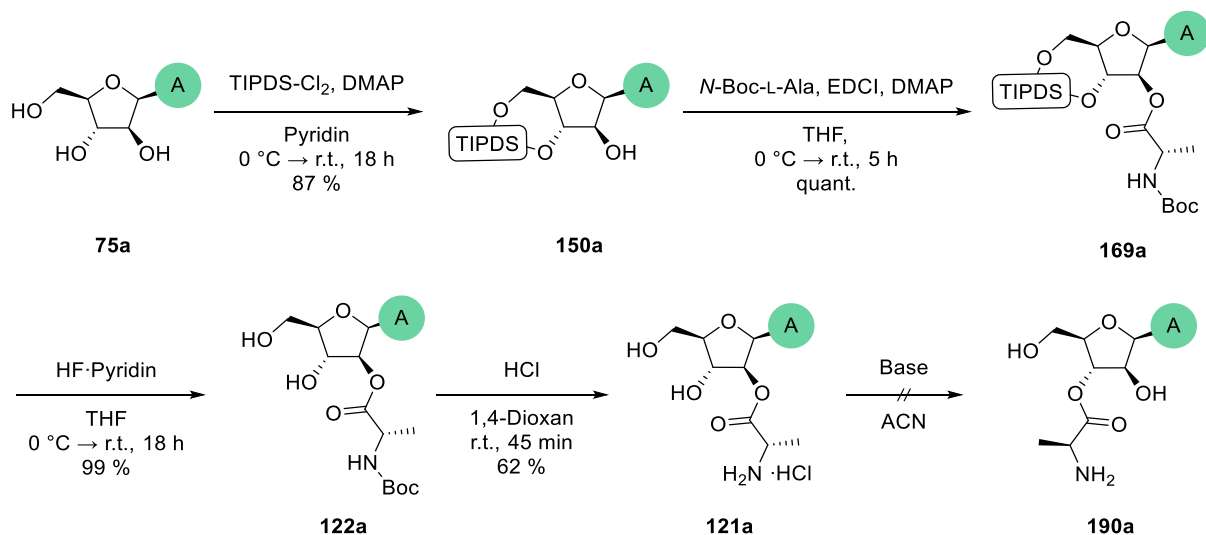


Abbildung 101. Synthese der Vidarabinvariante **121a** und die versuchte Estermigration vom 2'-Isomer **121a** zum 3'-Isomer **190a**.

4.3.3 Entwicklung einer stereo- und regioselektiven Syntheseroute zu modifizierten Nukleosiden

Die bisherigen Erkenntnisse der Esterwanderung sollten zur Entwicklung einer breiten synthetischen Anwendung für die Herstellung von verschiedenen Nukleosidisomeren genutzt werden. Bei der Untersuchung der Migration des Thioacetats konnte gezeigt werden, dass schwefelbasierte Ester zur Wanderung fähig sind. Bei der Synthese des Adenosin-Thioacetats **176a** (Abbildung 90) wurde bereits Triflat, der Ester der Trifluormethansulfonsäure, als Abgangsgruppe benutzt. Triflate können nicht nur in Substitutionsreaktionen eingesetzt werden, sondern finden unter anderem Verwendung in Kreuzkupplungsreaktionen.^[245-246] Es wurde ein hypothetischer Syntheseweg entworfen, ausgehend von einer Wanderung des Triflats, bei dem die Modifikation der Zuckereinheit in der 2'- und 3'-Position mit voller Kontrolle über die Regio- und Stereoselektivität möglich ist.

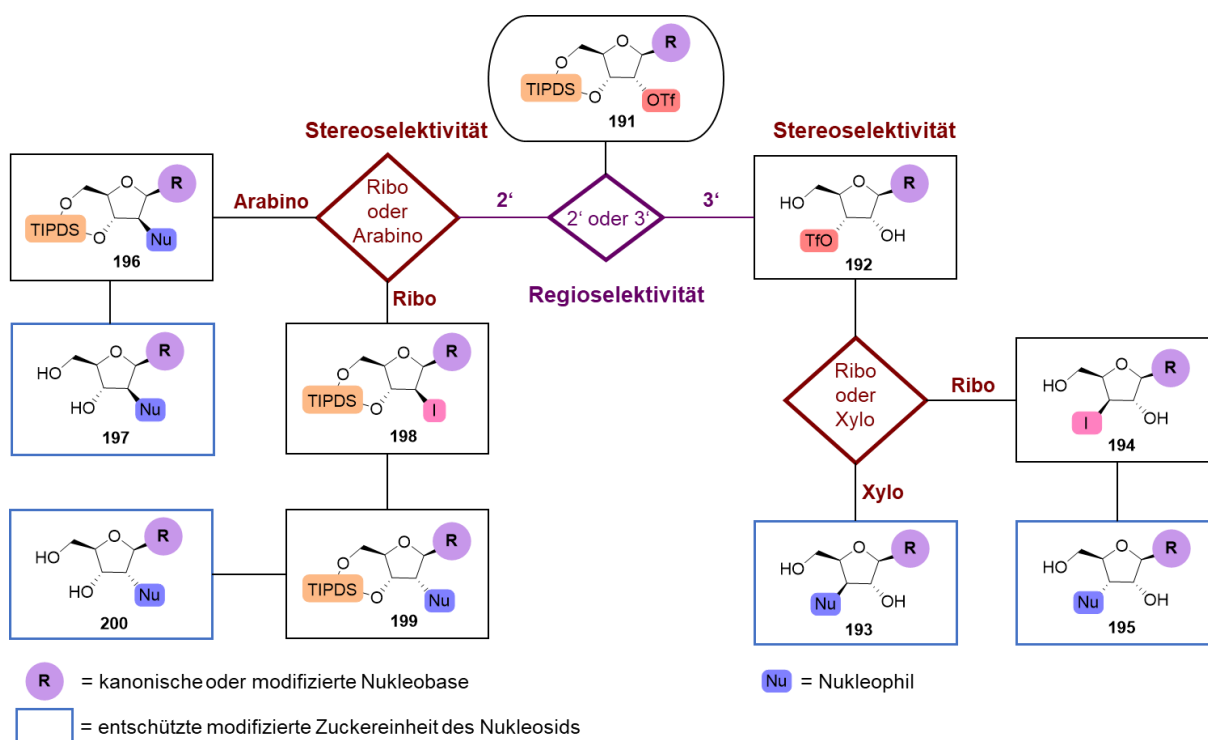


Abbildung 102. Entscheidungsbaum für die Modifizierungsmöglichkeiten der Zuckereinheit ermöglicht durch eine Wanderung der Triflatgruppe.

Ausgehend von 3',5'-TIPDS-2'-Triflat-Nukleosiden (**191**) könnte es durch Entsilylierung zur Wanderung des Triflats in die 3'-Position kommen (**192**). Dies würde die Wahl zwischen einem Ribosyl- oder Xylosyl-3'-modifizierten Produkt ermöglichen. Wenn Xylosyl-Nukleoside benötigt

werden, so müsste direkt nach der Desilylierung eine Substitution durchgeführt werden, sodass es zur Inversion der Stereoinformation kommen sollte (193). Wenn hingegen Ribosyl-Derivate gewünscht sind, müsste erst eine Inversion des Stereozentrums durchgeführt werden, z.B. durch Austausch des Triflats mit einem Iodid (194). Anschließend sollte durch Substitution die 3'-modifizierten Ribosyl-Nukleoside (195) erhalten werden können.

Wenn hingegen als erster Schritt nicht die Entschützung der TIPDS-Gruppe, sondern eine Reaktion des Triflats durchgeführt wird, sollte die Synthese von 2'-modifizierten Arabinosyl- oder Ribosyl-Nukleosiden möglich sein. Für Arabinosyl-Derivate könnte eine Substitution des Triflats mit einem Nukleophil durchgeführt werden (196). Wenn hingegen Ribosyl-Nukleoside synthetisiert werden sollen, so müsste zuerst eine Inversion des Stereozentrums durchgeführt werden (198). Dies könnte durch eine Reaktion mit Iodid erfolgen, woraufhin die nachfolgende Substitution wiederum eine Inversion mit sich bringt und die Ribosylform gebildet werden sollte (199). Anschließend Entsilylierung der Ribosyl- (199) oder Arabinosylform (196) sollte zu den freien an der Zuckereinheit modifizierten Nukleosiden führen (197, 200).

Abgesehen von Substitutionen könnten zur Modifikation der 2'- oder 3'-Position auch Kreuzkupplungsreaktionen durchgeführt werden. Hierbei kann über die Stereoinformation des Produkts oder der Verteilung der gebildeten Isomere keine Aussage getroffen werden.

Der Vorteil dieser vielfältigen Synthesemöglichkeiten ist, dass ausgehend von einem Edukt vier verschiedene Isomere und noch mehr sich in der Modifikation unterscheidenden Strukturen, synthetisiert werden können. Falls das zu modifizierende Nukleosid erst durch Glykosylierung hergestellt werden müsste, könnten so zu Beginn der Syntheseroute Reaktionsschritte in einem großen Maßstab durchgeführt werden und erst kurz vor Ende der Synthese kommt es zu einer Trennung der Wege. Dies würde einige Reaktionen einsparen, die sonst schon von Beginn an parallel mit allen benötigten Zuckerisomeren durchgeführt werden müssten.

All dies ist abhängig von der Fähigkeit der Wanderung der Triflatgruppe von der 2'- in die 3'-Position während der Entschützung mit HF·Pyridin. Deshalb wurde die Synthese des 3',5'-TIPDS-Adenosin-2'-Triflats **151a** anvisiert, um die mögliche Migration des Esters zu untersuchen (Abbildung 103). Ausgehend von **149a** konnte TIPDS-Adenosin-Triflat **151a** durch Verwendung von Triflatanhydrid und DMAP in DCM in sehr guter Ausbeute synthetisiert werden. Die anschließende Entschützung lieferte laut NMR ein freies Adenosin-Triflat als Produkt, allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, ob es zu einer Wanderung des Triflats kam. Die freien

Ergebnisse und Diskussion

Hydroxygruppen konnten im NMR nicht eindeutig zugeordnet werden und im Vergleich zu den zuvor benutzten Estern, war kein NMR-aktiver Kern vorhanden, der mittels HMBC-Kopplung eine Zuordnung ermöglicht hätte. Eine Derivatisierung des Triflats zur Aufklärung der Struktur war deshalb unumgänglich. Die Verwendung des Methyl-Grignards war aufgrund der vorliegenden Hydroxygruppen nicht erfolgreich. Auch der Ansatz der Acetylierung der Hydroxygruppen, um mittels HMBC-Kopplung bestimmen zu können welche Hydroxygruppen acetylgeschützt sind, brachte keinen Durchbruch. Die Verwendung von NaOMe in MeOH führte nicht zur Bildung des Methylethers, sondern vor allem zur Zersetzung zu Adenin. Deshalb wurden mildere Bedingungen gewählt und Triflat **201a** wurde in MeOH gelöst und für mehrere Stunden bei r.t. gerührt. Dies war allerdings ebenfalls nicht erfolgreich. Eine Reaktion von **201a** mit KCN in DMF führte zur Formation und erfolgreichen Isolation eines Produkts (**Abbildung 103**). Angenommen wurde die einfache Substitution des Triflats durch Cyanid, doch das NMR-Spektrum zeigte dafür untypische Signale. Stattdessen konnte als Produktstruktur **204a** nachgewiesen werden. Die Bildung erfolgt durch eine Eliminierung des Triflats und der damit verbundenen Enol-Bildung (**202a**). Tautomerisierung zum Keton (**203a**) und anschließender nukleophiler Angriff des Cyanids führten zur Bildung von **204a**. Da sich das Nitril laut NMR-Analyse in der 2'-Position befindet, muss das Edukt der Derivatisierung das 3'-Triflat (**201a**) gewesen sein. Somit konnte die Wanderung des 2'-Triflats erfolgreich demonstriert werden.

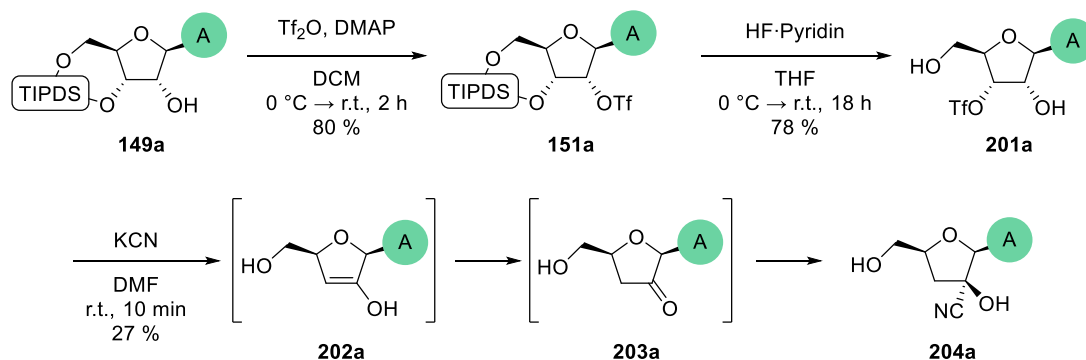


Abbildung 103. Synthese von **201a** mit anschließender Derivatisierung zu **204a** mit KCN.

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

In vorherigen Projekten des Arbeitskreises wurden Synthesen zu den kanonischen DNA-Nukleoside und zu Ribosylamin entwickelt. Diese wurden als Basis für einen präbiotischen Syntheseweg zur Wöhler-RNA genutzt (**Abbildung 104**). Hierbei wurden die beiden einfachen Aldehyde Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd sowie Biuret oder Triuret als Nukleobasen eingesetzt. Zur genauen Analyse der erwarteten Produkte und Unterscheidung von verschiedenen Produkten gleicher Masse wurden Referenzstrukturen synthetisiert. Es wurden sowohl die α -/ β -Biuret- und Triuret-Furanoside, als auch die korrespondierenden Pyranoside hergestellt.

Bei der präbiotischen Synthese des Biuret-Nukleosids konnte nachgewiesen werden, dass sich nicht nur das gewünschte β -Furanosid bildet, sondern sich auch das α -Furanosid und die Pyranoside bilden. Die präbiotische Reaktion weist eine enorme Robustheit auf und läuft insbesondere in Wasser bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten und Konzentrationen ab. Daher lässt sich vermuten, dass es zur Entstehung an unterschiedlichen Orten auf der Frühen Erde gekommen sein könnte. Die Triuret-Nukleosid-Synthese verläuft aufgrund der schlechten Löslichkeit von Triuret erst bei einer deutlichen Verdünnung erfolgreich ab. Konträr zur Biuret-Nukleosid-Synthese konnte einzig die Bildung der beiden Pyranosid-Anomere nachgewiesen werden. Anhand des angenommenen Reaktionsmechanismus sollte es in beiden Fällen zu einer ausschließlichen Bildung des β -Furanosids kommen. Da dies nicht der Fall ist, wurde eine anschließende Isomerisierung über eine offenkettige Zwischenstufe nach Bildung des β -Furanosids angenommen.

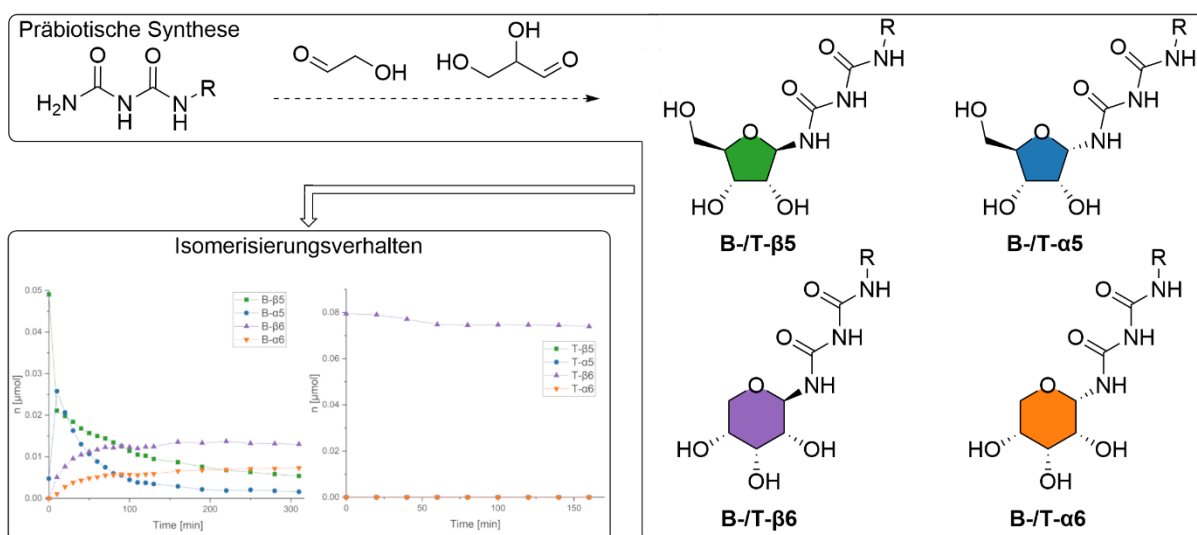


Abbildung 104. Grafische Zusammenfassung der Untersuchung der Wöhler-RNA. Von der präbiotischen Reaktion über die Aufklärung der Produktbildung bis hin zu Isomerisierungsuntersuchungen. B = Biuret; T = Triuret; 5 = Furanosid; 6 = Pyranosid.

Im Falle der Biuret-Nukleoside wurde die Isomerisierung der beiden Furanoside bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten im Verlauf von 24 h untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das α -Furanosid das stabilere Furanosid ist und die Anomerisierung der Furanoside bereits bei 20 °C abläuft. Die Isomerisierung zu den Pyranosiden beginnt erst bei 50 °C und tritt bei 80 °C verstärkt zu Tage. Ein basischer pH-Wert zeigt eine verstärkte Bildung der Pyranoside. Insgesamt ist der Einfluss der Temperatur deutlich stärker als der Einfluss des pH-Werts.

Da bei den Messungen der Biuret-Furanoside bei 80 °C eine sehr schnelle Isomerisierung innerhalb der ersten beiden Stunden beobachtet werden konnte, wurde anschließend die Umwandlung aller vier Biuret-Isomere einzeln bei 80 °C und bei pH 7 über den Zeitraum von 5 h im 10- bzw. 30-Minuten Takt betrachtet. Hierbei wurde beobachtet, dass sich beide Furanoside recht ähnlich verhalten. Es kommt zu einer sehr schnellen Anomerisierung innerhalb der ersten 10 Minuten zum jeweils anderen Furanosid, gefolgt von einer Isomerisierung zu den Pyranosiden, die nach ca. 2 h die Hauptspezies ausmachen. Die Pyranosid-Anomere verhalten sich untereinander auch recht ähnlich, unterscheiden sich allerdings maßgeblich von den Furanosiden. Es findet eine Umwandlung in die anderen Isomere statt, doch das Startpyranosid ist durchgehend das Hauptisomer.

Dieselbe Untersuchung wurde mit den Triuret-Isomeren für 150 Minuten bei 60 °C durchgeführt, da bei 80 °C die Zersetzung der Furanoside vor der Isomerisierung eintritt. Für die Triuret-Furanoside sieht man zu Beginn eine Anomerisierung, gefolgt von einer weitgehenden Zersetzung. Die Isomerisierung zu den Pyranosiden findet innerhalb dieser kurzen Zeitspanne kaum statt. Die Triuret-Pyranoside zeigen ein gänzlich anderes Bild. Die beiden Anomere zeigen eine enorme Stabilität, nicht nur gegenüber der Isomerisierung, sondern auch gegenüber den erhöhten Temperaturen. Dies ist im Einklang mit dem Ergebnis der präbiotischen Synthese, da ausschließlich die Pyranoside als Produkte nachgewiesen werden konnten, da die Furanoside unter den gewählten Synthesebedingungen nicht stabil sind.

Die Ergebnisse der Isomerisierungsuntersuchungen der Biuret- und Triuret-Nukleoside, sprechen gegen die Furanoside als plausible Proto-RNAs aufgrund der Isomerisierungsanfälligkeit. Falls die korrespondierenden Nukleotide eine erhöhte Stabilität aufweisen, könnte dies bei einer direkten Phosphorylierung der Nukleoside zur Entstehung eines plausiblen RNA-Vorläufers führen. Um dies zu untersuchen, müssten zuerst die β -Furanosid-Nukleotide hergestellt werden, damit diese

auf ihre Stabilität bei erhöhten Temperaturen untersucht werden können. Anschließend müsste eine präbiotische Phosphorylierung von den Nukleosiden zu den Nukleotiden etabliert werden.

Aufbauend auf der präbiotischen *in-situ* Synthese der Riboseeinheit der Wöhler-RNA wurde die Herstellung der kanonischen RNA-Nukleoside ausgehend von GA und GlyA untersucht. Allerdings konnte aufgrund der vorliegenden Keto-Enol-Tautomerisierung des Glykolaldehyds nach der Enaminbildung an der Nukleobase keine universelle Synthese für die biologisch relevanten Nukleoside entwickelt werden. Eben diese Bildung eines erneuten Aldehyds inspirierte die Untersuchung der präbiotischen Synthese von tRNA-Vorläufer Nukleosiden (**Abbildung 105**). Dabei wurde die Herstellung sowohl von 2'-N- als auch von 2'-C-Aminosäure-verknüpften Nukleosiden untersucht. In beiden Fällen wurden Referenzstrukturen basierend auf Adenosin als Modellnukleobase und Alanin als Aminosäure synthetisiert. Außerdem wurden nicht nur die Ribosyl-Derivate, sondern auch die Arabinosyl-Derivate hergestellt.

Für die präbiotische Synthese der N-verknüpften Derivate wurden verschiedene One-Pot Reaktionen bestehend aus Adenin, L-Alanin, GA und GlyA untersucht. Mittels HRMS-ESI Messungen konnte die Bildung der gewünschten Produktmasse nachgewiesen werden. UHPLC-QTOF-MS-Messungen zeigten keine Übereinstimmung in der Retentionszeit der gebildeten Produkte mit den zuvor als Referenzstrukturen hergestellten Ribosyl- und Arabinosyl-Derivaten.

Da für die erfolgreiche Bildung der anvisierten tRNA-Nukleosid-Analoga eine drei-schrittige Reaktionskaskade nötig ist, wurde das Produkt der Reaktion zwischen Adenin und GA synthetisch durch Ozonolyse hergestellt und anschließend in den präbiotischen Reaktionen eingesetzt.

Für präbiotischen One-Pot Reaktionen ausgehend vom Adenin-GA-Aldehyd wurde dieses mit L-Alanin und GlyA versetzt. Trotz Variation der Stöchiometrie, des pH-Werts sowie der Verwendung von verschiedenen Additiven konnte bei keiner Reaktion eine Produktbildung nachgewiesen werden. Es wurde deshalb die schrittweise Zugabe der Reaktanten untersucht, um mögliche Nebenreaktionen zu minimieren. Eine vorgelagerte Bildung des Adenin-GA-Alanins und anschließende Zugabe von GlyA lieferte lediglich Produkte, welche strukturell von den gewünschten Molekülen abweichen. Die Bildung der erwarteten Produktmasse ohne Übereinstimmung der Retentionszeit spricht für die Bildung von verschiedenen Isomeren. Dabei ist es wahrscheinlich, dass Regioisomere aufgrund von Kondensation des Glycerinaldehyds an die Nukleobase entstanden. Auch die Vereinfachung des Systems durch die Verwendung von Ammoniak anstelle von Alanin, um ein *proof-of-concept* zu ermöglichen, verlief nicht erfolgreich.

Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund dessen wurde dieses Thema der *N*-verknüpften tRNA-Nukleosid-Vorläufer nicht weiterverfolgt.

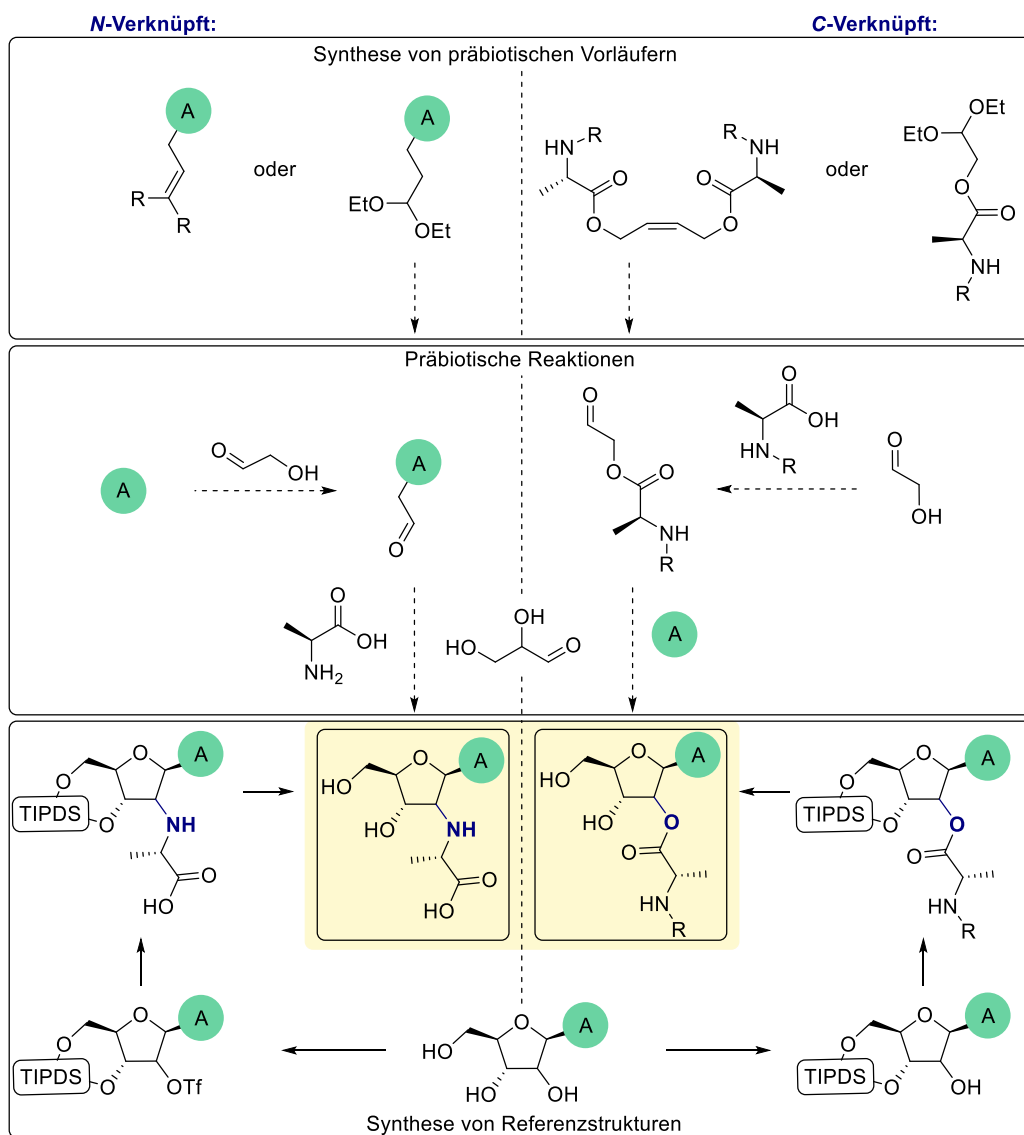


Abbildung 105. Übersichtsgrafik über das Thema der präbiotischen tRNA-Nukleosid-Analoga. Von der Synthese von präbiotischen Vorläufern zu den präbiotischen Reaktionen bis hin zur Synthese der Referenzsubstanzen.

Für die *C*-verknüpften Derivate erfolgte die Synthese der Referenzsubstanz nach 3',5'-TIPDS-Schätzung des Nukleosids mittels STEGLICH-Veresterung mit einer *N*-geschützten Aminosäure gefolgt von einer Desilylierungsreaktion und einer Entschätzung des Amins. Bei der Desilylierung der Ribosylform konnte eine Wanderung der Aminosäure von der 2'- in die 3'- Position beobachtet werden.

Für die präbiotischen Synthesen der C-verknüpften tRNA-Nukleosid-Analoga musste eine veresterte Aminosäure als präbiotisch plausibles Startmaterial hergestellt werden. Die Synthese des für diese Reaktion notwendigen Aminosäure-Glykolaldehydesters gelang in zwei Schritten mit mittlerer Ausbeute. Ausgehend von diesem Edukt kann durch Reaktion mit Adenin ein Enamin gebildet werden, an welchem Glycerinaldehyd angreifen könnte, gefolgt von einer Ringschlussreaktion zum 2'-modifizierten Ribosid.

Mit Ala-GA-Aldehyd als Edukt wurden verschiedene präbiotische Reaktionen getestet. Es wurden zum einen One-Pot Reaktionen angesetzt, zum anderen Reaktionen, bei denen zuerst die Bildung des Adenin-GA-Alanins gefolgt von der Zugabe von GlyA untersucht wurde. Trotz Variation der Temperatur, des Lösungsmittels, der Stöchiometrie und dem Einsatz von verschiedenen Additiven konnte keine Übereinstimmung der gebildeten Produkte mit den Referenzsubstanzen beobachtet werden. Stattdessen kam es auch hier zur Bildung von diversen Regioisomeren der antizipierten C-verknüpften tRNA-Nukleoside.

Um die möglicherweise störende Anwesenheit von Chlorid-Ionen im Produkt zu vermeiden, wurde ein auf Ozonolyse basierender Syntheseweg zu geschützten Ala-GA-Aldehyden entworfen. Die Synthesen der entsprechenden N-geschützten Aldehyde verlief in Ausbeuten mit bis zu 76 %. Jedoch ergab die finale Entschützung in keinem Fall das erwartete freie Aminoaldehyd.

Da die bisherigen präbiotischen Reaktionen unter Verwendung des ungeschützten Ala-GA-Aldehyds nicht erfolgreich verliefen, wurden Reaktionen mit N-geschützten Ala-GA-Aldehyden an Purin-basierten Nukleobasen untersucht. Es konnte keine erfolgreiche Bildung der gewünschten Nukleosid-Derivate nachgewiesen werden. MSMS-Messungen unterstützen die Vermutung, dass es zur Reaktion der Aldehyde an verschiedenen Stellen der Nukleobase kam.

Da der Riboseaufbau an der Wöhler-RNA und für die Bildung von Ribosylamin bei der Synthese von NAD erfolgreich verlief, stellt sich die Frage, weshalb die Reaktion nicht an den kanonischen Nukleosiden abläuft und wieso auch die auf der Tautomerie beruhende Synthese von tRNA-Nukleosid Vorläufern nicht erfolgreich war. Als Grund könnte zum einen eine mögliche Abschirmung durch die kanonischen Nukleobasen vorliegen, zum anderen kann die geringere Reaktivität der Nukleobasen dazu führen, dass die gewünschten Produkte nur unterhalb des Detektionslimits gebildet werden. Weitere Forschung sollte darauf abzielen, die tRNA-Vorläufer an vereinfachten Nukleobasen aufzubauen, die ein primäres Amin als Reaktionsstelle aufweisen.

Hierdurch könnte ein *proof-of-concept* durchgeführt werden, von dem aus neue Erkenntnisse für die mögliche Synthese mit den kanonischen Nukleobasen gewonnen werden können.

Aufbauend auf der Wanderungsfähigkeit von Estern wurde eine biomimetische Estermigration an Nukleosid-Derivaten untersucht (**Abbildung 106**). Die Wanderung von der 2'-Position zur 3'-Position der Ribose wurde bei der Desilylierung während der Synthese der Referenzsubstanzen für die C-verknüpften tRNA-Nukleosid-Vorläufer bereits beobachtet und findet in der Natur während der Proteinbiosynthese Anwendung.

Für die genauere Untersuchung wurde, in Analogie zu den in der Natur vorkommenden tRNA-Nukleosiden, anfänglich Adenosin als Nukleosid gewählt. Zu Beginn wurde die Wanderung der Acetylgruppe von der 2' in die 3'-Position untersucht, weshalb zuerst eine 3',5'-TIPDS-Schützung gefolgt von einer Veresterung nach STEGLICH mit Essigsäure in der 2'-Position der Ribose durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Silylgruppe mittels HF·Pyridin entfernt, während dieser Reaktion erfolgte die Wanderung des Esters. Im Falle der verhältnismäßig kleinen Acetylgruppe kommt es zu keiner vollständigen Wanderung, sondern zur Bildung eines unter den benutzten Methoden nicht trennbaren Regioisomerengemisch. Das Verhältnis der beiden Isomere konnte mittels NMR-Analytik bestimmt werden und lag auf der Seite des gewanderten 3'-Derivats mit 67:33 (3' zu 2').

Anschließend wurde die Acylwanderung mit *N*-Boc-L-Alanin, einem sterisch anspruchsvolleren und den natürlichen tRNA-Nukleosiden näheren Ester, untersucht. Die Synthese verlief über eine Veresterung des 3',5'-TIPDS-Adenosins mit der *N*-Boc-geschützten Aminosäure. Die Desilylierung mit HF·Pyridin führte zur vollständigen Wanderung der Aminosäure in die 3'-Position.

Bisher wurde als Entschützungsreagenz ausschließlich HF·Pyridin verwendet. Um den Einfluss der Reagenzien auf die Wanderung zu untersuchen, wurden verschiedene Desilylierungsmethoden an 2'-*N*-Boc-L-Ala-3',5'-TIPDS-Adenosin getestet. Der Einsatz von anorganischen Fluoridsalzen, z.B. NaF oder CsF, führte zur vollständigen Zersetzung des Edukts zu Adenosin und Adenin. Die Verwendung von TBAF und TASF führte ebenfalls zu einer nahezu vollständigen Zersetzung. HF·NEt₃ zeigte sehr ähnliche Ergebnisse zu HF·Pyridin, da bei beiden die komplette Wanderung in die 3'-Position beobachtet werden konnte und die Ausbeute ca. 85 % betrug. Als nicht Fluoridquelle wurde der Einsatz von HCl zur Spaltung der Silylgruppe untersucht. Hierbei kam es

zunächst zur Boc-Entschützung der Aminosäure, gefolgt von der Bildung von drei Produkten. Zum einen wurden die beiden vollständig entschützten 2'- und 3'-L-Alanin-Adenosin Isomere isoliert, zum anderen konnte ein teilsilylentschütztes Produkt identifiziert werden. Das Verhältnis der vollständig entschützten Isomere lag auf der Seite der 2'-Form mit 42:58 (3' zu 2'). Dieses Ergebnis kann an der verringerten Sterik im Vergleich zur Boc-geschützten Variante liegen oder der Abwesenheit einer Stickstoffbase, sowie dem Verzicht auf HF liegen. Zur weiteren Untersuchung wurde das Boc-entschützte und teilsilylentschützte 2'-Alanin-Adenosin mit HF·Pyridin vollständig entschützt. Es wurde ein Regioisomerengemisch der beiden komplett entschützten Produkte erhalten, bei dem das Verhältnis auf der Seite der 3'-Form lag (83:17 3' zu 2'). Dies spricht dafür, dass der Einfluss der Stickstoffbase überwiegt, da bei der HCl Entschützung das 2'-Isomer das Hauptprodukt bildete. Aber auch die Sterik scheint eine Rolle zu spielen, wenn man das Ergebnis der Aminosäurewanderung mit dem der Acetylwanderung (67:33 3' zu 2') unter Verwendung von HF·Pyridin vergleicht.

Nachfolgend wurde anhand der Wanderung der Aminosäure an den verbliebenen kanonischen RNA-Nukleosiden, Cytidin, Uridin und Guanosin, untersucht, ob es einen Grund gibt, weshalb in der Natur fast ausschließlich Adenosin verwendet wird. Es konnte festgestellt werden, dass es bei allen Nukleosiden zu einer vollständigen Wanderung der Aminosäure in die 3'-Position kam. Auch die Verwendung von Nebularin und N^6,N^6 -Dimethyladenosin als Nukleoside lieferte das gleiche Ergebnis. Die Nukleobasen scheinen folglich keinen großen Einfluss auf die Wanderung auszuüben.

Als nächstes wurde der Einfluss der Stereochemie der beiden involvierten Hydroxygruppen (2' und 3') untersucht. Hierzu wurde 2'-N-Boc-Ala-3',5'-TIPDS-Vidarabin mittels HF·Pyridin silylentschützt, wobei keine Wanderung der Aminosäure während der Entschützung nachgewiesen werden konnte. Es wurde anschließend versucht die Wanderung in die 3'-Position unter Verwendung von Triethylamin oder DBU zu induzieren, dies zeigte nicht das erwartete Ergebnis. Diese Beobachtung könnte ein Selektionsmerkmal der Ribose über die Arabinose in der frühen Entwicklung der heutigen biochemischen Strukturen und Prozesse darstellen.

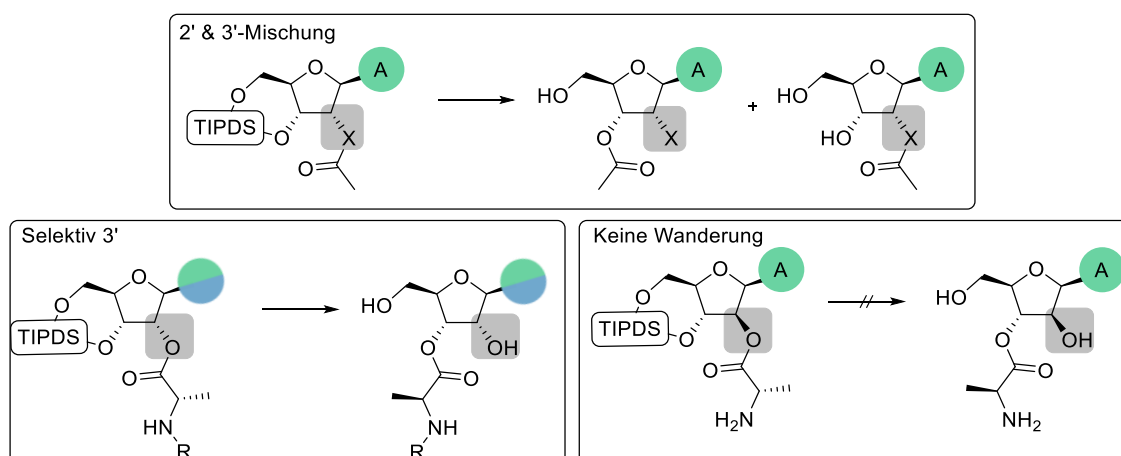


Abbildung 106. Überblick über die Ergebnisse des biomimetischen Acylwanderung an Nukleosiden.

Diese bisherigen Erkenntnisse der biomimetischen Acylwanderung wurden nun in Hinsicht auf eine breite synthetische Anwendung genutzt. Es wurde untersucht, ob die Wanderung einer Triflatgruppe in die 3'-Position möglich ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine vollständige Migration abläuft. Triflate können für Substitutionsreaktionen oder Kreuzkupplungen eingesetzt werden. Durch die Möglichkeit der Wanderung sollte, abhängig vom Zeitpunkt der Entschützung und der Modifikationen an der Zuckereinheit, eine volle Kontrolle über die Regio- und Stereoselektivität der gebildeten Nukleoside gewährleistet sein. Ausgehend von den 2'-Triflat-3',5'-TIPDS-Nukleosiden sollten selektiv die Ribosyl-, Arabinosyl- und Xylosyl-Derivate synthetisiert werden können.

Kapitel 6

Experimental

6.1 General Methods

All chemicals and solvents were purchased from Abcr GmbH, Acros Organics b.v.b.a., Sigma-Aldrich Co. LLC, BLD pharm or TCI and were used without further purification if not stated otherwise. For analysis HPLC-grade respectively HPLC-MS grade solvents were used. A VWR Puranity PU 15 was used for the ultrapure water. Argon gas (Ar 5.0) and ammonia gas (NH₃ 3.8) were acquired from Air Liquide Germany GmbH.

Reactions with water- or air-sensitive compounds were performed, applying standard *Schlenk* techniques. The used glassware has been dried under high vacuum by using a heat gun and was consecutively flushed with argon. To ensure water- and air-free reaction conditions and a pressure compensation during the reaction, the equipment was closed with septa and an argon-filled balloon. Furthermore, syringes and needles were used to transfer solvents or reagents and were purged three times with argon prior to use. Purified products were dried under high vacuum. Dry solvents were dried with a MBraun solvent purification system (MB SPS-800) or purchased. The solvents for reactions without inert atmosphere or work-up were of reagent grade or purified by distillation.

Chromatography:

Purification of products was accomplished using normal phase column chromatography on silica (35 – 70 µm, thermo scientific) or an Interchim puriFlash System (puriFlash 5.050 or XS520Plus), named flash column chromatography. Thin layer chromatography for reaction control as well as for control of column chromatographic purification was performed with Polygram® Sil G/UV254. Visualization of the developed chromatogram was performed using UV-light (254 nm and 356 nm) or KMnO₄ stain (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, and 1.25 mL 10% NaOH in 200 mL water).

Experimental

NMR:

^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -, and 2D-NMR-spectra for product characterization were recorded on Bruker Avance III HD 400, Bruker Avance III HD 800 or a Varian Inova 600. Deuterated solvents were used and the spectra calibrated to the residual solvent peak. Chemical shifts δ are reported in ppm, coupling constants $J_{\text{H-H}}$ in Hz and peak multiplicities are abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet or a combination of these descriptions. Atom numbering for NMR assignments is not based on IUPAC. Assignment of all signals was realized using 2D NMR spectra (COSY, HSQC, HMBC or sometimes NOESY). Numbers separated by “,” refer to an assignment of both atoms, numbers separated by “/” refer to an assignment of one or more of the atoms depending on the integrals. Magnetically inequivalent hydrogen atoms of the same carbon atom are differentiated by a and b.

ESI-MS:

The High-resolution ESI mass spectra were recorded using a Thermo Fisher Exactive Plus Orbitrap *via* direct injection. iPrOH/water (80:20 + 0.05% formic acid) was used as the injection solvent and the ions were analysed in the scan range from xxx to xxx with no prior splitting. The flow rate was set to 0.1 mL/min. The following parameters were applied during the mass analysis: Sheath gas flow: 2.00 L/min; auxiliary gas flow rate: 1.00 L/min; spray voltage: 4.00 kV; spray current: 0.80 kA; capillary temperature: 280 °C. The clean compounds were dissolved in ACN, iPrOH or ultrapure water. The reaction mixtures were prepared by diluting 10 μL of the mixture with 990 μL ultrapure water (if not stated otherwise), filtered and then used for the HRMS-measurements.

EI:

EI spectra were recorded with a Thermo Finnigan LTQ FT Ultra Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance mass spectrometer. For data processing, the Qual Browser of the Thermo Scientific Xcalibur 4.1 software suite (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) was used.

UHPLC-QTOF-MS:

An Agilent Technologies 1260 Infinity II LC System coupled with a downstream Agilent 6550 iFunnel Q-TOF/MS was used. As a solvent system ultrapure water (containing 0.05% (v/v) formic acid) (eluent A) and methanol (eluent B) were used. The following parameters were applied during the analysis if not further specified: no prior splitting, gas temperature: 250 °C, drying gas flow: 14.00 L/min, nebulizer pressure: 2.41 bar, sheath gas temperature 350 °C, sheath gas flow: 11.00 L/min, capillary voltage: 4.00 kV, capillary current: 0.188 μ A and nozzle voltage 1 kV, fragmentor voltage 180 V; for internal calibration the Agilent Technologies ESI-TOF reference mass solution was used, diluted in ACN/water (95:5). The internal reference masses were set to 121.050873 and 922.009798.

Method A: A Phenomenex Luna C18 (4.6 mm x 250 mm, 5.00 μ m particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 20 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	100	0	0.4
20.00	99	1	0.4
20.01	0	100	0.4
25.00	0	100	0.4
25.01	100	0	0.4
31.00	100	0	0.4

Method B: A Phenomenex Luna C18 (4.6 mm x 250 mm, 5.00 μ m particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	99.9	0.1	0.9
10.00	99.9	0.1	0.9

Experimental

Method C: A Phenomenex Luna C18 (4.6 mm x 250 mm, 5.00 μm particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	99.9	0.1	0.9
20.00	99.9	0.1	0.9

Method D: An Agilent Zorbax Extend-C18 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 μm particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	100	0	0.550
0.54	100	0	0.550
2.92	60	40	0.550
3.51	60	40	0.550
3.54	0	100	0.500
4.11	0	100	0.500
4.14	100	0	0.500
11.00	100	0	0.500

Method E: An Agilent Zorbax Extend-C18 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 μ m particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	100	0	0.550
0.54	100	0	0.550
2.92	60	40	0.550
3.51	60	40	0.550
19.11	0	100	0.500
19.14	100	0	0.500
22.00	100	0	0.500

Method F: An Agilent Zorbax Extend-C18 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 μ m particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	80	20	0.550
30.00	80	20	0.550

Experimental

Method G: A Dr. Maisch GmbH ReproSil-Pur 120 C18-AQ (100 mm x 2 mm, 2.4 µm particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	100	0	0.550
0.98	100	0	0.550
5.30	60	40	0.550
6.37	60	40	0.550
6.41	10	90	0.550
14.51	0	100	0.550
19.55	0	100	0.550
19.59	100	0	0.550
24.00	100	0	0.550
27.00	100	0	0.550

Method H: A Dr. Maisch GmbH ReproSil-Pur 120 C18-AQ (100 mm x 2 mm, 2.4 µm particle size) column was used for the separation at a constant temperature of 40 °C.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	100	0	0.550
0.98	100	0	0.550
5.30	60	40	0.550
6.37	60	40	0.550
6.41	0	100	0.550
14.51	0	100	0.550
14.55	100	0	0.550
21.77	100	0	0.550

Prep. HPLC:

An Agilent Technologies 1260 Infinity semi-preparative LC System was used for the preparative high-performance liquid chromatography. The separation was performed on a Phenomenex Luna C18 (21.2 mm x 250 mm, 5.00 µm particle size) column and as the mobile phase ultrapure water (eluent A) and ACN (eluent B) were used. During analysis the column was constantly kept at room temperature. Automatic collection of the fractions took place.

Method J:

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	99.9	0.1	18
15.00	99.9	0.1	18

Experimental

Method K:

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00	99.9	0.1	18
30.00	99.9	0.1	18

Lyophilisation:

A Christ Alpha 1-2 LDPlus was used for lyophilisation. The samples were prepared by freezing in liquid nitrogen prior to lyophilisation.

Ozone Generator:

A Aktobis water ozone generator WDH-WP15 was used for the generation of ozone during the ozonolysis.

6.2 General Procedures

General Procedure for the Prebiotic Reactions and the Preparation for Analysis:

The educt solids (if not stated otherwise 100 μmol) were added to a GC-Vial equipped with a stirring bar. Then the respective solvent (if not stated otherwise 1 mL/100 μmol) was added, followed by the addition of liquids if necessary, the vial was closed (except for the Wet-dry-cycle reactions) and it was placed in a heating block at the respective temperature. After the respective reaction time, the vial was cooled to r.t., opened, and if not stated otherwise 10 μL of the reaction mixture were added to 990 μL of ultrapure water/MeOH/ACN or *i*PrOH. The reaction vial was closed and if necessary heated again at the corresponding temperature. The diluted reaction mixture was filtered using a syringe filter and could be analysed afterwards.

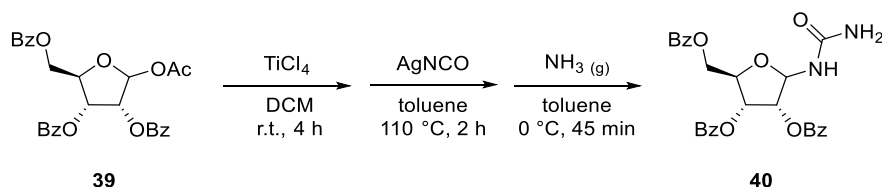
General Procedure for Ozonolysis:

The respective olefinic compound was dissolved in dry DCM (5 mL/mmol olefin). The solution was cooled to either 0 $^{\circ}\text{C}$ or -78 $^{\circ}\text{C}$ (depending on solubility) and dried oxygen (passed through columns of both orange gel and P_4O_{10}) was bubbled through. Then ozone (generated from the same oxygen stream) was bubbled through until the solution turned blue (5 min to 1 h depending on the olefin). The ozone generator was turned off and first oxygen, then nitrogen was bubbled through to remove any excess ozone. Once the solution lost all blue colour, DMS (100 μL /mmol olefin) was added to the solution and the mixture was stirred for another 1 h while warming to room temperature. All volatiles were removed *in vacuo* to obtain the respective aldehyde as a viscous liquid, which was purified by column chromatography where necessary/possible.

6.3 Wöhler-RNA

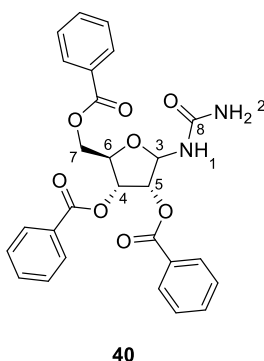
6.3.1 Synthetic Procedures and Characterisation of Isolated Compounds

Benzoyl-Urea-Furanoside (**40**)



This reaction was performed according to a literature procedure.^[190]

1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-1-β-D-ribose (**39**) (10.3 g, 20.4 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry DCM (100 mL) and TiCl₄ (3.14 mL, 28.6 mmol, 1.40 equiv.) was added dropwise. The yellow solution was stirred for 4 h at room temperature before water (50 mL) was added. The aqueous layer was extracted with DCM and the combined organic layers were washed with a sat. aq. NaCl-solution and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in dry toluene (120 mL). AgNCO (3.67 g, 24.5 mmol, 1.20 equiv.) was added and the reaction was stirred at 110 °C for 2 h. After cooling down to room temperature the purple suspension was filtered over celite. The filtrate was cooled to 0 °C and NH₃-gas was bubbled through it for 45 minutes. The solvent was removed *in vacuo* and after purification using flash column chromatography (DCM 100 % → DCM/MeOH 95:5) Compound **40** was obtained as a white solid (6.73 g, 13.7 mmol, 65 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₇H₂₅O₈N₂⁺ [M+H]⁺: 505.1605; found 505.1607.

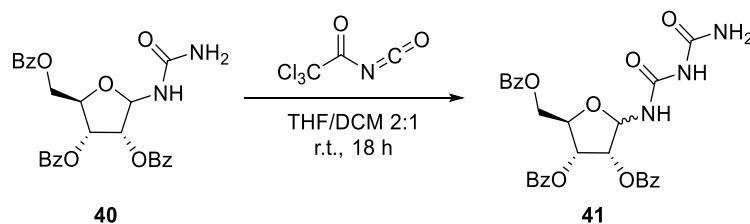
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.08 – 8.02 (m, 2H, H^{Bz}), 7.87 (ddd, J = 8.4, 4.0, 1.4 Hz, 4H, H^{Bz}), 7.72 – 7.60 (m, 3H, H^{Bz}), 7.58 – 7.50 (m, 2H, H^{Bz}), 7.50 – 7.40 (m, 4H, H^{Bz}), 7.24 (d, J = 9.7 Hz, 1H, H^1), 5.89 (s, 2H, H^2), 5.75 – 5.66 (m, 2H, $\text{H}^{3,4}$), 5.49 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H^5), 4.60 – 4.44 (m, 3H, $\text{H}^{6,7}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 165.6 – 164.8 (3C, $\text{C}^{\text{Bz-CO}}$), 157.4 (C^8), 133.9 – 128.6 (15C, C^{Bz}), 83.1 (C^3), 77.16 (C^6), 73.4 (C^5), 71.2 (C^4), 64.54 (C^7).

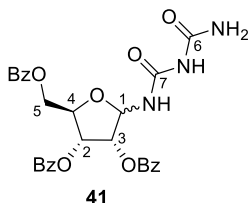
R_f: 0.56 (EtOAc 100 %).

Experimental

Benzoyl-Biuret-Furanoside (**41**)



Benzoyl-ribose-urea (**40**) (2.52 g, 5.00 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (120 mL) and dry DCM (60 mL). To the solution was trichloroacetyl isocyanate (1.96 mL, 16.5 mmol, 3.30 equiv.) added dropwise and the reaction was stirred over night at room temperature. After 18 h an excess of Al_2O_3 and MeOH were added and further stirred for 1 h. The suspension was filtered and the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash column chromatography (cHex/EtOAc 80:20 \rightarrow cHex/EtOAc 50:50) benzoyl-biuret-furanoside (**41**) was obtained as a white solid (2.67 g, 4.90 mmol, 98 %).

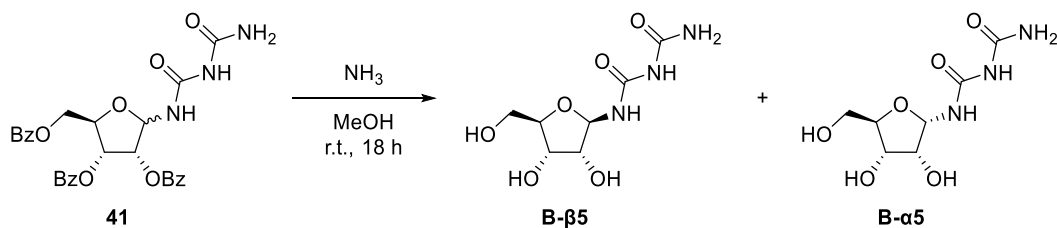


HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 548.1664, found: 548.1665.

^1H -NMR (599 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.05 (dt, J = 8.4, 1.6 Hz, 2H, H^{Bz}), 7.97 – 7.94 (m, 2H, H^{Bz}), 7.93 – 7.89 (m, 2H, H^{Bz}), 7.58 – 7.51 (m, 3H, H^{Bz}), 7.41 – 7.34 (m, 6H, H^{Bz}), 5.85 (dd, J = 8.5, 5.3 Hz, 1H, H^1), 5.83 – 5.78 (m, 1H, H^2), 5.71 (t, J = 5.4 Hz, 1H, H^3), 4.69 – 4.63 (m, 2H, $\text{H}^{4,5a}$), 4.60 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H^{5b}).

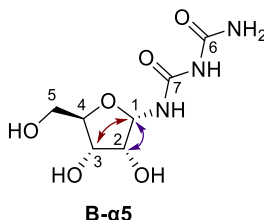
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 166.5 – 165.7 (3C, $\text{C}^{\text{Bz-CO}}$), 155.9 (C^6), 154.9 (C^7), 133.9 – 128.6 (15C, C^{Bz}), 83.2 (C^1), 78.9 (C^4), 73.8 (C^3), 71.8 (C^2), 63.9 (C^5).

R_f: 0.35 (DCM 100 %).

Biuret-Furanosides (**B-β5** and **B-α5**)

Benzoyl-biuret-furanoside (**41**) (1.00 g, 1.83 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in an methanolic ammonia solution (4 M, 91.0 mL, 365 mmol, 200 equiv.) and stirred for 18 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and purification using reverse phase flash chromatography (H₂O 100 % → H₂O/ACN 0:100) yielded a mixture of the α- and β-biuret-furanosides (**B-α5** and **B-β5**) (195 mg, 824 μmol, 45 %). Separation using a prep. HPLC system (method J) yielded **B-α5** (116 mg, 494 μmol, 60 %) as well as **B-β5** (20.0 mg, 82.0 μmol, 10 %) as white solids.

Characterization of the isomers was accomplished using NOESY-coupling (brown arrow) as well as coupling constants (underlined/purple arrow).

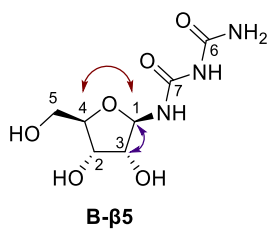
B-α5:

HR-MS (ESI): m/z calculated for C₇H₁₃N₃NaO₆ [M+Na]⁺: 258.0697, found: 258.0691.

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.67 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H¹), 4.26 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H²), 4.21 (dd, $J = 6.3, 4.8$ Hz, 1H, H³), 4.02 (ddd, $J = 6.5, 4.5, 3.0$ Hz, 1H, H⁴), 3.76 (dd, $J = 12.6, 3.0$ Hz, 1H, H^{5a}), 3.65 (dd, $J = 12.6, 4.5$ Hz, 1H, H^{5b}).

¹³C{¹H}-NMR (200 MHz, D₂O): δ [ppm] = 157.14 (C⁶), 155.60 (C⁷), 81.95 (C⁴), 80.71 (C¹), 70.54 (C³), 70.15 (C²), 60.96 (C⁵).

B-β5:

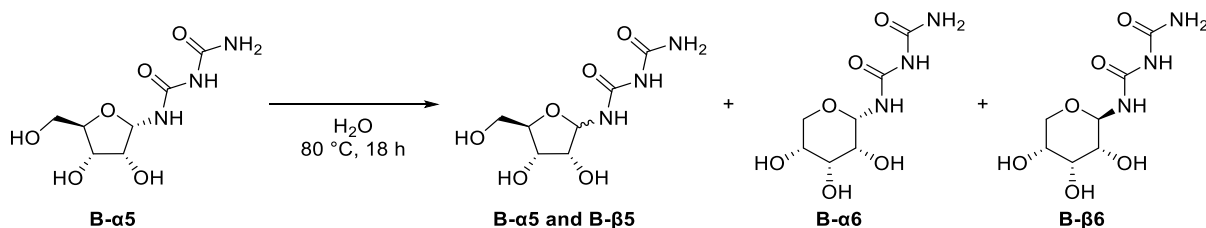


HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_7H_{13}N_3NaO_6$ $[M+Na]^+$: 258.0697, found: 258.0691.

1H -NMR (800 MHz, D_2O): δ [ppm] = 5.31 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H^1), 4.09 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H^2), 4.01 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H^3), 3.90 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H, H^4), 3.64 (dd, $J = 12.5, 3.5$ Hz, 1H, H^{5a}), 3.56 (dd, $J = 12.5, 4.4$ Hz, 1H, H^{5b}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (200 MHz, D_2O): δ [ppm] = 157.0 (C^6), 155.6 (C^7), 84.1 (C^1), 83.4 (C^4), 73.8 (C^3), 70.2 (C^2), 61.2 (C^5).

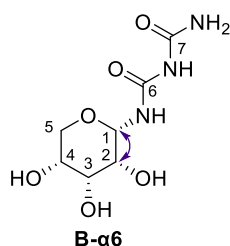
Biuret-Pyranosides (**B- α 6** and **B- β 6**)



The α -biuret-furanoside **B- α 5** (50 mg) was dissolved in ultra-pure water (4 mL) and stirred at 80 °C for 18 h. The solution was filtered and directly applied to a prep. HPLC system (method J). All four isomers could be obtained and analysed.

The biuret-pyranosides could be fully characterized *via* the coupling constants (underlined/purple arrow) of the anomeric proton H¹ to H².

B- α 6:

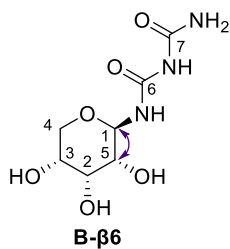


HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 258.0697, found: 258.0694.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO + MeOD): δ [ppm] = 5.14 (d, $\underline{J = 2.8\text{ Hz}}$, 1H, H¹), 3.83 (td, $J = 5.4, 2.9\text{ Hz}$, 2H, H^{2,3}), 3.78 – 3.68 (m, 2H, H^{4,5a}), 3.57 (td, $J = 11.3, 3.4\text{ Hz}$, 1H, H^{5b}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (200 MHz, DMSO): δ [ppm] = 155.1 (C⁶), 154.3 (C⁷), 77.5 (C¹), 70.1 (C²), 69.1 (C³), 67.8 (C⁴), 61.5 (C⁵).

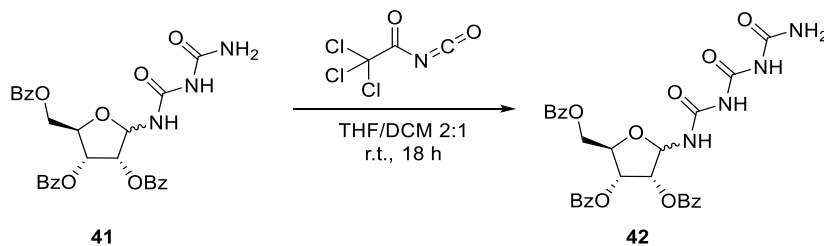
B-β6:



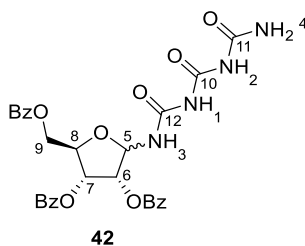
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_7H_{13}N_3NaO_6$ $[M+Na]^+$: 258.0697, found: 258.0694.

1H -NMR (400 MHz, DMSO + MeOD): δ [ppm] = 4.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H^1), 3.87 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H^2), 3.54 – 3.35 (m, 3H, $H^{3,4}$), 3.15 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H, H^5).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 155.4 (C^6), 154.8 (C^7), 77.2 (C^1), 71.0 (C^3), 70.1 (C^2), 67.1 (C^4), 64.4 (C^5).

Benzoyl-Triuret-Furanoside (42)

Benzoyl-biuret-furanoside (**41**) (1.00 g, 1.83 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (120 mL) and dry DCM (60 mL). To the solution trichloroacetyl isocyanate (762 μ L, 6.40 mmol, 3.50 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred over night at room temperature. After 18 h an excess of Al_2O_3 and MeOH was added and further stirred for 1 h. The suspension was filtered and the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash column chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 95:5) benzoyl-triuret-furanoside (**42**) was obtained as a white solid (620 mg, 1.06 mmol, 58 %).



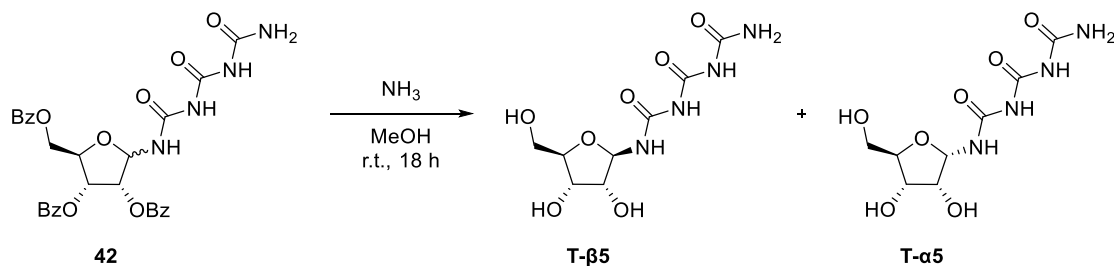
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 591.1722, found: 591.1724.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.10 (s, 1H, $\text{H}^{1/2}$), 9.55 (s, 1H, $\text{H}^{1/2}$), 8.64 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H^3), 8.03 (ddd, J = 8.5, 4.0, 1.4 Hz, 2H, H^{Bz}), 7.90 – 7.86 (m, 3H, H^{Bz}), 7.69 – 7.62 (m, 3H, H^{Bz}), 7.54 – 7.42 (m, 7H, H^{Bz}), 7.33 (s, 1H, H^{4a}), 6.80 (s, 1H, H^{4b}), 5.90 – 5.70 (m, 3H, $\text{H}^{5,6/7/8}$), 4.64 – 4.50 (m, 3H, $\text{H}^{9,6/7/8}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 165.5 – 164.7 (3C, $\text{C}^{\text{Bz-CO}}$), 154.2 ($\text{C}^{10/11}$), 152.8 (C^{12}), 152.5 ($\text{C}^{10/11}$), 134.0 – 128.5 (15C, C^{Bz}), 83.1 (C^5), 78.0 (C^6), 73.7 (C^7), 71.0 (C^8), 64.1 (C^9).

R_f: 0.80 (DCM/MeOH 95:5).

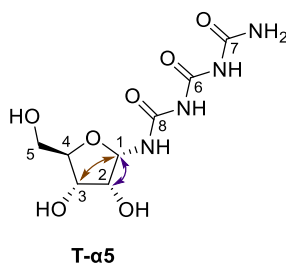
Triuret-Furanosides (T- α 5 and T- β 5)



Benzoyl-triuret-furanoside (**42**) (580 mg, 1.83 mmol) was dissolved in an methanolic ammonia solution (4 M, 30 mL) and stirred for 18 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and purification using reverse phase flash chromatography (H₂O/ACN 100:0 → H₂O/ACN 0:100) yielded the α -triuret-furanoside **T- α 5** (37.6 mg, 256 μ mol, 14 %) as well as the β -triuret-furanoside **T- β 5** (5.5 mg, 36.6 μ mol, 2 %).

Characterization of the isomers was accomplished using NOESY-coupling (brown arrow) as well as coupling constants (underlined/purple arrow).

T- α 5:

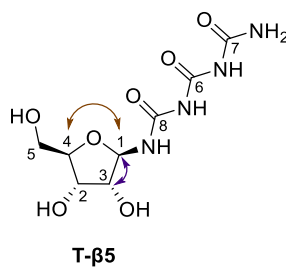


HR-MS (ESI): m/z calculated for C₈H₁₅N₄O₇ [M+H]⁺: 279.0935, found: 279.0934.

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.70 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H¹), 4.29 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H²), 4.21 (dd, $J = 6.0, 4.8$ Hz, 1H, H³), 4.03 (ddd, $J = 6.2, 4.5, 3.1$ Hz, 1H, H⁴), 3.76 (dd, $J = 12.6, 3.1$ Hz, 1H, H^{5a}), 3.64 (dd, $J = 12.6, 4.5$ Hz, 1H, H^{5b}).

¹³C{¹H}-NMR (200 MHz, D₂O): δ [ppm] = 156.2 (C^{6/7}), 154.7 (C⁸), 153.3 (C^{6/7}), 82.2 (C⁴), 80.7 (C¹), 70.5 (C³), 70.1 (C²), 60.9 (C⁵).

T-β5:

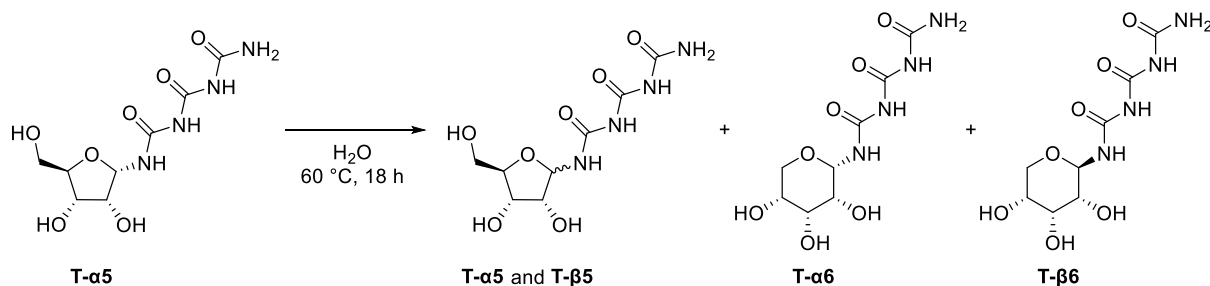


HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_8H_{15}N_4O_7$ $[M+H]^+$: 279.0935, found: 279.0933.

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 5.44 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H^1), 4.2 – 4.2 (m, 1H, H^2), 4.15 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H^3), 4.01 (td, $J = 4.2, 3.3$ Hz, 1H, H^4), 3.75 (dd, $J = 12.6, 3.5$ Hz, 1H, H^{5a}), 3.67 (dd, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 1H, H^{5b}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100 MHz, D_2O): δ [ppm] = 156.2 ($C^{6/7}$), 154.8 (C^8), 153.3 ($C^{6/7}$), 84.4 (C^1), 83.5 (C^4), 73.9 (C^3), 70.1 (C^2), 61.1 (C^5).

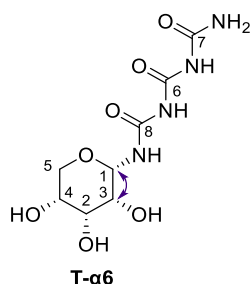
Triuret-Pyranosides (**T- α 6** and **T- β 6**)



The α -triuret-furanoside **T- α 5** (30 mg) was dissolved in ultra-pure water (4 mL) and stirred at 60 °C for 18 h. The solution was directly applied to a prep. HPLC system and all four isomers could be obtained and analysed (method K).

The triuret-pyranosides could be fully characterized *via* the coupling constants (underlined/purple arrow) of the anomeric proton H¹ to H².

T- α 6:

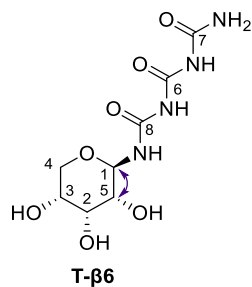


HR-MS (ESI): m/z calculated for C₈H₁₅N₄O₇ [M+H]⁺: 279.0935, found: 279.0937.

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.23 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, H¹), 4.00 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H²), 3.90 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H, H³), 3.89 (q, $J = 3.0$ Hz, 1H, H⁴), 3.83 (dd, $J = 12.2, 6.1$ Hz, 1H, H^{5a}), 3.65 (ddd, $J = 12.5, 6.2, 3.7$ Hz, 1H, H^{5b}).

¹³C{¹H}-NMR (200 MHz, D₂O): δ [ppm] = 156.3 (C^{6/7}), 155.0 (C⁸), 153.5 (C^{6/7}), 77.5 (C¹), 68.9 (C²), 68.3f (C³), 67.0 (C⁴), 61.0 (C⁵).

T-β6:



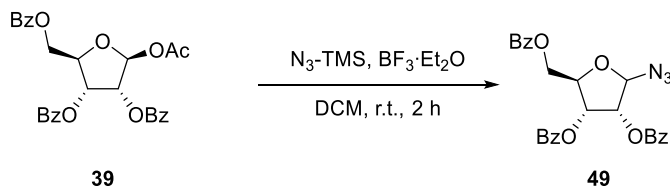
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_8H_{15}N_4O_7$ $[M+H]^+$: 279.0935, found: 279.0937.

1H -NMR (800 MHz, D_2O): δ [ppm] = 5.09 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H^1), 4.20 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, H^2), 3.86 (ddd, $J = 10.7, 5.4, 2.8$ Hz, 1H, H^3), 3.75 – 3.72 (m, 1H, H^{4a}), 3.71 – 3.67 (m, 2H, $H^{4b,5}$).

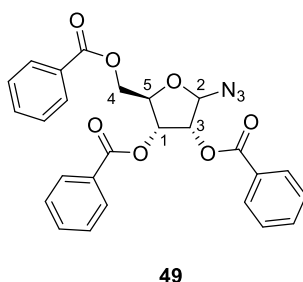
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (200 MHz, D_2O): δ [ppm] = 156.28 ($C^{6/7}$), 155.49 (C^8), 153.43 ($C^{6/7}$), 77.28 (C^1), 70.29 (C^2), 68.78 (C^5), 66.22 (C^3), 63.63 (C^4).

Experimental

(2R,3R,4R,5R)-2-azido-5-((benzoyloxy)methyl)tetrahydrofuran-3,4-diyl dibenzoate (49)



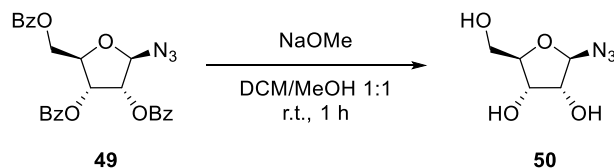
39 (35.0 g, 59.5 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DCM (300 mL) and cooled to 0 °C. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (7.47 mL, 59.5 mmol, 1.0 equiv.) and TMS-N_3 (11.8 mL, 89.2 mmol, 1.5 equiv.) were slowly added and the reaction was further stirred for 2 h at r.t.. A saturated aqueous NaHCO_3 solution was added and the aqueous phase was extracted with DCM (3x). The combined organic layers were washed with a saturated aqueous NaCl solution and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed *in vacuo* and azide **49** (34.0 g, 59.5 mmol, quant.) was obtained as a colourless sticky oil.



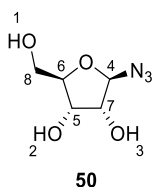
HR-MS (EI): m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{O}_7$: 445.1287; found: 445.1267.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.14 – 8.07 (m, 2H, H^{Bz}), 8.04 – 7.97 (m, 2H, H^{Bz}), 7.94 – 7.86 (m, 2H, H^{Bz}), 7.63 – 7.48 (m, 3H, H^{Bz}), 7.48 – 7.39 (m, 4H, H^{Bz}), 7.39 – 7.30 (m, 2H, H^{Bz}), 5.84 (dd, J = 6.6, 4.9 Hz, 1H, H^1), 5.69 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H^2), 5.58 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H^3), 4.83 – 4.73 (m, 2H, $\text{H}^{4\text{a},5}$), 4.61 – 4.51 (m, 1H, $\text{H}^{4\text{b}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 166.3 – 165.2 (3C, $\text{C}^{\text{Bz-CO}}$), 133.9 – 128.4 (18C, $\text{C}^{\text{Bz-Ar}}$), 93.5 (C^2), 80.0 (C^5), 75.4 (C^3), 71.6 (C^1), 63.9 (C^4).

(2R,3R,4S,5R)-2-azido-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (**50**)

Crude **49** (29.8 g, 61.2 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM/MeOH (1:1; each 250 mL), NaOMe (1.65 g, 30.6 mmol, 0.50 equiv.) was added and the reaction was stirred for 1 h at room temperature. Dowex[®] 50WX8 (H⁺-form) was added until the solution reached a pH-value of 7 and the suspension was further stirred for 10 minutes. After filtration the solvent was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in H₂O (70 mL) and washed with chloroform (3x). The water was removed using lyophilisation and unprotected ribose-azide **50** (10.7 g, 61.2 mmol, quant.) was obtained as a colourless oil.



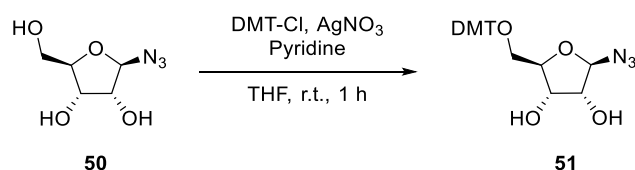
HR-MS (EI): m/z calculated for C₅H₉N₂O₄⁺ [M+H]⁺: 161.0557; found: 161.0550.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 5.55 (s, 1H, H^{1/2/3}), 5.29 (d, J = 26.8 Hz, 1H, H^{1/2/3}), 5.14 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H⁴), 4.86 (s, 1H, H^{1/2/3}), 3.89 (dd, J = 6.6, 4.5 Hz, 1H, H⁵), 3.82 (ddd, J = 6.6, 5.3, 3.3 Hz, 1H, H⁶), 3.69 (dd, J = 4.5, 2.2 Hz, 1H, H⁷), 3.57 (dd, J = 11.9, 3.4 Hz, 1H, H^{8a}), 3.41 (dd, J = 11.9, 5.4 Hz, 1H, H^{8b}).

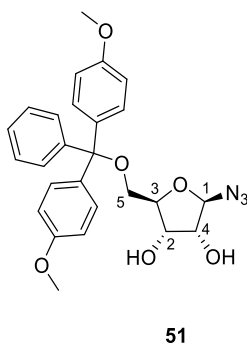
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 94.6 (C⁴), 84.5 (C⁶), 74.7 (C⁷), 70.2 (C⁵), 61.9 (C⁸).

Experimental

(2R,3R,4S,5R)-2-azido-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (**51**)



Compound **50** (3.32 g, 19.0 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry THF (170 mL) and pyridine (7.63 mL, 94.8 mmol, 5.0 equiv.), AgNO₃ (3.86 g, 22.8 mmol, 1.2 equiv.) and DMT-Cl (7.71 g, 22.8 mmol, 1.2 equiv.) were added. The yellow reaction was stirred at room temperature for 1 hour. A 5 % aqueous NaHCO₃ solution was added and the aqueous phase was extracted with DCM (3x). After drying over Na₂SO₄ the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash chromatography (cHex/EtOAc 3:1) DMT-protected ribose-azide **51** (8.33 g, 17.4 mmol, 92 %) was obtained as an orange oil.



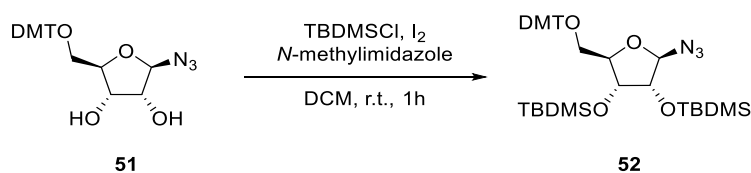
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₆H₂₇N₃NaO₆⁺ [M+Na]⁺: 500.1792; found: 500.1790.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.50 – 7.43 (m, 2H, H^{DMT}), 7.40 – 7.32 (m, 4H, H^{DMT}), 7.36 – 7.20 (m, 2H, H^{DMT}), 7.24 – 7.13 (m, 1H, H^{DMT}), 6.88 – 6.79 (m, 4H, H^{DMT}), 5.35 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H¹), 4.27 (dd, J = 6.5, 4.7 Hz, 1H, H²), 4.17 – 4.07 (m, 1H, H³), 3.98 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H, H⁴), 3.79 (s, 6H, H^{DMT-Me}), 3.35 (dd, J = 10.2, 4.4 Hz, H^{5a}), 3.31 (dd, J = 10.1, 4.7 Hz, 1H, H^{5b}).

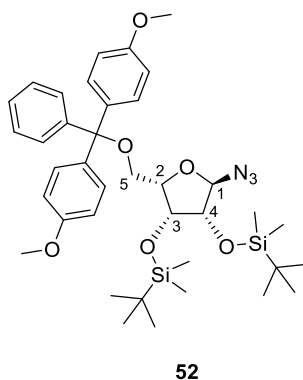
¹³C{¹H}-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] 158.6 - 113.2 (15C, C^{DMT}), 94.9 (C¹), 86.5 (C^{DMT}), 82.8 (C³), 75.4 (C⁴), 72.0 (C²), 64.0 (C⁵), 55.3 (C^{DMT-Me}).

R_f: 0.28 (cHex/EtOAc 2:1).

(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-azido-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)tetrahydrofuran-3,4-diyl)bis(oxy))bis(*tert*-butyldimethylsilane) (**52**)



DMT-azide **51** (6.97 g, 14.6 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DCM (40 mL) and *N*-methylimidazole (7.00 mL, 87.6 mmol, 6.0 equiv.) and I₂ (14.8 g, 58.4 mmol, 4.0 equiv.) were added. The reaction was stirred for 5 minutes and TBDMSCl (5.28 g, 35.0 mmol, 2.4 equiv.) was added. The reaction was stirred at r.t. for 1 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc and washed with a saturated aqueous Na₂S₂O₃ solution. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash chromatography (cHex 100 % → cHex/EtOAc 90:10) 5'-DMT-2',3'-TBDMS-protected azidoribose **52** (10.4 g, 14.4 mmol, 99 %) was obtained as a yellowish oil.



HR-MS (EI): m/z calculated for C₃₈H₅₅N₃O₆Si₂ [M]: 705.3629; found: 705.3633.

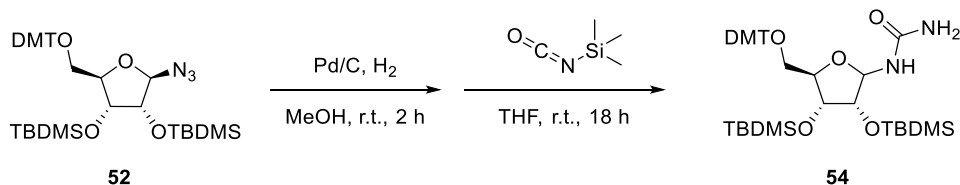
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.54 – 7.46 (m, 2H, H^{DMT}), 7.43 – 7.34 (m, 4H, H^{DMT}), 7.33 – 7.24 (m, 2H, H^{DMT}), 7.24 – 7.15 (m, 1H, H^{DMT}), 6.87 – 6.78 (m, 4H, H^{DMT}), 5.25 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H¹), 4.15 (ddd, J = 7.4, 5.1, 2.5 Hz, 1H, H²), 4.07 (dd, J = 6.9, 3.9 Hz, 1H, H³), 3.82 (dd, J = 3.9, 1.9 Hz, 1H, H⁴), 3.78 (s, 6H, H^{DMT-Me}), 3.31 (dd, J = 10.4, 2.7 Hz, 1H, H^{5a}), 3.10 (dd, J = 10.4, 5.2 Hz, 1H, H^{5b}), 0.90 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.73 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.11 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.07 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), -0.05 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), -0.20 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}).

Experimental

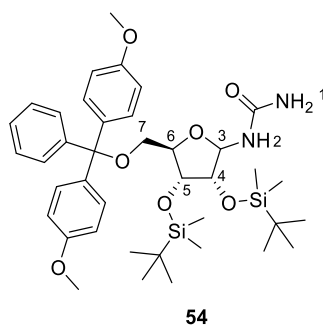
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 158.6 – 113.2 (C^{15} , C^{DMT}), 95.2 (C^1), 86.2 (C^{DMT}), 82.7 (C^2), 76.3 (C^4), 72.0 (C^3), 63.8 (C^5), 55.3 ($\text{C}^{\text{DMT-Me}}$), 25.9 (6C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu}}$) 18.2 - 18.1 (2C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu-quart.}}$), -4.1 – -4.9 (4C, $\text{C}^{\text{TBDMS-Me}}$).

R_f 0.26 (cHex/EtOAc 99:1).

1-((2R,3R,4R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3,4-bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)urea (**54**)



52 (14.5 g, 20.6 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry MeOH (350 mL) and Pd/C (10 %, 500 mg) was added. A balloon filled with H₂ gas was added and the reaction was heavily stirred over night at room temperature. The suspension was filtered through celite and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product **53** was dissolved in dry THF (120 mL) and trimethylsilyl isocyanate (13.9 mL, 103 mmol, 5.0 equiv.) was added. The reaction was stirred over night at room temperature before MeOH (20 mL) was added and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DCM und washed with water and a saturated aqueous NaCl solution. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. Purification using flash chromatography (cHex/EtOAc 1:1) yielded **54** (37 %) as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₃₉H₅₈N₂NaO₇Si₂⁺ [M+Na]⁺: 745.3675; found: 745.3668.

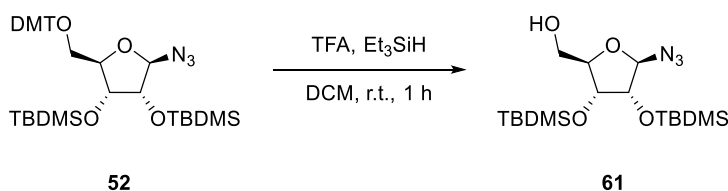
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.43 – 7.37 (m, 3H, H^{DMT}), 7.26 (tdd, J = 15.9, 12.9, 7.4 Hz, 11H, H^{DMT}), 6.90 – 6.88 (m, 6H, H^{DMT}), 6.01 (s, 2H, H¹), 5.71 (s, 1H, H²), 5.56 (dd, J = 9.9, 5.2 Hz, 1H, H³), 4.15 (t, J = 4.6 Hz, 1H, H⁴), 3.87 (q, J = 3.7 Hz, 1H, H⁵), 3.80 – 3.75 (m, 1H, H⁶), 3.73 (s, 6H, H^{DMT-Me}), 3.14 (dd, J = 10.2, 2.9 Hz, 1H, H^{7a}), 2.93 (ddd, J = 19.5, 10.2, 4.8 Hz, 1H, H^{7b}), 0.89 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.75 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.06 (d, J = 2.1 Hz, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.04 (d, J = 2.7 Hz, 3H, H^{TBDMS-Me}), -0.01 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), -0.11 (d, J = 2.2 Hz, 3H, H^{TBDMS-Me}).

Experimental

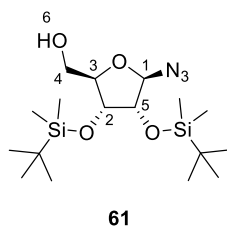
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 158.2 – 158.1 (3C, C^{DMT}), 157.4 (C^8), 144.9 (2C, C^{DMT}), 135.4 - 85.5 (11C, C^{DMT}), 80.7 (C^3), 75.2 (C^6), 73.7 (C^5), 71.3 (C^4), 63.8 (C^7), 55.0 ($\text{C}^{\text{DMT-Me}}$), 25.9 - 25.6 (6C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 17.7 (2C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu-quart}}$), -4.6 – -5.3 (4C, $\text{C}^{\text{TBDMS-Me}}$).

R_f 0.27 (cHex/EtOAc 1:1).

((2R,3R,4R,5R)-5-azido-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methanol (**61**)



5'-DMT-protected azidoribose **52** (20.4 g, 28.9 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM (750 mL) and TFA (19.0 mL, 289 mmol, 10 equiv.) as well as Et₃SiH (46.2 mL, 289 mmol, 10 equiv.) were added. The solution turned dark red and was stirred at room temperature until it turned colourless (45 min). Water was added and the aqueous phase was extracted using DCM. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash chromatography (cHex/EtOAc 99:1) 5'-deprotected azidoribose **61** (8.28 g, 20.5 mmol, 71 %) was obtained as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₇H₃₇N₃NaO₄Si₂⁺ [M+Na]⁺: 426.2215; found: 426.2214.

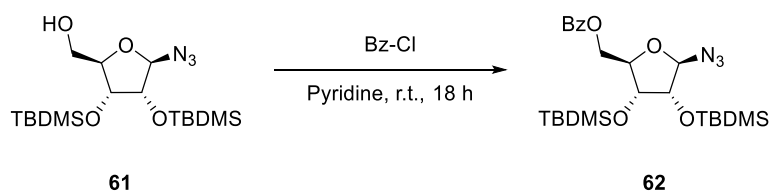
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.13 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H¹), 4.18 (dd, J = 7.5, 4.0 Hz, 1H, H²), 4.05 (ddd, J = 7.5, 3.6, 2.6 Hz, 1H, H³), 3.89 (ddd, J = 12.4, 4.7, 2.6 Hz, 1H, H^{4a}), 3.83 (dd, J = 3.9, 1.5 Hz, 1H, H⁵), 3.60 (ddd, J = 12.2, 8.3, 3.6 Hz, 1H, H^{4b}), 1.79 (dd, J = 8.3, 4.7 Hz, 1H, H⁶), 0.91 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.90 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.11 (s, 3H, 11, 12, 22, 23, H^{TBDMS-Me}), 0.10 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.09 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.08 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 95.2 (C¹), 83.4 (C³), 76.9 (C⁵), 70.6 (C²), 61.5 (C⁴), 25.9 (6C, C^{TBDMS-tBu}), 18.2 (2C, C^{TBDMS-tBu-quart}), -4.2 – -4.9 (4C, C^{TBDMS-Me}).

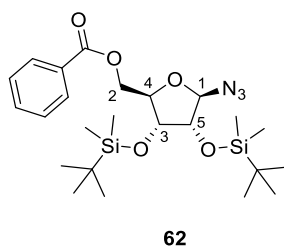
R_f: 0.41 (cHex/EtOAc 9:1).

Experimental

((2R,3R,4R,5R)-5-azido-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**62**)



Azidoribose **61** (5.26 g, 13.0 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry pyridine (90 mL), Bz-Cl (4.54 mL, 39.1 mmol, 3.0 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred at r.t. over night. After the addition of water, the aqueous phase was extracted using DCM (2x). The combined organic layers were washed with 2M aqueous HCl solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution and a saturated aqueous NaCl solution. After drying over Na₂SO₄ the solvent was removed under reduced pressure and purification with flash chromatography yielded 5'-Bz-protected azidoribose **62** (6.42, 12.6 mmol, 97 %) as a colourless oil.



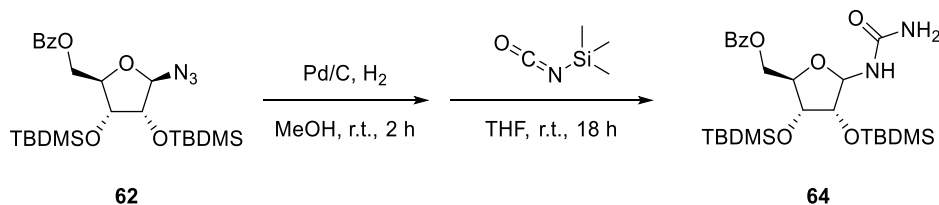
62

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.17 – 8.02 (m, 2H, H^{Bz}), 7.63 – 7.53 (m, 1H, H^{Bz}), 7.51 – 7.41 (m, 2H, H^{Bz}), 5.18 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H¹), 4.76 – 4.62 (m, 1H, H^{2a}), 4.34 (dd, J = 7.1, 3.7 Hz, 1H, H³), 4.32 – 4.30 (m, 1H, H⁴), 4.29 – 4.26 (m, 1H, H^{2b}), 3.86 (dd, J = 3.7, 1.5 Hz, 1H, H⁵), 0.92 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.90 (s, 9H, H^{TBDMS-tBu}), 0.11 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.10 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.08 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}), 0.06 (s, 3H, H^{TBDMS-Me}).

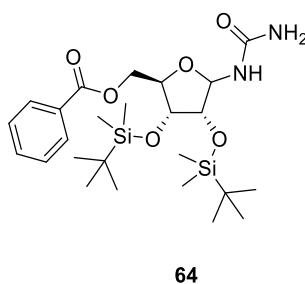
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 166.5 (C^{Bz-CO}), 133.3 – 128.6 (6C, C^{Bz}), 94.9 (C¹), 80.8 (C⁴), 76.5 (C⁵), 71.4 (C³), 63.2 (C²), 25.9 (6C, C^{TBDMS-tBu}), 18.2 (2C, C^{TBDMS-tBu-quart}), -4.1 – -4.9 (4C, C^{TBDMS-Me}).

R_f 0.70 (cHex/EtOAc 9:1).

((2R,3R,4R)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-ureidotetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**64**)



Azidoribose **62** (2.00 g, 3.94 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry MeOH (30 mL) and Pd/C (10 %, 300 mg) was added. A balloon filled with H₂ gas was added and the reaction was heavily stirred over night at room temperature. The suspension was filtered through celite and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product **63** was dissolved in dry THF (30 mL) and trimethylsilyl isocyanate (2.67 mL, 19.7 mmol, 5.0 equiv.) was added. The reaction was stirred over night at room temperature before MeOH (5 mL) was added and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DCM und washed with water and a saturated aqueous NaCl solution. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. Purification using flash chromatography (DCM 100 % → DCM/MeOH 95:5) yielded **64** (310 mg, 591 μmol, 15 %) as a white solid.



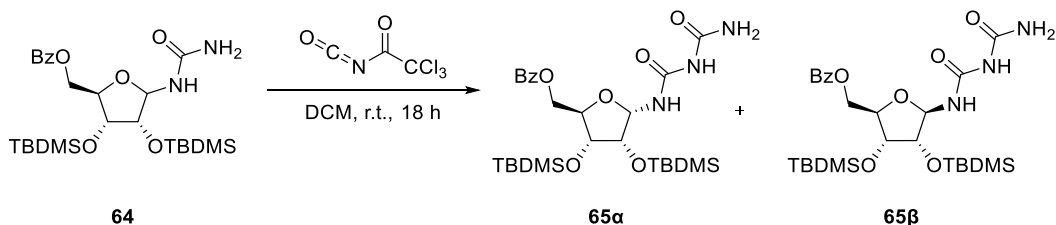
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₅H₄₄N₂NaO₆Si₂⁺ [M+Na]⁺: 547.2630; found: 547.2632.

R_f: 0.22 (DCM/MeOH 98:2).

Experimental

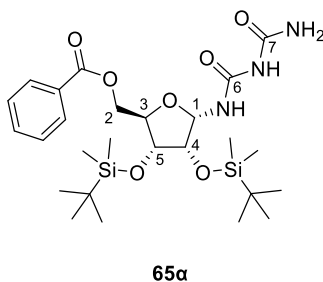
((2R,3R,4R,5S)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(3-carbamoylureido)tetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**65 α**)

((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(3-carbamoylureido)tetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**65 β**)



Ribose-urea **64** (494 mg, 914 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in dry DCM (120 mL). To the solution was trichloroacetyl isocyanate (449 μL , 3.77 mmol, 4.0 equiv.) added dropwise and the reaction was stirred over night at room temperature. After 18 h an excess of Al_2O_3 and MeOH were added and further stirred for 1 h. The suspension was filtered and the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash column chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 95:5) 5'-Bz-2',3'-TBDMS-biuret-furanosides **65 α** and **65 β** (combined yield: 321 mg, 565 μmol , 60 %) were obtained as white solids.

65 α :



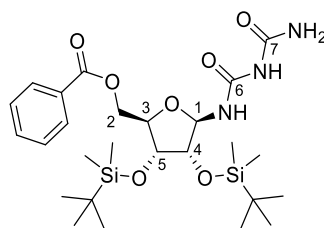
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{Si}_2^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 590.2688; found: 590.2689.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.09 – 7.98 (m, 2H, H^{Bz}), 7.64 – 7.52 (m, 1H, H^{Bz}), 7.49 – 7.39 (m, 2H, H^{Bz}), 5.65 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H^1), 4.35 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H, H^2), 4.34 – 4.30 (m, 1H, H^3), 4.26 (dd, $J = 5.9, 4.8$ Hz, 1H, H^4), 4.14 (dd, $J = 4.8, 1.2$ Hz, 1H, H^5), 0.91 (s, 9H, $\text{H}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 0.89 (s, 9H, $\text{H}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 0.14 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.10 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.08 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.06 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (151 MHz, CDCl_3): 166.3 ($\text{C}^{\text{Bz-CO}}$), 155.4 ($\text{C}^{6/7}$), 154.8 ($\text{C}^{6/7}$), 133.5 – 128.6 (6C, C^{Bz}), 83.2 (C^3), 81.3 (C^1), 74.3 (C^5), 71.4 (C^4), 64.6 (C^2), 26.0 – 25.9 (6C, $\text{C}^{\text{TBDMS-}i\text{Bu}}$), 18.3 (2C, $\text{C}^{\text{TBDMS-}i\text{Bu-quart}}$), -4.4 – -4.9 (4C, $\text{C}^{\text{TBDMS-Me}}$).

R_f: 0.26 (DCM/MeOH 98:2).

65 β :



65 β

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{Si}_2^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 590.2688; found: 590.2688.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.09 – 7.92 (m, 2H, H^{Bz}), 7.77 – 7.62 (m, 1H, H^{Bz}), 7.62 – 7.45 (m, 2H, H^{Bz}), 5.62 (dd, $J = 9.6, 5.3$ Hz, 1H, H^1), 4.35 (dd, $J = 11.8, 4.5$ Hz, 1H, H^{2a}), 4.30 – 4.26 (m, 1H, H^3), 4.25 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H^4), 4.24 – 4.20 (m, 1H, H^{2b}), 4.14 (td, $J = 4.6, 2.6$ Hz, 1H, H^5), 0.86 (s, 18H, $\text{H}^{\text{TBDMS-}i\text{Bu}}$), 0.12 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.07 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.06 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.02 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$).

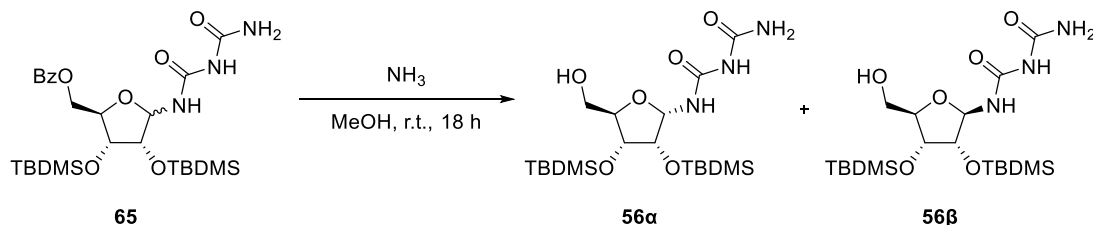
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 165.5 ($\text{C}^{\text{Bz-CO}}$), 155.3 ($\text{C}^{6/7}$), 154.0 ($\text{C}^{6/7}$), 133.6 – 128.8 (6C, C^{Bz}), 81.0 (C^5), 80.0 (C^1), 73.3 (C^4), 71.1 (C^3), 64.4 (C^2), 25.8 – 25.7 (6C, $\text{C}^{\text{TBDMS-}i\text{Bu}}$), 18.0 – 17.8 (2C, $\text{C}^{\text{TBDMS-}i\text{Bu-quart}}$), -4.4 – -5.2 (4C, $\text{C}^{\text{TBDMS-Me}}$).

R_f: 0.19 (DCM/MeOH 98:2).

Experimental

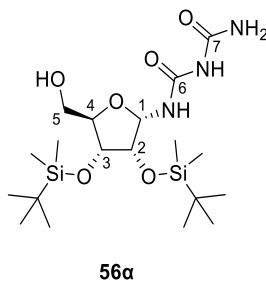
α -Biuret-Furanosid-2',3'-TBDMS (**56 α**)

β -Biuret-Furanosid-2',3'-TBDMS (**56 β**)



Biuret-furanoside **65** (150 mg, 264 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in an methanolic ammonia solution (4 M, 10.0 mL) and stirred for 18 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and purification using flash chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 98:2) yielded a mixture of the α - and β -2',3'-TBDMS-biuret-furanosides (**56 α** and **56 β**) (112 mg, 240 μmol , 91 %).

56 α :

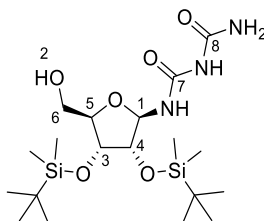


HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{NaO}_6\text{Si}_2^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 486.2426; found: 486.2426.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.66 – 5.50 (m, 1H, H^1), 4.16 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H^2), 4.11 (dd, J = 4.9, 2.7 Hz, 1H, H^3), 4.05 (q, J = 3.0 Hz, 1H, H^4), 3.71 (s, 1H, H^{5a}), 3.62 – 3.50 (m, 1H, H^{5b}), 0.91 – 0.87 (m, 18H, $\text{H}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 0.13 – 0.06 (m, 12H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 155.9 (C^7), 155.6 (C^6), 85.6 (C^4), 81.4 (C^1), 73.5 (C^3), 72.0 (C^2), 62.2 (C^5), 26.0 (6C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 18.4 – 18.2 (2C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu-quart}}$), -4.2 – -4.8 (4C, $\text{C}^{\text{TBDMS-Me}}$).

R_f: 0.64 (EtOAc/MeOH 98:2).

56 β :56 β

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{19}H_{41}N_3NaO_6Si_2^+$ $[M+Na]^+$: 486.2426; found: 486.2427.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.37 (dd, $J = 8.8, 3.6$ Hz, 1H, H^1), 4.39 – 4.23 (m, 1H, H^2), 4.14 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H^3), 4.07 – 4.01 (m, 1H, H^4), 3.94 (dq, $J = 4.9, 2.6$ Hz, 1H, H^5), 3.82 (dd, $J = 12.4, 2.5$ Hz, H^{6a}), 3.56 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, H^{6b}), 0.89 (d, $J = 1.1$ Hz, 18H, $H^{TBDMS-tBu}$), 0.16 – 0.03 (m, 12H, $H^{TBDMS-Me}$).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.0 (C^8), 154.6 (C^7), 85.7 (C^1), 83.7 (C^5), 76.2 (C^4), 71.7 (C^3), 60.7 (C^6), 25.9 (6C, $C^{TBDMS-tBu}$), 18.2 (2C, $C^{TBDMS-tBu-quart.}$), -4.3 – -4.8 (4C, $C^{TBDMS-Me}$).

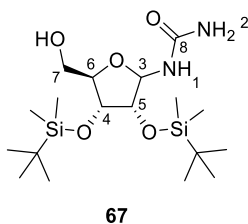
R_f : 0.54 (EtOAc/MeOH 98:2).

Experimental

1-((3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)urea (**67**)



5'-DMT-protected urea-ribose **54** (3.62 g, 5.00 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM (500 mL) and TFA (3.29 mL, 50 mmol, 10 equiv.), followed by Et₃SiH (7.99 mL, 50 mmol, 10 equiv.) was added. The solution turned dark red and was stirred at room temperature until it turned colourless (45 min). Water was added and the aqueous phase was extracted using DCM. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. After purification using flash chromatography (cHex/EtOAc 1:4) 5'-deprotected urea-ribose **67** (936 mg, 2.25 mmol, 45 %) was obtained as a white solid.



67

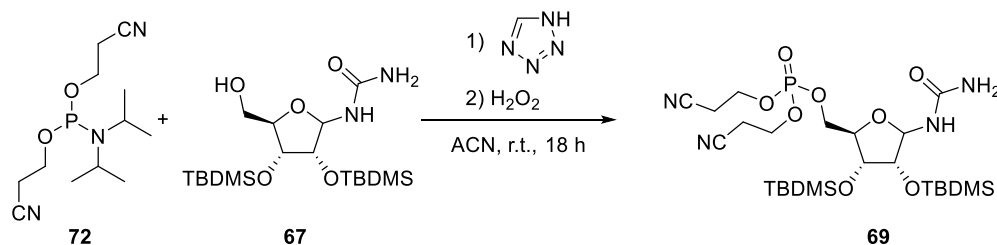
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₈H₄₁N₂O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 421.2549; found: 421.2550.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 6.41 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H¹), 5.65 (d, J = 12.4 Hz, 2H, H²), 5.15 (dd, J = 10.1, 5.7 Hz, 1H, H³), 4.01 (dd, J = 4.5, 3.3 Hz, 1H, H⁴), 3.83 (dd, J = 5.7, 4.5 Hz, 1H, H⁵), 3.63 (q, J = 4.2 Hz, 1H, H⁶), 3.42 – 3.32 (m, 3H, H⁷), 0.92 – 0.88 (m, 18H, H^{TBDMS-tBu}), 0.13 – 0.04 (m, 12H, H^{TBDMS-Me}).

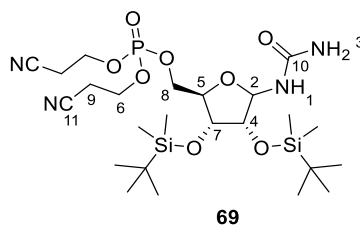
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 157.7 (C⁸), 84.2 (C³), 83.1 (C⁶), 75.2 (C⁵), 72.4 (C⁴), 61.6 (C⁷), 26.1 – 25.7 (6C, C^{TBDMS-tBu}), 17.8 (2C, C^{TBDMS-tBu-quart}), -4.5 – 4.8 (4C, C^{TBDMS-Me}).

R_f: 0.21 (cHex/EtOAc 1:2).

((2R,3R,4R)-3,4-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-5-ureidotetrahydrofuran-2-yl)methyl bis(2-cyanoethyl) phosphate (**69**)



Urea-ribose **67** (50.0 mg, 119 μmol , 1.0 equiv.) was dissolved in dry ACN (1 mL) and tetrazole (608 μL , 273 μmol , 2.3 equiv.) and phosphoramidite **72** (74.2 mg, 273 μmol , 2.3 equiv.) were added. The reaction was stirred at r.t. over night. H_2O_2 (37 %, 2 mL) was added and after 30 minutes the solvent was removed *in vacuo*. Purification using flash chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 95:5) yielded compound **69** (30.2 mg, 49.9 μmol , 42 %) as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8\text{PSi}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 607.2743; found: 607.2741.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.40 (s, 1H, H^1), 6.12 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H^2), 5.88 (s, 2H, H^3), 5.17 (s, 1H, H^4), 4.36 (d, J = 12.3 Hz, 1H, H^5), 4.26 – 4.14 (m, 4H, H^6), 3.84 (dd, J = 5.6, 2.5 Hz, 1H, H^7), 3.67 (t, J = 10.8 Hz, 1H, H^{8a}), 3.51 (dd, J = 10.5, 5.3 Hz, 1H, H^{8b}), 2.99 – 2.89 (m, 4H, H^9), 0.92 (s, 9H, $\text{H}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 0.86 (s, 9H, $\text{H}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 0.16 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.12 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.08 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$), 0.07 (s, 3H, $\text{H}^{\text{TBDMS-Me}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 157.4 (C^{10}), 118.2 (C^{11}), 77.3 (C^4), 73.3 (C^2), 72.1 (C^5), 67.0 (C^7), 62.8 (C^6), 54.8 (C^8), 26.0 – 25.8 (6C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu}}$), 19.1 (C^9), 18.2 – 17.9 (2C, $\text{C}^{\text{TBDMS-tBu-quart}}$), -4.5 – -5.3 (4C, $\text{C}^{\text{TBDMS-Me}}$).

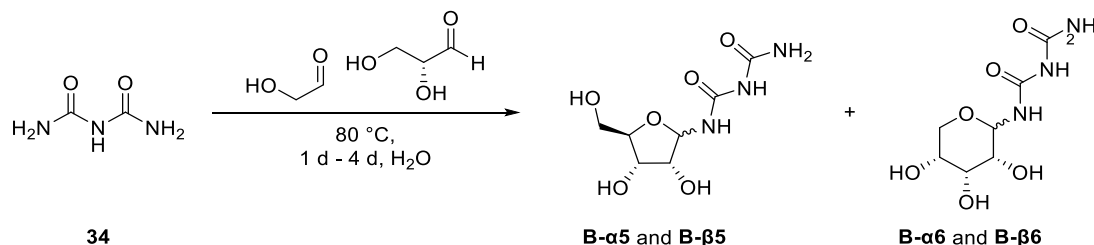
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (162 MHz, DMSO): δ [ppm] = -2.13.

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO): δ [ppm] = -2.13 (dd, J = 13.6, 5.8 Hz).

R_f : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

6.3.2 Prebiotic Biuret Reactions

Equivalent Screening



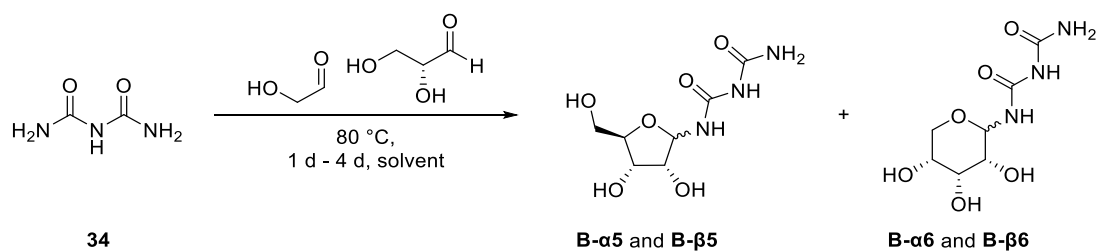
Biuret (**34**, 10.3 mg, 100 μmol, 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (1.00 equiv. or 1.50 equiv. or 3.00 equiv.) and glyceraldehyde (1.00 equiv. or 1.50 equiv. or 3.00 equiv.) were dissolved in ultrapure water (1.00 mL) and heated at 80 °C. An aliquot of the reaction (10 μL) (after 1 d and 4 d) was dissolved in 990 μL ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method A (**Table 1**).

Table 1. Overview of the screening of aldehyde equivalents in the prebiotic reaction towards the biuret-nucleosides after 1 d and 4 d.

Entry	Equiv. GA:GlyA	Time [d]	Product Formation
1	1:1	1;4	yes
2	1.5:1.5	1;4	yes
3	1.5:3	1;4	yes
4	3:3	1;4	yes

GA = glycolaldehyde. GlyA = glyceraldehyde

Solvent Screening



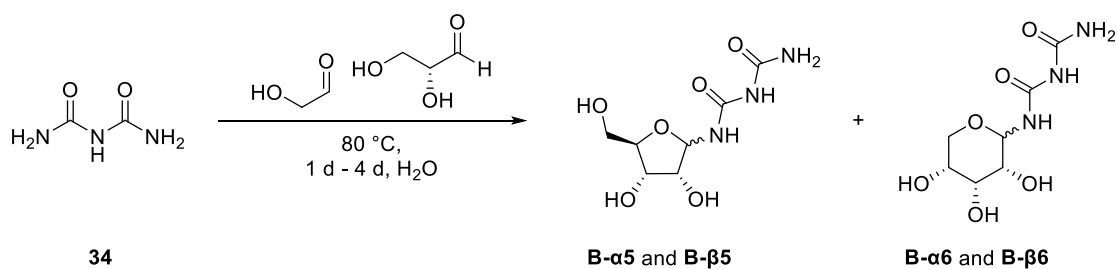
Biuret (**34**, 10.3 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (6.01 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) and glyceraldehyde (9.01 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) were dissolved in a solvent (1.00 mL) and heated at 80 $^\circ\text{C}$. An aliquot of the reaction (10 μL) (after 1 d and 4 d) was dissolved in 990 μL ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method A (**Table 2**).

Table 2. Overview of the screening of different solvents in the prebiotic reaction towards the biuret-nucleosides after 1 d and 4 d.

Entry	Solvent	Time [d]	Product Formation
1	99:1 MeOH:H ₂ O	1;4	no
2	ACN	1;4	no
3	DMF	1;4	no
4	P.b. pH 7	1;4	traces
5	P.b. pH 8	1;4	traces
6	P.b. pH 9	1;4	traces

P.b. = phosphate buffer.

Concentration Screening

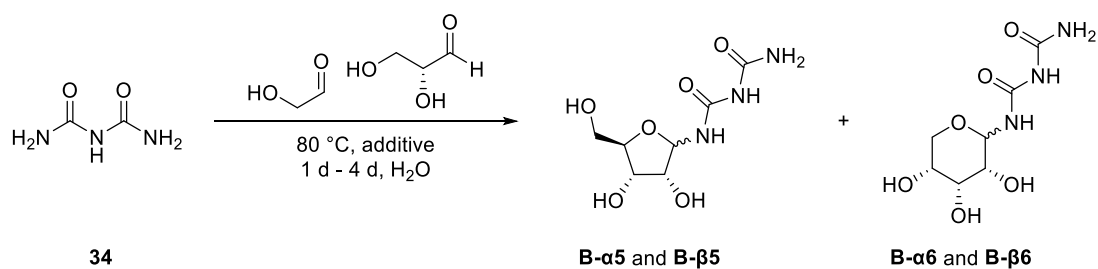


Biuret (**34**, 10.3 mg, 100 μ mol, 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (6.01 mg, 100 μ mol, 1.00 equiv.) and glyceraldehyde (9.01 mg, 100 μ mol, 1.00 equiv.) were dissolved in water (see **Table 3**) and heated at 80 °C. An aliquot of the reaction (after 1 d and 4 d) was dissolved in ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method A.

Table 3. Overview of the screening of concentrations in the prebiotic reaction towards the biuret-nucleosides after 1 d and 4 d.

Entry	Solvent; amount	Concentration [M]	Time [d]	Product Formation
1	neat; 0 μ L	-	1;4	no; no
2	water; 10 μ L	paste reaction	1;4	traces, no
3	water; 2 mL	0.05	1;4	yes, yes
4	water; 1 mL	0.1	1;4	yes, yes
5	water; 0.5 mL	0.2	1;4	yes, yes
6	water; 0.25 mL	0.4	1;4	yes, yes

Additive Screening

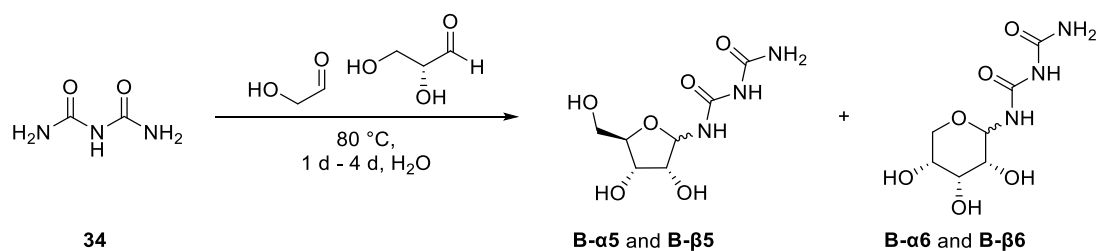


Biuret (**34**, 10.3 mg, 100 μ mol, 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (6.01 mg, 100 μ mol, 1.00 equiv.) and glyceraldehyde (9.01 mg, 100 μ mol, 1.00 equiv.) as well as the additive were dissolved in water (1.00 mL) and heated at 80 °C. An aliquot of the reaction (10 μ L) (after 1 d or 4 d) was dissolved in 990 μ L ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method A (**Table 4**).

Table 4. Overview of the screening of additives in the prebiotic reaction towards the biuret-nucleosides at 80 °C after 1 d and/or 4 d.

Entry	Solvent	Time [d]	Additive	Product Formation
1	water	1;4	Borax	no, no
2	water	1	Boric acid	no
3	water	4	MgCl ₂	yes

pH-Value Screening

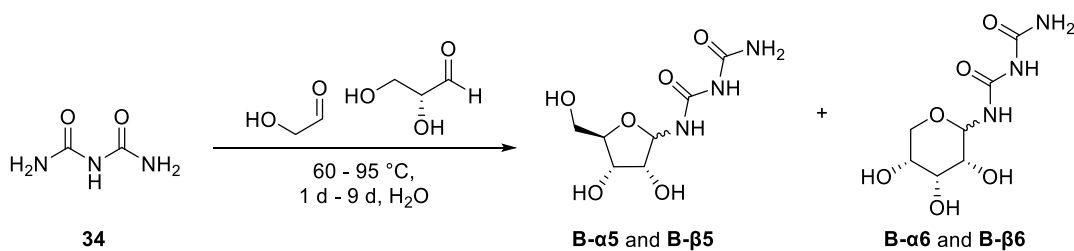


Biuret (**34**, 10.3 mg, 100 μmol, 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (6.01 mg, 100 μmol, 1.00 equiv.) and glyceraldehyde (9.01 mg, 100 μmol, 1.00 equiv.) were dissolved in ultrapure water (1.00 mL), the pH was adjusted using 0.5 M or 2 M aqueous NaOH or 0.5 M or 2 M aqueous HCl, and heated at 80 °C. An aliquot of the reaction (10 μL) (after 1 d and 4 d) was dissolved in 990 μL ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method A (**Table 5**).

Table 5. Overview of the screening of pH-values in the prebiotic reaction at 80 °C towards the biuret-nucleosides after 1 d and 4 d.

Entry	T [°C]	pH-Value	Time [d]	Product Formation
1	80	3	1;4	yes
2	80	5	1;4	yes
3	80	7	1;4	yes
4	80	9	1;4	yes
5	80	12	1;4	traces

Temperature Screening

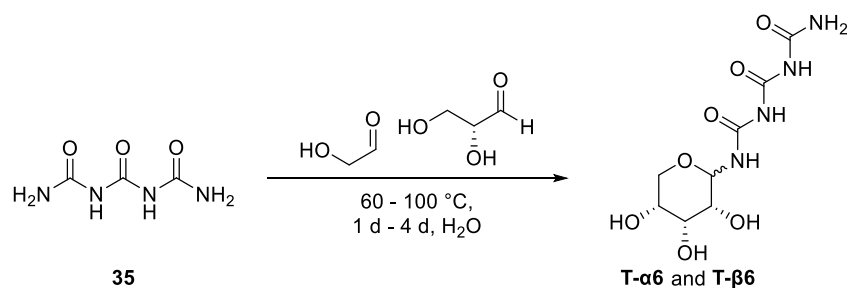


Biuret (**34**, 10.3 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (6.01 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) and glyceraldehyde (9.01 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) were dissolved in ultrapure water (1.00 mL) and heated. An aliquot of the reaction (10 μL) (after 1 d, 4 d, 9 d) was dissolved in 990 μL ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method A (Table 6).

Table 6. Overview of the screening of temperatures in the prebiotic reaction towards the biuret-nucleosides after 1 d, 4 d and 9 d.

Entry	T [$^\circ\text{C}$]	Time [d]	Product Formation
1	60	1	no
2	60	4	yes
3	60	9	yes
4	70	1	traces
5	70	4	yes
6	70	9	yes
7	80	1	yes
8	80	4	yes
9	80	9	yes
10	95	1	yes
11	95	4	no

6.3.3 Prebiotic Triuret Reactions



Triuret (**35**, 14.6 mg, 100 μmol , 1.00 equiv.) and the aldehydes glycolaldehyde (1.00 equiv. or 1.50 equiv. or 4.00 equiv.) and glyceraldehyde (1.00 equiv. or 1.50 equiv. or 4.00 equiv.) were dissolved in ultrapure water (0.1 M or 0.025 M) and heated. An aliquot of the reaction (after 1 d, 3 d or 4 d) was dissolved in ultrapure water and the mixture was filtered and analysed *via* UHPLC-QTOF-MS using method C (**Table 7**).

Table 7. Overview of the screening for the prebiotic reaction towards the triuret-nucleosides.

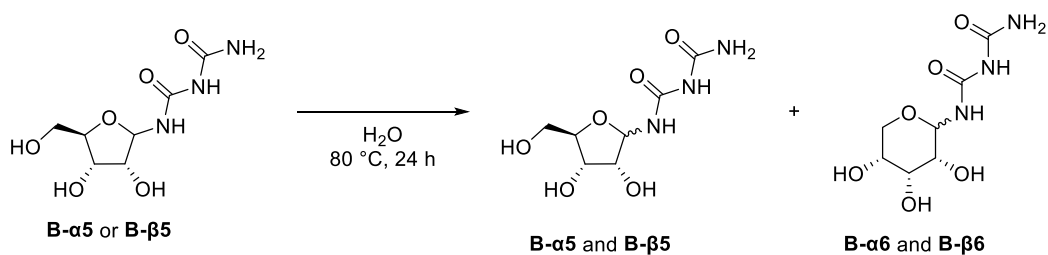
Entry	Equiv. GA:GlyA	T [$^\circ\text{C}$]	c [M]	Time [d]	Product Formation
1	1:1	80	0.1	1;4	no; no
2 ⁺	1:1	80	0.1	1;4	no; no
3	1.5:1.5	80	0.1	1;4	no; no
4	1.5:1.5	100	0.1	1;4	no; no
5	3:3	80	0.1	1;4	no; no
6	4:4	80	0.025	3	yes
7	4:4	70	0.025	3	yes
8	4:4	60	0.025	3	yes
9 [*]	4:4	60	0.025	3	no

+ = pH 8. * = pH 9. GA = glycolaldehyde, GlyA = glyceraldehyde.

6.3.4 Isomerisation

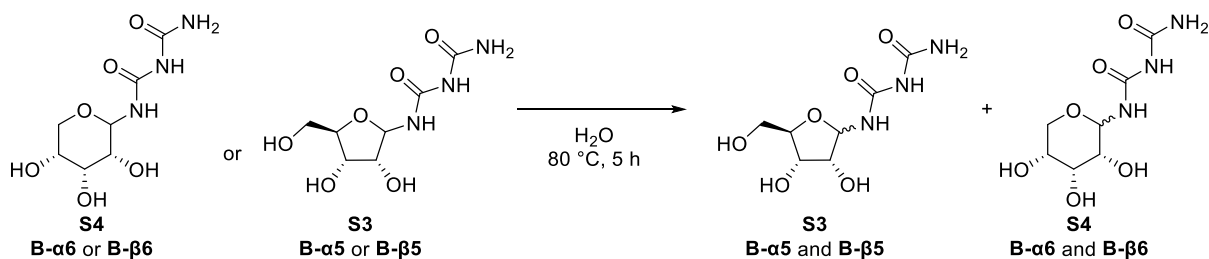
Biuret

Biuret-Furanoside Isomerisation Experiments at different Temperatures and pH-values



The biuret-furanoside (**B-α5** or **B-β5**) was dissolved in ultrapure water (1.0 mL), pH value was adjusted beforehand (pH = 5, 7 or 9), and heated at the corresponding temperature (20 °C, 50 °C or 80 °C). The reaction was analysed using the UHPLC-QTOF-MS (method C) and after immediate injection it was further heated at the corresponding temperature. This procedure was performed after two hours, five hours and 24 hours of reaction time.

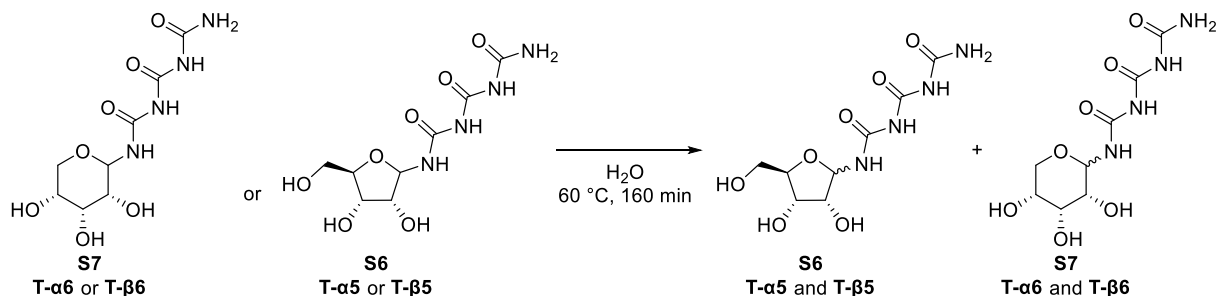
Isomerisation studies on all Biuret-nucleosides



The biuret-nucleoside (**B-α5**, **B-β5**, **B-α5** or **B-β5**) was dissolved in ultrapure water (1.0 mL), pH value was adjusted beforehand to pH 7, and analysed using the UHPLC-QTOF-MS (method B). Directly after injection the reaction was heated at the 80 °C. For the next two hours the reaction was analysed every 10 minutes and immediately after injection heated again at 80 °C. After two hours the measurements were performed every 30 minutes until a total reaction time of five hours was reached.

Triuret

Triuret-Nucleosides Isomerisation Studies

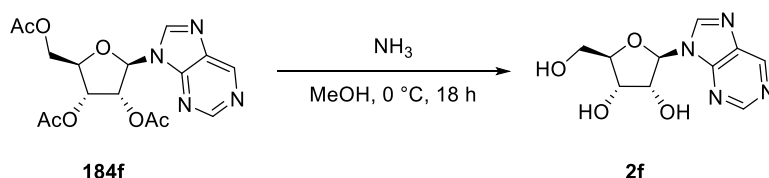


The triuret-nucleoside (**T-β5**, **T-α5**, **T-β6** or **T-α6**) was dissolved in ultrapure water (1 mL, pH 7), and analysed using the UHPLC-QTOF-MS (method C). Immediately after injection the reaction was heated at the $60\text{ }^\circ\text{C}$. For the next 160 minutes the reaction was analysed every 20 minutes and directly after injection heated again at $60\text{ }^\circ\text{C}$.

6.4 tRNA-Nucleosides and Biomimetic Estermigration

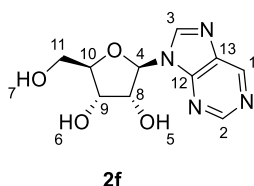
6.4.1 Synthetic Procedures and Characterisation of Isolated Compounds

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(hydroxymethyl)-5-(9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diol (**2f**)



Deacetylation was conducted similarly to the synthesis described by SHI *et al.*^[247]

Ac-Nebularine **184f** (3.99 g, 10.6 mmol, 1.00 equiv.) was suspended in NH₃/methanol (105 mL, 7 M) and stored at 0 °C overnight. The solvent was removed *in vacuo*. After washing with EtOH and recrystallization (EtOH), nebularine **2f** was obtained as an off-white solid (3.54 g, 8.59 mmol, 81 %).

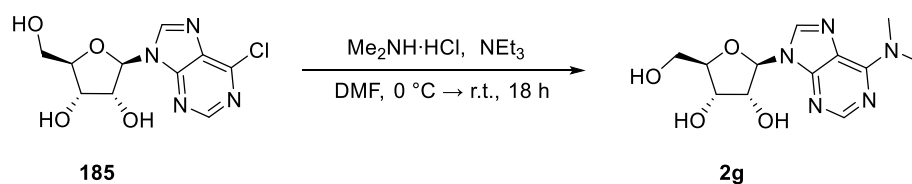


HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₀H₁₃N₄O₄⁺ [M+H]⁺: 253.0931; found: 253.0929.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.21 (s, 1H, H¹), 8.97 (s, 1H, H²), 8.87 (s, 1H, H³), 6.06 (d, J = 5.7 Hz, 1H, H⁴), 5.56 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H⁵), 5.27 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H⁶), 5.11 (t, J = 5.5 Hz, 1H, H⁷), 4.64 (q, J = 5.5 Hz, 1H, H⁸), 4.19 (q, J = 4.7 Hz, 1H, H⁹), 3.98 (q, J = 3.9 Hz, 1H, H¹⁰), 3.69 (dt, J = 12.0, 4.4 Hz, 1H, H^{11a}), 3.58 (ddd, J = 12.0, 5.9, 4.0 Hz, 1H, H^{11b}).

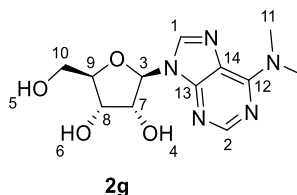
¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 152.2 (C²), 151.0 (C¹²), 148.3 (C¹), 145.5 (C³), 134.2 (C¹³), 87.5 (C⁴), 85.7 (C¹⁰), 73.7 (C⁸), 70.3 (C⁹), 61.3 (C¹¹).

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-(dimethylamino)-9*H*-purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (2*g*)



The synthesis was conducted similarly as presented by HERBERT *et al.* [248]

6-Chloropurine riboside (**185**) (2.87 g, 10.0 mmol, 1.00 equiv.) and dimethylamine hydrochloride (1.06 mg, 13.0 mmol, 5.00 equiv.) were suspended in DMF and stirred for 30 min at 0 °C. After addition of NEt_3 (2.20 mL, 15.8 mmol, 6.00 equiv.), the solution was stirred for 2 h at 0 °C and overnight at room temperature. The suspension was filtered and washed with ice-cold DMF (50 mL), the solvent was removed *in vacuo* resulting in a yellow solid. After purification by washing in acetone (80 mL) and recrystallizing in EtOH, **2g** was obtained as a white solid (2.01 g, 6.80 mmol, 68 %).



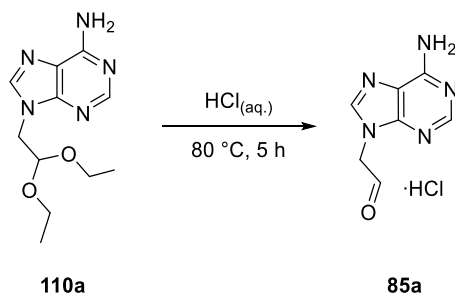
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 296.1353; found 296.1351.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.37 (s, 1H, H^1), 8.21 (s, 1H, H^2), 5.90 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H^3), 5.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H^4), 5.38 (dd, $J = 7.0, 4.6$ Hz, 1H, H^5), 5.20 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H^6), 4.57 (td, $J = 6.1, 4.9$ Hz, 1H, H^7), 4.14 (td, $J = 4.8, 3.2$ Hz, 1H, H^8), 3.95 (q, $J = 3.5$ Hz, 1H, H^9), 3.75 – 3.62 (m, 1H, H^{10a}), 3.55 (ddd, $J = 12.1, 7.0, 3.6$ Hz, 1H, H^{10b}), 3.43 (d, $J = 43.5$ Hz, 5H, H^{11}).

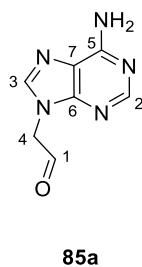
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 154.3 (C^{12}), 151.7 (C^2), 149.9 (C^{13}), 138.6 (C^1), 119.8 (C^{14}), 87.8 (C^3), 85.8 (C^9), 73.5 (C^7), 70.6 (C^8), 61.6 (C^{10}).

Experimental

2-(6-amino-9H-purin-9-yl)acetaldehyde hydrochloride (**85a**) as HCl salt



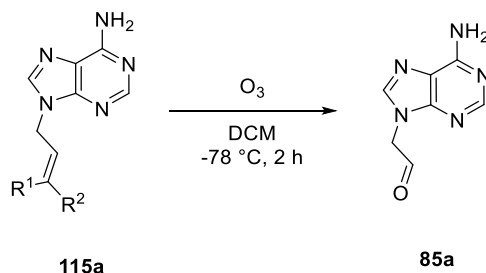
Compound **110a** (408 mg, 1.62 mmol) was suspended in aqueous HCl (1 M, 2 mL) and the mixture was heated to 90 °C for 1 h until TLC analysis indicated full conversion of the starting material. All volatiles were removed under diminished pressure and the deprotected aldehyde **85a** (340 mg, 1.59 mmol, 98 %) as the hydrochloride salt was obtained as an off-white solid.



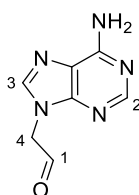
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_7H_8N_5O^+$ $[M+H]^+$: 178.0723; found: 178.0720.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.69 (s, 1H, H¹), 8.54 (s, 1H, H²), 8.43 (s, 1H, H³), 5.40 (s, 2H, H⁴).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 195.9 (C¹), 150.2 (C⁵), 148.7 (C⁶), 144.8 (C³), 144.7 (C²), 117.7 (C⁷), 53.0 (C⁴).

2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)acetaldehyde (**85a**) via Ozonolysis

115a (350.4 mg, 2.00 mmol) was dissolved in dry DCM (10 mL). The solution was cooled to -78 °C and dried oxygen (passed through columns of both orange gel and P₄O₁₀) was bubbled through to avoid formation of NO_x during ozonolysis. Then ozone (generated from the same oxygen stream) was bubbled through until the solution turned blue (2 h). The ozone generator was turned off and first oxygen, then nitrogen was bubbled through to remove any excess ozone. Once the solution lost all blue colour, DMS (100 µL/mmol olefin) was added to the solution and the mixture was stirred for another 1 h while warming to room temperature. All volatiles were removed *in vacuo* to obtain the respective aldehyde **85a** (308.3 mg, 1.74 mmol, 87 %) as a light yellow oil.



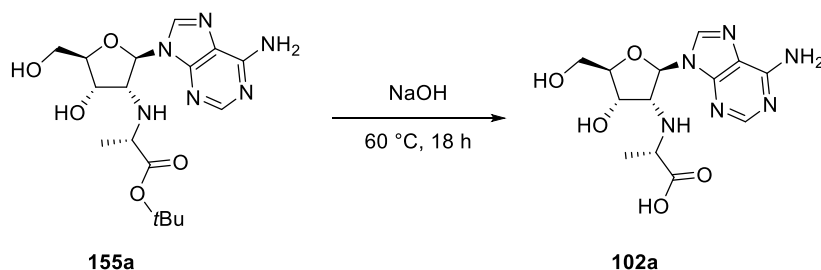
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₇H₈N₅O⁺ [M+H]⁺: 178.0723; found: 178.0720.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.69 (s, 1H, H¹), 8.54 (s, 1H, H²), 8.43 (s, 1H, H³), 5.40 (s, 2H, H⁴).

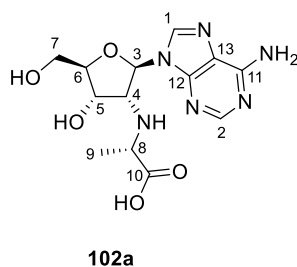
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 195.9 (C¹), 150.2 (C⁵), 148.7 (C⁶), 144.8 (C³), 144.7 (C²), 117.7 (C⁷), 53.0 (C⁴).

Experimental

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-L-alanine (**102a**)



NaOH (0.50 M, 2.00 mL) was added to ester **155a** (78.9 mg, 200 μmol) and the reaction mixture was stirred at 55 $^{\circ}\text{C}$ overnight. The resulting solution was brought to pH 6 with acidic ion exchange resin (Dowex MarathonTM C hydrogen form) and after filtration it was washed with EtOAc ($3 \times 5.00\text{ mL}$) in order to remove remaining reactant. The aqueous phase was concentrated by freeze-drying and substituted adenosine **102a** (45.4 mg, 134 μmol , 67 %) was obtained as a colourless solid.



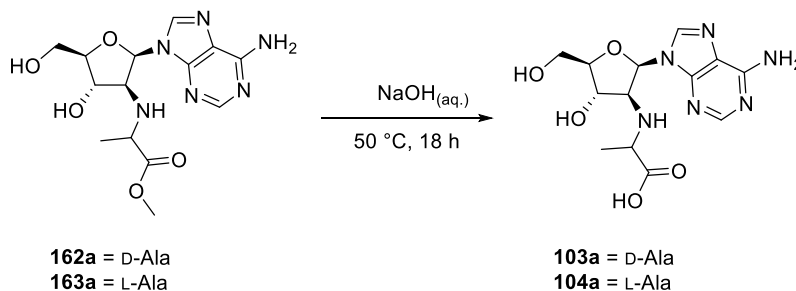
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 339.1411; found: 339.1414.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.22 (s, 1H, H^1), 8.11 (s, 1H, H^2), 6.25 (d, $J = 7.7\text{ Hz}$, 1H, H^3), 4.63 – 4.53 (m, 2H, $\text{H}^{4,5}$), 4.28 – 4.22 (m, 1H, H^6), 3.70 (d, $J = 3.2\text{ Hz}$, 2H, H^7), 3.55 (q, $J = 7.1\text{ Hz}$, 1H, H^8), 1.28 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 3H, H^9).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 175.0 (C^{10}), 155.6 (C^{11}), 152.6 (C^2), 148.7 (C^{12}), 140.7 (C^1), 119.1 (C^{13}), 87.7 (C^6), 84.9 (C^3), 69.1 (C^4), 61.4 (C^7), 60.2 (C^5), 57.2 (C^8), 16.2 (C^9).

((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-D-alanine (**103a**)

((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-L-alanine (**104a**)

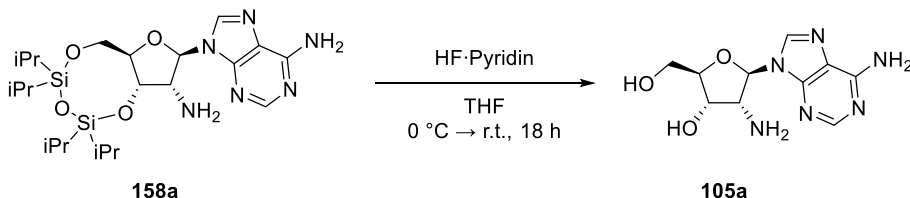


162a or **163a** (8.0 mg) was dissolved in an aqueous NaOH-solution (0.5 M, 2.0 mL) and was stirred overnight at 50 °C. The solution was cooled to room temperature and an ion exchange resin (Dowex Marathon™ C hydrogen form) was added until pH = 7. The suspension was filtered and the solvent was removed using lyophilisation and the crude products **103a** or **104a** were directly used for UHPLC-QTOF-MS measurements.

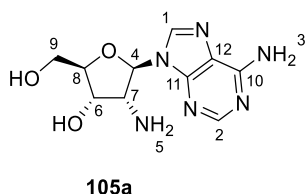
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{13}H_{19}N_6O_5^+$ $[M+H]^+$: 339.1411; found: 339.1412.

Experimental

(2R,3S,4R,5R)-4-amino-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (**105a**)



TIPDS-Amine **158a** (100 mg, 196 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (1.0 mL) and the solution was cooled to 0 $^{\circ}\text{C}$. HF·pyridine (70 wt.%; 46.0 μL , 1.77 mmol, 9.0 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm to room temperature and was stirred overnight. Excess fluoride was quenched *via* addition of TMS-OMe (1.0 mL) and further stirring for 30 min. The solvent was removed *in vacuo* and **105a** (37 mg, 140 μmol , 71 %) was obtained as a white solid.

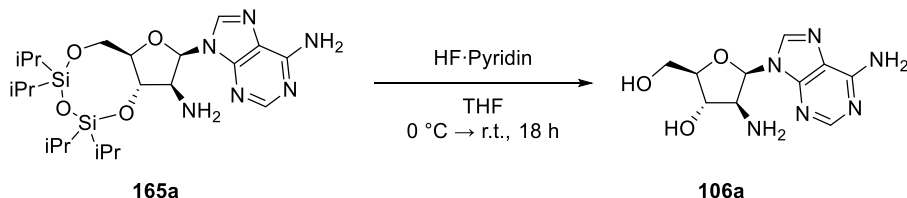


HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 267.1200; found: 267.1196.

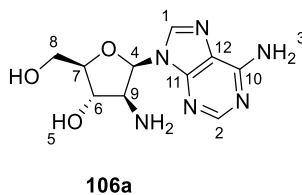
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H^1), 8.13 (s, 1H, H^2), 7.37 (s, 2H, H^3), 5.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H^4), 5.52 (s, 2H, H^5), 4.14 (dd, $J = 5.3, 1.7$ Hz, 1H, H^6), 4.08 (dd, $J = 8.0, 5.2$ Hz, 1H, H^7), 4.00 (td, $J = 3.8, 1.5$ Hz, 1H, H^8), 3.65 (dd, $J = 12.0, 4.1$ Hz, 1H, H^{9a}), 3.63 – 3.50 (m, 1H, H^{9b}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.2 (C^{10}), 152.3 (C^2), 149.2 (C^{11}), 140.3 (C^1), 119.5 (C^{12}), 88.1 (C^4), 87.0 (C^8), 71.3 (C^6), 62.0 (C^9), 56.6 (C^7).

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-amino-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (106a)



TIPDS-Amine **165a** (35 mg, 69 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (1.0 mL) and the solution was cooled to 0 $^{\circ}\text{C}$. HF·pyridine (70 wt.%; 16.0 μL , 619 μmol , 9.0 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm to room temperature and was stirred overnight. Excess fluoride was quenched *via* addition of TMS-OMe (1.0 mL) and further stirring for 30 min. The solvent was removed *in vacuo* and after purification using flash column chromatography ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 95:5 \rightarrow ACN 100 %) **106a** (12 mg, 46 μmol , 67 %) was obtained as a white solid.



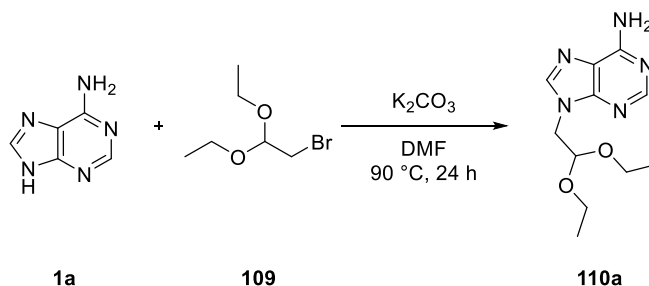
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 267.1200; found: 267.1197.

^1H -NMR (600 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.28 (s, 1H, H^1), 8.11 (s, 1H, H^2), 7.22 (s, 2H, H^3), 6.20 (d, J = 6.3 Hz, 1H, H^4), 5.43 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H^5), 4.08 (td, J = 6.5, 3.4 Hz, 1H, H^6), 3.75 – 3.72 (m, 1H, H^7), 3.70 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H^{8a}), 3.61 (dd, J = 11.9, 3.9 Hz, 1H, H^{8b}), 3.51 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H^9).

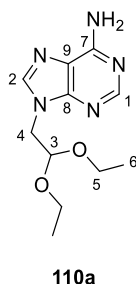
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (151 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.0 (C^{10}), 152.3 (C^2), 149.4 (C^{11}), 140.1 (C^1), 118.6 (C^{12}), 84.5 (C^4), 84.1 (C^7), 74.9 (C^6), 60.5 (C^9), 60.4 (C^8).

Experimental

9-(2,2-Diethoxyethyl)-9H-purin-6-amine (**110a**):



Adenine (**1a**, 405.4 mg, 3.00 mmol, 1.0 equiv.) and K_2CO_3 (829.2 mg, 6.00 mmol, 2.0 equiv.) were suspended in dry DMF (5 mL). Bromoacetaldehyde diethyl acetate (**109**, 580 μ L, 4.50 mmol, 1.5 equiv.) was added and the mixture was heated to 90 °C. After 24 h TLC analysis indicated full conversion. The solids were removed by hot filtration and the filter cake was washed with DCM. Volatiles were removed under reduced pressure and the crude residue was dried extensively under high vacuum. Said residue was purified by flash column chromatography (DCM \rightarrow DCM/MeOH 95:5) and **110a** (557.9 mg, 2.22 mmol, 74 %) was obtained as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{11}H_{18}N_5O_2^+$ $[M+H]^+$: 252.1455; found: 252.1458.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.14 (s, 1H, H^1), 8.05 (s, 1H, H^2), 7.21 (s, 2H, H^{NH_2}), 4.84 (t, J = 5.5 Hz, 1H, H^3), 4.21 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H^4), 3.64 (dq, J = 9.7, 7.0 Hz, 2H, H^{5a}), 3.42 (dq, J = 9.7, 7.1 Hz, 2H, H^{5b}), 1.02 (t, J = 7.0 Hz, 6H, H^6).

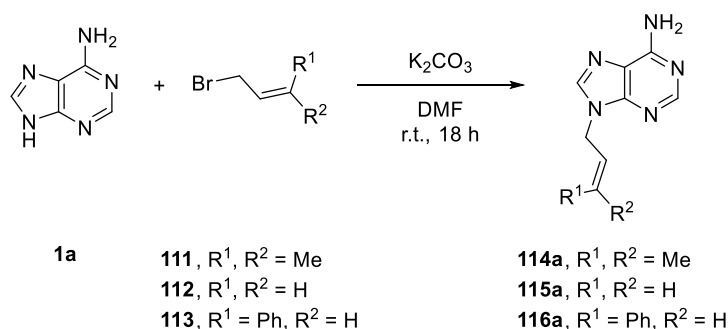
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 155.9 (C^7), 152.5 (C^2), 149.7 (C^8), 141.3 (C^1), 118.4 (C^9), 99.4 (C^3), 62.2 (C^5), 45.2 (C^4), 15.1 (C^6).

R_f 0.30 (DCM/MeOH 95:5).

9-(3-Methylbut-2-en-1-yl)-9H-purin-6-amine (**114a**),

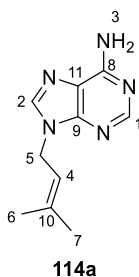
9-Allyl-9H-purin-6-amine (**115a**),

9-Cinnamyl-9H-purin-6-amine (**116a**)



Adenine (1.10 g, 8.14 mmol, 1.0 equiv.) and K₂CO₃ (1.35 g, 9.77 mmol, 1.2 equiv.) were suspended in dry DMF (10 mL). Bromide **111**, **112** or **113** (0.90 equiv.) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. After TLC analysis indicated full conversion the slightly yellow suspension was diluted with EtOAc and washed with water (3 ×). The aqueous phase was reextracted with EtOAc and iPrOH/CHCl₃ (1:3). The combined organic phases were then washed with sat. aqueous LiCl and NaCl solutions and dried over Na₂SO₄. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography to receive **114a**, **115a** or **116a** as beige solids.

9-(3-Methylbut-2-en-1-yl)-9H-purin-6-amine (**114a**):



Yield: 339 mg, 2.69 mmol, 22 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₀H₁₄N₅⁺ [M+H]⁺: 204.1244; found: 204.1240.

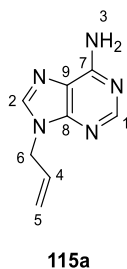
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.37 (s, 1H, H¹), 7.79 (s, 1H, H²), 5.90 (s, 2H, H³), 5.44 (dddd, J = 7.2, 5.7, 2.9, 1.5 Hz, 1H, H⁴), 4.76 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H⁵), 1.81 (s, 3H, H^{6/7}), 1.80 (s, 3H, H^{6/7}).

Experimental

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 155.4 (C^8), 152.8 (C^1), 150.1 (C^9), 140.3 (C^2), 139.4 (C^{10}), 119.8 (C^{11}), 117.8 (C^4), 41.4 (C^5), 25.8 ($\text{C}^{6/7}$), 18.3 ($\text{C}^{6/7}$).

R_f: 0.70 (EtOAc/MeOH 95:5).

9-Allyl-9H-purin-6-amine (**115a**):



Yield: 402 mg, 4.97 mmol, 61 %.

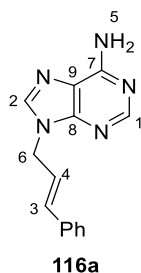
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 176.0931; found: 176.0930.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.13 (s, 1H, H^1), 8.11 (s, 1H, H^2), 7.23 (s, 2H, H^3), 6.06 (ddt, J = 17.2, 10.6, 5.4 Hz, 1H, H^4), 5.18 (dd, J = 10.3, 1.5 Hz, 1H, H^{5a}), 5.02 (dd, J = 17.1, 1.6 Hz, 1H, H^{5b}), 4.78 (dt, J = 5.6, 1.7 Hz, 2H, H^6).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.0 (C^7), 152.5 (C^1), 149.4 (C^8), 140.7 (C^2), 133.5 (C^4), 118.6 (C^9), 117.4 (C^5), 44.9 (C^6).

R_f: 0.45 (EtOAc/MeOH 9:1).

9-Cinnamyl-9H-purin-6-amine (**116a**):



Yield: 264 mg, 1.06 mmol, 13 %.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.40 (s, 1H, H^1), 7.87 (s, 1H, H^2), 7.40 – 7.26 (m, H^{Ph}), 6.62 (dt, J = 15.8, 1.5 Hz, 1H, H^3), 6.38 (dt, J = 15.8, 6.3 Hz, 1H, H^4), 5.63 (s, 2H, H^5), 4.98 (dd, J = 6.4, 1.5 Hz, 2H, H^6).

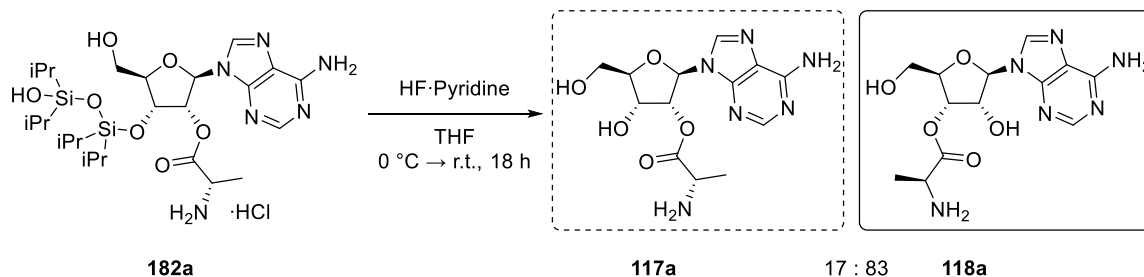
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 155.5 (C^7), 153.3 (C^1), 150.1 (C^8), 140.4 (C^2), 135.7 ($\text{C}^{\text{Ph-quart}}$), 134.6 (C^3), 128.9 (2C, C^{Ph}), 128.5 (C^{Ph}), 126.8 (2C, C^{Ph}), 122.7 (C^4), 119.8 (C^9), 45.6 (C^6).

R_f: 0.31 (EtOAc).

Experimental

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**117a**)

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**118a**)

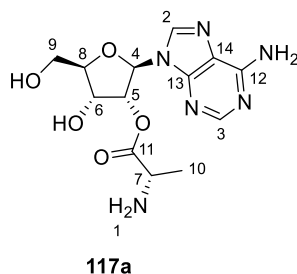


Compound **182a** (52.3 mg, 0.082 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (2 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF-pyridine (70 wt.%; 22.0 μ L, 0.823 mmol, 10.0 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred for 18 h. Excess fluoride was quenched by adding TMS-OMe (2 mL) and stirring for an additional 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 50:50). A mixture of regioisomers **117a** and **118a** (26.6 mg, 0.079 μ mol, 96 %, sum of the two regioisomers) were obtained as a white solid.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{13}H_{19}N_6O_5^+$ $[M+H]^+$: 339.1411; found: 339.1412.

R_f: 0.11 (No separation between isomers observed; EtOAc/MeOH 70:30).

2'-Isomer **117a**:

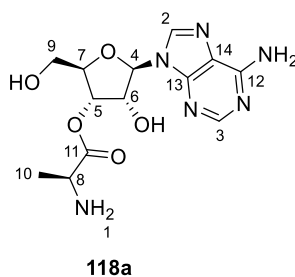


¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.67 (s, 3H, H¹), 8.60 (s, 1H, H²), 8.38 (s, 1H, H³), 6.27 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H⁴), 5.70 (t, J = 4.9 Hz, 1H, H⁵), 4.53 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H⁶), 4.19 (t, J = 6.2

Hz, 1H, H⁷), 4.07 (dt, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H, H⁸), 3.79 – 3.56 (m, 2H, H⁹), 1.45 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H¹⁰).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 168.9 (C¹¹), 153.0 (C¹²), 148.9 (C¹³), 148.4 (C³), 141.0 (C²), 119.0 (C¹⁴), 85.6 (C⁸), 85.5 (C⁴), 76.7 (C⁵), 68.5 (C⁶), 61.1 (C⁹), 47.9 (C⁷), 15.8 (C¹⁰).

3'-Isomer **118a**:



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.77 – 8.71 (m, 3H, H¹), 8.62 (s, 1H, H²), 8.40 (s, 1H, H³), 6.08 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H⁴), 5.39 (dd, $J = 5.2, 2.2$ Hz, 1H, H⁵), 4.90 (dd, $J = 7.0, 5.2$ Hz, 1H, H⁶), 4.23 (dd, $J = 3.9, 2.3$ Hz, 1H, H⁷), 4.19 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H⁸), 3.79 – 3.56 (m, 2H, H⁹), 1.51 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H¹⁰).

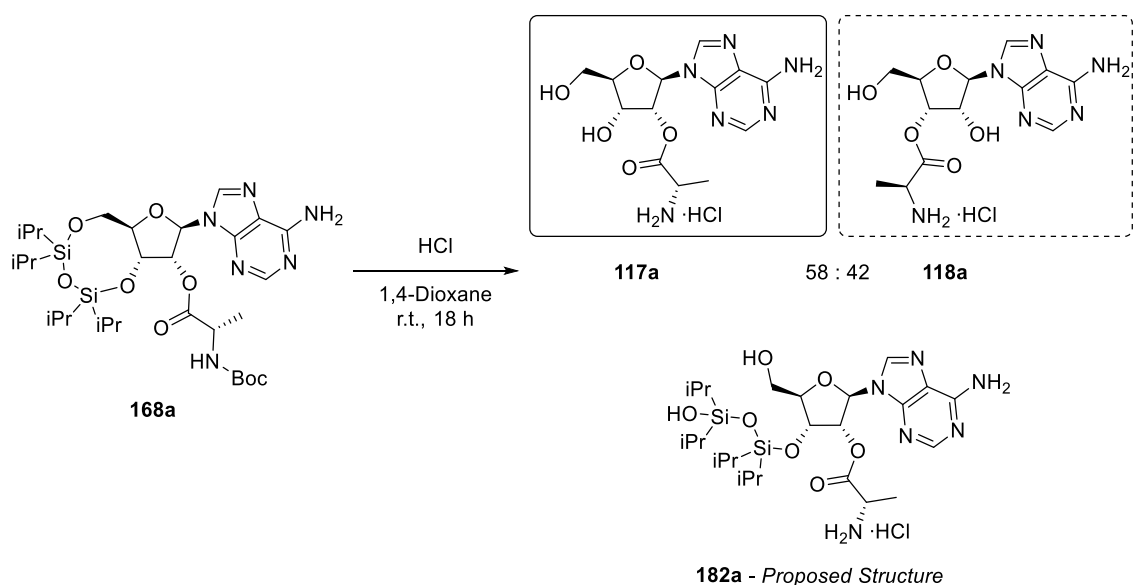
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 168.9 (C¹¹), 153.0 (C¹²), 148.9 (C¹³), 148.4 (C³), 141.0 (C²), 119.0 (C¹⁴), 86.9 (C⁴), 83.2 (C⁷), 74.9 (C⁵), 72.6 (C⁶), 61.1 (C⁹), 47.9 (C⁸), 15.8 (C¹⁰).

Experimental

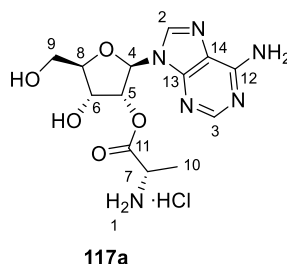
(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**117a**)

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**118a**)

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-((3-hydroxy-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxaneyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate hydrochloride (**182a**)



Compound **168a** (210 mg, 308 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in 1,4-dioxane (6 mL). HCl in 1,4-dioxane (4 M, 2.00 mL) was added and the mixture was stirred for 18 h. After TLC analysis indicated full conversion, all volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified *via* flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 1:1). Fully deprotected compounds **117a** and **118a** (7.3 mg, 18.5 μ mol, 6 %) were obtained as a mixture of regioisomers. Furthermore, a Boc-deprotected alanine-adenosine **182a** with a partially hydrolysed silyl ether also could be isolated (91.9 mg, 145 μ mol, 47 %).

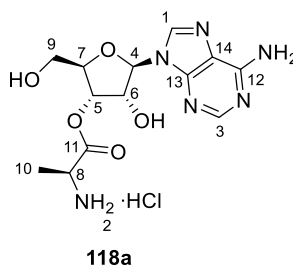
2'-Isomer **117a**:

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{13}H_{19}N_6O_5^+$ $[M+H]^+$: 339.1411; found: 339.1412.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.75 (s, 2H, H^1), 8.69 (s, 1H, H^2), 8.49 (s, 1H, H^3), 6.29 (d, J = 4.3 Hz, 1H, H^4), 5.68 (t, J = 4.7 Hz, 1H, H^5), 4.53 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H^6), 4.20 (m, 1H, H^7), 4.10 – 4.04 (m, 1H, H^8), 3.80 – 3.57 (m, 2H, H^9), 1.45 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H^{10}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 168.9 (C^{11}), 151.6 (C^{12}), 148.2 (C^{13}), 146.9 (C^3), 141.7 (C^2), 118.8 (C^{14}), 85.5 (2C, $C^{4,8}$), 76.9 (C^5), 68.4 (C^6), 60.4 (C^9), 47.9 (C^7), 15.7 (C^{10}).

R_f: 0.11 (EtOAc/MeOH 70:30).

3'-Isomer **118a**:

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{13}H_{19}N_6O_5^+$ $[M+H]^+$: 339.1411; found: 339.1412.

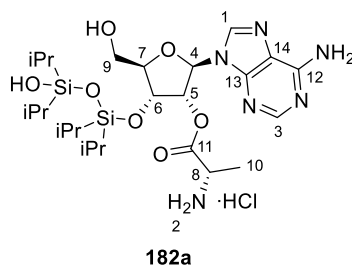
1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.71 (s, 1H, H^1), 8.68 (s, 2H, H^2), 8.50 (s, 1H, H^3), 6.10 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H^4), 5.39 (dd, J = 5.2, 2.3 Hz, 1H, H^5), 4.88 (dd, J = 6.9, 5.2 Hz, 1H, H^6), 4.25 (q, J = 3.5 Hz, 1H, H^7), 4.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H^8), 3.80 – 3.57 (m, 2H, H^9), 1.51 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H^{10}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 168.9 (C^{11}), 151.7 (C^{12}), 148.7 (C^{13}), 146.7 (C^3), 141.5 (C^1), 118.7 (C^{14}), 86.8 (C^4), 83.2 (C^8), 74.7 (C^5), 72.8 (C^6), 61.0 (C^9), 48.1 (C^7), 15.8 (C^{10}).

R_f: 0.11 (EtOAc/MeOH 70:30).

Experimental

Partially hydrolysed product **182a**:

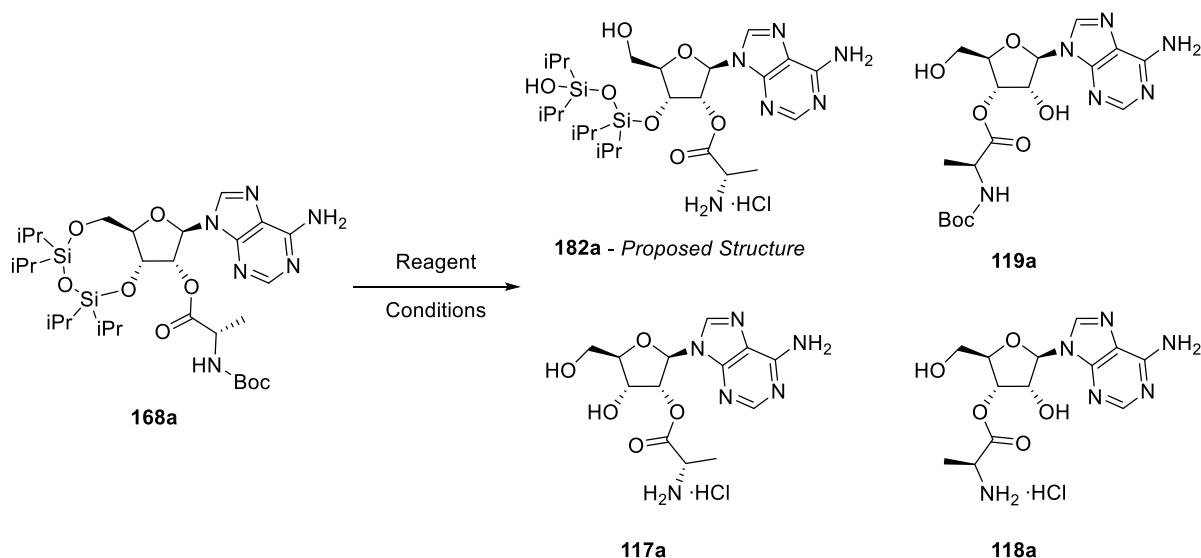


HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{30}H_{55}N_6O_9Si_2^+$ $[M+H]^+$: 699.3564; found: 699.3568.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.66 (s, 1H, H^1), 8.63 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H, H^2), 8.45 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H^3), 6.30 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H^4), 5.79 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H^5), 4.88 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H^6), 4.23 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, H^7), 4.08 (m, 1H, H^8), 3.81 (dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, 1H, H^{9a}), 3.67 (dd, $J = 12.3, 3.4$ Hz, 1H, H^{9b}), 1.47 (dd, $J = 17.6, 7.2$ Hz, 4H, H^{10}), 1.10 – 0.88 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 169.4 (C^{11}), 151.9 (C^{12}), 148.2 (C^{13}), 147.9 (C^3), 141.4 (C^2), 118.8 (C^{14}), 85.8 (C^7), 85.6 (C^4), 76.6 (C^5), 69.9 (C^6), 60.2 (C^9), 47.8 (C^8), 17.3 – 17.0 (8C, C^{iPr-CH_3}), 16.1 (C^{10}), 13.1 – 12.6 (C4, C^{iPr-CH}).

R_f: 0.37 (EtOAc/MeOH 70:30).

Silyl Reagent Screening **117a**, **118a**, **119a**, **182a**

Reagent ^[1]	Solvent	Equiv.	T [°C]	t [h]	Yield [%]
CsF (s)	NH ₃ in MeOH (7 M)	5.00	65	18	Decomposition
HCl (4 M in Et ₂ O)	1,4-Dioxane	25.0	r.t.	18	3.5 117a ; 2.5 118a ; 47 182a
3HF·NEt ₃	THF	25.0	0 → r.t.	18	82 119a
HF·Pyridine (70 wt.% HF)	THF	20.0	0 → r.t.	18	85 119a
NaF (s)	THF	25.0	r.t. → 66	48	No Conversion
NH ₄ F (s)	THF	25.0	r.t. → 66	24	No Conversion
TASF (s) ^[2]	THF	6.00	0 → r.t.	18	Decomposition
TBAF (1 M, in THF) ^[3]	THF	1.20	0	0.2	Decomposition
TBAF·H ₂ O (s)	THF	3.00	0	0.2	Decomposition

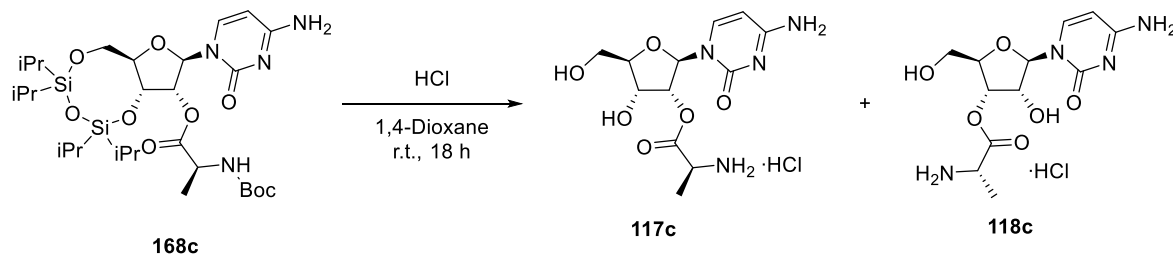
[1] All experiments were performed according to modified literature procedures; [2] TASF = Tris(dimethylamino)sulfonium difluorotrimethylsilicate; [3] TBAF = Tetrabutylammonium fluoride.

Experimental

Compound **168a** (68.3 mg, 0.10 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in a solvent listed in the table above (0.5 mL). A reagent for deprotection (view table for stoichiometry) was added at a suitable temperature (0 °C or r.t.) and reaction progress was monitored by TLC and/or HRMS. When no conversion was observed within 24 h the temperature was increased. The reaction was stopped either after full consumption of the starting material or upon full conversion according to MS analysis. Excess fluoride was quenched with TMS-OMe (0.2 mL) and after 30 min all volatiles were removed *in vacuo*. Purification *via* flash column chromatography yielded **119a**, **117a**, **118a** or **182a** in the yields given in the table above.

For analytical data of the products obtained by successful reactions with HCl or HF·pyridine view the respective pages of the mentioned compounds.

(2R,3R,4R,5R)-2-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate hydrochloride (**117c**)
(2R,3R,4R,5R)-2-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate hydrochloride (**118c**)

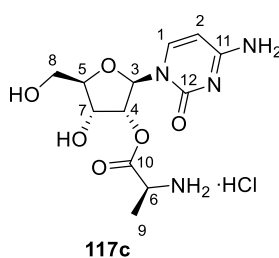


Compound **168c** (197 mg, 300 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in 1,4-dioxane (6 mL). HCl in 1,4-dioxane (4 M, 2.00 mL) was added and the mixture was stirred for 18 h. After TLC analysis indicated full conversion, all volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified *via* flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 1:1). Fully deprotected compounds **117c** and **118c** (40:60; 88.1 mg, 252 μ mol, 84 %) were obtained as a mixture of regioisomers.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{12}H_{19}N_4O_6^+$ $[M+H]^+$: 315.1299; found: 315.1297.

R_f: 0.05 (No separation between isomers observed; EtOAc/MeOH 70:30).

2'-Isomer **117c**:

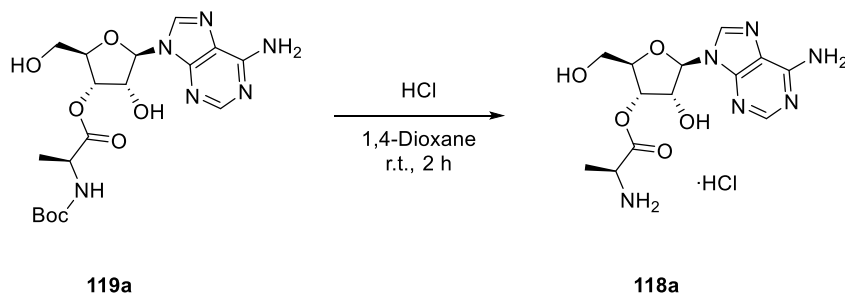


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.28 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H¹), 6.14 (dd, J = 7.7, 2.3 Hz, 1H, H²), 5.89 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H³), 5.39 (dd, J = 5.0, 2.7 Hz, 1H, H⁴), 4.25 (q, J = 5.5 Hz, 1H, H⁵), 4.21 – 4.09 (m, 1H, H⁶), 4.07 – 3.93 (m, 1H, H⁷), 3.78 (dd, J = 12.5, 2.5 Hz, 1H, H^{8a}), 3.72 – 3.56 (m, 1H, H^{8b}), 1.46 (dd, J = 7.1, 3.5 Hz, 3H, H⁹).

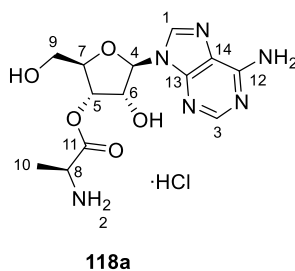
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 168.8 (C¹⁰), 160.7 (C¹¹), 148.2 (C¹²), 143.8 (C¹), 94.0 (C²), 87.5 (C³), 84.5 (C⁷), 76.9 (C⁴), 67.1 (C⁵), 59.8 (C⁸), 48.6 (C⁶), 16.1 (C⁹).



(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**118a**)



Ester **119a** (90.0 mg, 205 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in 1,4-dioxane (2 mL) and HCl in 1,4-dioxane (4 M, 1.00 mL) was added dropwise to the solution. The mixture was stirred at r.t. for 2 h until a white suspension had formed. The white residue was filtered and washed with Et₂O. Compound **118a** (53.2 mg, 142 μmol , 69 %) was obtained as a hydrochloride in the form of white foam.



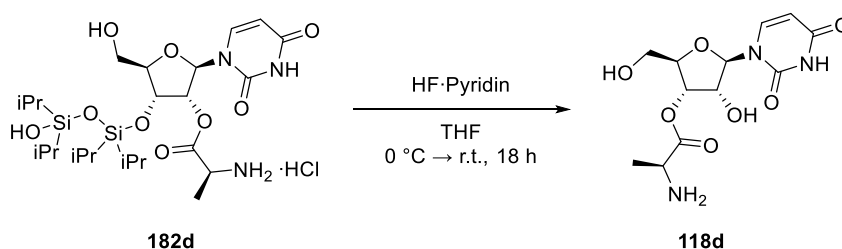
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₃H₁₉N₆O₅⁺ [M+H]⁺: 339.1411; found: 339.1413.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.79 (s, 1H, H¹), 8.76 – 8.70 (m, 3H, H²), 8.57 (s, 1H, H³), 6.11 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H⁴), 5.39 (dd, J = 5.2, 2.4 Hz, 1H, H⁵), 4.87 (dd, J = 6.8, 5.2 Hz, 1H, H⁶), 4.26 (q, J = 3.6 Hz, 1H, H⁷), 4.23 – 4.13 (m, 1H, H⁸), 3.66 (qd, J = 12.1, 3.9 Hz, 2H, H⁹), 1.50 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H¹⁰).

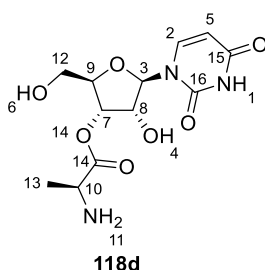
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 168.9 (C¹¹), 150.5 (C¹²), 148.6 (C¹³), 145.5 (C³), 141.9 (C¹), 118.6 (C¹⁴), 86.8 (C⁴), 83.3 (C⁷), 74.6 (C⁵), 73.0 (C⁶), 60.9 (C⁹), 48.1 (C⁸), 15.8 (C¹⁰).

Experimental

(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**118d**)



Compound **182d** (83.5 mg, 0.136 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (1 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 77.0 μ L, 2.73 mmol, 20.0 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred for 18 h. Excess fluoride was quenched by adding TMS-OMe (2 mL) and stirring for an additional 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 50:50). 3'-Isomer **118d** (34.5 mg, 0.098 μ mol, 72 %) was obtained as a white solid.



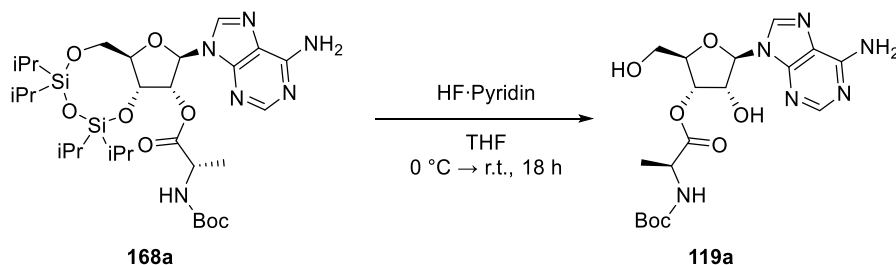
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{12}H_{18}N_3O_7^+$ $[M+H]^+$: 316.1139; found: 316.1140.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.40 (s, 1H, H¹), 7.92 (dd, J = 17.4, 8.0 Hz, 1H, H²), 5.90 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H³), 5.81 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H⁴), 5.71 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H⁵), 5.45 (s, 1H, H⁶), 5.23 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H⁷), 4.30 (dq, J = 17.8, 6.2 Hz, 1H, H⁸), 4.18 – 4.09 (m, 4H, H^{9,10,11}), 3.60 (s, 2H, H¹²), 1.47 (d, J = 7.6 Hz, 3H, H¹³).

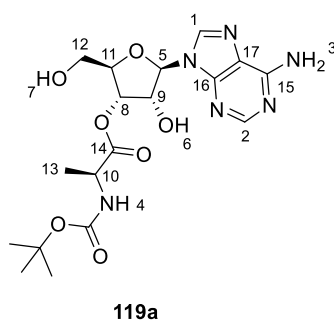
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 169.4 (C¹⁴), 163.5 (C¹⁵), 151.3 (C¹⁶), 140.9 (C²), 102.9 (C⁵), 87.2 (C³), 82.8 (C⁹), 75.1 (C⁷), 72.4 (C⁸), 61.4 (C¹²), 48.5 (C¹⁰), 16.2 (C¹³).

R_f: 0.10 (EtOAc/MeOH 70:30).

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (tert-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119a**)



Compound **168a** (200 mg, 293 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (2 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 191 μL , 7.34 mmol, 25.0 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred for 18 h at room temperature until TLC confirmed full conversion. Excess fluoride was quenched by adding TMS-OMe (2 mL) and stirring for an additional 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (cHex/EtOAc 1:1 \rightarrow EtOAc 100 %). Compound **119a** (110 mg, 250 μmol , 85 %) was obtained as a white foam.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 439.1936; found: 439.1938.

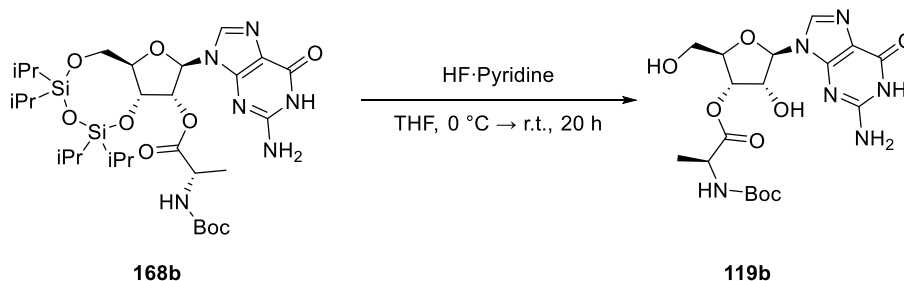
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.38 (s, 1H, H¹), 8.15 (s, 1H, H²), 7.41 (s, 2H, H³), 7.35 (d, J = 7.5, 1H, H⁴), 5.92 (d, J = 7.3, 1H, H⁵), 5.76 (d, J = 6.5, 1H, H⁶), 5.63 (d, J = 8.4, 1H, H⁷), 5.29 – 5.22 (m, 1H, H⁸), 4.89 (q, J = 6.2, 1H, H⁹), 4.15 (p, J = 7.4, 1H, H¹⁰), 4.06 (q, J = 3.0, 1H, H¹¹), 3.72 – 3.55 (m, 2H, H¹²), 1.40 (s, 9H, H^{Boc}), 1.32 (d, J = 7.4, 3H, H¹³).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.3 (C¹⁴), 156.3 (C¹⁵), 155.4 (C^{Boc-CO}), 149.2 (C¹⁶), 139.7 (C¹), 119.3 (C¹⁷), 87.3 (C⁵), 78.3 (C^{Boc-quart.}), 73.9 (C⁸), 71.9 (C⁹), 61.6 (C¹²), 28.2 (C^{Boc-CH3}), 17.1 (C¹³).

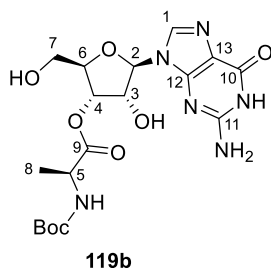
R_f: 0.44 (EtOAc 100 %).

Experimental

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119b**)



2'-*N*-Boc-Alanine-3',5'-TIPDS-guanosine (**168b**) (105 mg, 0.150 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in THF (1 mL) and cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 78.0 μ L, 3.75 mmol, 25.0 equiv.) was added to the suspension and stirred overnight. After quenching of the excess fluoride using TMS-OMe (1 mL), the residue was purified *via* flash column chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 85:15). 3'-*N*-Boc-alanine-guanosine **119b** (57.1 mg, 151 μ mol, 83 %) was obtained with minor impurities.



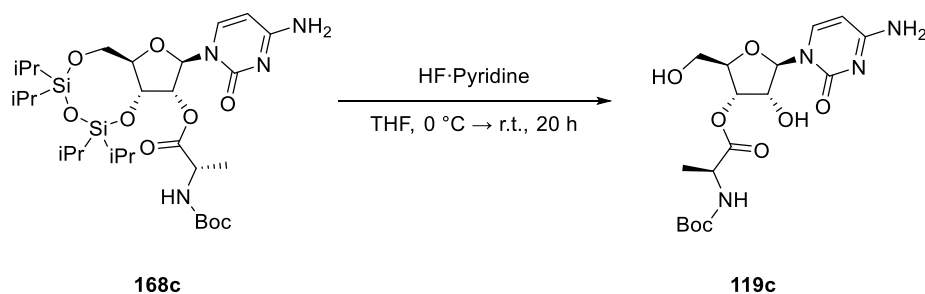
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{18}H_{27}N_6O_8^+$ [M+H] $^+$: 455.1885; found: 455.1887.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.96 (s, 1H, H¹), 5.69 (dd, J = 6.7, 4.9 Hz, 1H, H²), 5.21 (dd, J = 5.3, 2.0 Hz, 1H, H³), 4.71 (q, J = 6.3 Hz, 1H, H⁴), 4.14 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H⁵), 3.99 (q, J = 2.6, 1.9 Hz, 1H, H⁶), 3.70 – 3.47 (m, 2H, H⁷), 1.42 – 1.28 (m, 12H, H⁸, H^{Boc}).

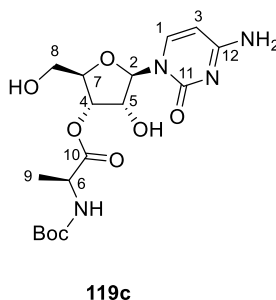
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.3 (C⁹), 156.7 (C¹⁰), 155.3 (C^{Boc-CO}), 153.8 (C¹¹), 151.3 (C¹²), 135.3 (C¹), 116.7 (C¹³), 85.9 (C²), 83.3 (C⁶), 78.3 (C^{Boc-quart.}), 73.8 (C⁴), 72.1 (C³), 61.3 (C⁷), 49.2 (C⁵), 28.2 (2C, C⁸, C^{Boc-CH3}).

R_f: 0.11 (EtOAc/MeOH 98:2).

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(4-amino-2-oxypyrimidin-1(2*H*)-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (tert-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119c**)



2'-*N*-Boc-Alanine-3',5'-TIPDS-cytidine **168c** (96.2 mg, 150 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in THF (1 mL) and cooled to 0 °C. HF-pyridine (70 wt.%; 78.0 μ L, 3.75 mmol, 25.0 equiv.) was added to the suspension and the reaction was stirred overnight at r.t. until MS analysis confirmed full conversion. After quenching with TMS-OMe (1 mL), the residue was purified *via* flash column chromatography (THF/DCM 50:50 \rightarrow THF/DCM 90:10) to obtain 3'-*N*-Boc-alanine-cytidine **119c** (54.0 mg, 120 μ mol, 80 %) as colourless solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{17}H_{27}N_4O_8^+$ $[M+H]^+$: 415.1823; found: 415.1828.

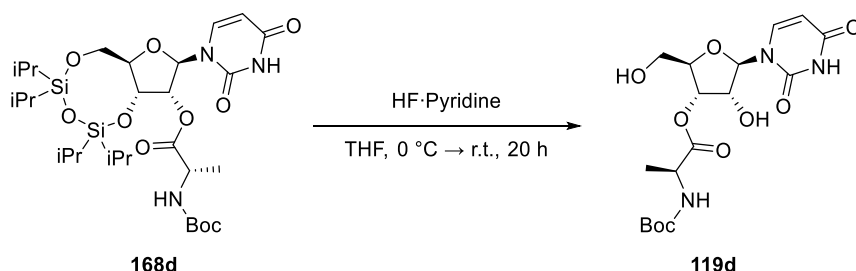
1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.68 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H¹), 5.79 (d, J = 6.6 Hz, 1H, H²), 5.62 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 1H, H³), 5.05 – 4.91 (m, 1H, H⁴), 4.11 (p, J = 6.3 Hz, 1H, H⁵), 3.98 (h, J = 7.5 Hz, 1H, H⁶), 3.82 (q, J = 3.1 Hz, 1H, H⁷), 3.54 – 3.38 (m, 2H, H⁸), 1.26 (s, 9H, H^{Boc}) 1.17 (dd, J = 7.5, 3.5 Hz, 3H, H⁹).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.4 (C¹⁰), 165.5 (C¹¹), 155.4 (C¹²), 141.3 (C¹), 139.2 (C^{Boc-CO}), 94.5 (C³), 88.2 (C²), 82.3 (C⁷), 78.3 (C^{quart}), 73.2 (C⁴), 72.1 (C⁵), 61.0 (C⁸), 49.3 (C⁶), 28.2 (C^{Boc-CH3}), 17.2 (C⁹).

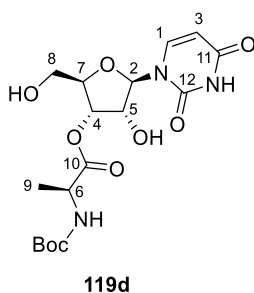
R_f: 0.29 (EtOAc 100 %).

Experimental

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119d**)



2'-*N*-Boc-Alanine-3',5'-TIPDS-Uridine **168d** (99.0 mg, 150 μ mol, 1.00 equiv.) was suspended in THF (1 mL) and cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 78.0 μ L, 3.75 mmol, 25.0 equiv.) was added to the suspension and stirred overnight until TLC analysis indicated full conversion. After quenching of the excess fluoride with TMS-OMe (1 mL), the product was purified *via* flash column chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 85:15) to yield 2'-*N*-Boc-alanine-uridine **119d** (46.1 mg, 111 μ mol, 73 %) as colourless solid. The product contained minor impurities after purification indicated by ^1H -NMR.



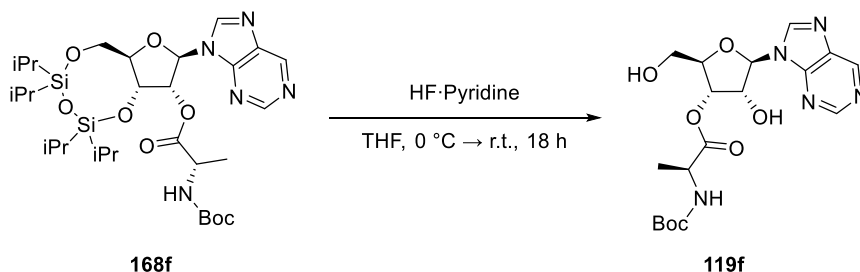
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_9^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 438.1483; found: 438.1488.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.88 (dd, J = 17.5, 8.1 Hz, 1H, H^1), 5.88 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H^2), 5.75 – 5.62 (m, 1H, H^3), 5.24 – 5.07 (m, 1H, H^4), 4.34 – 4.20 (m, 1H, H^5), 4.08 (dp, J = 14.5, 7.3 Hz, 1H, H^6), 3.94 (q, J = 2.7 Hz, 1H, H^7), 3.63 – 3.52 (m, 2H, H^8), 1.39 (s, 9H, H^{Boc}) 1.27 (d, J = 8.1 Hz, 3H, H^9).

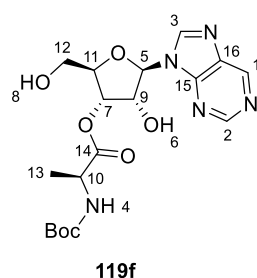
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.4 (C^{10}), 163.0 (C^{11}), 155.4 ($\text{C}^{\text{Boc-CO}}$), 150.9 (C^{12}), 140.7 (C^1), 102.5 (C^3), 86.7 (C^2), 83.1 (C^7), 78.3 ($\text{C}^{\text{Boc-quart}}$), 73.5 (C^4), 71.8 (C^5), 61.1 (C^8), 49.4 (C^6), 28.2 ($\text{C}^{\text{Boc-CH}_3}$), 17.0 (C^9).

R_f 0.41 (EtOAc 100 %).

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-(9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-yl
(*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119f**)



168f (150 mg, 225 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in THF (1 mL). The reaction was cooled to 0 °C and HF-pyridine (70 wt.%; 0.053 mL, 2.03 mmol, 9.00 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm up to r.t. and stirred for 18 h before it was quenched with MeO-TMS (1 mL). It was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 98:2) yielding compound **119f** as white foam (98.2 mg, 221 μ mol, 98 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{18}H_{26}N_5O_7^+$ $[M+H]^+$: 424.1827; found: 424.1828.

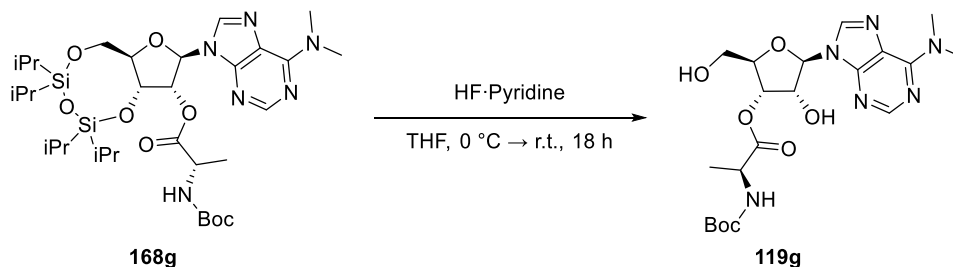
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.23 (s, 1H, H^1), 8.99 (s, 1H, H^2), 8.88 (s, 1H, H^3), 7.35 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H^4), 6.10 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H^5), 5.83 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H^6), 5.31 (dd, $J = 5.5$, 2.2 Hz, 2H, $H^{7,8}$), 4.96 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H^9), 4.17 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, H^{10}), 4.12 – 4.08 (m, 1H, H^{11}), 3.74 – 3.57 (m, 2H, H^{12}), 1.41 (s, 6H, H^{Boc}), 1.33 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H^{13}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.3 (C^{14}), 155.3 ($C^{\text{Boc-CO}}$), 152.3 (C^2), 151.1 (C^{15}), 148.4 (C^1), 145.2 (C^3), 134.1 (C^{16}), 86.8 (C^5), 83.7 (C^{11}), 78.3 ($C^{\text{Boc-quart}}$), 73.6 (C^7), 72.1 (C^9), 61.2 (C^{12}), 49.3 (C^{10}), 28.1 ($C^{\text{Boc-CH}_3}$), 17.1 (C^{13}).

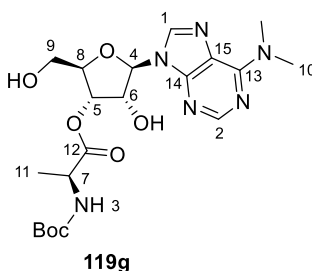
R_f: 0.20 (EtOAc/MeOH 98:2).

Experimental

(2R,3S,4R,5R)-5-(6-(dimethylamino)-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119g**)



168g (150 mg, 212 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (1 mL). The reaction was cooled to 0 $^{\circ}\text{C}$ followed by the addition of HF·pyridine (70 wt.%; 50.0 μL , 1.90 mmol, 9.00 equiv.). The reaction was allowed to warm to r.t. overnight. HF·pyridine (25.0 μL , 950 μmol , 4.50 equiv.) was added again and the reaction was further stirred for 5 h at r.t. The reaction was quenched with MeO-TMS (1 mL) followed by additional 30 min of stirring. Concentration of the reaction *in vacuo* and purification by flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 90:10) yielded compound **119g** as white foam (54.0 mg, 116 μmol , 55 %).



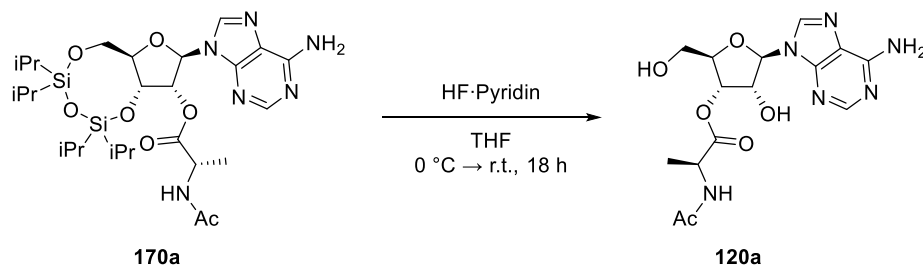
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 467.2249; found: 467.2253.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.43 (s, 1H, H^1), 8.24 (s, 1H, H^2), 7.35 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H^3), 5.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H^4), 5.26 (dd, $J = 5.3, 2.0$ Hz, 1H, H^5), 4.88 (dd, $J = 7.3, 5.3$ Hz, 1H, H^6), 4.15 (p, $J = 7.3$ Hz, 1H, H^7), 4.06 (q, $J = 3.1$ Hz, 1H, H^8), 3.64 (ddd, $J = 35.7, 12.3, 3.6$ Hz, 2H, H^9), 3.55 – 3.22 (m, 6H, H^{10}), 1.40 (s, 9H, H^{Boc}), 1.31 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H, H^{11}).

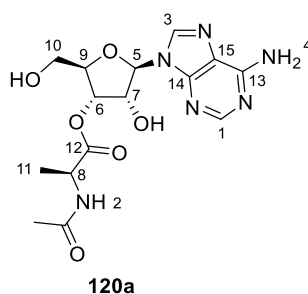
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.3 (C^{12}), 155.4 ($\text{C}^{\text{Boc-CO}}$), 154.0 (C^{13}), 151.4 (C^2), 149.9 (C^{14}), 138.6 (C^1), 119.7 (C^{15}), 87.2 (C^4), 83.7 (C^8), 78.3 ($\text{C}^{\text{Boc-quart}}$), 73.8 (C^5), 71.9 (C^6), 61.5 (C^9), 49.3 (C^7), 28.2 ($\text{C}^{\text{Boc-CH}_3}$), 17.2 (C^{11}).

R_f: 0.57 (EtOAc).

(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetyl-L-alaninate (**120a**)



Silyl-Ac-Ala-Adenosine **170a** (249 mg, 400 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (2.4 mL) and the solution was cooled to 0 $^{\circ}\text{C}$. HF·pyridine (70 wt.%; 250 μL , 8.00 mmol, 20.0 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm to room temperature and was stirred overnight. Excess fluoride was quenched *via* addition of TMS-OMe (3.0 mL) and further stirring for 30 min. Purification by column chromatography (EtOAc/MeOH 95:5) yielded **120a** (106 mg, 280 μmol , 70 %) as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 381.1517; found: 381.1517.

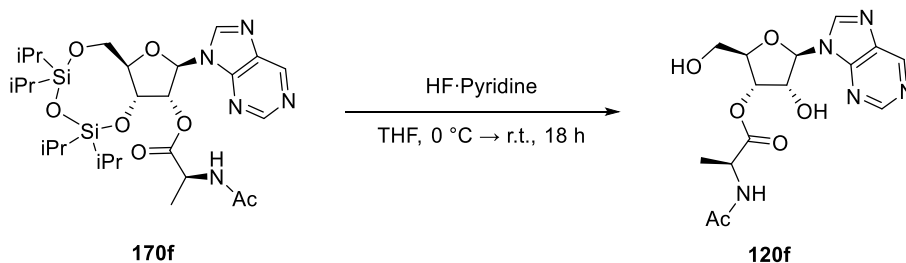
^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, H^1), 8.37 (s, 1H, H^2), 8.16 (s, 1H, H^3), 7.43 (s, 2H, H^4), 5.91 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H^5), 5.28 (dd, $J = 5.3, 1.9$ Hz, 1H, H^6), 4.92 (td, $J = 6.9, 5.3$ Hz, 1H, H^7), 4.41 (p, $J = 7.3$ Hz, 1H, H^8), 4.10 (td, $J = 3.3, 1.8$ Hz, 1H, H^9), 3.78 – 3.55 (m, 2H, H^{10}), 1.88 (s, 3H, $\text{H}^{\text{Ac-CH}_3}$), 1.35 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H^{11}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.0 (C^{12}), 169.4 ($\text{C}^{\text{Ac-CO}}$), 156.3 (C^{13}), 152.6 (C^3), 149.2 (C^{14}), 139.9 (C^1), 119.4 (C^{15}), 87.6 (C^5), 83.7 (C^9), 74.1 (C^6), 71.8 (C^7), 61.7 (C^{10}), 47.8 (C^8), 22.4 ($\text{C}^{\text{Ac-CH}_3}$), 17.3 (C^{11}).

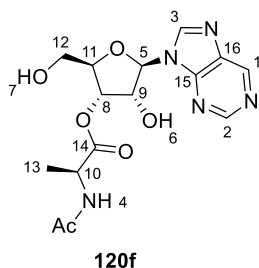
R_f : 0.16 (EtOAc/MeOH 95:5).

Experimental

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-(9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-yl acetyl-L-alaninate (**120f**)



170f (271 mg, 445 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (2.7 mL). The reaction was cooled down to 0 $^{\circ}\text{C}$ and HF·pyridine (230 μL , 8.91 mmol, 20.0 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm up to r.t. and stirred for 18 h. The reaction was quenched with MeO-TMS (3 mL) and all volatiles were removed under reduced pressure. Purification using column chromatography (EtOAc/MeOH 98:2) yielded compound **120f** as white foam (154 mg, 418 μmol , 94 %).



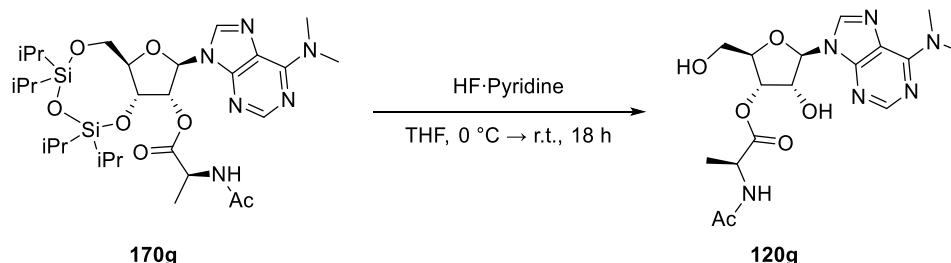
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_6^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 366.1408; found: 366.1410.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.24 (s, 1H, H¹), 8.99 (s, 1H, H²), 8.89 (s, 1H, H³), 8.37 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H⁴), 6.08 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H⁵), 5.84 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H⁶), 5.32 (td, J = 5.1, 2.3 Hz, 2H, H^{7,8}), 4.98 (dq, J = 11.7, 5.7 Hz, 1H, H⁹), 4.47 – 4.32 (m, 1H, H¹⁰), 4.12 (q, J = 3.7 Hz, 2H, H¹¹), 3.78 – 3.66 (m, 1H, H^{12a}), 3.61 (dq, J = 12.3, 6.2 Hz, 1H, H^{12b}), 1.90 – 1.86 (m, 4H, H^{Ac}), 1.36 (d, J = 7.3 Hz, 3H, H¹³).

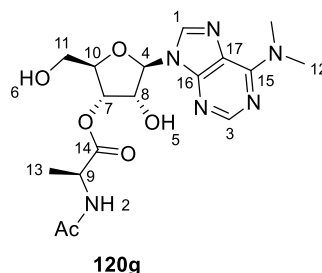
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 171.9 (C¹⁴), 169.3 (C^{Ac-CO}), 152.3 (C²), 151.1 (C¹⁵), 148.5 (C¹), 145.3 (C³), 134.2 (C¹⁶), 87.0 (C⁵), 83.6 (C¹¹), 73.6 (C⁸), 72.1 (C⁹), 61.2 (C¹²), 47.8 (C¹⁰), 22.3 (C^{Ac-CH3}), 17.3 (C¹³).

R_f: 0.07 (EtOAc/MeOH 98:2).

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-(dimethylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetyl-L-alaninate (**120g**)



170g (231 mg, 355 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (2.1 mL). The reaction was cooled to 0 °C. HF·pyridine (180 μL , 7.11 mmol, 20.0 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm to r.t. and stirred for 18 h. The reaction was quenched with MeO-TMS (3 mL). The reaction was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (EtOAc/MeOH 98:2) to give compound **120g** as white foam (142 mg, 348 μmol , 98 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 409.1830; found: 409.1831.

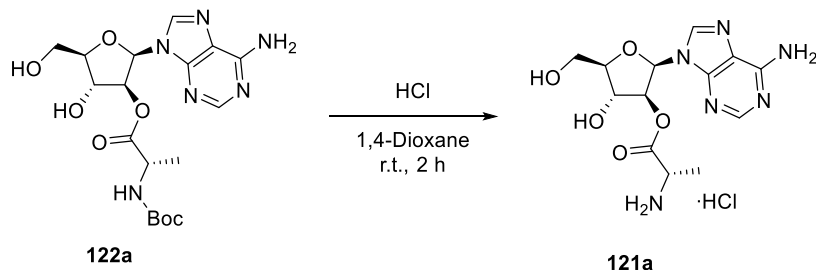
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.40 (s, 1H, H^1), 8.35 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H^2), 8.23 (s, 1H, H^3), 5.93 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H^4), 5.75 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, H^5), 5.62 (dd, $J = 7.4, 4.7$ Hz, 1H, H^6), 5.31 – 5.23 (m, 1H, H^7), 4.91 (p, $J = 5.9$ Hz, 1H, H^8), 4.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H^9), 4.09 (q, $J = 2.9$ Hz, 1H, H^{10}), 3.74 – 3.52 (m, 2H, H^{11}), 3.47 (s, 6H, H^{12}), 1.88 (s, 3H, H^{Ac}), 1.35 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H^{13}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.0 (C^{14}), 169.3 ($\text{C}^{\text{Ac-CO}}$), 154.4 (C^{15}), 151.8 (C^3), 150.0 (C^{16}), 138.6 (C^1), 119.8 (C^{17}), 87.4 (C^4), 83.6 (C^{10}), 73.9 (C^7), 71.7 (C^8), 61.5 (C^{11}), 47.7 (C^9), 22.3 ($\text{C}^{\text{Ac-CH}_3}$), 17.3 (C^{13}).

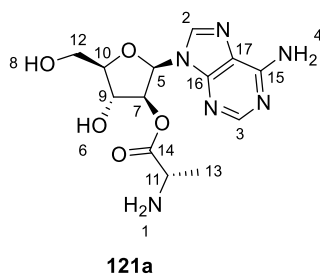
R_f: 0.07 (EtOAc/MeOH 98:2).

Experimental

(2R,3S,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate hydrochloride (**121a**)



122 (65.7 mg, 0.150 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in 1,4-dioxane (1 mL) and HCl in 1,4-dioxane (4 M; 0.375 mL, 0.740 mmol, 5.00 equiv.) was added. The reaction was stirred for 2 h, filtered and washed with MeOH. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (18-C, H₂O/ACN 95:5) to give compound **121** as white foam (30.6 mg, 0.093 mmol, 62 %).



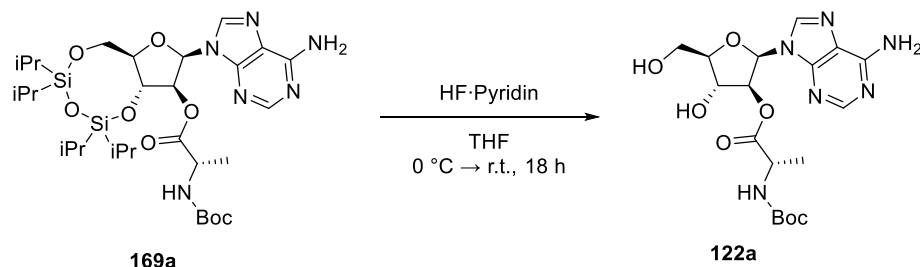
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₈H₂₇N₆O₇⁺ [M+H]⁺: 339.1411; found: 339.1413.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.40 (s, 2H, H¹), 8.32 (s, 1H, H²), 8.13 (s, 1H, H³), 7.37 (s, 2H, H⁴), 6.48 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H⁵), 6.00 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H⁶), 5.46 (dd, J = 6.3, 6.3 Hz, 1H, H⁷), 5.16 (s, 1H, H⁸), 4.58 (q, J = 6.4 Hz, 1H, H⁹), 3.98 – 3.85 (m, 2H, H^{10,11}), 3.74 (dd, J = 12.2, 3.3 Hz, 1H, H^{12a}), 3.66 (dd, J = 12.2, 4.9 Hz, 1H, H^{12b}), 0.64 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H¹³).

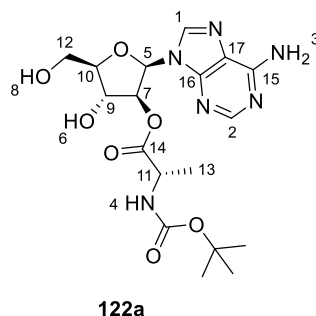
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.3 (C¹⁴), 155.9 (C¹⁵), 152.7 (C³), 149.1 (C¹⁶), 139.8 (C²), 118.4 (C¹⁷), 82.6 (C¹⁰), 80.5 (C⁵), 78.7 (C⁷), 71.3 (C⁹), 60.2 (C¹²), 47.5 (C¹¹), 14.4 (C¹³).

R_f 0.01 (DCM/MeOH 9:1).

(2R,3S,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (tert-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**122a**)



Compound **169a** (86.2 mg, 0.127 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (0.75 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 0.030 mL, 1.14 mmol, 9.00 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred for 72 h until TLC confirmed full conversion. Excess fluoride was quenched by adding TMS-OMe (150 μ L) and stirring for an additional 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (H₂O/ACN 95:5 \rightarrow ACN 100 %). Compound **122a** (54.9 mg, 125 μ mol, 99 %) was obtained as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₈H₂₇N₆O₇⁺ [M+H]⁺: 439.1936; found: 439.1939.

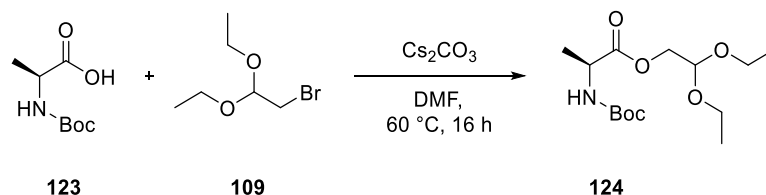
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H¹), 8.11 (s, 1H, H²), 7.30 (s, 1H, H³), 7.17 (d, J = 7.3, 1H, H⁴), 6.45 (d, J = 6.1, 1H, H⁵), 5.90 (s, 1H, H⁶), 5.28 (t, J = 6.4, 1H, H⁷), 5.08 (t, J = 5.6, 1H, H⁸), 4.56 (t, J = 6.8, 1H, H⁹), 3.87 – 3.77 (m, 1H, H^{10,11}), 3.75 – 3.62 (m, 1H, H¹²), 0.45 (d, J = 7.3, 3H, H¹³).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.2 (C¹⁴), 156.0 (C¹⁵), 155.2 (C^{Boc-CO}), 152.7 (C²), 149.1 (C¹⁶), 139.9 (C¹), 118.4 (C¹⁷), 82.6 (C¹¹), 80.7 (C⁵), 78.2 (C⁷), 78.0 (C^{Boc-quart}), 71.4 (C⁹), 60.5 (C¹⁰), 48.4 (C¹³), 28.2 (C^{Boc-CH₃}), 15.3 (C¹²).

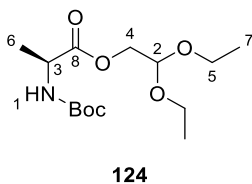
R_f: 0.30 (DCM/MeOH 9:1).

Experimental

2,2-Diethoxyethyl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**124**):



N-Boc-Alanin **123** (5.68 g, 30.0 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in EtOH (40 mL) and an aqueous 0.5 M Cs₂CO₃ solution was used to adjust the pH-value to 7. The solvent was removed *in vacuo* using DMF for coevaporation. The residue was suspended in DMF (40 mL) and bromide **109** (9.03 mL, 60.0 mmol, 2.0 equiv.) was added, before the reaction was heated at 60 °C overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc. The organic phase was washed with an aqueous sat. NaHCO₃ solution and reextracted using EtOAc. The combined organic layers were washed with an aqueous sat. NaCl solution and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and purification via column chromatography (cHex/EtOAc 9:1) yielded alanine-acetal **124** (5.00 g, 16.5 mmol, 55 %) as a clear liquid.

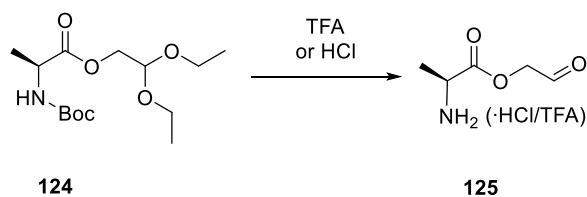


HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₄H₂₈NO₆⁺ [M+H]⁺: 306.1911; found: 306.1913.

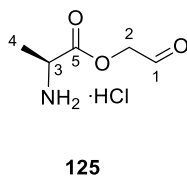
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.30 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H¹), 4.63 (t, J = 5.4 Hz, 1H, H²), 4.10 – 3.88 (m, 3H, H^{3,4}), 3.61 (dq, J = 8.9, 7.0, 1.9 Hz, 2H, H^{5a}), 3.50 (dq, J = 9.6, 7.1 Hz, 2H, H^{5b}), 1.37 (s, 9H, H^{Boc}), 1.23 (d, J = 7.3 Hz, 3H, H⁶), 1.11 (td, J = 7.0, 1.4 Hz, 6H, H⁷).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.9 (C^{Boc-CO}), 155.2 (C⁸), 99.0 (C²), 78.1 (C<sup>Boc-
quart.</sup>), 63.7 (C⁴), 62.0 (C⁵), 48.9 (C³), 16.8 (C⁶).

R_f: 0.57 (cHex/EtOAc 7:3).

2-oxoethyl L-alaninate (**125**) as HCl or TFA salt

To 2,2-diethoxyethyl-boc-L-alaninate (**124**, 30.5 mg, 0.10 mmol) was added conc. HCl (12 M, 0.25 mL) or TFA (20 equiv.) and the mixture was stirred at r.t. for 2 h until mass spectrometry indicated full conversion. The solution concentrated *in vacuo* to receive 2-oxoethyl L-alaninate hydrochloride (**125**, 16.5 mg, 0.10 mmol, quant.) as a colourless very viscous resin.



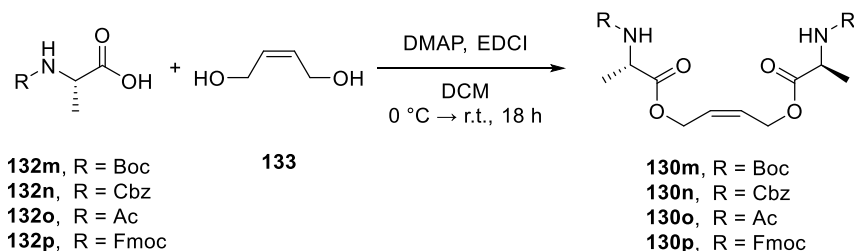
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₅H₁₀NO₃⁺ [M+H]⁺: 132.0655; found: 132.0651.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.54 (s, 1H, H¹), 5.05 – 4.91 (m, 2H, H²), 4.17 (pd, J = 5.5, 2.8 Hz, 1H, H³), 1.49 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H⁴).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 196.5 (C¹), 169.7 (C⁵), 69.8 (C²), 47.7 (C³), 15.9 (C⁴).

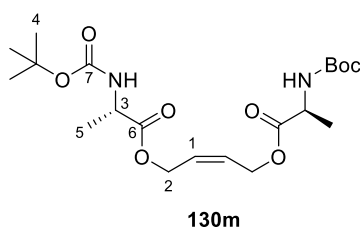
Experimental

Protected (Z)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130m-p**)



Boc-, Cbz-, acetyl- or Fmoc-protected L-alanine (17.2 mmol, 3.44 equiv., 1.0 equiv.) was suspended in DCM (50 mL) and DMAP (183 mg, 1.50 mmol, 0.3 equiv.) and diol (411 μ L, 5.00 mmol, 1.0 equiv.) were added. The mixture was then cooled to 0 °C and EDCI (3.35 g, 17.5 mmol, 3.5 equiv.) was added. The now clear solution was stirred and warmed to r.t. overnight. Water (30 mL) was added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted with DCM (3 \times 30 mL) and the combined organic phases were washed with sat. aqueous NaCl solution. They were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography to receive the corresponding protected (Z)-But-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate).

Boc-(Z)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130m**):



Yield: 2.15 g, 5.00 mmol, quant..

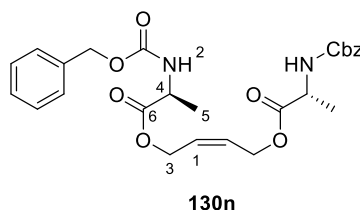
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₀H₃₅N₂O₈⁺ [M+H]⁺: 431.2388; found: 431.2387.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.33 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H^{NH}), 5.67 (t, J = 4.2 Hz, 2H, H¹), 4.75 – 4.59 (m, 4H, H²), 4.01 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H³), 1.37 (s, 18H, H⁴), 1.22 (d, J = 7.3 Hz, 6H, H⁵).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.0 (C⁶), 155.3 (C⁷), 128.0 (C¹), 78.2 – 49.0 (C^{2,3,8}), 28.2 (C⁴), 16.8 (C⁵).

R_f: 0.52 (cHex/EtOAc 2:1).

Cbz-(*Z*)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130n**):



Yield: 2.49 g, 5.00 mmol, quant..

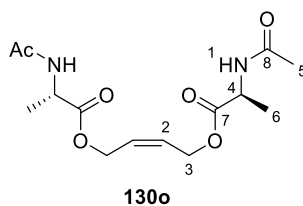
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{26}H_{31}N_2O_8^+$ $[M+H]^+$: 499.2075; found: 499.2078.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39 – 7.28 (m, 10H, H^{Cbz-Ar}), 5.75 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H¹), 5.34 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H²), 5.10 (d, J = 2.9 Hz, 4H, H^{Cbz-CH₂}), 4.77 – 4.71 (m, 4H, H³), 4.39 (p, J = 7.3 Hz, 2H, H⁴), 1.41 (d, J = 7.2 Hz, 6H, H⁵).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.8 (C⁶), 155.7 (C^{Cbz-CO}), 136.3 (C^{Cbz-Ar-quart}), 128.7 – 128.1 (5C, C^{1,Cbz-Ar}), 67.1 (C^{Cbz-CH₂}), 60.6 (C³), 49.7 (C⁴), 18.7 (C⁵).

R_f: 0.31 (cHex/EtOAc 6:1).

Ac-(*Z*)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130o**):



Yield: 1.35 g, 4.30 mmol, 86 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{14}H_{23}N_2O_6^+$ $[M+H]^+$: 315.1551; found: 315.1552.

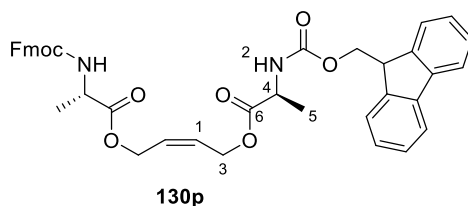
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.17 (s, 1H, H¹), 5.76 (ddt, J = 5.4, 4.0, 1.4 Hz, 1H, H²), 4.74 (dq, J = 3.8, 1.1 Hz, 2H, H³), 4.58 (pd, J = 7.2, 1.1 Hz, 1H, H⁴), 2.01 (d, J = 1.2 Hz, 3H, H⁵), 1.39 (dd, J = 7.3, 0.8 Hz, 3H, H⁶).

Experimental

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 173.0 (C^7), 169.8 (C^8), 128.1 (C^2), 60.9 (C^3), 48.2 (C^4), 23.2 (C^5), 18.5 (C^6).

R_f : 0.4 (EtOAc/MeOH 95:5).

Fmoc-(*Z*)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130p**):



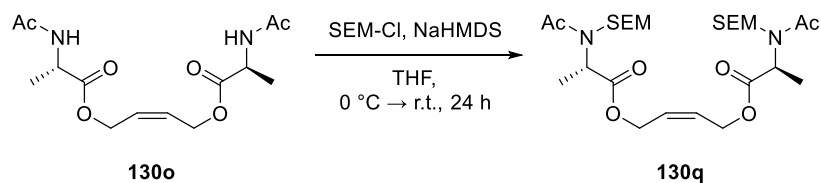
Yield: 533 mg, 800 μmol , 16 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_8^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 675.2701; found: 675.2699.

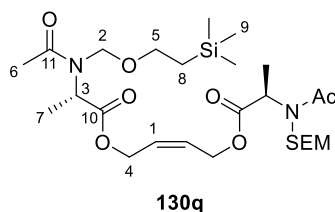
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.76 – 7.31 (m, 16H, $\text{H}^{\text{Fmoc-Ar}}$), 5.77 (t, J = 4.4 Hz, 2H, H^1), 5.38 – 5.28 (m, 2H, H^2), 4.77 (d, J = 4.5 Hz, 4H, H^3), 4.46 – 4.32 (m, 6H, $\text{H}^{4,\text{Fmoc-CH}_2}$), 4.22 (t, J = 7.0 Hz, 2H, $\text{H}^{\text{Fmoc-CH}}$), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H^5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.8 (C^6), 155.7 ($\text{C}^{\text{Fmoc-CO}}$), 143.9 – 141.3 (4C, $\text{C}^{\text{Fmoc-Ar-quart}}$), 128.0 – 120.0 (16C, $\text{C}^{\text{Fmoc-Ar-CH}}$), 67.0 ($\text{C}^{\text{Fmoc-CH}_2}$), 60.8 (C^3), 49.6 (C^4), 47.1 ($\text{C}^{\text{Fmoc-CH}}$), 18.6 (C^5).

R_f : 0.50 (cHex/EtOAc 1:1).

Ac-SEM-(Z)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130q**)

Acetyl protected diester **130o** (4.11 g, 52.3 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry THF (10 mL) and NaHMDS (0.6 M, 87.2 mL) was added dropwise at 0 °C. SEM chloride (587 μ L, 3.32 mmol, 2.5 equiv.) was added and the mixture was allowed to warm to r.t. After stirring for 3 d TLC indicated some conversion of the reactant and the volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified via column chromatography (cHex/EtOAc 2:1 \rightarrow EtOAc/MeOH 98:2) to obtain the bis-protected product **130q** (2.18 g, 3.79 mmol, 29 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{26}H_{50}N_2NaO_8Si_2^+$ $[M+Na]^+$: 597.2998; found: 467.3000.

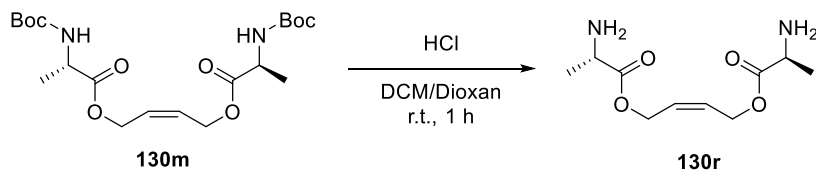
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.12 (dddd, J = 11.8, 10.5, 5.4, 4.0 Hz, 2H, H^1), 4.70 – 4.59 (m, 4H, H^2), 4.21 (p, J = 7.3 Hz, 1H, H^3), 4.10 (dd, J = 6.3, 1.5 Hz, 2H, H^4), 3.55 (m, 2H, H^5), 1.82 (s, 3H, H^6), 1.24 (d, J = 7.3 Hz, 3H, H^7), 0.88 (dd, J = 8.8, 7.5 Hz, 2H, H^8), 0.00 (s, 9H, H^9).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.6 (C^{10}), 169.2 (C^{11}), 130.7 (C^1), 64.4 (C^2), 62.5 (C^5), 60.3 (C^4), 47.6 (C^3), 22.2 (C^6), 17.6 (C^8), 16.9 (C^7), -1.3 (C^9).

R_f: 0.90 (EtOAc 100 %).

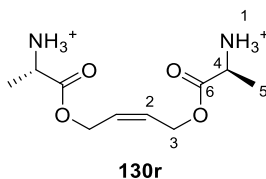
Experimental

(Z)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130r**)



Boc-(Z)-But-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130m**, 5.00 g, 11.61 mmol) was dissolved in DCM (70 mL) and HCl in 1,4-dioxane (4 M, 11.6 mL) was added. The mixture was stirred for 1 h and the resulting suspension was filtered. The filter cake was washed with Et₂O and the residue was dried under high vacuum.

If necessary to transfer the hydrochloride into the free base, the solid was treated with sat. aqueous NaHCO₃ solution, which was then extracted with EtOAc. The organic phase was then dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. **130r** was obtained as a yellowish oil (quant.).

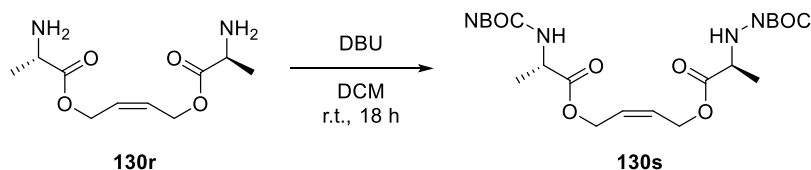


HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₀H₁₉N₂O₄⁺ [M+H]⁺: 231.1339; found: 231.1343.

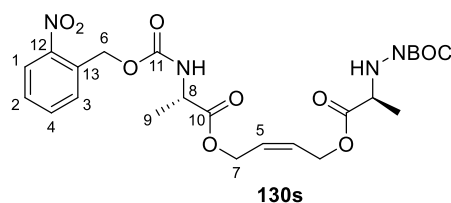
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.73 (s, 6H, H¹), 5.81 – 5.69 (m, 2H, H²), 4.87 – 4.75 (m, 4H, H³), 4.06 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H⁴), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 6H, H⁵).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 169.8 (C⁶), 127.9 (C²), 61.3 (C³), 47.8 (C⁴), 15.7 (C⁵).

NBOC-(Z)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130s**)



Compound **130r** (1.60 g, 5.28 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DCM (40 mL) and DBU (3.94 mL, 26.4 mmol, 5.0 equiv.) was added dropwise. NBOC-Im (3.26 g, 13.2 mmol, 2.5 equiv.) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. When TLC indicated full conversion the volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified *via* column chromatography (Pent/EtOAc 4:1 → Pent/EtOAc 6:5) to obtain **130s** (1.15 g, 1.95 mmol, 37 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{26}H_{29}N_4O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 589.1776; found: 589.1778.

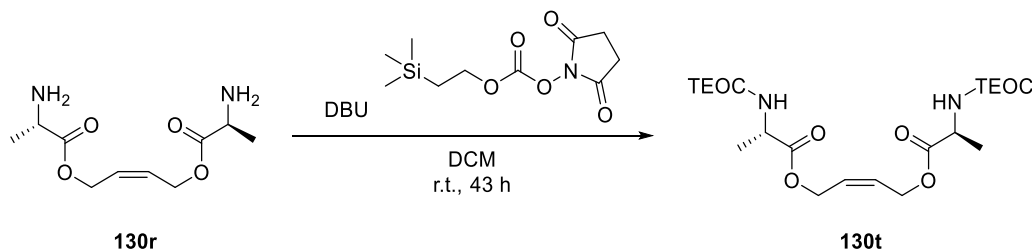
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.12 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1H, H^1), 7.99 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H^{NH}), 7.80 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, H^2), 7.66 (dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H, H^3), 7.64 – 7.57 (m, 1H, H^4), 5.66 (dd, $J = 4.8, 3.6$ Hz, 1H, H^5), 5.38 (s, 2H, H^6), 4.68 (dt, $J = 3.7, 2.0$ Hz, 2H, H^7), 4.11 (p, $J = 7.3$ Hz, 1H, H^8), 1.29 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H^9).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.6 (C^{10}), 155.5 (C^{11}), 137.3 (C^{12}), 147.1 (C^{13}), 134.2 – 124.9 (5C, C^{1-5}), 62.3 (C^7), 60.4 (C^6), 49.4 (C^8), 16.9 (C^9).

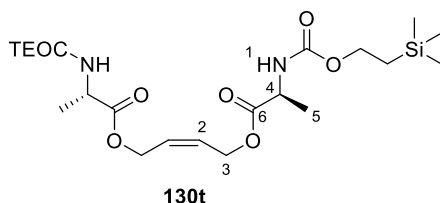
R_f : 0.50 (Pent/EtOAc 1:1).

Experimental

TEOC-(*Z*)-but-2-ene-1,4-diyl (2*S*,2'*S*)-bis(2-aminopropanoate) (**130t**)



Compound **130r** (485 mg, 1.60 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DCM (15 mL) and DBU (1.19 mL, 8.00 mmol, 5.0 equiv.) was added dropwise. TEOC-OSu (1.04 g, 4.00 mmol, 2.5 equiv.) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. When TLC indicated full conversion the volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified *via* column chromatography (Pent/EtOAc 4:1 → Pent/EtOAc 6:5) to obtain **130t** (137 mg, 272 μ mol, 17 %).

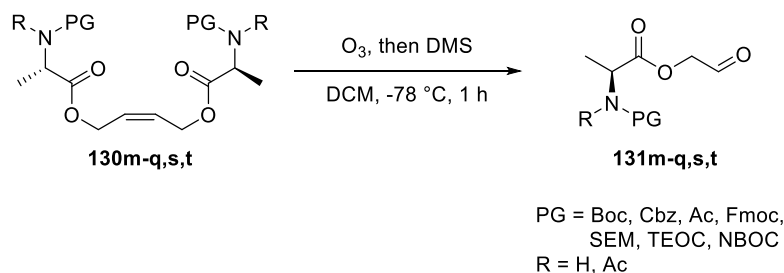


HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{22}H_{42}N_2NaO_8Si_2^+$ [$M+Na$] $^+$: 541.2372; found: 541.2378.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.54 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H^1), 6.31 – 5.49 (m, 2H, H^2), 4.67 (dt, J = 4.2, 2.0 Hz, 4H, H^3), 4.12 – 3.96 (m, 6H, H^4 , $H^{TEOC-CH_2}$), 1.25 (d, J = 7.3 Hz, 3H, H^5), 0.98 – 0.84 (m, 4H, $H^{TEOC-CH_2}$), 0.02 (s, 9H, $H^{TEOC-CH_3}$).

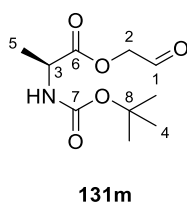
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.8 (C^6), 156.1 ($C^{TEOC-CO}$), 128.0 (C^2), 61.9 ($C^{TEOC-CH_2}$), 60.2 (C^3), 49.2 (C^4), 17.4 ($C^{TEOC-CH_2}$), 16.9 (C^5).

R_f 0.66 (cHex/EtOAc 1:1).

Protected 2-oxoethyl L-alaninate (**131m-q,s,t**)

Olefines **130m-Boc** (120 mg, 281 μmol), **130n-Cbz** (244 mg, 489 μmol), **130o-Ac** (100 mg, 323 μmol), **130p-Fmoc** (400 mg, 593 μmol), **130q-Ac-SEM** (548 mg, 1.23 mmol), **130s-NBOC** (34.0 mg, 489 μmol) and **130t-TEOC** (137 mg, 264 μmol) were dissolved in dry DCM (5 mL/mmol olefin). The solution was cooled to $-78\text{ }^\circ\text{C}$ and dried oxygen (passed through columns of both orange gel and P_4O_{10}) was bubbled through to avoid formation of NO_x during ozonolysis. Then ozone (generated from the same oxygen stream) was bubbled through until the solution turned blue (1 h). The ozone generator was turned off and first oxygen, then nitrogen was bubbled through to remove any excess ozone. Once the solution lost all blue color, DMS (100 $\mu\text{L}/\text{mmol}$ olefin) was added to the solution and the mixture was stirred for another 1 h while warming to room temperature. All volatiles were removed *in vacuo* to obtain the respective N-protected 2-oxoethyl L-alaninates **131m-q,s,t** as light yellow oils.

Boc-2-oxoethyl L-alaninate (**131m**):



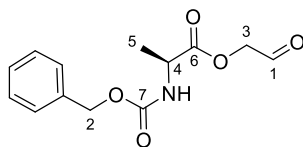
Yield: 97.9 mg, 423 μmol , 76 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 232.1179; found: 232.1181.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, H^1), 7.36 (d, 1H, H^{NH}), 4.89 (m, 2H, H^2), 4.12 (m, 1H, H^3), 1.38 (s, 9H, H^4), 1.30 (d, $J = 7.2$, 3H, H^5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 197.0 (C^1), 172.8 (C^6), 155.2 (C^7), 78.3 (C^8), 67.6 (C^2), 48.8 (C^3), 28.2 (C^4), 17.0 (C^5).

R_f: 0.42 (cHex/EtOAc 1:1).

Cbz-2-oxoethyl L-alaninate (**131n**):

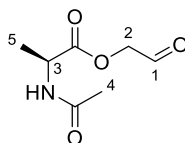
131n

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_5^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 266.1023; found: 266.1053.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, H¹), 7.85 (d, 1H, H^{NH}), 7.35 (m, 5H, H^A), 5.03 (s, 2H, H²), 4.84 (m, 2H, H³), 4.22 (m, 1H, H⁴), 1.35 (d, $J = 7.2$, 3H, H⁵).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 197.0 (C¹), 172.6 (C⁶), 155.9 (C⁷), 136.9 – 127.8 (4C, C^{Ar}), 69.0 (C³), 65.5 (C²), 49.2 (C⁴), 17.1 (C⁵).z

Ac-2-oxoethyl L-alaninate (**131o**):



131o

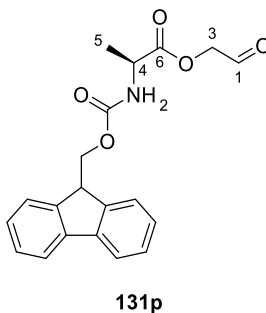
Yield: 94.8 mg, 547 μmol , 43 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_7H_{12}NO_4^+ [M+H]^+$: 174.0761; found: 174.077.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, H¹), 4.82 (m, 2H, H²), 4.32 (m, 1H, H³), 2.09 (s, 3H, H⁴), 1.46 (d, *J* = 7.2, 3H, H⁵).

R_f: 0.20 (EtOAc 100 %).

Fmoc-2-oxoethyl L-alaninate (**131p**):



Yield: 96.4 mg, 173 μmol , 46 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 354.1336; found: 354.1335.

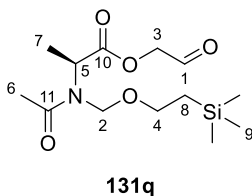
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.60 (s, 1H, H^1), 7.77 – 7.32 (m, 8H, $\text{H}^{\text{Fmoc-Ar}}$), 5.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H^2), 4.82 (d, J = 17.5 Hz, 1H, H^{3a}), 4.70 (d, J = 17.4 Hz, 1H, H^{3b}), 4.52 (p, J = 7.3 Hz, 1H, H^4), 4.40 (q, J = 8.6 Hz, 2H, $\text{H}^{\text{Fmoc-CH}_2}$), 4.23 (t, J = 7.0 Hz, 1H, $\text{H}^{\text{Fmoc-CH}}$), 1.53 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H^5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 194.8 (C^1), 172.7 (C^6), 155.8 ($\text{C}^{\text{Fmoc-CO}}$), 143.9 – 141.4 (4C, $\text{C}^{\text{Fmoc-Ar-quart}}$), 127.9 – 120.1 (8C, $\text{C}^{\text{Fmoc-Ar}}$), 69.2 (C^3), 67.2 ($\text{C}^{\text{Fmoc-CH}_2}$), 49.6 (C^4), 47.2 ($\text{C}^{\text{Fmoc-CH}}$), 18.7 (C^5).

R_f : 0.35 (cHex/EtOAc 1:1).

Experimental

Ac-SEM-2-oxoethyl L-alaninate (**131q**):



Yield: 269 mg, 886 μmol , 36 %.

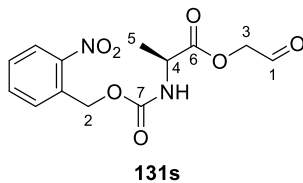
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}_5\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 304.1575; found: 304.1574.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.59 (s, 1H, H^1), 4.97 – 4.85 (m, 2H, H^2), 4.80 – 4.73 (m, 2H, H^3), 4.67 – 4.66 (m, 2H, H^4), 3.56 (m, 1H, H^5), 2.20 (s, 3H, H^6), 1.54 (d, $J = 7.2$, 3H, H^7), 0.94 (m, 2H, H^8), 0.02 (s, 9H, H^9).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 196.0 (C^1), 171.6 (C^{10}), 171.5 (C^{11}), 69.2 (C^2), 65.3 (C^3), 53.4 (C^4), 21.6 (C^5), 18.1 (C^6), 17.5 (C^7), 15.3 (C^8), -1.3 (C^9).

R_f: 0.25 (cHex/EtOAc 1:1).

NBOC-2-oxoethyl L-alaninate (**131s**):



Yield: 26.0 mg, 83.2 μmol , 72 %.

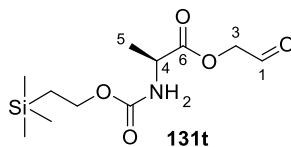
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 311.0874; found: 311.0875.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, H^1), 8.13 – 7.59 (m, 4H, H^{Ar}), 8.1 (d, 1H, H^{NH}), 5.39 (d, 2H, H^2), 4.84 (m, 2H, H^3), 4.22 (m, 1H, H^4), 1.37 (d, $J = 7.2$, 3H, H^5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 197.0 (C^1), 172.4 (C^6), 155.5 (C^7), 147.1 – 124.9 (6C, C^{Ar}), 69.1 (C^3), 62.4 (C^2), 49.2 (C^4), 17.1 (C^5).

R_f: 0.27 (EtOAc 100 %).

TEOC-2-oxoethyl L-alaninate (**131t**):



Yield: 44.4 mg, 161 μmol , 61 %.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NNaO}_5\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 298.1081; found: 298.1082.

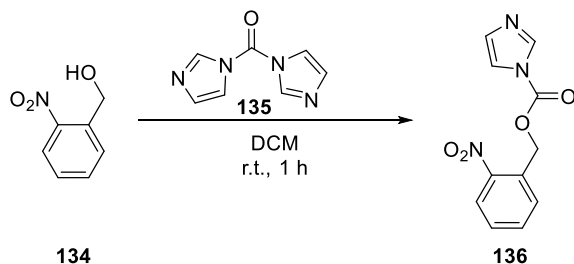
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, H^1), 7.60 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H^2), 4.82 (q, $J = 17.8$ Hz, 2H, H^3), 4.17 (p, $J = 7.4$ Hz, 1H, H^4), 4.08 – 3.96 (m, 2H, $\text{H}^{\text{TEOC-CH}_2}$), 1.33 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H^5), 0.95 – 0.87 (m, 2H, $\text{H}^{\text{TEOC-CH}_2}$), 0.02 (s, 9H, $\text{H}^{\text{TEOC-CH}_3}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 197.0 (C^1), 172.7 (C^6), 156.1 ($\text{C}^{\text{TEOC-CO}}$), 87.3 ($\text{C}^{\text{TEOC-CH}_2}$), 69.0 (C^3), 62.0 ($\text{C}^{\text{TEOC-CH}_2}$), 49.0 (C^4), 17.4 (C^5), -1.4 (3C, $\text{C}^{\text{TEOC-CH}_3}$).

R_f: 0.53 (cHex/EtOAc 1:1).

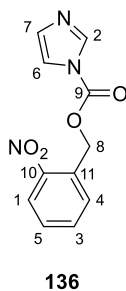
Experimental

2-Nitrobenzyl 1*H*-imidazole-1-carboxylate (**136**)



This reaction was performed according to a modified literature procedure.^[249]

2-Nitrobenzyl alcohol (**134**, 1.26 g, 8.20 mmol, 1.0 equiv.) and CDI (**135**, 2.00 g, 12.3 mmol, 1.5 equiv.) were dissolved in DCM (40 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h until TLC indicated full conversion. The solution was washed with sat. aqueous NaCl solution (40 mL) and then dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the light-brown residue was purified *via* flash column chromatography (Pent/EtOAc 1:1 → Pent/EtOAc 1:3). NBOC-Im **136** was obtained as a white solid (2.01 g, 8.12 mmol, 99 %).



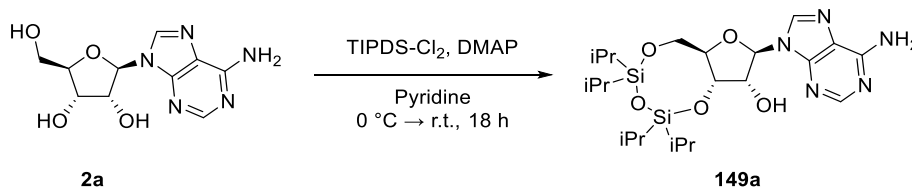
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₁H₁₀N₃O₄⁺ [M+H]⁺: 248.0666; found: 248.0668.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.19 – 8.16 (m, 1H, H¹), 8.18 – 8.17 (m, 1H, H²), 7.71 (td, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H³), 7.65 – 7.61 (m, 1H, H⁴), 7.61 – 7.54 (m, 1H, H⁵), 7.45 (dd, J = 1.7, 1.3 Hz, 1H, H⁶), 7.12 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H⁷), 7.09 (dd, J = 1.7, 0.8 Hz, 1H, H⁸), 5.84 (s, 1H, H⁹).

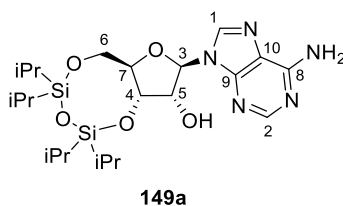
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 148.4 (C⁹), 147.8 (C¹⁰), 137.3 (C²), 131.1 (C⁷), 130.2 (C¹¹), 129.5 (C⁴), 125.6 (C¹), 117.3 (C⁶), 66.4 (C⁸).

R_f: 0.10 (Pent/EtOAc 1:1).

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-ol (149a)



Adenosine (**2a**) (8.02 g, 30.0 mmol, 1.00 equiv.) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP; 1.83 g, 15.0 mmol, 0.50 equiv.) were suspended in dry pyridine (75 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane (TIPDS-Cl₂; 11.5 mL, 36.0 mmol, 1.20 equiv.) was added dropwise and the mixture was slowly warmed to r.t. overnight. Cold water (20 mL) was added, once TLC indicated full conversion (18 h) and all volatiles were removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and the solution was washed with sat. aqueous NaCl solution (50 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ concentrated *in vacuo* and the residue was purified *via* column chromatography (DCM/MeOH 98:2 → DCM/MeOH 94:4) to yield **149a** (12.2 g, 23.9 mmol, 80 %) as a colourless foam.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₄₀N₅NaO₅Si₂⁺ [M+Na]⁺: 510.2562; found: 510.2567.

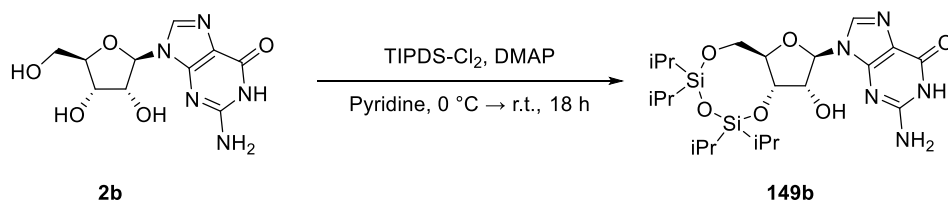
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H¹), 8.07 (s, 1H, H²), 5.87 (s, 1H, H³), 5.64 (s, 1H, H^{OH}), 4.79 (dd, J = 8.5, 5.1 Hz, 1H, H⁴), 4.52 (s, 1H, H⁵), 4.06 (dd, J = 12.7, 3.4 Hz, 1H, H^{6a}), 4.00 (dt, J = 8.6, 3.0 Hz, 1H, H⁷), 3.93 (dd, J = 12.7, 2.7 Hz, 1H, H^{6b}), 1.04 (s, 28H, H^{iPr}).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.6 (C⁸), 153.0 (C²), 149.1 (C⁹), 139.7 (C¹), 119.7 (C¹⁰), 89.8 (C³), 81.2 (C⁷), 74.1 (C⁵), 70.2 (C⁴), 61.2 (C⁶), 17.9 – 12.4 (12C, C^{iPr}).

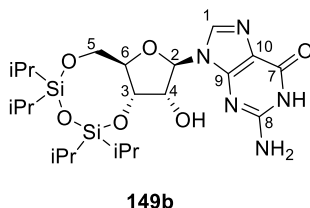
R_f: 0.42 (EtOAc 100 %).

Experimental

2-Amino-9-((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-9-hydroxy-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (149b)



Guanosine (**2b**) (2.83 g, 10.0 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (610 mg, 5.00 mmol, 0.500 equiv.) were dissolved in dry pyridine (25 mL) and cooled to 0 °C. TIPDS-Cl₂ (4.80 mL, 15.0 mmol, 1.50 equiv.) was added dropwise to the mixture and warmed to r.t. overnight. After adding water (10 mL) the solvents were removed *in vacuo* and the product was purified *via* flash column chromatography (H₂O 100 % → ACN 100 %) to yield 3',5'-TIPDS-guanosine **149b** (2.37 g, 4.50 mmol, 45 %) as a colourless foam.



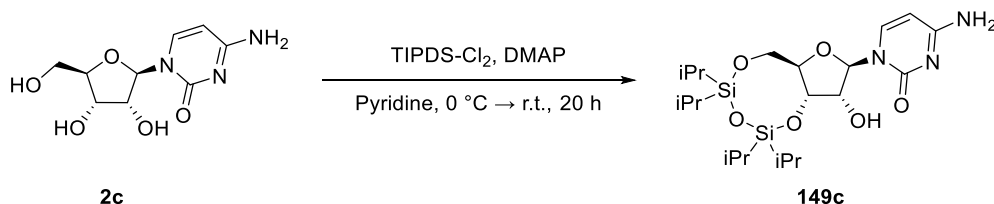
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₄₀N₅O₆Si₂⁺ [M+H]⁺: 526.2512; found: 526.2518.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.75 (s, 1H, H¹), 6.50 (s, 2H, H^{NH2}), 5.67 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H²), 4.34 (dd, J = 8.1, 5.0 Hz, 1H, H³), 4.25 (td, J = 5.1, 1.8 Hz, 1H, H⁴), 4.12 – 3.86 (m, 3H, H^{5,6}), 1.10 – 0.94 (m, 28H, H^{iPr}).

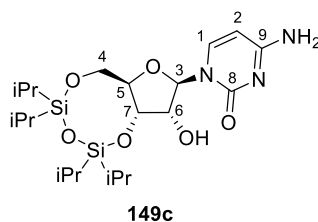
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.7 (C⁷), 153.9 (C⁸), 150.6 (C⁹), 134.1 (C¹), 116.8 (C¹⁰), 87.8 (C²), 81.0 (C⁶), 73.9 (C⁴), 69.6 (C³), 60.7 (C⁵), 17.3 – 12.1 (12C, C^{iPr}).

R_f: 0.19 (EtOAc 100 %).

4-Amino-1-(((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-9-hydroxy-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)pyrimidin-2(1*H*)-one (149c)



Cytidine (**2c**) (2.43 g, 10.0 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (612 mg, 5.00 mmol, 0.500 equiv.) were dissolved in dry pyridine (25 mL) and cooled to 0 °C. TIPDS-Cl₂ (4.80 mL, 15.0 mmol, 1.50 equiv.) was added dropwise to the mixture and the reaction was warmed to r.t. overnight. After adding water (10 mL) the solvents were removed *in vacuo* and the product was purified *via* flash column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to yield 3',5'-TIPDS-cytidine **149c** (4.62 g, 9.53 mmol, 95 %) as colourless foam.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₁H₄₀N₃O₆Si₂⁺ [M+H]⁺: 486.2450; found: 486.2453.

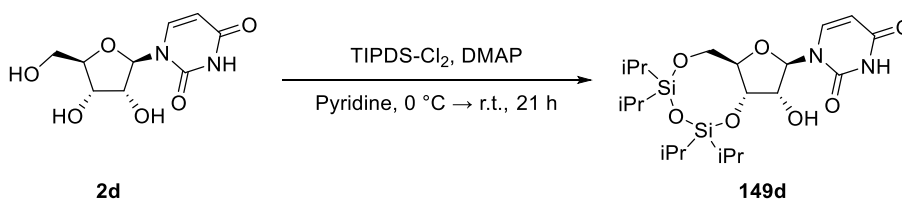
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.71 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H¹), 7.16 (d, J = 22.5 Hz, 2H, H^{NH2}), 5.66 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H²), 5.55 (s, 1H, H³), 4.20 – 4.11 (m, 1H, H⁴), 4.07 (dd, J = 9.1, 4.4 Hz, 1H, H⁵), 4.00 (dt, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H, H⁶), 3.96 – 3.86 (m, 2H, H⁷, H⁴), 1.11 – 0.89 (m, 28H, H^{iPr}).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 165.7 (C⁸), 154.8 (C⁹), 139.9 (C¹), 93.2 (C²), 90.7 (C³), 80.5 (C⁶), 74.1 (C⁷), 68.44 (C⁵), 60.0 (C⁴), 17.5 – 11.8 (12C, C^{iPr}).

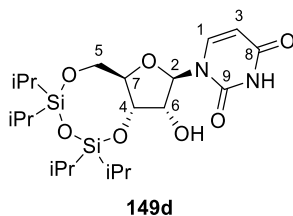
R_f: 0.39 (EtOAc 100 %).

Experimental

1-((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-9-hydroxy-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (**149d**)



Uridine (**2d**) (2.44 g, 10.0 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (610 mg, 5.00 mmol, 0.500 equiv.) were dissolved in dry pyridine (25 mL) and cooled to 0 °C. TIPDS-Cl₂ (4.80 mL, 15.0 mmol, 1.50 equiv.) was added dropwise to the mixture and warmed to r.t. overnight. After adding water (10 mL) the solvents were removed *in vacuo* and the residue was dissolved in DCM (100 mL). The organic phase was washed with sat. aqueous NaCl solution (50 mL) and the aqueous phase was re-extracted with DCM (3 × 50 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified *via* flash column chromatography (DCM/MeOH 97:3 → DCM/MeOH 85:15). 3',5'-TIPDS-uridine **149d** (4.63 g, 9.52 mmol, 95 %) was obtained as a colourless foam.



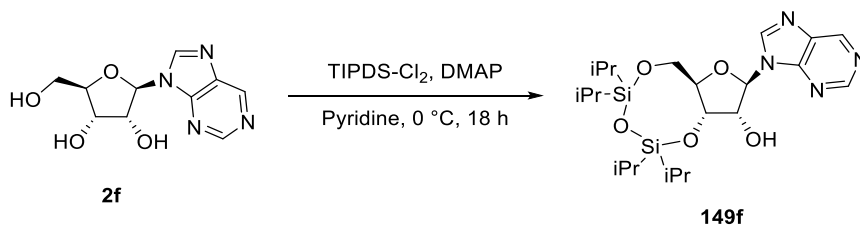
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₁H₃₉N₂O₇Si₂⁺ [M+H]⁺: 487.2290; found: 487.2295.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.37 (s, 1H, H^{NH}), 7.68 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H¹), 5.61 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H^{OH}), 5.53 (s, 1H, H²), 5.51 (s, 1H, H³), 4.18 – 4.07 (m, 3H, H^{4,5a,6}), 3.97 (dt, J = 8.6, 2.5 Hz, 1H, H⁷), 3.90 (dd, J = 13.2, 2.7 Hz, 1H, H^{5b}), 1.11 – 0.89 (m, 28H, H^{iPr}).

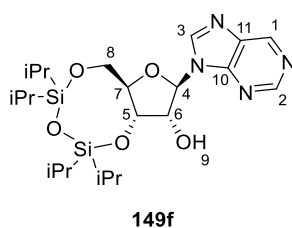
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 163.3 (C⁸), 150.2 (C⁹), 139.8 (C¹), 101.0 (C³), 90.6 (C²), 80.9 (C⁷), 73.6 (C⁶), 68.8 (C⁴), 60.2 (C⁵), 17.5 – 11.9 (12C, C^{iPr}).

R_f: 0.22 (DCM/MeOH 99:1).

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-2,2,4,4-tetraisopropyl-8-(9*H*-purin-9-yl)tetrahydro-6*H*-furo[3,2-
f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-ol (149f)



Nebularine **2e** (2.09 g, 8.30 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (0.51 g, 4.10 mmol, 0.500 equiv.) were suspended in dry pyridine (21 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. TIPDS-Cl₂ (3.80 mL, 9.94 mmol, 1.20 equiv.) was added dropwise and the mixture was slowly warmed to r.t. overnight. Cold water (10 mL) was added once TLC indicated full conversion and all volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified *via* column chromatography (EtOAc 100%) to yield 3',5'-TIPDS-nebularine **149f** (3.88 g, 7.89 mmol, 95 %) as an orange oil.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₃₉N₄O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 495.2453; found: 495.2455.

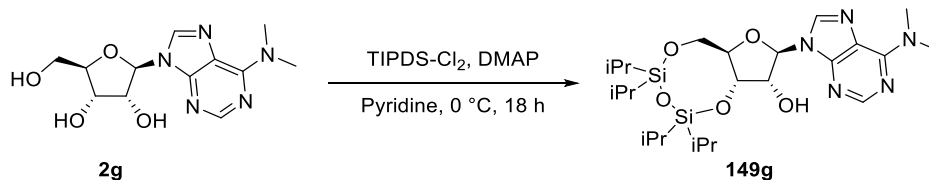
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.15 (s, 1H, H¹), 8.93 (s, 1H, H²), 8.26 (s, 1H, H³), 6.06 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H⁴), 5.15 – 5.06 (m, 1H, H⁵), 4.64 (d, J = 5.5 Hz, 1H, H⁶), 4.17 – 4.09 (m, 2H, H^{7,8a}), 4.09 – 4.00 (m, 1H, H^{8b}), 3.19 (s, 1H, H⁹), 1.13 (d, J = 9.8 Hz, 4H, H^{iPr-CH}), 1.13 – 0.97 (m, 24H, H^{iPr-CH₃}).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 152.8 (C²), 150.6 (C¹⁰), 149.2 (C¹), 144.5 (C³), 135.1 (C¹¹), 89.7 (C⁴), 82.3 (C⁷), 75.1 (C⁶), 70.7 (C⁵), 61.6 (C⁸), 17.6 – 17.1 (8C, C^{iPr-CH₃}), 13.4 – 12.7 (4C, C^{iPr-CH}).

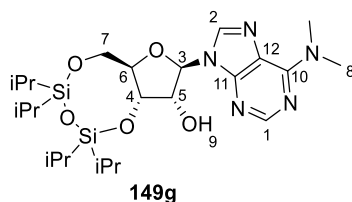
R_f: 0.55 (EtOAc 100 %).

Experimental

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-8-(6-(dimethylamino)-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-ol (**149g**)



Dimethyl adenosine (**2g**) (1.43 g, 4.85 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (300 mg, 2.43 mmol, 0.500 equiv.) were suspended in dry pyridine (12 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. TIPDS-Cl₂ (1.86 mL, 5.82 mmol, 1.20 equiv.) was added dropwise and the mixture was slowly warmed to r.t. overnight. Cold water (20 mL) was added once TLC indicated full conversion and all volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified *via* column chromatography (cHex/EtOAc 1:3) to yield 3',5'-TIPDS-dimethyl adenosine **149g** (1.66 g, 3.10 mmol, 64 %) as a colourless oil.



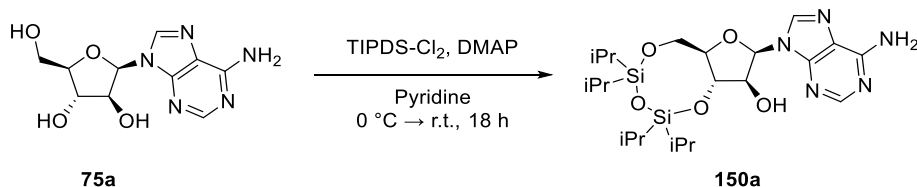
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₄H₄₄N₅O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 538.2875; found: 538.2877.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.26 (s, 1H, H¹), 7.85 (s, 1H, H²), 5.95 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H³), 5.15 (dd, J = 7.3, 5.5 Hz, 1H, H⁴), 4.55 (dt, J = 5.6, 1.5 Hz, 1H, H⁵), 4.17 – 4.05 (m, 2H, H^{6,7a}), 4.08 – 3.98 (m, 1H, H^{7b}), 3.51 (s, 6H, H⁸), 3.3 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H⁹), 1.16 – 1.01 (m, 28H, H^{iPr}).

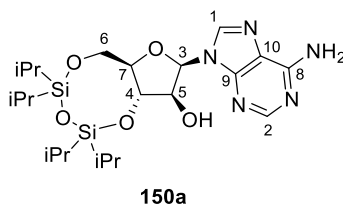
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 155.1 (C¹⁰), 152.5 (C¹), 149.9 (C¹¹), 137.3 (C²), 121.0 (C¹²), 89.8 (C³), 82.4 (C⁶), 75.3 (C⁵), 71.3 (C⁴), 62.3 (C⁷), 17.6 – 17.1 (8C, C^{iPr-CH3}), 13.4 – 12.7 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f: 0.47 (EtOAc).

(6a*R*,8*R*,9*S*,9a*S*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-ol (150a)



Dry pyridine (60 mL) was added to vidarabine (**75a**, 4.72 g, 17.7 mmol, 1.00 equiv.). The suspension was cooled to 0 °C and TIPDS-Cl₂ (6.20 mL, 19.4 mmol, 1.10 equiv.) was added over 20 min. The reaction mixture was stirred and allowed to warm to r.t. over 18 h at which point TLC indicated full conversion. Toluene (100 mL) was added and the mixture was concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (EtOAc/MeOH 98:2 → EtOAc/MeOH 95:5) to give compound **150a** as a colourless foam (7.83 g, 15.4 mmol, 87 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₄₀N₅O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 510.2562; found: 510.2562.

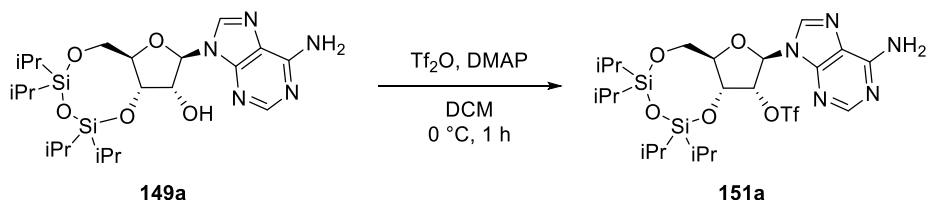
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.22 (s, 1H, H¹), 8.09 (s, 1H, H²), 6.16 (d, J = 5.8, 1H, H³), 5.89 (s, 2H, H⁴), 4.72 – 4.61 (m, 2H, H^{5,6}), 4.01 (d, J = 3.4, 2H, H⁷), 3.84 (dt, J = 9.3, 3.3, 1H, H⁸), 1.16 – 0.98 (m, 28H, H^{iPr}).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 155.7 (C⁹), 152.8 (C²), 149.4 (C¹⁰), 140.6 (C¹), 120.0 (C¹¹), 84.2 (C³), 81.3 (C⁸), 77.2 (C⁵), 74.4 (C⁶), 61.5 (C⁷), 17.8 – 12.2 (12C, C^{iPr}).

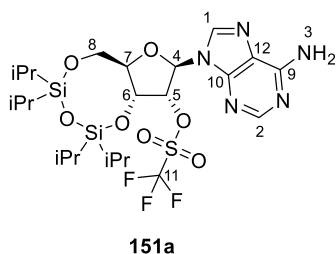
R_f: 0.63 (EtOAc/MeOH 9:1 with 1 % Et₃N).

Experimental

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl trifluoromethanesulfonate (**151a**)



TIPDS-protected adenosine **149a** (1.02 g, 2.00 mmol, 1.0 equiv.) and DMAP (733 mg, 6.00 mmol, 3.0 equiv.) were dissolved in dry DCM (10 mL). The reaction mixture was cooled to 0 °C and triflic anhydride (504 μ L, 3.00 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at r.t. for 2 h. Water (20 mL) was added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted with DCM (2 \times 10 mL). The combined organic phases were washed with water (20 mL), sat. aqueous NH_4Cl solution (40 mL), sat. aqueous NaCl solution (40 mL) and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:1) to yield triflate **151a** as off-white solid (689 mg, 1.07 mmol, 54 %).



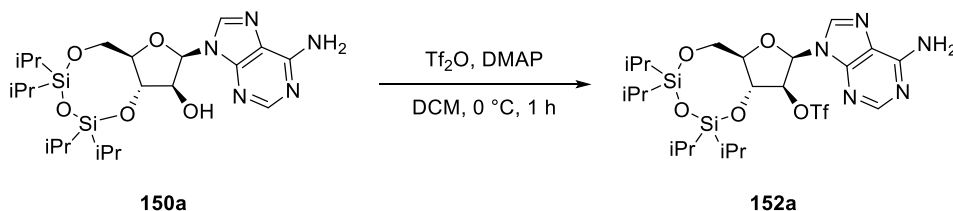
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_7\text{F}_3\text{SSi}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 642.2054; found: 642.2059.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.27 (s, 1H, H^1), 7.99 (s, 1H, H-C^2), 6.11 (s, 1H, H^3), 5.86 (s, 2H, H^{NH_2}), 5.78 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, H^4), 5.27 (dd, $J=9.3, 4.8$ Hz, 1H, H^{5a}), 4.22 – 4.02 (m, 3H, H^{5b-7}), 1.12 – 1.04 (m, 28H, H^{iPr}).

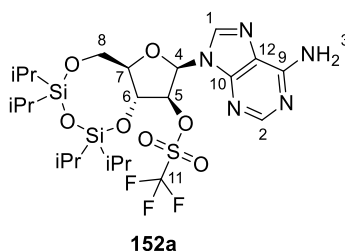
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 155.5 (C^8), 153.2 (C^1), 149.0 (C^9), 139.3 (C^2), 120.2 (C^{10}), 119.6 (C^{11}), 88.4 (C^3), 81.4 (C^7), 76.8 (C^4), 68.2 (C^6), 59.6 (C^5), 17.4 – 16.7 ($\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 13.2 – 12.7 ($\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

R_f: 0.20 (cHex/EtOAc 1:1).

(6a*R*,8*R*,9*S*,9a*R*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*b*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl trifluoromethanesulfonate (**152a**)



150a (2.55 g, 5.00 mmol, 1.00 equiv.) and 4-Dimethylaminopyridine (1.80 g, 15.0 mmol, 3.00 equiv.) were dissolved in dry DCM (26 mL). The mixture was cooled to 0 °C and TiF_2O (900 μL , 5.50 mmol, 1.10 equiv.) was added slowly over 5 min. The reaction was stirred and allowed to warm to r.t. over 1 h until TLC analysis indicated full conversion. Water (10 mL) was added, the phases were separated and the organic layer was washed with sat. aqueous solution NH_4Cl (50 mL) and sat. aqueous NaCl solution (50 mL). It was then dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:1) to give **152a** (2.45 g, 3.89 mmol, 78 %) as colourless foam.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_7\text{SSi}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 642.2055; found: 642.2057.

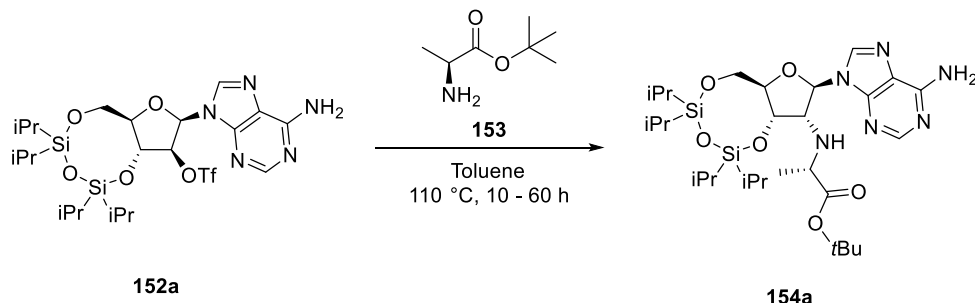
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H^1), 8.08 (s, 1H, H^2), 7.47 (s, 2H, H^3), 6.48 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H^4), 6.06 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H, H^5), 5.67 (dd, $J = 8.1, 8.1$ Hz, 1H, H^6), 4.26 – 3.89 (m, 3H, $\text{H}^{7,8}$), 1.34 – 0.99 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.0 (C^9), 152.3 (C^2), 149.1 (C^{10}), 140.6 (C^1), q, 122.5 – 113.0 (C^{11}), 116.1 (C^{12}), 89.3 – 78.5 ($\text{C}^{4,5,7}$), 74.2 (C^6), 62.1 (C^8), 17.3 – 12.3 (12C, C^{iPr}).

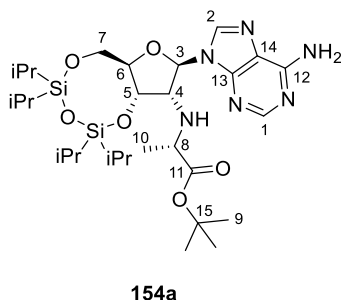
$R_f = 0.68$ (EtOAc 100 %).

Experimental

Tert-butyl ((6*aR*,8*R*,9*R*,9*aS*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyl tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl)-*L*-alaninate (**154a**)



Toluene (5 mL) was added to triflate **152a** (700 mg, 1.09 mmol, 1.0 equiv.) and the mixture was heated to 110 °C. *L*-Alanine *tert*-butyl ester (3.17 g, 21.8 mmol, 20 equiv.) in toluene (3 mL) was added dropwise over 48 h. Once TLC indicated close to full conversion the volatiles were removed *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:1) to give compound **154a** as colourless solid (159 mg, 261 μ mol, 24 %).



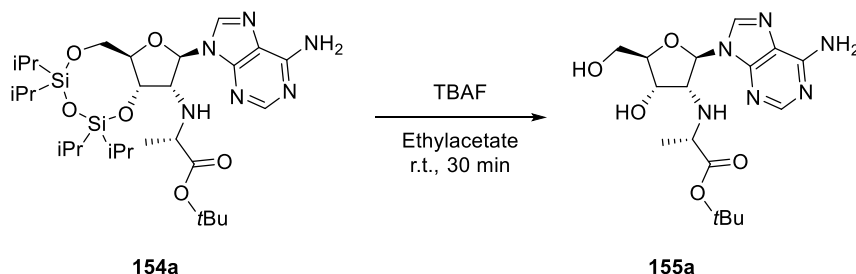
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{29}H_{53}N_6O_6Si_2^+$ $[M+H]^+$: 637.3560; found: 637.3562.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.23 (s, 1H, H^1), 8.20 (s, 1H, H^2), 6.04 (s, 1H, H^3), 4.82 – 4.74 (m, 1H, H^4), 4.25 – 4.17 (m, 2H, $H^{5,6}$), 4.15 – 4.09 (m, 1H, H^{7a}), 4.00 (dd, J = 12.9, 2.8 Hz, 1H, H^{7b}), 3.60 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H^8), 1.41 (s, 9H, H^9), 1.34 (s, 3H, H^{10}), 1.08 – 1.04 (m, 28H, H^{iPr}).

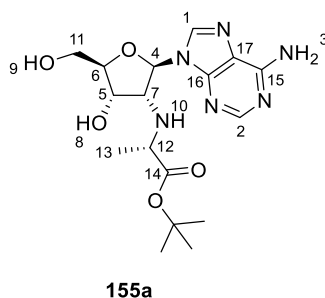
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 174.1 (C^{11}), 153.3 (C^{12}), 149.8 (C^1), 148.4 (C^{13}), 140.3 (C^2), 119.5 (C^{14}), 89.8 (C^3), 83.0 (C^6), 81.3 (C^8), 69.0 (C^5), 63.0 (C^4), 60.9 (C^7), 55.9 (C^{15}), 28.2 (C^9), 18.5 (C^{10}), 17.8 – 16.7 (8C, C^{iPr-Me}), 13.5 – 12.6 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f = 0.52 (Pent/EtOAc 1:1).

Tert-butyl ((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-*L*-alaninate (**155a**)



EtOAc (4.0 mL) was added to **154a** (90.7 mg, 142 μ mol, 1.0 equiv.) and TBAF (186 mg, 712 μ mol, 5.0 equiv.). The reaction was stirred at r.t. for 30 min, quenched with TMS-MeOH (0.30 mL), concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (EtOAc/MeOH 9:1) to give compound **155a** as yellow liquid (46.1 mg, 82 %).



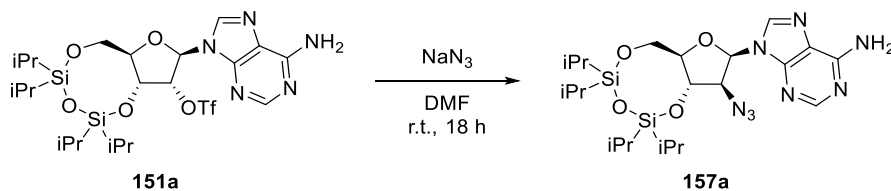
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{17}H_{27}N_6O_5^+$ $[M+H]^+$: 395.2037; found: 395.2038.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, H^1), 7.86 (s, 1H, H^2), 6.25 (s, 2H, H^3), 5.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H^4), 4.36 – 4.05 (m, 4H, $H^{5,6,7+8/9/10}$), 3.95 (dd, J = 13.0, 1.7 Hz, 1H, H^{11a}), 3.76 (dd, J = 12.9, 1.8 Hz, 1H, H^{11b}), 3.21 (q, J = 7.1 Hz, 1H, H^{12}), 1.19 (s, 9H, H^{tBu}), 1.14 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H^{13}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 175.1 (C^{14}), 156.2 (C^{15}), 152.4 (C^2), 148.8 (C^{16}), 141.1 (C^1), 121.3 (C^{17}), 90.9 – 55.8 ($7C^{4,5,6,7,11,12,tBu-quart.}$), 27.7 (C^{tBu-CH_3}), 18.7 (C^{13}).

Experimental

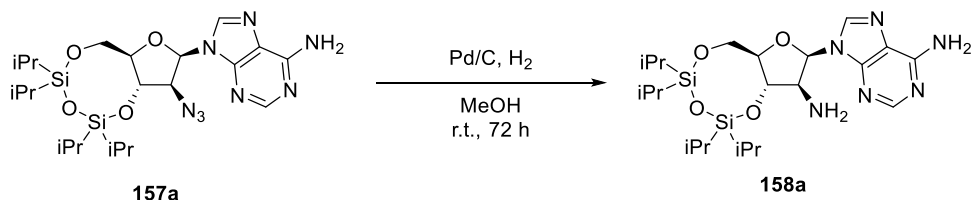
9-(((6a*R*,8*R*,9*S*,9a*S*)-9-azido-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-
[1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-9*H*-purin-6-amine (**157a**)



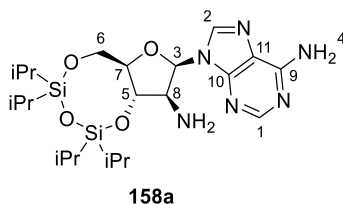
Triflate **151a** (642 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv.) and NaN_3 (325 mg, 5.0 mmol, 5.0 equiv.) were suspended in dry DMF (10 mL) and the mixture was stirred at r.t. overnight. Cold water (50 mL) was added and the solution was extracted with EtOAc (2×100 mL). The combined organic phases were washed with sat. aqueous NaCl solution (50 mL) and dried over N_2SO_4 . The crude azide **157a** was analysed only by mass spectrometry and further processed without further purification.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_4\text{Si}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 535.2627; found: 535.2638.

9-((6a*R*,8*R*,9*S*,9a*S*)-9-amino-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-
f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-9*H*-purin-6-amine (**158a**)



Methanol (75 mL) was added to the crude product **157a** (7.79 mmol) and Pd/C (10 % w/w; 623 mg) was added to the solution. The mixture was stirred vigorously under an atmosphere of H₂ at r.t. for 72 h until TLC indicated full conversion of the starting material. All solids were filtered off through celite and the remaining solution was concentrated *in vacuo*. The residue was purified *via* column chromatography (EtOAc 100 % + 1 % NEt₃ → EtOAc/MeOH 98.5:1.5 + 1 % NEt₃) to receive 2'-arabinosylamine **158a** (1.96 g, 4.60 μmol, 59 % over both steps).



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₄₁N₆O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 509.2722; found: 509.2716.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.31 (s, 1H, H¹), 8.17 (s, 1H, H²), 6.26 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H³), 5.70 (s, 2H, H⁴), 4.50 (t, J = 8.8 Hz, 1H, H⁵), 4.17 (dd, J = 13.0, 3.0 Hz, 1H, H^{6a}), 4.07 – 4.00 (m, 1H, H^{6b}), 3.96 – 3.84 (m, 2H, H^{7,8}), 1.17 – 1.03 (m, 28H, H^{1Pr}).

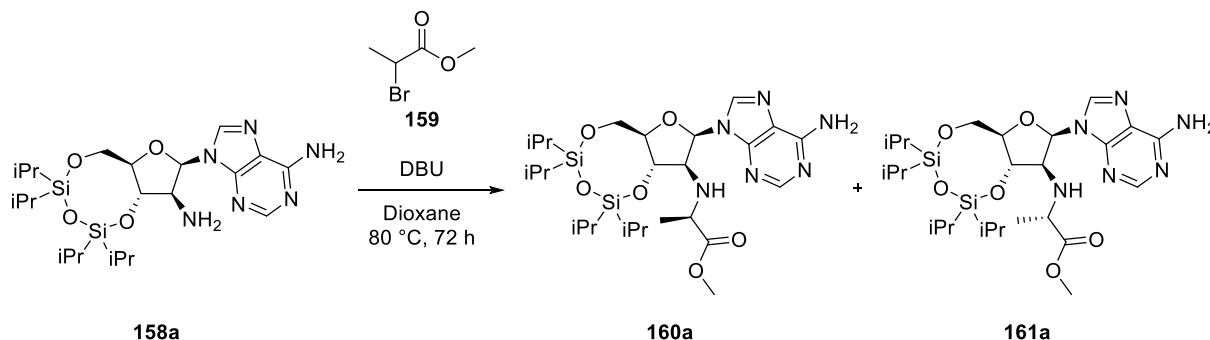
¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 155.6 (C⁹), 153.1 (C¹), 150.0 (C¹⁰), 140.0 (C²), 120.2 (C¹¹), 84.9 (C³), 82.6 (C⁷), 74.6 (C⁵), 61.2 (C⁶), 60.7 (C⁸), 17.7 – 17.1 (8C, C^{iPr-CH3}), 13.7 – 12.7 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f: 0.12 (EtOAc/MeOH 98:2 + 1 % NEt₃).

Experimental

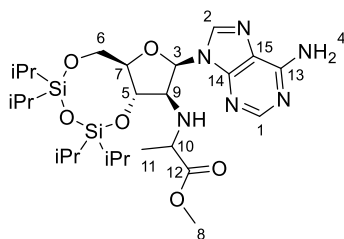
Methyl ((6a*R*,8*R*,9*S*,9a*S*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyl tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl)-D-alaninate (**160a**)

Methyl ((6a*R*,8*R*,9*S*,9a*S*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyl tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl)-L-alaninate (**161a**)



1,4-dioxane (15 mL) and DBU (249 μ L, 1.67 mmol, 1.0 equiv.) was added to amine **158a** (850 mg, 1.67 mmol, 1.0 equiv.). The reaction was heated to 80 °C and methyl 2-bromopropionate (**159**, 1.86 mL, 16.7 mmol, 10.0 equiv.). The reaction was stirred at 80 °C for 3 d. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:9 \rightarrow EtOAc/MeOH 99:1) to give compounds **160a** and **161a** as yellow solids (195 mg, 33.0 μ mol, 33 %).

Diastereomer 1:



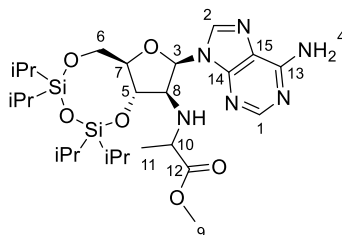
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{26}H_{46}N_6O_6Si_2^+$ $[M+H]^+$: 594.3017; found: 594.3017.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, H^1), 8.19 (s, 1H, H^2), 6.37 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H^3), 5.85 (s, 2H, H^4), 4.45 (t, J = 8.8 Hz, 1H, H^5), 4.16 – 3.99 (m, 2H, H^6), 3.87 (dt, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H, H^7), 3.69 (s, 3H, H^8), 3.61 (dd, J = 9.2, 6.5 Hz, 1H, H^9), 3.33 (q, J = 7.0 Hz, 1H, H^{10}), 1.21 – 0.96 (m, 28H, H^{ipr}), 0.74 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H^{11}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 175.8 (C^{12}), 155.5 (C^{13}), 152.9 (C^1), 150.0 (C^{14}), 140.4 (C^2), 119.4 (C^{15}), 83.2 (C^3), 82.1 (C^7), 72.7 (C^5), 64.6 (C^9), 60.9 (C^6), 55.3 (C^{10}), 52.0 (C^8), 19.5 (C^{11}), 18.2 – 16.1 (8C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 14.7 – 10.1 (4C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

R_f: 0.15 (cHex/EtOAc 1:9).

Diastereomer 2:



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_6\text{Si}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 594.3017; found: 594.3017.

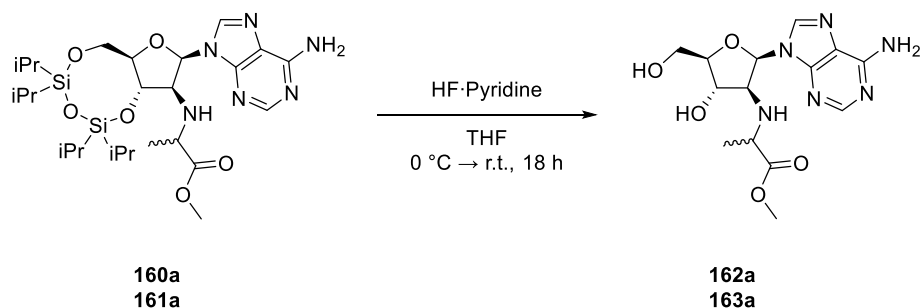
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.29 (s, 1H, H^1), 8.10 (s, 1H, H^2), 6.30 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H^3), 5.81 (s, 2H, H^4), 4.74 – 4.64 (m, 1H, H^5), 4.11 (dd, J = 12.7, 4.2 Hz, 1H, H^{6a}), 3.99 (dd, J = 12.7, 3.1 Hz, 1H, H^{6b}), 3.86 – 3.80 (m, 1H, H^7), 3.73 – 3.66 (m, 1H, H^8), 3.56 (s, 4H, $\text{H}^{9,10}$), 1.18 – 0.96 (m, 31H, $\text{H}^{11,\text{iPr}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 175.5 (C^{12}), 155.5 (C^{13}), 152.9 (C^1), 149.9 (C^{14}), 140.7 (C^2), 120.0 (C^{15}), 83.7 (C^3), 82.2 (C^7), 75.0 (C^5), 65.2 (C^8), 61.8 (C^6), 55.6 ($\text{C}^{9/10}$), 52.0 ($\text{C}^{9/10}$), 19.0 (C^{11}), 17.8 – 17.0 (8C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 13.7 – 12.4 (4C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

R_f: 0.10 (cHex/EtOAc 1:9).

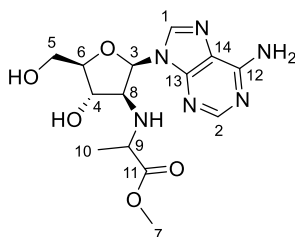
Methyl ((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-D-alaninate (**162a**)

Methyl ((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-L-alaninate (**163a**)



Diastereomer 1 (57.6 mg, 97.0 μmol , 1.00 equiv.) or 2 (39.5 mg, 66.0 μmol , 1.00 equiv.) of **160a/161a** were dissolved in dry THF (1 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF·pyridine (1: 70 wt.%; 50.4 μL , 1.93 mmol, 20.0 equiv.; 2: 70 wt.%; 34.5 μL , 1.33 mmol, 20.0 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred for 18 h at room temperature until TLC confirmed full conversion. Excess fluoride was quenched by adding TMS-OMe (1 mL) and stirring for an additional 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/MeOH 95:5). Compounds diastereomer 1 (25.4 mg, 71.8 μmol , 74 %) and 2 (14.7 mg, 41.6 μmol , 63 %) of **162a/163a** were obtained as off-white solids. The assignment of the D- or L-configuration to the respective diastereomers was not disclosed.

Diastereomer 1:

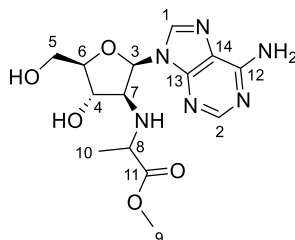


HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 353.1568; found: 353.1567.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.47 (s, 1H, H¹), 8.20 (s, 1H, H²), 6.40 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H³), 4.34 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H⁴), 3.91 (dd, J = 12.1, 2.3 Hz, 1H, H^{5a}), 3.86 (dt, J = 7.8, 2.7 Hz, 1H, H⁶), 3.80 (dd, J = 12.2, 3.2 Hz, 1H, H^{5b}), 3.69 (s, 3H, H⁷), 3.52 (dd, J = 8.2, 6.4 Hz, 1H, H⁸), 3.14 (q, J = 7.0 Hz, 1H, H⁹), 0.77 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H¹⁰).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 175.3 (C^{11}), 155.1 (C^{12}), 151.5 (C^2), 148.4 (C^{13}), 140.7 (C^1), 117.5 (C^{14}), 83.4 (C^3), 82.7 (C^6), 71.7 (C^4), 64.9 (C^8), 59.0 (C^5), 54.4 (C^9), 50.2 (C^7), 17.2 (C^{10}).

Diastereomer 2:



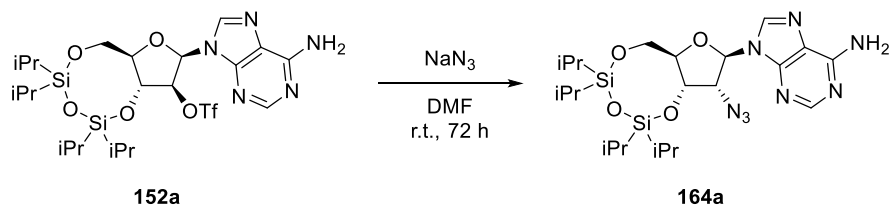
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 353.1568; found: 353.1566.

^1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.43 (s, 1H, H^1), 8.18 (s, 1H, H^2), 6.40 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H^3), 4.37 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H^4), 3.95 – 3.85 (m, 2H, $\text{H}^{5a,6}$), 3.83 – 3.78 (m, 1H, H^{5b}), 3.69 – 3.63 (m, 1H, H^7), 3.49 (s, 4H, $\text{H}^{8,9}$), 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H^{10}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 174.3 (C^{11}), 155.1 (C^{12}), 151.5 (C^2), 148.4 (C^{13}), 140.3 (C^1), 117.7 (C^{14}), 83.5 (C^3), 83.0 (C^6), 72.2 (C^4), 63.9 (C^7), 59.3 (C^5), 53.5 (C^8), 50.1 (C^9), 16.7 (C^{10}).

Experimental

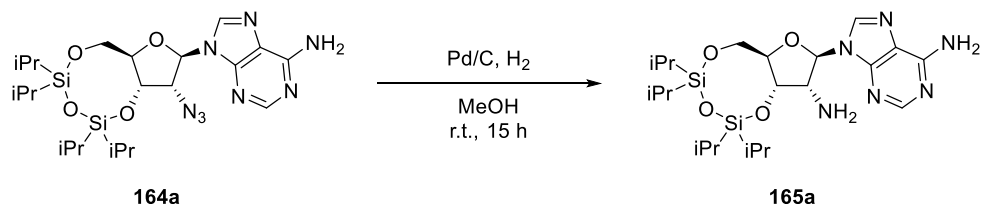
9-(((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-9-azido-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-
/1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-9*H*-purin-6-amine (**164a**)



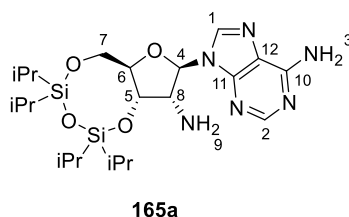
DMF (40 mL) was added to triflate **152a** (8.25 g, 12.9 mmol, 1.0 equiv.). Sodium azide (4.18 g, 6.42 mmol, 5.0 equiv.) was added and the reaction was stirred for 72 h at room temperature. Water (50 mL) was then added, the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 100 mL) and the organic layers were washed with sat. aqueous NaCl solution and dried over Na₂SO₄. After removal of the solvent *in vacuo* crude compound **164a** was obtained, which was used without further purification.

HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₃₉N₈O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 535.2627; found: 535.2637.

9-((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-9-amino-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-
f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-9*H*-purin-6-amine (**165a**)



The crude product **164a** was dissolved in dry MeOH (200 mL) and Pd/C (10 % w/w; 692 mg, 0.355 mmol, 3 mol%) was added. The reaction was vigorously stirred for 15 h under H₂ atmosphere. The mixture was filtered through celite, concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (EtOAc/MeOH 99:1 → EtOAc/MeOH 97:3 + 1 % NEt₃) to give compound **165a** as white solid (5.59 g, 11.1 mmol, 86 % over 2 steps).



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₂H₄₁N₆O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 509.2722; found: 509.2723.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, H¹), 8.08 (s, 1H, H²), 7.33 (s, 2H, H³), 5.72 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H⁴), 4.81 (dd, *J* = 6.4, 6.4 Hz, 1H, H⁵), 4.03 – 3.92 (m, 4H, H^{6,7,8}), 3.35 (s, 2H, H⁹), 1.17 – 0.99 (m, 28H, H^{iPr}).

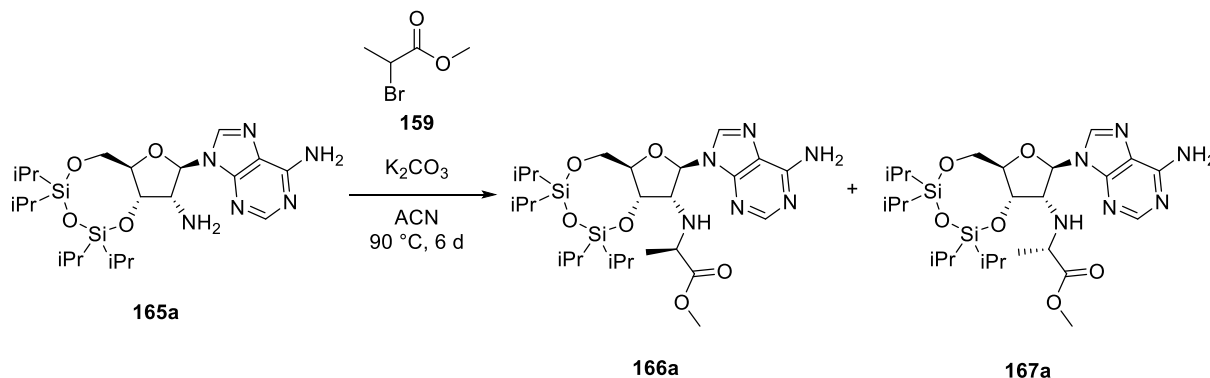
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 156.1 (C¹⁰), 152.5 (C²), 149.1 (C¹¹), 139.8 (C¹), 119.2 (C¹²), 89.0 – 56.9 (5C, C^{4,5,6,7,8}), 17.5 – 16.9 (C^{iPr-CH3}), 12.8 – 12.1 (C^{iPr-CH}).

R_f = 0.09 (EtOAc/MeOH 97:3 + 1 % NEt₃).

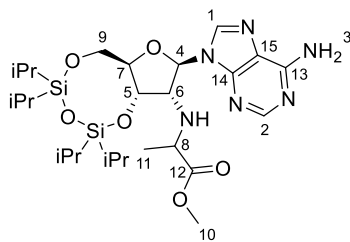
Experimental

Methyl ((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyl tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl)-L-alaninate (**166a**)

Methyl ((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*S*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyl tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl)-D-alaninate (**167a**)



ACN (20 mL) was added to amine **165a** (509 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv.). Methyl 2-bromopropionate (0.223 mL, 2.00 mmol, 2.0 equiv.) and K₂CO₃ (276 mg, 2.00 mmol, 2.0 equiv.) were added. Methyl 2-bromopropionate (0.112 mL, 1.00 mmol, 1.0 equiv.) was added after 19 h. The reaction was stirred at 90 °C for 6 d. ACN (6 mL) was added, the mixture was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:4 → EtOAc/MeOH 99:1) to give compounds **166a** and **167a** as yellow solids (195 mg, 33.0 μmol, 33 %). The assignment of the D- or L-configuration to the respective diastereomers was not disclosed.



166a = D-Ala
167a = L-Ala

Diastereomer 1:

HR-MS (ESI): *m/z* calculated for C₂₂H₄₁N₆O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 595.3090; found: 595.3106.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H¹), 8.05 (s, 1H, H²), 7.35 (s, 2H, H³), 5.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H⁴), 5.05 (dd, 1H, H⁵), 4.11 – 3.87 (m, 3H, H^{6,7,8}), 3.70 – 3.57 (m, 2H, H⁹), 3.53 (s, 3H, H¹⁰), 1.25 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H¹¹), 1.04 (s, 28H, H^{iPr}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 175.1 (C^{12}), 156.1 (C^{13}), 152.5 (C^1), 148.5 (C^{14}), 139.3 (C^2), 119.4 (C^{15}), 87.8 – 51.7 ($\text{C}^{4,5,6,7,8,9,10}$), 19.7 (C^{11}), 17.4 – 16.8 (8C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 12.7 – 12.2 (4C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

R_f = 0.14 (EtOAc).

Diastereomer 2:

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_4\text{Si}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 595.3090; found: 595.3104.

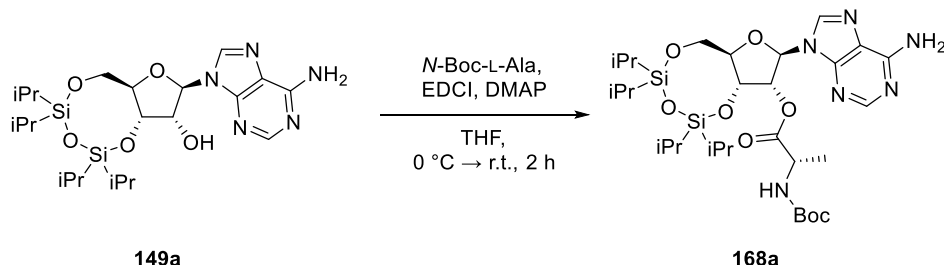
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H^1), 8.05 (s, 1H, H^2), 7.35 (s, 2H, H^3), 5.94 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H^4), 5.05 (dd, 1H, H^5), 4.07 – 3.57 (m, 3H, $\text{H}^{6,7,8}$), 3.64 (dd, J = 13.9, 7.1 Hz, 2H, H^9), 3.53 (s, 3H, H^{10}), 1.25 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H^{11}), 1.04 (s, 28H, H^{iPr}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 175.1 (C^{12}), 156.1 (C^{13}), 152.5 (C^1), 148.5 (C^{14}), 139.3 (C^2), 119.4 (C^{15}), 87.8 – 51.7 ($\text{C}^{4,5,6,7,8,9,10}$), 18.2 (C^{11}), 17.4 – 16.8 (8C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 12.7 – 12.2 (4C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

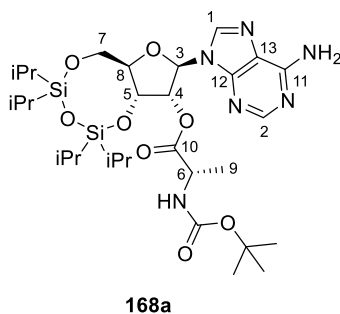
R_f = 0.28 (EtOAc).

Experimental

(6aR,8R,9R,9aR)-8-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (tert-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**168a**)



N-Boc-L-Alanine (223 mg, 1.18 mmol, 1.20 equiv.) was dissolved in dry THF (5 mL). The solution was cooled to 0 °C and EDCI·HCl (282 mg, 1.47 mmol, 1.50 equiv.) was added. After 15 min, **149a** (500 mg, 980 μmol, 1.00 equiv.) and DMAP (240 mg, 1.96 mmol, 2.00 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t. and stirred for 2 h and was subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:1) to give compound **168a** as white foam (668 mg, 980 μmol, 100 %).



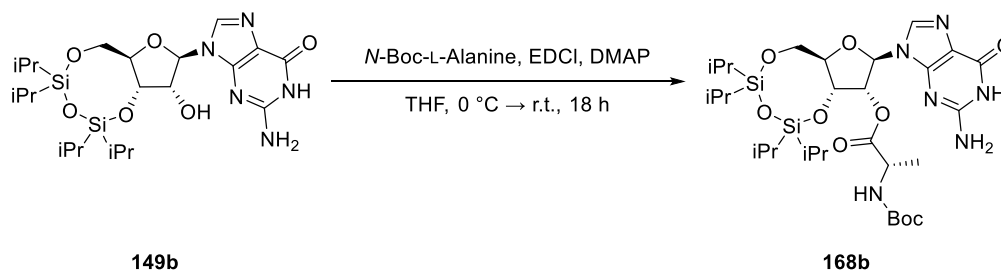
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{30}H_{53}N_6O_8Si_2^+$ $[M+H]^+$: 681.3458; found: 681.3466.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.26 (s, 1H, H^1), 8.04 (s, 1H, H^2), 7.38 – 7.36 (m, 3H, H^{NH2} , H^{NH}), 6.10 (s, 1H, H^3), 5.98 (d, J = 6.2 Hz, 1H, H^4), 5.29 – 5.21 (m, 1H, H^5), 4.15 (p, J = 7.4 Hz, 1H, H^6), 4.02 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H^7), 3.97 – 3.87 (m, 1H, H^8), 1.11 – 0.93 (m, 37H, H^{iPr}), 1.33 (d, 3H, H^9).

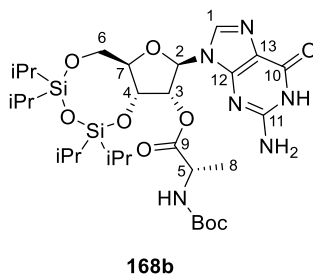
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.5 (C^{10}), 156.6 (C^{11}), 155.6 (C^{Boc-CO}), 153.0 (C^2), 149.0 (C^{12}), 140.9 (C^1), 119.7 (C^{13}), 87.0 (C^3), 81.3 (C^8), 78.7 ($C^{Boc-quart}$), 75.1 (C^4), 69.31 (C^5), 60.2 (C^7), 49.4 (C^6), 28.6 ($C^{Boc-CH3}$), 17.8 – 11.9 (13C, C^9 , C^{iPr}).

R_f 0.57 (EtOAc 100 %).

(6a*R*,8*R*,9*S*,9a*R*)-8-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**168b**)



N-Boc-L-Alanine (298 mg, 1.60 mmol, 1.05 equiv.) was dissolved in dry THF (15 mL) and cooled to 0 °C. EDCI·HCl (316 mg, 1.70 mmol, 1.10 equiv.) was added and the mixture was stirred for 15 min. 3',5'-TIPDS-Guanosine (**149b**) (788 mg, 1.50 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (275 mg, 2.25 mmol, 1.50 equiv.) were added and the reaction was allowed to warm to r.t. overnight. Once TLC analysis indicated full conversion, the volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified *via* flash column chromatography (DCM 100 % → DCM/MeOH 85:15) to yield 2'-*N*-Boc-alanine-3',5'-TIPDS-guanosine **168b** (603 mg, 900 μmol, 57 %) as colourless solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{30}H_{53}N_6O_9Si_2^+$ $[M+H]^+$: 697.3407; found: 697.3410.

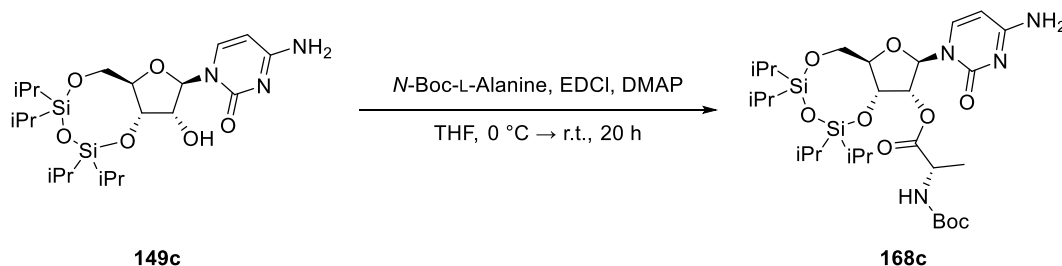
1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.85 (s, 1H, H¹), 5.89 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H²), 5.63 (dd, J = 5.2, 1.7 Hz, 1H, H³), 4.64 (dd, J = 8.3, 5.2 Hz, 1H, H⁴), 4.19 – 4.05 (m, 2H, H^{5,6a}), 4.01 – 3.89 (m, 2H, H^{6b,7}), 1.36 (s, 9H, H^{Boc}), 1.31 (d, J = 7.4 Hz, 3H, H⁸), 1.09 – 0.95 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 171.9 (C⁹), 156.6 (C¹⁰), 155.2 (C^{Boc-CO}), 154.0 (C¹¹), 150.5 (C¹²), 134.7 (C¹), 116.7 (C¹³), 84.9 (C²), 81.2 (C⁷), 78.3 (C^{Boc-quart.}), 75.0 (C³), 68.7 (C⁴), 60.1 (C⁶), 48.8 (C⁵), 28.2 (C^{Boc-CH3}), 17.4 – 16.6 (13C, C⁸, C^{iPr}).

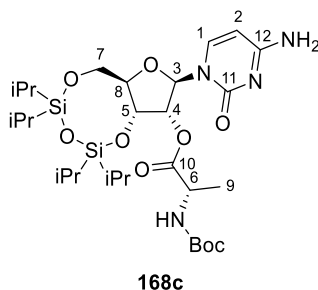
R_f: 0.42 (EtOAc 100 %).

Experimental

(6a*R*,8*R*,9*S*,9a*R*)-8-(4-Amino-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**168c**)



N-Boc-Alanine (298 mg, 1.60 mmol, 1.05 equiv.) was dissolved in dry THF (15 mL) and cooled to 0 °C. EDCI·HCl (316 mg, 1.70 mmol, 1.10 equiv.) was added and the mixture was stirred for 15 min. 3',5'-TIPDS-cytidine **149c** (729 mg, 1.50 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (275 mg, 2.25 mmol, 1.50 equiv.) were added and the reaction was warmed to r.t. overnight. Once TLC analysis indicated full conversion, the solvents were removed *in vacuo* and the residue was purified *via* column chromatography (DCM 100 % → DCM/MeOH 85:15) to yield 2'-*N*-Boc-alanine-3',5'-TIPDS-cytidine **168c** (831 mg, 1.30 mmol, 84 %) as colourless solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{29}H_{53}N_4O_9Si_2^+ [M+H]^+$: 657.3346; found: 657.3359.

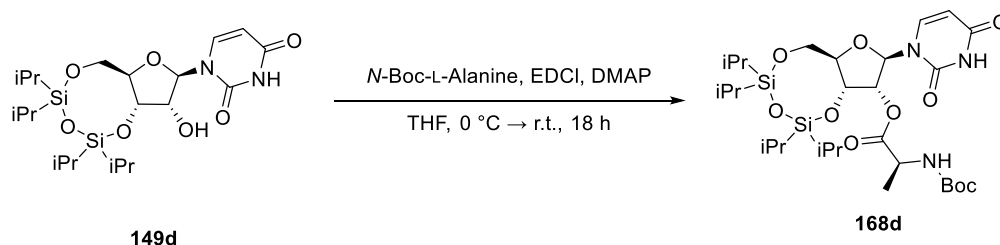
1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.65 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H^1), 7.35 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H^{NH}), 7.28 (s, 2H, H^{NH2}), 5.71 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H^2), 5.65 (s, 1H, H^3), 5.38 (d, J = 4.9 Hz, 1H, H^4), 4.44 (dd, J = 9.3, 4.9 Hz, 1H, H^5), 4.20 – 4.08 (m, 2H, H^6 , H^{7a}), 3.97 – 3.87 (m, 2H, $H^{7b,8}$), 1.38 (s, 9H, H^{Boc}), 1.35 – 1.21 (m, 3H, H^9), 1.05 – 0.82 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 171.8 (C^{10}), 165.9 (C^{11}), 155.1 (C^{Boc-CO}), 154.5 (C^{12}), 140.8 (C^1), 93.9 (C^2), 89.0 (C^3), 81.0 (C^8), 78.2 ($C^{Boc-quart}$), 75.2 (C^4), 68.0 (C^5), 59.9 (C^7), 48.8 (C^6), 28.2 ($C^{Boc-CH3}$), 17.6 – 11.8 (13C, C^9 , C^{iPr}).

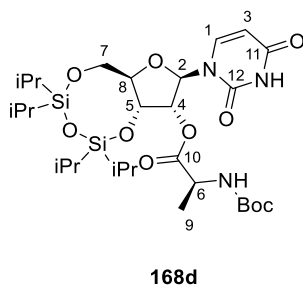
R_f 0.62 (EtOAc 100 %).

Experimental

(6aR,8R,9R,9aR)-8-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**168d**)



N-Boc-Alanine (298 mg, 1.60 mmol, 1.05 equiv.) was dissolved in dry THF (15 mL) and cooled to 0 °C. EDCI-HCl (316 mg, 1.70 mmol, 1.10 equiv.) was added and the mixture was stirred for 15 min. 3',5'-TIPDS-Uridine **149d** (730 mg, 1.50 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (275 mg, 2.25 mmol, 1.50 equiv.) were added and the reaction was allowed to warm to r.t. overnight. The solvents were removed *in vacuo* and the residue was purified *via* flash column chromatography (DCM 100 % → DCM/MeOH 85:15) to yield 2'-*N*-Boc-alanine-3',5'-TIPDS-uridine **168d** (780 mg, 1.20 mmol, 80 %) as colourless solid.



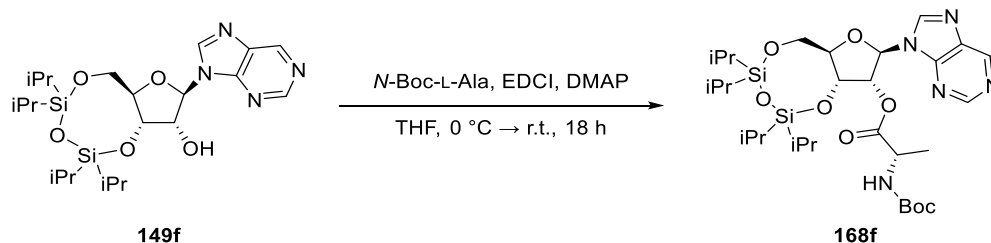
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{29}H_{52}N_3O_{10}Si_2^+$ $[M+H]^+$: 658.3186; found: 658.3191.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.43 (s, 1H, H^{NH}), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H^1), 7.35 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H^{NH}), 5.66 – 5.65 (m, 1H, H^2), 5.63 – 5.54 (m, 2H, H^3 , H^4), 4.51 (dd, J = 9.2, 5.1 Hz, 1H, H^5), 4.18 – 4.07 (m, 2H, $H^{6,7a}$), 3.96 – 3.85 (m, 2H, $H^{7b,8}$), 1.36 (s, 9H, H^{Boc}), 1.34 – 1.21 (m, 3H, H^9), 1.06 – 0.81 (m, 37H, H^{iPr}).

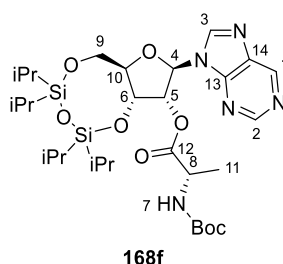
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 171.7 (C^{10}), 163.3 (C^{11}), 155.1 (C^{Boc-CO}), 150.1 (C^{12}), 140.9 (C^1), 101.5 (C^3), 88.9 (C^2), 81.1 (C^5), 78.2 ($C^{Boc-quart.}$), 74.6 (C^4), 68.1 (C^6), 59.8 (C^7), 48.8 (C^8), 28.2 (C^{Boc-CH_3}), 17.6 – 11.7 (12C, C^{iPr}).

R_f: 0.68 (EtOAc 100 %).

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-2,2,4,4-tetraisopropyl-8-(9*H*-purin-9-yl)tetrahydro-6*H*-furo[3,2-
f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**168f**)



N-Boc-L-Alanine (382 mg, 2.02 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (20 mL). The mixture was cooled to 0 °C and EDCI·HCl (426 mg, 2.22 mmol, 1.10 equiv.) was added. After 15 minutes, **149f** (1.00 g, 2.02 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (370 mg, 3.03 mmol, 1.50 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t., further stirred overnight and subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:1) to give compound **168f** as white foam (1.01 g, 1.52 mmol, 75 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{30}H_{52}N_5O_8Si_2^+$ $[M+H]^+$: 666.3349; found: 666.3355.

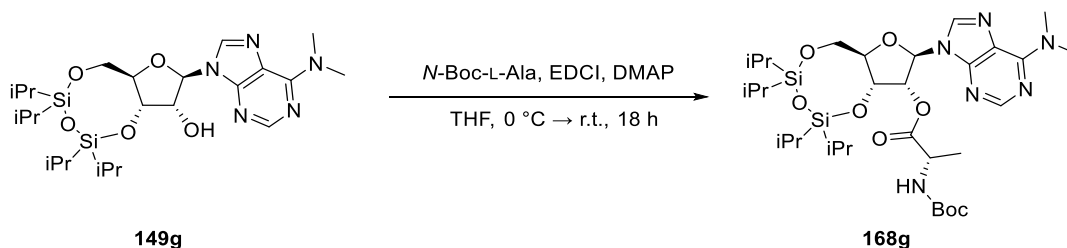
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.16 (s, 1H, H^1), 8.92 (s, 1H, H^2), 8.27 (s, 1H, H^3), 6.10 (s, 1H 4), 5.95 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H^5), 5.20 (dd, J = 9.1, 5.3 Hz, 1H, H^6), 5.07 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H^7), 4.48 (p, J = 7.2 Hz, 1H, H^8), 4.19 (d, J = 12.9 Hz, 1H, H^{9a}), 4.08 – 4.00 (m, 2H, $H^{9b,10}$), 1.48 – 1.41 (m, 9H, H^{Boc}), 1.13 – 0.99 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.4 (C^{12}), 155.2 (C^{Boc-CO}), 152.9 (C^2), 150.5 (C^{13}), 149.2 (C^1), 144.4 (C^3), 135.0 (C^{14}), 87.8 (C^4), 82.0 (C^{10}), 80.2 ($C^{Boc-quart}$), 75.9 (C^5), 68.6 (C^6), 59.9 (C^9), 49.3 (C^8), 28.4 (C^{Boc-CH_3}), 19.2 (C^{11}), 17.6 – 16.9 (8C, C^{iPr-CH_3}), 13.5 – 12.6 (4C, C^{iPr-CH}).

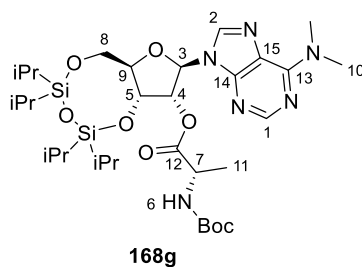
R_f: 0.63 (EtOAc 100 %).

Experimental

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-8-(6-(dimethylamino)-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (tert-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**168g**)



N-Boc-L-Alanine (348 mg, 1.84 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (20 mL). The mixture was cooled to 0 °C and EDCI·HCl (388 mg, 2.02 mmol, 1.10 equiv.) was added. After 15 minutes, **149g** (990 mg, 1.84 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (337 mg, 2.76 mmol, 1.50 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t. and stirred overnight and subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:1) to give compound **168g** as white foam (935 mg, 1.32 mmol, 72 %).



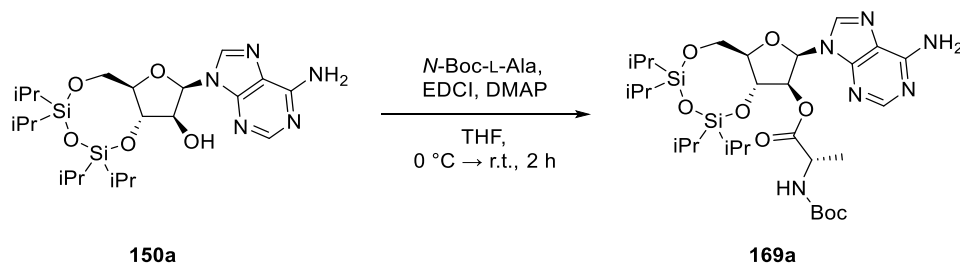
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{32}H_{57}N_6O_8Si_2^+ [M+H]^+$: 709.3771; found: 709.3773.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.23 (s, 1H, H¹), 7.84 (s, 1H, H²), 5.98 (s, 1H, H³), 5.88 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H⁴), 5.23 (dd, J = 8.7, 5.3 Hz, 1H, H⁵), 5.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H⁶), 4.45 (p, J = 7.4 Hz, 1H, H⁷), 4.15 (dd, J = 13.9, 3.6 Hz, 1H, H^{8a}), 4.04 – 3.95 (m, 2H, H^{8b,9}), 3.49 (s, 6H, H¹⁰), 1.42 (d, J = 3.5 Hz, 12H, H^{11,Boc}), 1.14 – 0.87 (m, 28H, H^{iPr}).

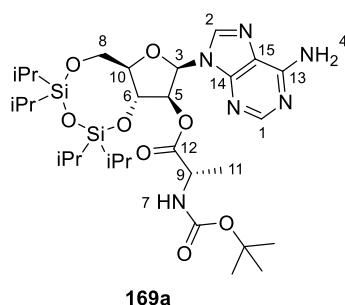
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.3 (C¹²), 155.1 (C^{Boc-CO}), 155.0 (C¹³), 152.6 (C¹), 149.8 (C¹⁴), 137.2 (C²), 120.9 (C¹⁵), 87.6 (C³), 81.8 (C⁹), 80.0 (C^{Boc-quart}), 76.3 (C⁴), 69.1 (C⁵), 60.3 (C⁸), 49.3 (C⁷), 38.7 (C¹⁰), 28.4 (C^{Boc-CH3}), 19.3 (C¹¹), 17.5 – 16.9 (8C, C^{iPr-CH3}), 13.4 – 12.6 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f: 0.61 (cHex/EtOAc 1:1).

(6aR,8R,9S,9aR)-8-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**169a**)



N-Boc-L-Alanine (445 mg, 2.35 mmol, 1.20 equiv.) was dissolved in dry THF (25 mL). The solution was cooled to 0 °C and EDCI-HCl (564 mg, 1.50 mmol, 1.50 equiv.) was added. After 15 min, **150a** (500 mg, 980 μmol, 1.00 equiv.) and DMAP (240 mg, 1.96 mmol, 2.00 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t. and stirred for 2 h and subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:4) to give compound **169a** as white foam (668 mg, 2.35 mmol, 100 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{30}H_{53}N_6O_8Si_2^+ [M+H]^+$: 681.3458; found: 681.3469.

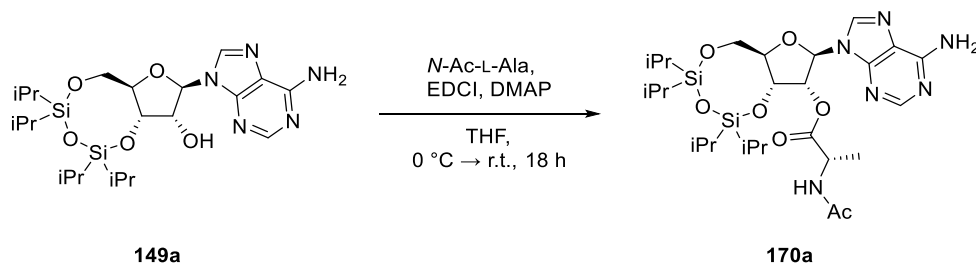
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.3 (s, 1H, H^1), 7.9 (s, 1H, H^2), 6.5 (d, $J = 6.6$, 1H, H^3), 5.7 (s, 2H, H^4), 5.5 (t, $J = 7.3$, 1H, H^5), 5.3 (t, $J = 8.1$, 1H, H^6), 4.8 (d, $J = 8.1$, 1H, H^7), 4.3 (dd, $J = 12.5$, 4.9, 1H, H^{8a}), 4.1 (qd, $J = 7.3$, 3.7, 1H, H^9), 4.0 (dd, $J = 12.5$, 3.2, 1H, H^{8b}), 3.9 (ddd, $J = 8.1$, 4.8, 3.1, 1H, H^{10}), 1.4 (s, 9H, H^{Boc}), 1.2 – 1.0 (m, 28H, H^{iPr}), 0.5 (d, $J = 7.2$, 3H, H^{11}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.5 (C^{12}), 155.5 (C^{13}), 154.9 (C^{Boc-CO}), 153.2 (C^1), 149.8 (C^{14}), 140.4 (C^2), 119.9 (C^{15}), 81.4 (C^3), 80.6 (C^{10}), 78.9 (C^5), 77.4 ($C^{Boc-quart}$), 72.8 (C^6), 61.8 (C^8), 48.7 (C^9), 28.4 (C^{Boc-CH_3}), 17.8 – 12.4 (13C, $C^{11,iPr}$).

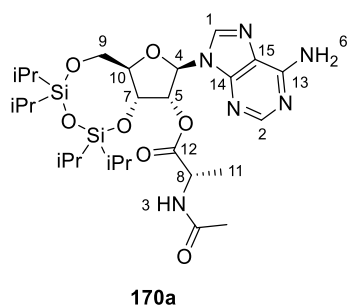
R_f: 0.51 (EtOAc 100%).

Experimental

(6aR,8R,9R,9aR)-8-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl acetyl-L-alaninate (**170a**)



N-Ac-L-Alanine (257 mg, 1.96 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (21 mL) and cooled to 0 °C. EDCI·HCl (414 mg, 2.16 mmol, 1.10 equiv.) was added and the white suspension was stirred for 15 min. TIPDS-Adenosine **149a** (1.00 g, 1.96 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (360 mg, 2.94 mmol, 1.50 equiv.) were added and the reaction was warmed to r.t. and was stirred overnight. After TLC indicated conversion, removal of the solvents *in vacuo* and purification by column chromatography (EtOAc/MeOH 98:2) yielded **170a** (1.06 g, 1.71 mmol, 87 %) as a white solid.



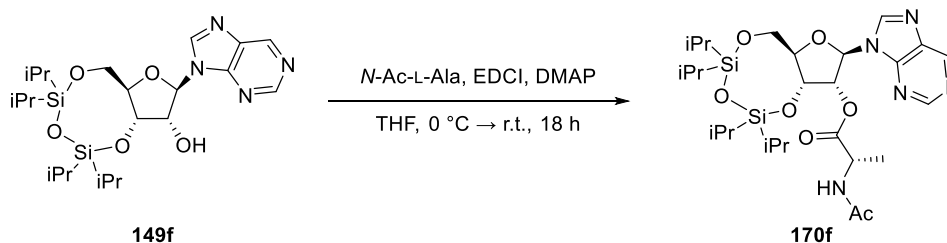
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{27}H_{47}N_6O_7Si_2^+ [M+H]^+$: 623.3039; found: 623.3040.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.28 (s, 1H, H^1), 7.97 (s, 1H, H^2), 6.07 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H^3), 6.01 (s, 1H, H^4), 5.90 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H^5), 5.54 (d, J = 6.6 Hz, 2H, H^6), 5.19 (dd, J = 8.9, 5.2 Hz, 1H, H^7), 4.76 (p, J = 7.2 Hz, 1H, H^8), 4.23 – 4.13 (m, 1H, H^{9a}), 4.04 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H^{10}), 4.01 (q, J = 2.8 Hz, 1H, H^{9b}), 2.02 (s, 3H, H^{Ac-CH_3}), 1.48 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H^{11}), 1.17 – 0.99 (m, 28H, H^{iPr}).

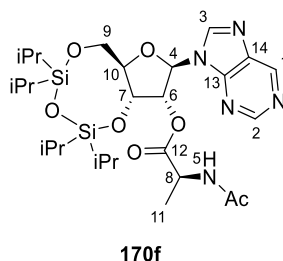
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.2 (C^{12}), 169.7 (C^{Ac-CO}), 155.5 (C^{13}), 153.4 (C^1), 149.3 (C^{14}), 139.7 (C^2), 120.5 (C^{15}), 87.6 (C^4), 81.9 (C^{10}), 76.4 (C^5), 68.8 (C^7), 60.1 (C^9), 48.2 (C^8), 23.3 (C^{Ac-CH_3}), 19.2 (C^{11}), 17.6 – 16.9 (8C, C^{iPr-CH_3}), 13.5 – 12.6 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f: 0.43 (EtOAc/MeOH 98:2).

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-2,2,4,4-tetraisopropyl-8-(9*H*-purin-9-yl)tetrahydro-6*H*-furo[3,2-
f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl acetyl-L-alaninate (**170f**)



N-Ac-L-Alanine (268 mg, 2.05 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (20 mL). The mixture was cooled to 0 °C and EDCI·HCl (432 mg, 2.25 mmol, 1.10 equiv.) was added. After 15 minutes, **149f** (1.01 g, 2.05 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (375 mg, 3.07 mmol, 1.50 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t. and stirred overnight before it was subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (EtOAc/MeOH 98:2) to give compound **170f** as white foam (730 mg, 1.54 mmol, 75 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{27}H_{46}N_5O_7Si_2^+$ $[M+H]^+$: 608.2930; found: 608.2935.

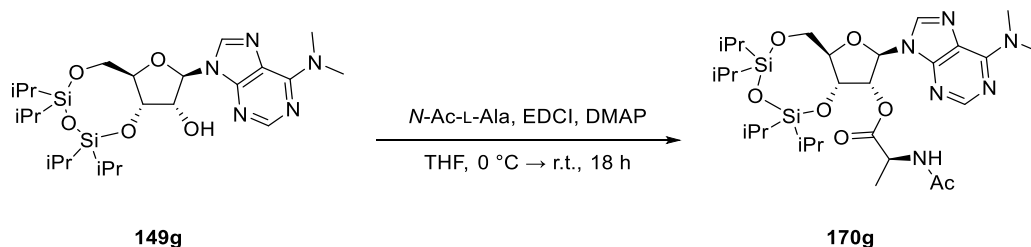
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.16 (s, 1H, H^1), 8.93 (s, 1H, H^2), 8.30 (s, 1H, H^3), 6.11 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H^4), 6.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H^5), 5.94 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H^6), 5.22 – 5.12 (m, 1H, H^7), 4.83 – 4.71 (m, 1H, H^8), 4.25 – 4.15 (m, 1H, H^{9a}), 4.09 – 3.99 (m, 2H, $H^{9b,10}$), 2.02 (d, J = 1.4 Hz, 3H, H^{Ac-CH_3}), 1.50 (dd, J = 8.9, 7.1 Hz, 3H, H^{11}), 1.13 – 0.98 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.2 (C^{12}), 169.7 (C^{Ac-CO}), 152.9 (C^2), 150.5 (C^{13}), 149.2 (C^1), 144.3 (C^3), 135.0 (C^{14}), 87.7 (C^4), 82.0 (C^{10}), 76.1 (C^6), 68.6 (C^7), 59.8 (C^9), 48.2 (C^8), 23.3 (C^{Ac-CH_3}), 19.1 (C^{11}), 17.5 – 16.9 (8C, C^{iPr-CH_3}), 13.5 – 12.6 (4C, C^{iPr-CH_2}).

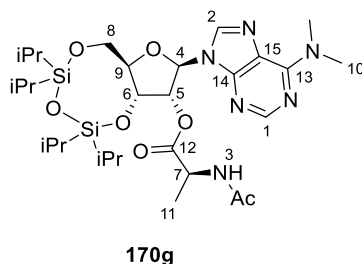
R_f: 0.14 (EtOAc/MeOH 98:2).

Experimental

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-8-(6-(dimethylamino)-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyl tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl acetyl-L-alaninate (**170g**)



N-Ac-L-Alanine (244 mg, 1.86 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (20 mL). The mixture was cooled to 0 °C and EDCI-HCl (392 mg, 2.05 mmol, 1.10 equiv.) was added. After 15 minutes, **149g** (1.00 g, 1.84 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (341 mg, 2.79 mmol, 1.50 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t. and stirred overnight and was subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (EtOAc 100 %) to give compound **170g** as white foam (816 mg, 1.25 mmol, 68 %).



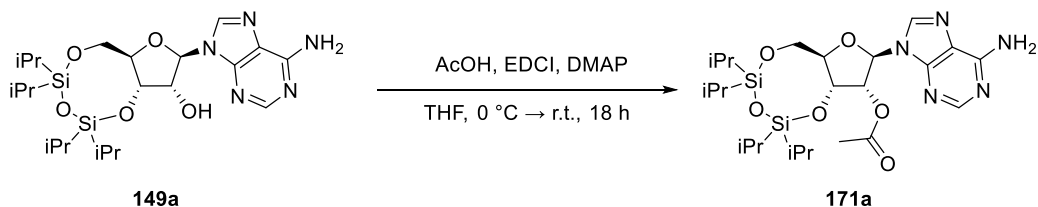
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_7\text{Si}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 651.3352; found 651.3358.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, H^1), 7.86 (s, 1H, H^2), 6.10 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H^3), 5.99 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H^4), 5.88 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H^5), 5.21 (dd, $J = 8.8, 5.3$ Hz, 1H, H^6), 4.75 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H, H^7), 4.21 – 4.11 (m, 1H, H^{8a}), 4.05 – 3.95 (m, 2H, $\text{H}^{8b,9}$), 3.53 – 3.48 (m, 6H, H^{10}), 2.01 (s, 3H, $\text{H}^{\text{Ac-CH}_3}$), 1.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H^{11}), 1.13 – 0.91 (m, 28H, H^{iPr}).

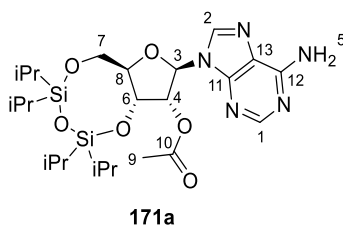
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.1 (C^{12}), 169.7 ($\text{C}^{\text{Ac-CO}}$), 155.1 (C^{13}), 152.7 (C^1), 149.8 (C^{14}), 137.1 (C^2), 120.9 (C^{15}), 87.5 (C^4), 81.9 (C^9), 69.0 (C^6), 60.3 (C^8), 48.2 (C^7), 38.8 (C^{10}), 23.3 ($\text{C}^{\text{Ac-CH}_3}$), 19.2 (C^{11}), 17.6 – 16.9 (8C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 13.5 – 12.6 (4C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

R_f: 0.29 (EtOAc 100 %).

(6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*b*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl acetate (**171a**)



Acetic acid (57.2 μ L, 1.00 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF and the solution was cooled to 0 $^{\circ}$ C. EDCI \cdot HCl (211 mg, 1.10 mmol, 1.10 equiv.) was added and the resulting mixture was stirred for 15 min. TIPDS-protected adenosine **149a** (510 mg, 1.00 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (183 mg, 1.50 mmol, 1.50 equiv.) were added and the suspension was stirred for 18 h at r.t. until TLC analysis confirmed full conversion of the starting material. All volatiles were removed under diminished pressure and the residue was purified *via* flash column chromatography (EtOAc 100 %). Ester **171a** (515 mg, 933 μ mol, 93 %) was obtained as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{24}H_{42}N_5O_6Si_2^+$ $[M+H]^+$: 552.2668; found: 552.2668.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H¹), 7.98 (s, 1H, H²), 6.03 (s, 1H, H³), 5.77 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H⁴), 5.72 (s, 2H, H⁵), 5.06 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H⁶), 4.15 (t, J = 15.1 Hz, 1H, H^{7a}), 4.03 (d, J = 13.4 Hz, 2H, H^{7b,8}), 2.17 (s, 3H, H⁹), 1.06 (ddd, J = 21.6, 12.4, 5.9 Hz, 28H, H^{iPr}).

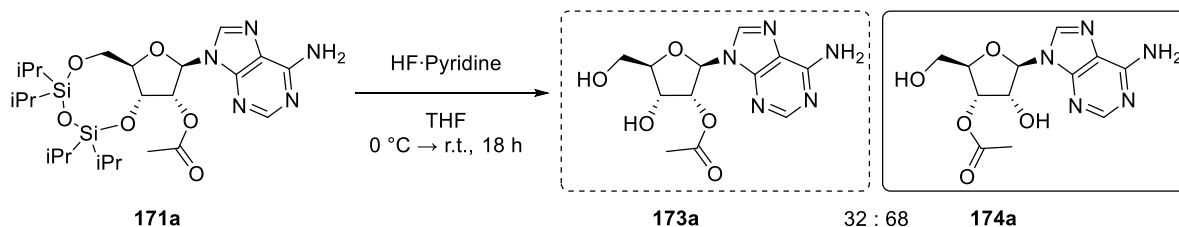
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 169.5 (C¹⁰), 155.6 (C¹¹), 153.3 (C¹), 149.3 (C¹²), 139.3 (C²), 120.4 (C¹³), 87.5 (C³), 82.2 (C⁸), 75.8 (C⁴), 69.1 (C⁶), 60.7 (C⁷), 20.9 (C⁹), 17.6 – 12.9 (12C, C^{iPr}).

R_f: 0.49 (EtOAc/MeOH 98:2).

Experimental

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetate (**173a**)

(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetate (**174a**)

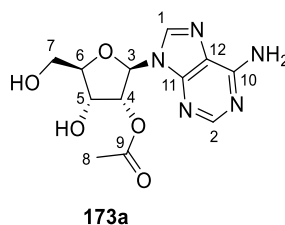


TIPDS-protected Ester **171a** (214 mg, 389 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (2.3 mL) in a PTFE vessel. HF·pyridine (70 wt.%; 200 μL , 7.75 mmol, 20.0 equiv.) was added and the mixture was stirred for 18 h until TLC analysis confirmed full conversion. Excess fluoride was destroyed by adding TMS-OMe (3.0 mL) and the reaction was further stirred for 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the colourless residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/MeOH 98:2) to receive a mixture of 2'- and 3'-acetyl adenosine **173a** and **174a** (102 mg, 331 μmol , 85 % sum of the two regioisomers). The ratio of the 2'- to 3'-isomer was 1:2 according to ^1H -NMR integrals, however the ratio was subject to shift in solution in favour of the 3'-regioisomer.

HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 310.1146.; found: 310.1145.

R_f: 0.08 (No separation between isomers observed; EtOAc/MeOH 98:2).

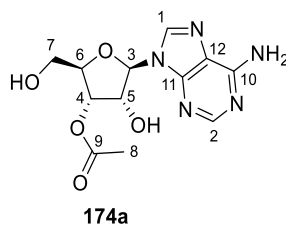
2'-Isomer **173a**:



^1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H), 8.18 (s, 1H, H^1), 5.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H^2), 5.40 (dd, $J = 5.4, 1.9$ Hz, 1H, H^3), 4.98 (dd, $J = 7.3, 5.4$ Hz, 1H, H^4), 4.28 (q, $J = 2.3$ Hz, 1H, H^5), 4.19 (q, $J = 2.8$ Hz, 1H, H^6), 3.90 (td, $J = 12.9, 2.4$ Hz, 1H, H^{7a}), 3.78 (dt, $J = 12.6, 2.5$ Hz, 1H, H^{7b}), 2.17 (s, 3H, H^8).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = δ 170.6 (C9), 156.0 (C10), 152.0 (C2), 148.4 (C11), 140.4 (C1), 119.5 (C5), 89.3 (C3), 84.6 (C6), 73.7 (C4), 72.4 (C5), 61.8 (C7), 19.3 (C8).

3'-Isomer **174a**:

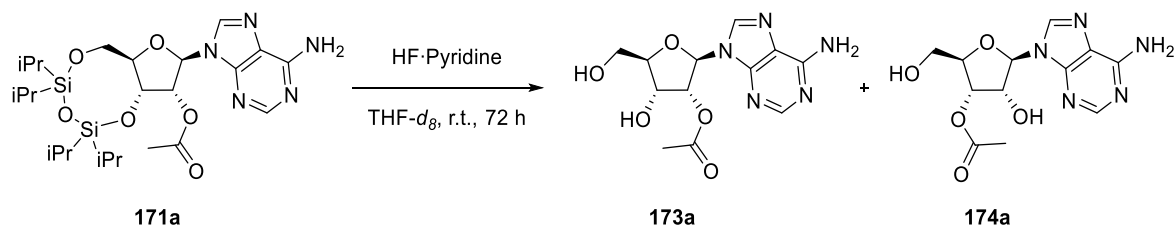


^1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, H¹), 8.18 (s, 1H, H²), 6.20 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H³), 5.67 (dd, J = 6.0, 5.2 Hz, 1H, H⁴), 4.64 (dd, J = 5.2, 3.4 Hz, 1H, H⁵), 4.19 (q, J = 2.8 Hz, 1H, H⁶), 3.90 (td, J = 12.9, 2.4 Hz, 1H, H^{7a}), 3.78 (dt, J = 12.6, 2.5 Hz, 1H, H^{7b}), 2.08 (s, 3H, H⁸).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 170.2 (C9), 156.0 (C10), 152.1 (C2), 148.5 (C11), 140.2 (C1), 119.3 (C5), 87.0 (C3), 86.7 (C6), 75.6 (C4), 69.4 (C5), 61.5 (C7), 19.0 (C8).

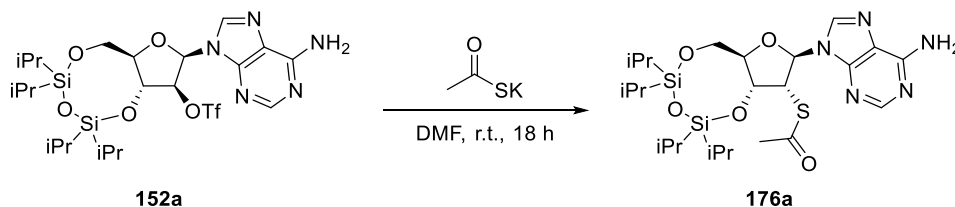
Experimental

NMR Experiment (**173a**, **174a**)

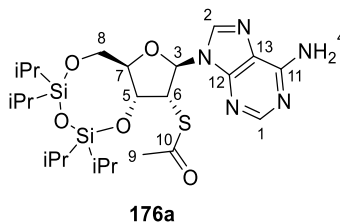


Ester **171a** (10.5 mg, 19.0 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF-*d*₈ (0.75 mL) in a NMR tube equipped with a PTFE inlet. HF·pyridine (70 wt.%; 7.90 μL , 381 μmol , 20.0 equiv.) was added and the reaction progress was tracked with repeated ¹H-NMR analysis at 20 °C. For the first hour spectra were recorded every 10 min, for the next 2 h every 30 min, for the next 9 h every 1 h and after that every 3 h.

S-((6a*R*,8*R*,9*R*,9a*R*)-8-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl) ethanethioate (**176a**)



152a (2.48 g, 3.87 mmol, 1.00 equiv.) and potassium thioacetate (685 mg, 6.00 mmol, 1.55 equiv.) were dissolved in dry DMF (20 mL) and stirred for 18 h. EtOAc (100 mL) was added and the solution was washed with water, sat. aqueous lithium chloride solution and sat. aqueous NaCl solution. The organic phase was dried over Na₂SO₄, concentrated *in vacuo* and the residue was purified *via* column chromatography (cHex/EtOAc 1:2) to yield **176a** (2.07 g, 3.64 mmol, 94 %) as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₄H₄₂N₅O₅SSi₂⁺ [M+H]⁺: 568.2440; found: 568.2455.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.31 (s, 1H, H¹), 7.95 (s, 1H, H²), 6.06 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H³), 5.67 (d, J = 12.1 Hz, 2H, H⁴), 5.31 – 5.23 (m, 1H, H⁵), 4.70 (dd, J = 7.5, 4.7 Hz, 1H, H⁶), 4.10 – 3.99 (m, 3H, H^{7,8}), 2.32 (s, 3H, H⁹), 1.18 – 0.92 (m, 28H, H^{iPr}).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 195.0 (C¹⁰), 155.6 (C¹¹), 153.2 (C¹), 149.8 (C¹²), 139.8 (C²), 120.3 (C¹³), 88.8 (C³), 85.0 (C⁷), 71.5 (C⁵), 62.8 (C⁸), 51.6 (C⁶), 30.7 (C⁹), 17.6 -17.1 (8C, C^{iPr-CH₃}), 13.4 - 12.8 (4C, C^{iPr-CH}).

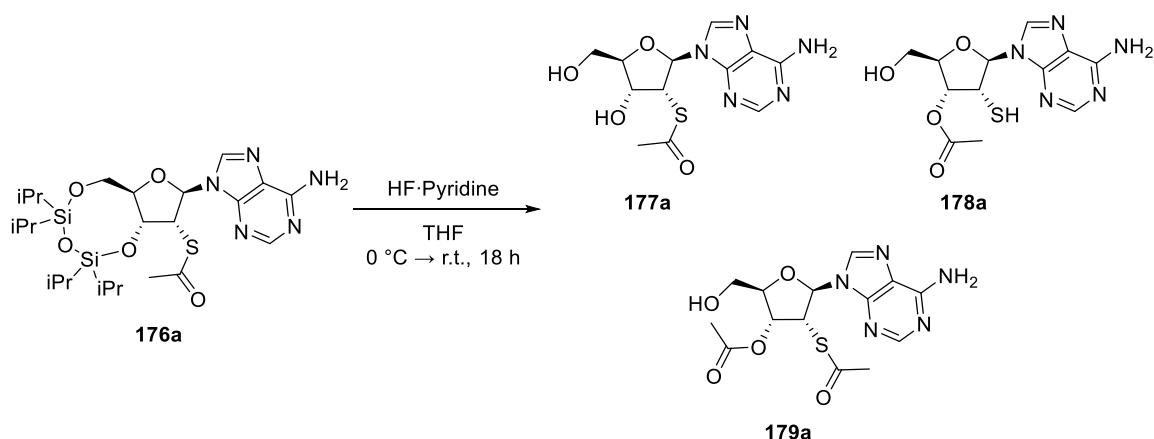
R_f: 0.13 (cHex/EtOAc 1:2).

Experimental

S-(*(2R,3R,4R,5R)*-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl) ethanethioate (**177a**)

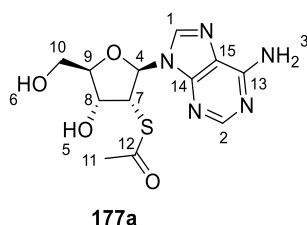
(*2R,3R,4R,5R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)-4-mercaptotetrahydrofuran-3-yl acetate (**178a**)

(*2R,3R,4R,5R*)-4-(acetylthio)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetate (**179a**)



176a (400 mg, 704 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (10 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 370 μ L, 14.5 μ mol, 20.0 equiv.) was added, the reaction was allowed to warm to r.t. and was stirred for 18 h until complete conversion was indicated by TLC analysis. Excess fluoride was quenched by addition of TMS-OMe (3.0 mL) and after 30 min the volatiles were removed under diminished pressure. The residue was purified by flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 70:30) to yield three different products **177a** (16.0 mg, 49.3 μ mol, 7 %), **178a** (65.9 μ g, 203 μ mol, 29 %) and **179a** (56.1 mg, 153 μ mol, 22 %).

2'-Isomer **177a**:



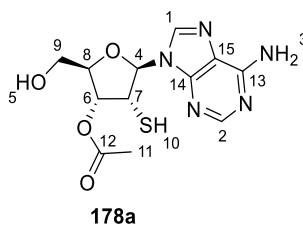
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{12}H_{16}N_5O_4S^+$ $[M+H]^+$: 326.0918; found: 326.0921.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.32 (s, 1H, H¹), 8.14 (s, 1H, H²), 7.36 (s, 2H, H³), 6.10 (d, J = 9.1, 1H, H⁴), 6.03 (d, J = 4.9, 1H, H⁵), 5.77 (s, 1H, H⁶), 4.76 (dd, J = 9.2, 5.0, 1H, H⁷), 4.36 – 4.33 (m, 1H, H⁸), 4.10 – 4.07 (m, 1H, H⁹), 3.76 – 3.57 (m, 2H, H¹⁰), 2.19 (s, 3H, H¹¹).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 193.71 (C¹²), 156.15 (C¹³), 152.37 (C²), 149.16 (C¹⁴), 139.74 (C¹), 119.24 (C¹⁵), 88.29 (C⁹), 87.74 (C⁴), 72.34 (C⁸), 61.96 (C¹⁰), 50.07 (C⁷), 30.26 (C¹¹).

R_f: 0.37 (EtOAc/MeOH 95:5).

3'-Isomer **178a**:



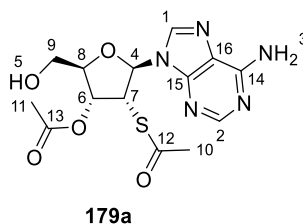
HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₂H₁₆N₅O₄S⁺ [M+H]⁺: 326.0918; found: 326.0921.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.37 (s, 1H, H¹), 8.15 (s, 1H, H²), 7.42 (s, 2H, H³), 5.97 (d, J = 9.4, 1H, H⁴), 5.65 (t, J = 6.1, 1H, H⁵), 5.38 (dd, J = 5.4, 1.1, 1H, H⁶), 4.40 (td, J = 9.7, 5.3, 1H, H⁷), 4.15 (td, J = 3.5, 1.1, 1H, H⁸), 3.65 (dddd, J = 19.3, 11.9, 7.7, 3.7, 2H, H⁹), 3.05 (d, J = 9.9, 1H, H¹⁰), 2.17 (s, 3H, H¹¹).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 169.6 (C¹²), 156.3 (C¹³), 152.6 (C²), 149.21 (C¹⁴), 139.8 (C¹), 119.3 (C¹⁵), 89.7 (C¹²), 84.9 (C⁸), 75.2 (C⁶), 61.6 (C⁹), 42.5 (C⁷), 20.7 (C¹¹).

R_f: 0.37 (EtOAc/MeOH 95:5).

2'- and 3'-acetylated **179a**:



Experimental

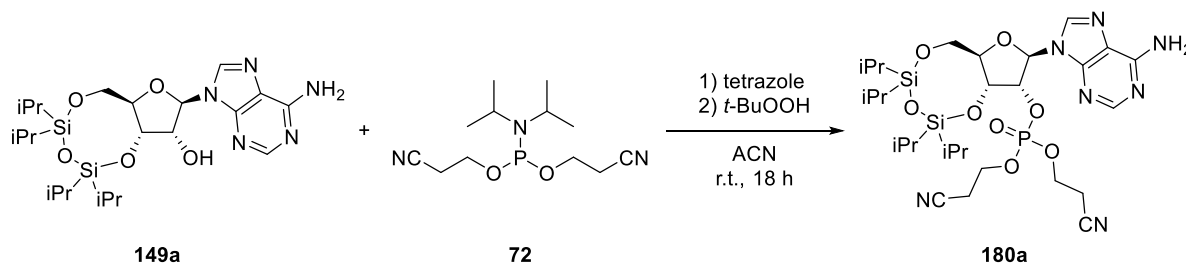
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{14}H_{18}N_5O_5S^+$ $[M+H]^+$: 368.1023; found: 368.1021.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.35 (s, 1H, H¹), 8.15 (s, 1H, H²), 7.44 (s, 2H, H³), 6.15 (d, J = 9.4, 1H, H⁴), 6.02 – 5.98 (m, 1H, H⁵), 5.46 (d, J = 5.4, 1H, H⁶), 4.95 (dd, J = 9.4, 5.4, 1H, H⁷), 4.24 (q, J = 2.5, 1H, H⁸), 3.80 – 3.56 (m, 2H, H⁹), 2.22 (s, 3H, H¹⁰), 2.13 (s, 3H, H¹¹).

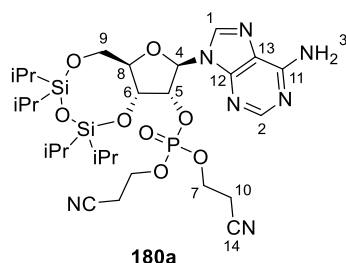
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 192.6 (C¹²), 169.5 (C¹³), 156.3 (C¹⁴), 152.6 (C²), 149.0 (C¹⁵), 139.5 (C¹), 119.2 (C¹⁶), 87.1 (C⁴), 85.6 (C⁸), 75.0 (C⁶), 61.7 (C⁹), 42.5 (C⁷), 30.2 (C¹⁰), 20.6 (C¹¹).

R_f 0.41 (EtOAc/MeOH 95:5).

(6aR,8R,9R,9aR)-8-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-*b*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl bis(2-cyanoethyl) phosphate (**180a**)



To 3',5'-TIPDS adenosine **149a** (510 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv.) and molecular sieves (1 g, 3 Å) was dry ACN (25 mL) added. Phosphoramidite **72** (298 mg, 1.10 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred at r.t. for 30 minutes. Then tetrazole (17.8 mL, 8.00 mmol, 8.0 equiv.) was added and the reaction was stirred overnight. After addition of *t*-BuOOH (0.7 mL, 6 M in decan) the reaction was further stirred for 1.5 h before it was filtered over celite. The residue was dissolved in water and was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with water and a saturated aqueous NaCl solution. After drying over Na₂SO₄ the solvent was removed *in vacuo* and purification using flash chromatography (EtOAc 100 % → EtOAc/MeOH 1:1) yielded **180a** (152 mg, 230 μmol, 23 %) as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₂₈H₄₇N₇O₈PSi₂⁺ [M+H]⁺: 696.2757; found: 696.2760.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.20 (s, 1H, H¹), 8.05 (s, 1H, H²), 7.40 (s, 2H, H³), 6.18 (s, 1H, H⁴), 5.45 (dd, *J* = 8.4, 5.0 Hz, 1H, H⁵), 5.11 (ddd, *J* = 9.2, 5.0, 1.9 Hz, 1H, H⁶), 4.34 – 4.20 (m, 4H, H⁷), 4.13 – 4.00 (m, 2H, H^{8,9a}), 3.94 (dd, *J* = 13.2, 2.5 Hz, 1H, H^{9b}), 2.96 (dt, *J* = 11.7, 5.9 Hz, 4H, H¹⁰), 1.15 – 0.93 (m, 28H, H^{iPr}).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.6 (C¹¹), 153.0 (C²), 148.9 (C¹²), 140.1 (C¹), 119.7 (C¹³), 118.5 (d, *J* = 25.3 Hz, C¹⁴), 88.0 (C⁴), 80.6 (C⁸), 79.7 (C⁵), 68.7 (C⁶), 63.2 (t, *J* = 5.6 Hz, C⁷), 60.1 (C⁹), 19.5 (t, *J* = 7.6 Hz, C¹⁰), 18.0 – 17.0 (8C, C^{iPr-CH₃}), 13.2 – 12.1 (4C, C^{iPr-CH}).

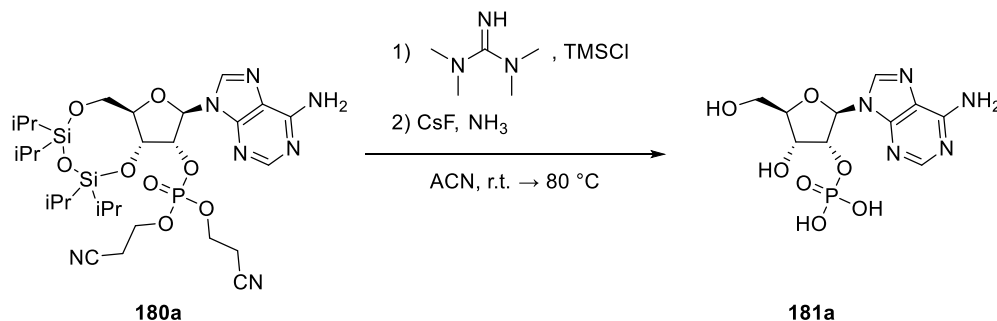
³¹P{¹H}-NMR (162 MHz, DMSO): δ [ppm] = -2.64.

Experimental

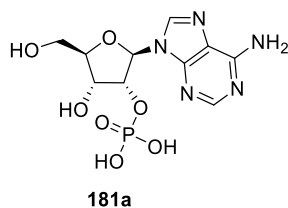
^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO): δ [ppm] = -2.67 (p, $J = 7.5$ Hz).

R_f 0.05 (EtOAc 100 %).

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl dihydrogen phosphate (**181a**)



180a (120 mg, 173 μmol , 1.0 equiv.) was dissolved in dry ACN (6 mL) and tetramethyl guanidine (108 μL , 862 μmol , 5.0 equiv.) and TMS-Cl (87.6 μL , 690 μmol , 4.0 equiv.) were added. The reaction was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in dry MeOH (6 mL). Ammonia in methanol (7M, 1 mL) was added and after stirring for 5 minutes CsF (131 mg, 862 μmol , 5.0 equiv.) was added. The reaction was heated at 80 °C for 24 h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product **181a** was obtained as a white solid.



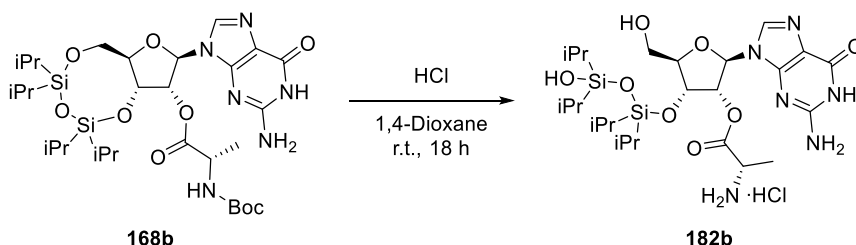
HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$ [M-H] $^-$: 346.0558; found: 346.0543.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - NMR (162 MHz, D_2O): δ [ppm] = 0.13 (s).

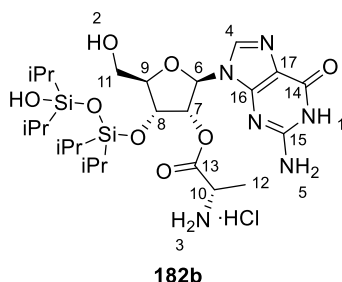
^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O): δ [ppm] = 0.13 (d, J = 8.9 Hz).

Experimental

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-((3-hydroxy-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxaneyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate hydrochloride (182b)



Compound **168b** (209 mg, 300 μ mol, 1.00 equiv.) was suspended in 1,4-dioxane (6 mL). HCl in 1,4-dioxane (4 M, 2.00 mL) was added and the mixture was stirred for 18 h. After TLC analysis indicated full conversion, all volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified *via* flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 1:1). The *N*-Boc-deprotected alanine-guanosine **182b** with a partially hydrolysed silyl ether could be isolated (108 mg, 165 μ mol, 55 %) as a white solid.



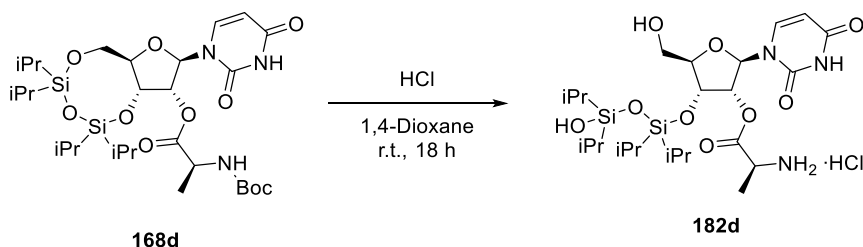
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{25}H_{47}N_6O_8Si_2^+$ $[M+H]^+$: 615.2988; found: 615.2993.

1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.14 (d, J = 5.5 Hz, 1H, $H^{1/2}$), 8.50 (s, 3H, H^3), 8.3 – 8.1 (m, 1H, H^4), 7.32 (s, 1H, $H^{1/2}$), 6.80 (s, 2H, H^5), 5.97 (d, J = 5.6 Hz, H^6), 5.77 – 5.65 (m, H^7), 4.79 – 4.66 (m, 1H, H^8), 4.11 (dq, J = 5.3, 3.2 Hz, 1H, H^9), 4.08 – 3.98 (m, 1H, H^{10}), 3.71 – 3.62 (m, 1H, H^{11a}), 3.58 (dd, J = 12.2, 3.3 Hz, 1H, H^{11b}), 1.37 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H^{12}), 1.00 – 0.82 (m, 28H, H^{iPr}).

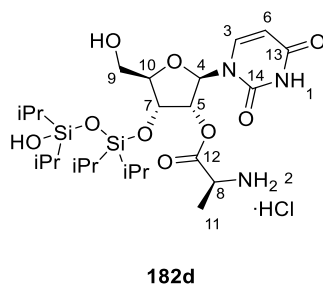
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 170.0 (C^{13}), 154.9 (C^{14}), 153.6 (C^{15}), 151.0 (C^{16}), 135.9 (C^4), 107.9 (C^{17}), 86.7 (C^9), 85.1 (C^6), 76.7 (C^7), 71.0 (C^8), 61.0 (C^{11}), 48.2 (C^{10}), 18.0 – 17.1 (8C, C^{iPr-CH_3}), 16.1 (C^{12}), 14.0 – 12.3 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f 0.47 (EtOAc).

(2R,3R,4R,5R)-2-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-((3-hydroxy-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxaneyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate hydrochloride (**182d**)



Compound **168d** (197 mg, 300 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in 1,4-dioxane (6 mL). HCl in 1,4-dioxane (4 M, 2.00 mL) was added and the mixture was stirred for 18 h. After TLC analysis indicated full conversion, all volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified *via* flash column chromatography (EtOAc 100 % \rightarrow EtOAc/MeOH 1:1). The Boc-deprotected alanine-uridine **182d** (99.3 mg, 162 μmol , 54 %) with a partially hydrolysed silyl ether could be obtained as a white solid.



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_9\text{Si}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 576.2767; found: 576.2770.

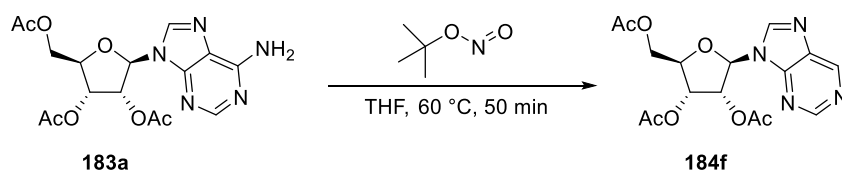
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.41 (d, J = 14.6 Hz, 1H, H^1), 8.60 (s, 3H, H^2), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H^3), 5.68 (dd, J = 12.7, 7.9 Hz, 2H, $\text{H}^{4/5}$), 5.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H^6), 4.53 (dd, J = 9.3, 5.1 Hz, 1H, H^7), 4.20 – 4.05 (m, 2H, $\text{H}^{8,9a}$), 4.01 – 3.88 (m, 2H, $\text{H}^{9b,10}$), 1.45 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H^{11}), 1.07 – 0.86 (m, 28H, H^{iPr}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 169.0 (C^{12}), 163.2 (C^{13}), 150.1 (C^{14}), 140.6 (C^3), 101.4 (C^6), 88.6 (C^4), 81.0 (C^{10}), 75.7 (C^5), 67.8 (C^7), 59.7 (C^9), 47.8 (C^8), 17.5 – 17.0 (8C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}_3}$), 16.8 (C^{11}), 12.9 – 11.5 (4C, $\text{C}^{\text{iPr-CH}}$).

R_f : 0.44 (EtOAc).

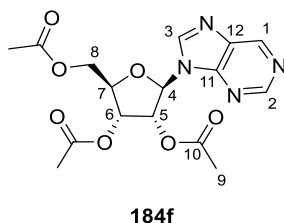
Experimental

(2R,3R,4R,5R)-2-(acetoxymethyl)-5-(9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diyl diacetate (**184f**)



Ac-Nebularine was prepared similarly to HERBERT *et al.*^[2]

Acetyl-protected adenosine **183a** (3.93 g, 10.0 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (120 mL) at 60 °C. TBN (23.8 mL, 200 mmol, 20.0 equiv.) was added and the yellow solution gradually turned red. The solution was stirred at 60 °C for 50 min before concentration of the reaction *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % → EtOAc/MeOH 98:2) yielding Ac-nebularine **184f** (4.00 g, 5.30 mmol, 53%) as a white solid.



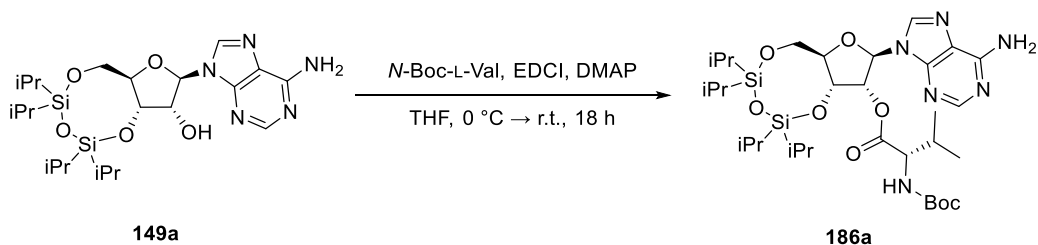
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{16}H_{19}N_4O_7^+$ [M+H]⁺: 379.1248; found: 379.1247.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.17 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H¹), 9.00 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H²), 8.25 (s, 1H, H³), 6.25 (dd, J = 5.1, 1.0 Hz, 1H, H⁴), 5.97 (td, J = 5.3, 1.1 Hz, 1H, H⁵), 5.68 (td, J = 5.1, 1.3 Hz, 1H, H⁶), 4.50 – 4.46 (m, 1H, H⁷), 4.45 – 4.32 (m, 2H, H⁸), 2.15 (s, J = 1.5 Hz, 3H, H⁹), 2.11 (s, J = 1.6 Hz, 3H, H⁹), 2.07 (s, J = 1.5 Hz, 3H, H⁹).

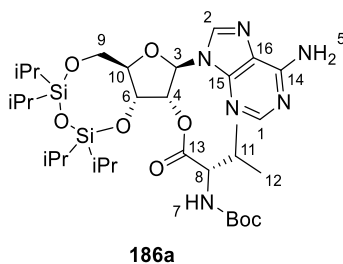
¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4 (C¹⁰), 169.7 (C¹⁰), 169.5 (C¹⁰), 153.0 (C²), 151.0 (C¹¹), 149.3 (C¹), 143.7 (C³), 134.8 (C¹²), 86.5 (C⁴), 80.5 (C⁷), 73.2 (C⁵), 70.6 (C⁶), 63.1 (C⁸), 20.9 (C⁹), 20.7 (C⁹), 20.5 (C⁹).

R_f: 0.14 (EtOAc).

(6aR,8R,9R,9aR)-8-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-*b*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-valinate (**186a**)



N-Boc-L-Valine (1.09 g, 5.00 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (54 mL). The solution was cooled to 0 °C and EDCI·HCl (1.05 g, 5.50 mmol, 1.10 equiv.) was added. After 15 min, **149a** (2.55 g, 5.00 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (920 mg, 7.50 mmol, 1.50 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t. and stirred overnight before subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:2) to give compound **186a** as white foam (2.76 g, 3.90 mmol, 78 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{32}H_{57}N_6O_8Si_2^+$ $[M+H]^+$: 709.3771; found: 709.3773.

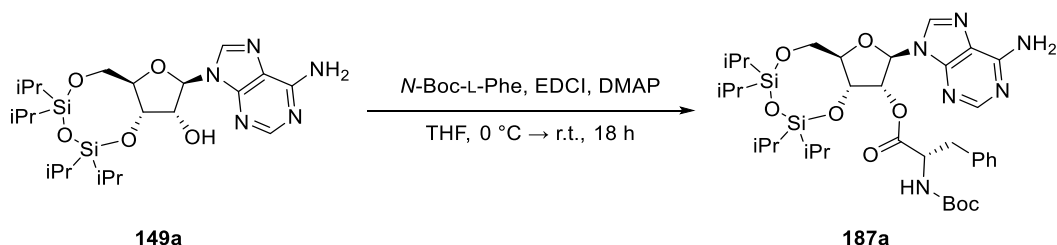
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.28 (s, 1H, H¹), 7.99 (s, 1H, H²), 5.99 (s, 1H, H³), 5.88 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H⁴), 5.59 (s, 2H, H⁵), 5.19 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H⁶), 5.12 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁷), 4.39 (dd, J = 9.0, 4.4 Hz, 1H, H⁸), 4.20 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H^{9a}), 4.09 – 3.97 (m, 2H, H^{9b,10}), 2.20 (ddd, J = 13.0, 6.5, 3.9 Hz, 1H, H¹¹), 1.44 (s, 9H, H^{Boc}), 1.10 – 1.00 (m, 34H, H¹², iPr).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.3 (C¹³), 155.6 (Boc), 155.3 (C¹⁴), 153.1 (C¹), 149.2 (C¹⁵), 139.7 (C²), 120.3 (C¹⁶), 87.9 (C³), 81.7 (C¹⁰), 79.9 (Boc), 76.1 (C⁴), 68.2 (C⁶), 59.6 (C⁹), 58.6 (C⁸), 31.6 (C¹¹), 28.3 (Boc), 17.7 - 16.7 (9C, C^{12/iPr-CH3}), 13.4 - 12.3 (4C, C^{iPr-CH}).

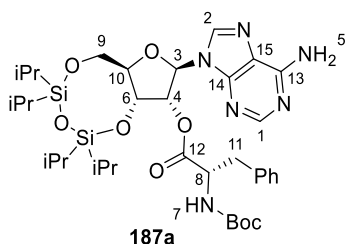
R_f: 0.21 (cHex/EtOAc 1:2).

Experimental

(6aR,8R,9R,9aR)-8-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalaninate
(187a)



N-Boc-L-Phenylalanine (1.33 g, 5.00 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (54 mL). The solution was cooled to 0 °C and EDCI·HCl (1.05 g, 5.50 mmol, 1.10 equiv.) was added. After 15 min, **149a** (2.55 g, 5.00 mmol, 1.00 equiv.) and DMAP (920 mg, 7.50 mmol, 1.50 equiv.) were added. The reaction mixture was allowed to warm to r.t., stirred overnight and subsequently concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography (cHex/EtOAc 1:2) to give compound **187a** as white foam (3.22 g, 4.25 mmol, 85 %).



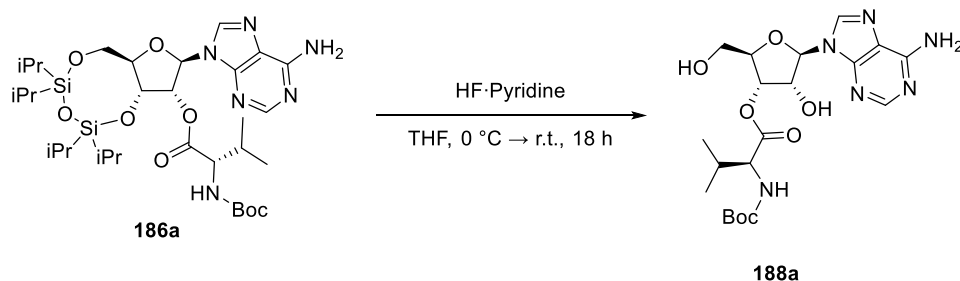
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{36}H_{57}N_6O_8Si_2^+ [M+H]^+$: 757.3771; found: 757.3783.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H^1), 7.85 (s, 1H, H^2), 7.29 – 7.07 (m, 5H, Ph), 5.84 (s, 1H, H^3), 5.81 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H^4), 5.65 (s, 2H, H^5), 5.24 (dd, J = 8.9, 5.3 Hz, 1H, H^6), 4.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H^7), 4.67 (td, J = 8.1, 4.8 Hz, 1H, H^8), 4.19 – 4.03 (m, 1H, H^{9a}), 4.00 – 3.88 (m, 2H, $H^{9b,10}$), 3.21 (dd, J = 14.1, 5.0 Hz, 1H, H^{11a}), 2.91 (dd, J = 14.1, 7.8 Hz, 1H, H^{11b}), 1.31 (s, 9H, H^{Boc}), 1.10 – 0.92 (m, 29H, H^{iPr}).

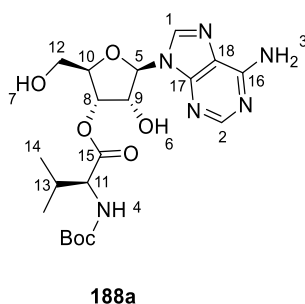
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.1 (C^{12}), 155.6 (C^{13}), 155.2 (C^{Boc-CO}), 153.3 (C^1), 149.3 (C^{14}), 139.9 (C^2), 136.2 (C^{Ph}), 129.4 (C^{Ph}), 128.7 (C^{Ph}), 127.2 (C^{Ph}), 120.5 (C^{15}), 87.8 (C^3), 81.9 (C^{10}), 80.2 ($C^{Boc-quart}$), 76.6 (C^4), 68.9 (C^6), 60.2 (C^9), 54.5 (C^8), 38.8 (C^{11}), 28.4 (C^{Boc-CH_3}), 17.6 – 17.0 (8C, C^{iPr-CH_3}), 13.5 – 12.7 (4C, C^{iPr-CH}).

R_f: 0.28 (cHex/EtOAc 1:2).

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-valinate (**188a**)



186a (268 mg, 380 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in THF (2.3 mL) and cooled down to 0 $^\circ\text{C}$. HF·pyridine (70 wt.%; 200 μL , 7.55 mmol, 20.00 equiv.) was added and the reaction was allowed to warm up to r.t. overnight. After quenching with MeO-TMS (3.0 mL) it was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (EtOAc 100 %) to give compound **188a** as white foam (170 mg, 367 μmol , 97 %).



HR-MS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 467.2249; found: 467.2252.

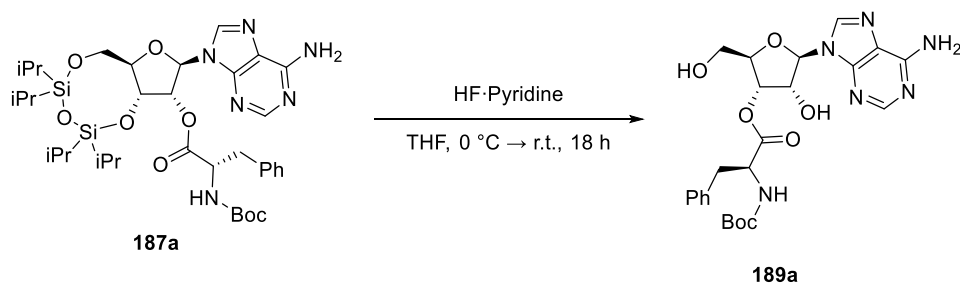
^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.38 (s, 1H, H^1), 8.15 (s, 1H, H^2), 7.38 (s, 2H, H^3), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H^4), 5.93 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H^5), 5.75 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H^6), 5.61 (dd, $J = 7.2$, 4.7 Hz, 1H, H^7), 5.27 (dd, $J = 5.2$, 1.8 Hz, 1H, H^8), 4.90 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H^9), 4.03 (ddd, $J = 14.2$, 7.3, 2.2 Hz, 2H, $\text{H}^{10,11}$), 3.75 – 3.54 (m, 2H, H^{12}), 2.13 (p, $J = 6.7$ Hz, 1H, H^{13}), 1.38 (d, $J = 25.5$ Hz, 9H, H^{Boc}), 0.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, H^{14}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 171.0 (C^{15}), 156.2 (C^{16}), 155.9 ($\text{C}^{\text{Boc-CO}}$), 152.5 (C^2), 149.2 (C^{17}), 139.6 (C^1), 119.2 (C^{18}), 87.2 (C^5), 83.8 (C^{10}), 78.3 ($\text{C}^{\text{Boc-quart}}$), 73.9 (C^8), 71.9 (C^9), 61.5 (C^{12}), 59.5 (C^{11}), 29.8 (C^{13}), 28.2 ($\text{C}^{\text{Boc-CH}_3}$), 19.1 (C^{14}).

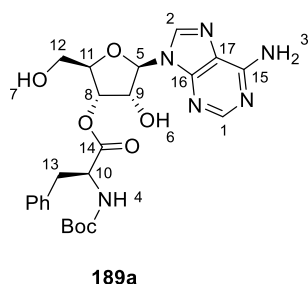
R_f: 0.07 (EtOAc 100%).

Experimental

(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalaninate (**189a**)



187a (269 mg, 355 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in THF (2.1 mL). The reaction was cooled down to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 180 μ L, 7.11 mmol, 20.0 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm up to r.t. and stirred for 18 h before it was quenched with MeO-TMS (3.0 mL). It was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (EtOAc 100 %) to give compound **189a** as white foam (171 mg, 334 μ mol, 94 %).



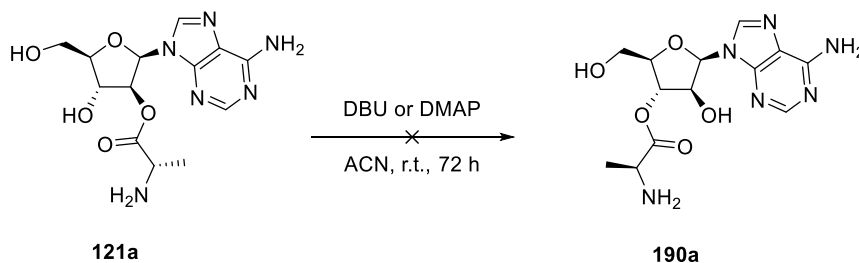
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{24}H_{31}N_6O_7^+$ [M+H] $^+$: 515.2249; found: 515.2249.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.37 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H 1), 8.15 (s, 1H, H 2), 7.44 – 7.35 (m, 3H, H 3,4), 7.35 – 7.26 (m, 3H, H $^{\text{Ph}}$), 7.21 (dtt, J = 17.7, 7.3, 3.8 Hz, 2H, H $^{\text{Ph}}$), 5.91 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H 5), 5.76 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H 6), 5.64 (dd, J = 7.4, 4.6 Hz, 1H, H 7), 5.26 (dd, J = 5.3, 1.8 Hz, 1H, H 8), 4.90 (td, J = 7.2, 5.3 Hz, 1H, H 9), 4.33 (ddd, J = 9.9, 8.2, 5.2 Hz, 1H, H 10), 3.97 (p, J = 2.8 Hz, 1H, H 11), 3.66 (dt, J = 12.2, 4.1 Hz, 1H, H 12a), 3.57 (ddd, J = 11.7, 7.5, 3.3 Hz, 1H, H 12b), 3.16 – 3.02 (m, 1H, H 13a), 2.94 (dd, J = 13.8, 10.0 Hz, 1H, H 13b), 1.34 (s, 9H, H $^{\text{Boc}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 171.3 (C 14), 156.3 (C 15), 155.5 (C $^{\text{Boc-CO}}$), 152.5 (C 2), 149.2 (C 16), 139.7 (C 1), 137.6 (C $^{\text{Ph-quart}}$), 129.2 (C $^{\text{Ph}}$), 128.3 (C $^{\text{Ph}}$), 126.5 (C $^{\text{Ph}}$), 119.3 (C 17), 87.2 (C 5), 83.7 (C 11), 78.4 (C $^{\text{Boc-quart}}$), 74.1 (C 8), 71.9 (C 9), 61.6 (C 12), 55.5 (C 10), 36.8 (C 13), 28.1 (C $^{\text{Boc-CH}_3}$).

R $_f$: 0.08 (EtOAc 100 %).

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**190a**)



Both methods listed below are modified literature procedures known to induce an acyl shift in similar substrates.^[1]

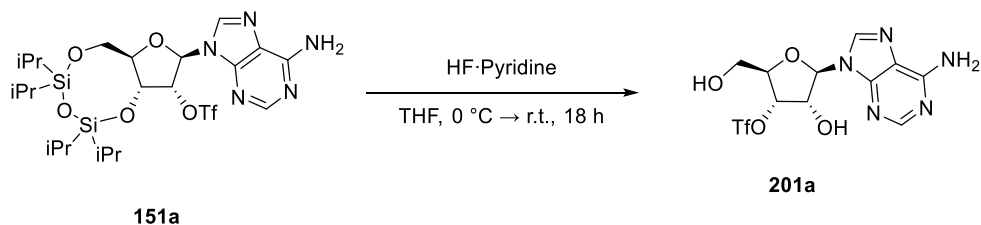
Method 1: Ester **121a** (15.7 mg, 46.4 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in ACN (800 μL) and either different amounts of DBU (3.50 μL , 23.2 μmol , 0.500 equiv.) up to (14.0 μL , 92.8 μmol , 2.00 equiv.) or DMAP (2.80 mg, 23.2 μmol , 0.500 equiv.) were added. The resulting solution was stirred at r.t. Aliquots of 10 μL were diluted in H_2O (990 μL) and subjected to UPLC-QTOF analysis in regular intervals.

Method 2: Ester **121a** (15.7 mg, 46.4 μmol , 1.00 equiv.) was dissolved in acetonitrile-*d*3 (750 μL) and DBU (3.50 μL , 23.5 μmol , 0.500 equiv.) or NEt_3 (3.20 μL , 23.2 μmol , 0.500 equiv.) were added. The resulting solution was subjected to ^1H -NMR analysis in regular intervals.

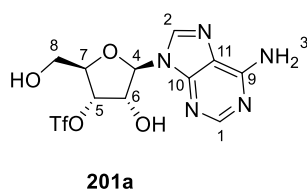
Neither method led to the observation of any kind of ester migration reaction, however degradation of the reactant **121a** to adenosine and adenine could be observed with prolonged time in solution.

Experimental

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl trifluoromethanesulfonate (201a)



Compound **151a** (2.63 g, 4.10 mmol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry THF (12 mL) and the solution was cooled to 0 °C. HF·pyridine (70 wt.%; 1.06 mL, 40.1 mmol, 10.0 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred for 18 h until TLC confirmed full conversion. Excess fluoride was quenched by adding TMS-OMe (10 mL) and stirring for an additional 30 min. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (cHex/EtOAc 4:1 → EtOAc 100 %). Compound **201a** (1.43 g, 3.57 mmol, 87 %) was obtained as a white foam.



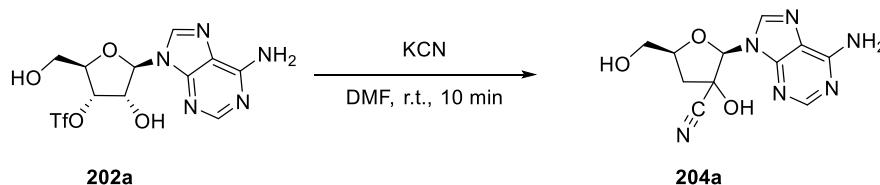
HR-MS (ESI): m/z calculated for $C_{11}H_{13}F_3N_5O_6S^+$ $[M+H]^+$: 400.0533; found: 400.0533.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): δ [ppm] = 8.24 (s, 1H, H^1), 8.13 (s, 1H, H^2), 6.50 (s, 2H, H^3), 6.31 (d, $J=5.8$, 1H, H^4), 5.87 (t, $J=5.3$, 1H, H^5), 4.68 (s, 1H, H^6), 4.23 (q, $J=2.3$, 1H, H^7), 3.78 (m, 2H, H^8).

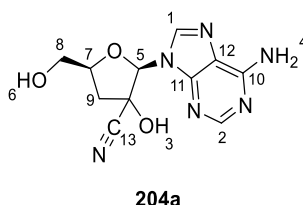
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CD_3CN): δ [ppm] = 156.6 (C^9), 152.3 (C^1), 149.6 (C^{10}), 141.7 (C^2), 121.3 (C^{11}), 88.0 (C^7), 87.3 (C^4), 87.1 (C^5), 70.4 (C^6), 62.3 (C^8).

R_f 0.22 (EtOAc 100 %).

(2*R*,5*S*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-carbonitrile (**204a**)



Triflate **202** (45.5 mg, 114 μ mol, 1.00 equiv.) was dissolved in dry DMF (4 mL). KCN (37.1 mg, 570 μ mol, 5.00 equiv.) was added and the solution was stirred at r.t. for 10 min. An aliquot was taken and quenched with basic aqueous NaClO solution. TLC analysis indicated full consumption of the starting material, the solution was diluted with 2 mL H₂O and excess cyanide was precipitated from the solution using FeCl₃ (100 mg). The mixture was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified *via* flash column chromatography (DCM 100 % \rightarrow DCM/MeOH 70:30) to obtain cyanhydrine **204a** (840 mg, 114 μ mol, 27 %) with minor impurities.



HR-MS (ESI): m/z calculated for C₁₁H₁₃N₆O₃⁺ [M+H]⁺: 277.1044; found: 277.1045.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.55 (s, 1H, H¹), 8.18 (s, 1H, H²), 7.76 (s, 1H, H³), 7.39 (d, J = 5.5, 2H, H⁴), 6.22 (s, 1H, H⁵), 5.34 (t, J = 5.3, 1H, H⁶), 4.42 (ddd, J = 11.3, 4.8, 2.7, 1H, H⁷), 3.76 (dddd, J = 70.6, 12.3, 5.5, 3.3, 2H, H⁸), 2.81 – 2.38 (m, 2H, H⁹).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.1 (C¹⁰), 152.8 (C²), 149.1 (C¹¹), 138.08 (C¹), 118.7 (C¹²), 11.0 (C¹³), 90.4 (C⁵), 81.6 (C⁷), 76.5 (C¹⁴), 60.7 (C⁸), 38.0 (C⁹).

R_f: 0.10 (EtOAc 100 %).

6.4.2 Prebiotic Reactions

General Procedure for the Prebiotic Reactions and the Preparation for Analysis

The solids ($100\ \mu\text{mol} = 1.0\ \text{equiv.}$) were added to a glass vial (1.5 mL) equipped with a stirring bar. Then the respective solvent (if not stated otherwise 1 mL; 0.1 M) was added, followed by the addition of liquids. The vial was closed (except for the wet-dry-cycle reactions) and it was placed in a metal heating block at the specified temperature. After the respective reaction time, the vial was cooled to r.t., opened, and if not stated otherwise $10\ \mu\text{L}$ of the reaction mixture were added to $990\ \mu\text{L}$ of ultrapure water/MeOH/ACN or *i*PrOH. The reaction vial was closed and if necessary heated again at the corresponding temperature. The diluted reaction mixture was filtered using a syringe filter and analysed afterwards.

During the reaction times aliquots were taken and analysed ranging from a daily basis to every 2 days or 3 days. The stated reaction times correspond therefore to the stop time of the reaction / to the addition of reagents and not to the measurements.

If explicitly stated, the pH was adjusted using aqueous HCl or NaOH (0.5 – 2 M) if not otherwise stated. For a reaction without the addition of a HCl-salt compound the pH value ranged from 4 – 5. When a HCl-salt compound was involved, the pH value dropped to 3 – 4.

Prebiotic RNA-Reactions

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	50	4 d	ZnCl ₂ (0.5 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	ZnCl ₂ (0.5 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	imidazole (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	Na ₂ HPO ₄ (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	NaOAc (0.5 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	CuCl ₂ (0.5 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	phosphate buffer	50	4 d	pH = 7
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	50	4 d	thioacetic acid (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	thioacetic acid (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	DMF	50	4 d	thioacetic acid (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	80	4 d	

Experimental

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	65	3 d	
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	100	4 d	
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	r.t.	3 d	Borax (1.0 equiv.) / Boric acid (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	80	3 d	Borax (1.0 equiv.) / Boric acid (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	100	3 d	Borax (1.0 equiv.) / Boric acid (1.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	tBuOH	50	4 d	
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	pH = 3
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	pH = 5
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	pH = 7
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	pH = 9
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bG (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	
bC (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	
bU (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	4 d	
ba (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	15 d	
bG (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	15 d	
bC (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	15 d	
bU (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	15 d	
ba (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	15 d	
bG (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	15 d	
bC (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	15 d	
bU (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	15 d	

Experimental

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bA (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	7 d	Borax (1.0 equiv.)
bG (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	7 d	Borax (1.0 equiv.)
bC (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	7 d	Borax (1.0 equiv.)
bU (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	7 d	Borax (1.0 equiv.)

Prebiotic RNA-Reactions with additional nucleobases or nucleosides

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bG (1.0 equiv.), Rib-C (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bC (1.0 equiv.), Rib-G (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bU (1.0 equiv.), Rib-A (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bA (1.0 equiv.), Ara-U (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bG (1.0 equiv.), Ara-C (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bC (1.0 equiv.), Ara-G (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bU (1.0 equiv.), Ara-A (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 2 d
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	r.t.	13 d	
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	30	13 d	

Experimental

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.), GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH	50	13 d	
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.)	MeOH	30 → 4 → 30	1 h + 4 d + 4 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 4 d
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.)	MeOH	30 → 4 → 50	1 h + 4 d + 4 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 4 d
bA (1.0 equiv.), Rib-U (1.0 equiv.)	MeOH	30 → 4 → 60	1 h + 4 d + 4 d	GA (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.) addition after 4 d
bA (1.0 equiv.), bU (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
bG (1.0 equiv.), bC (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
bC (1.0 equiv.), bG (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
bU (1.0 equiv.), bA (1.0 equiv.)	MeOH	r.t. → 50	2 d + 3 d	GA (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d

Prebiotic *N*-linked tRNA-Reactions

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
bA (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GA (10 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	4 d	
bA (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GA (10 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	neat	50	4 d	
bA (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GA (10 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d	NaOAc (4.0 equiv.)
bA (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GA (2.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water	50	7 d	
bA (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GA (2.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	7 d	
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.)	MeOH	50	4 d	
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.)	DMF	50	4 d	
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.)	MeOH	50	4 d	AgNO ₃ (1.0 equiv.) / Na ₂ CO ₃ (1.0 equiv.)

Experimental

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (2.0 equiv.), GlyA (2.0 equiv.)	DMF	50	4 d	AgNO ₃ (1.0 equiv.) / Na ₂ CO ₃ (1.0 equiv.)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50		L-Ala, D-Ala, D/L-Ala
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50		NaOAc (4.0 equiv.)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	2 d	
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d	L-Ala, D-Ala
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	DMF	50	5 d	L-Ala, D-Ala
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d	

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	water	50	5 d	
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	water	50	5 d	pH = 7 / 11, adjusted using a K ₃ PO ₄ -Lsg (1 M)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	water	50	5 d	pH = 7 / 11, adjusted using a K ₂ CO ₃ -Lsg (1 M)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.), GlyA	water	50	5 d	GlyA (0.5 equiv. / 1.0 equiv. / 1.5 equiv.)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d + 6 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	DMF	50	5 d + 6 d	GlyA (6.0 equiv.) Addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d + 6 d	NaOAc (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d,
adenine-aldehyde (85)e (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	DMF	50	5 d + 6 d	NaOAc (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d,

Experimental

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
adenine-aldehyde (85) (3.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (3.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	neat	50	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water (0.5 mL)	50	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	r.t.	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	80	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	1 d + 6 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 1 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water	50	1 d + 6 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 1 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	3 d + 4 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 3 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water	50	3 d + 4 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 3 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	MeOH/water 99:1	50	5 d + 2 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water	50	5 d + 2 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water	50	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d, pH = 7 / 11, adjusted using a K ₃ PO ₄ -Lsg (1 M)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water	50	5 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 5 d, pH = 7 / 11, adjusted using a K ₂ CO ₃ -Lsg (1 M)
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	water	50	4 d + 3 d	GlyA (0.5 equiv./1.0 equiv./1.5 equiv.) addition after 4 d
adenine-aldehyde (85) (1.0 equiv.), Ala (1.0 equiv.)	neat	50	2 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 2 d

Prebiotic C-linked tRNA-Reactions

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	DMF	50	5 d	
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/ water 99:1	50	5 d	
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	DMF	50	5 d	NaOAc (4.0 equiv.) / Na ₂ HPO ₄ (4.0 equiv.) / imidazole (4.0 equiv.)
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (6.0 equiv.)	MeOH/ water 99:1	50	5 d	NaOAc (4.0 equiv.) / Na ₂ HPO ₄ (4.0 equiv.) / imidazole (4.0 equiv.)
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	NaHCO ₃ (1.0 equiv.)
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water (10 µL)	50	5 d	NaHCO ₃ (1.0 equiv.)
N-Boc-Ala-aldehyde (131m) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	
N-Boc-Ala-aldehyde (131m) (1.0 equiv.), purine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	
N-Boc-Ala-aldehyde (131m) (1.0 equiv.), purine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	water (5 µL)	50	3d	
N-Boc-Ala-aldehyde (131m) (1.0 equiv.), purine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	MeOH/ water 99:1	50	3d	
N-Boc-Ala-aldehyde (131m) (1.0 equiv.), N,N-dimethyladenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	

Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
<i>N</i> -Boc-Ala-aldehyde (131m) (1.0 equiv.), <i>N,N</i> -dimethyladenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	80	5 d	
<i>N</i> -Ac-Ala-aldehyde (131o) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	
<i>N</i> -Ac-Ala-aldehyde (131o) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	under an argon atmosphere
<i>N</i> -Ac-Ala-aldehyde (131o) (1.0 equiv.), purine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	
<i>N</i> -Ac-Ala-aldehyde (131o) (1.0 equiv.), <i>N,N</i> -dimethyladenine (1.0 equiv.), GlyA (1.0 equiv.)	neat	50	5 d	
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.)	MeOH	r.t.	2 d + 5 d	GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.)	MeOH	50	2 d + 5 d	GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (2.0 equiv.)	MeOH	50	2 d + 5 d	GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (1.0 equiv.)	DMF	50	2 d + 5 d	GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (2.0 equiv.)	DMF	50	2 d + 5 d	GlyA (2.0 equiv.) addition after 2 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (3.0 equiv.)	MeOH	50	3 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 3 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (3.0 equiv.)	DMF	50	3 d + 3 d	GlyA (6.0 equiv.) addition after 3 d

Experimental

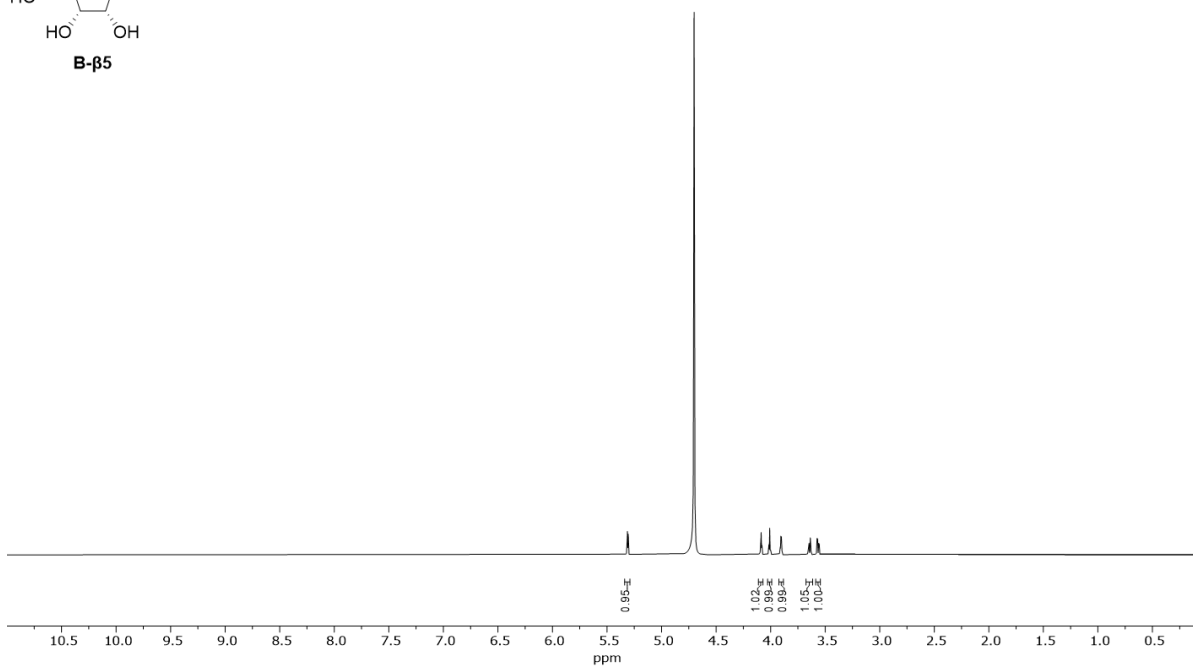
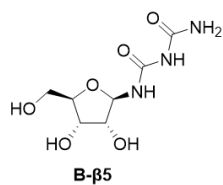
Educts	Solvents	T [°C]	Time	Additional Information
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (3.0 equiv.)	MeOH	50	3 d + 3 d	NaOAc (2.0 equiv.) / Na ₂ HPO ₄ (2.0 equiv.) / imidazole (2.0 equiv.) / NaHCO ₃ (2.0 equiv.) at start, followed by GlyA (6.0 equiv.) after 3 d
Ala-aldehyde (125) (1.0 equiv.), adenine (3.0 equiv.)	MeOH	50	3 d + 3 d	NaOAc (2.0 equiv.) / Na ₂ HPO ₄ (2.0 equiv.) / imidazole (2.0 equiv.) / NaHCO ₃ (2.0 equiv.) at start, followed by GlyA (6.0 equiv.) after 3 d

Kapitel 7

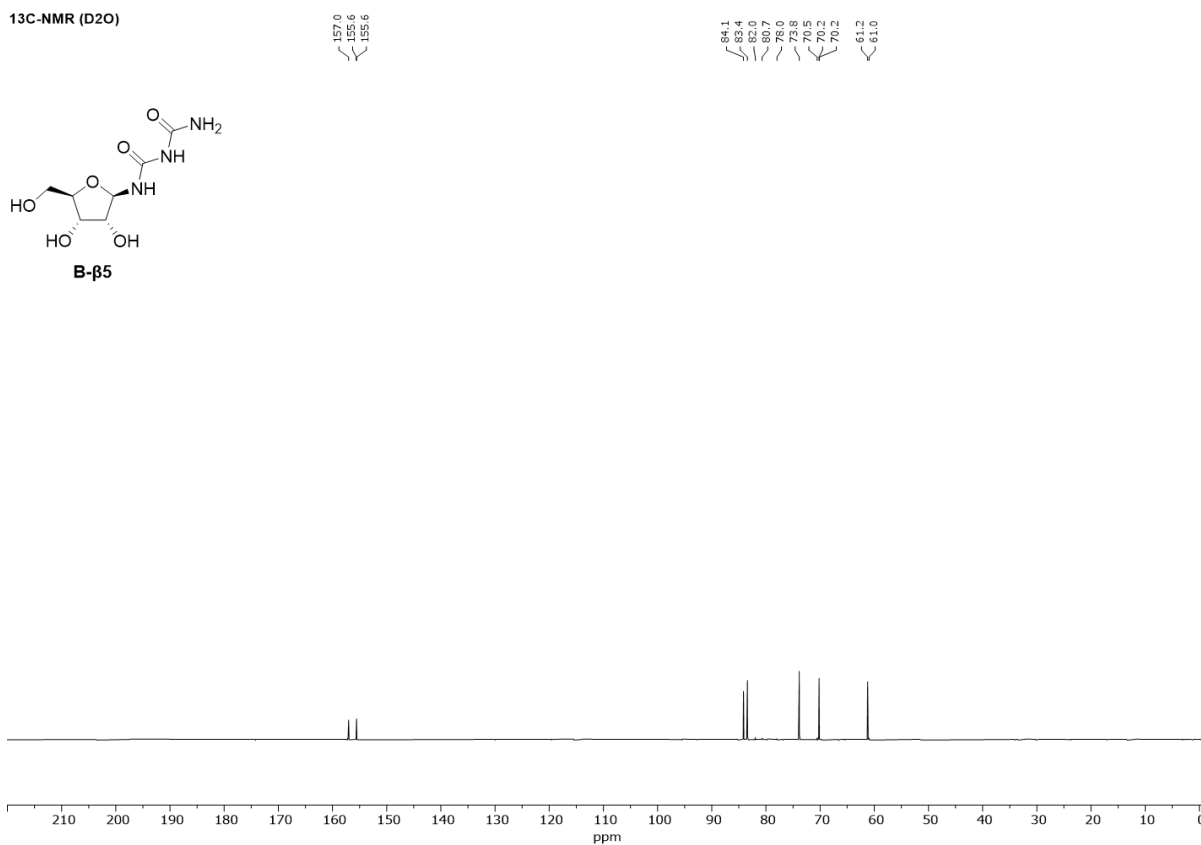
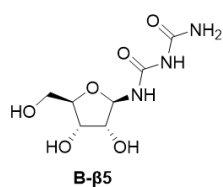
Anhang

7.1.1 NMR Spektren

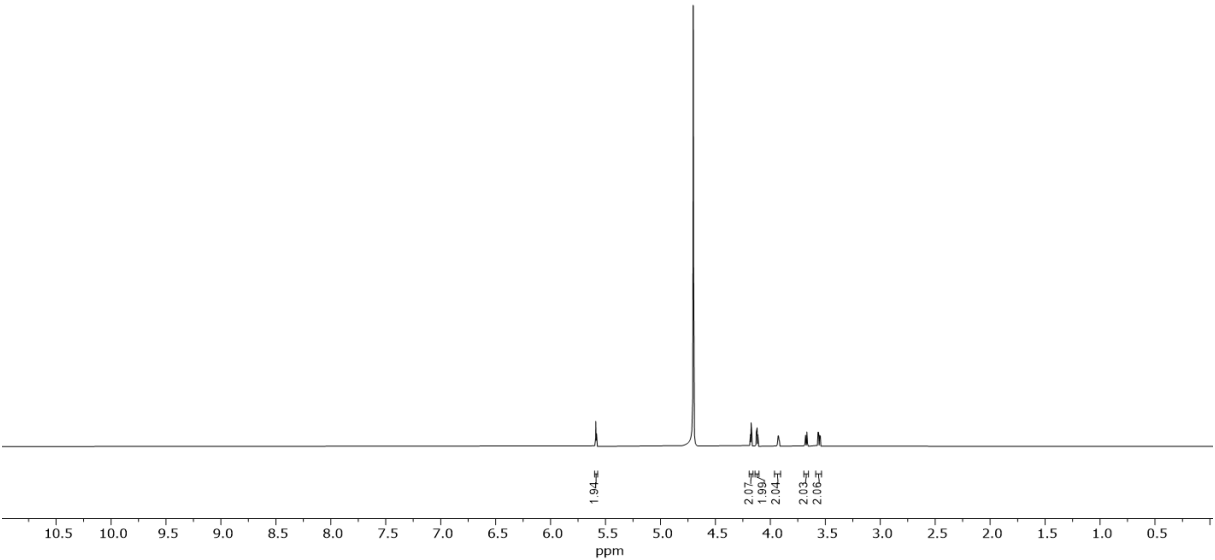
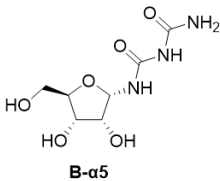
¹H-NMR (D₂O)



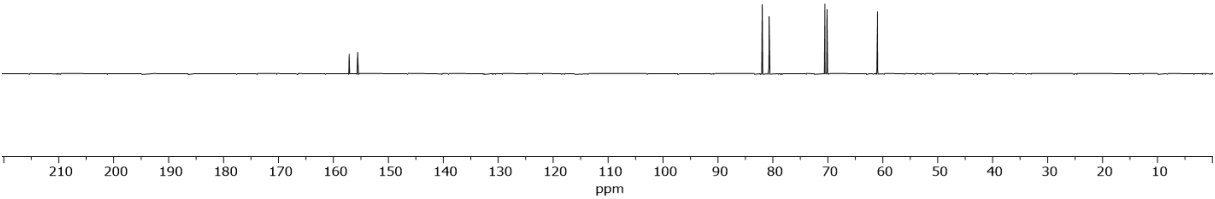
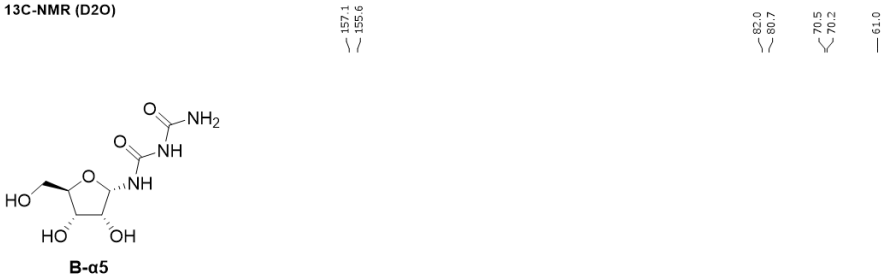
¹³C-NMR (D₂O)

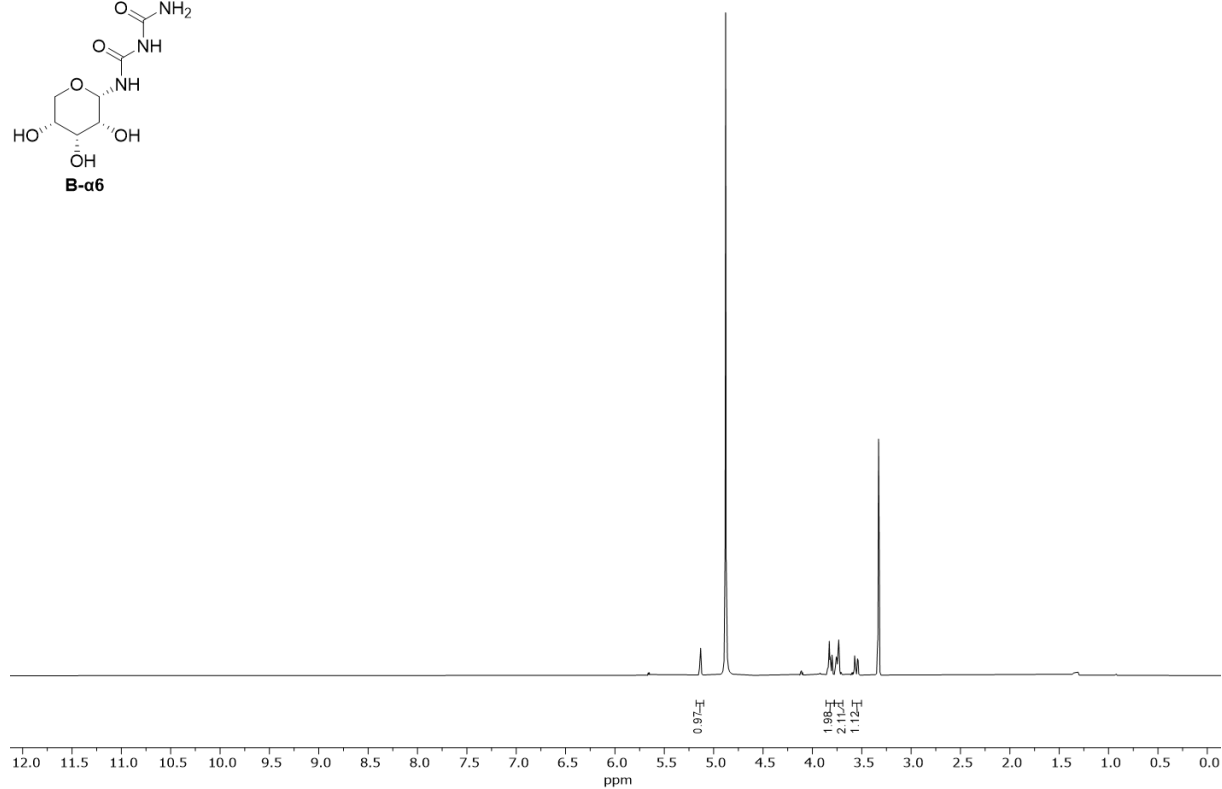
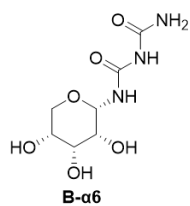
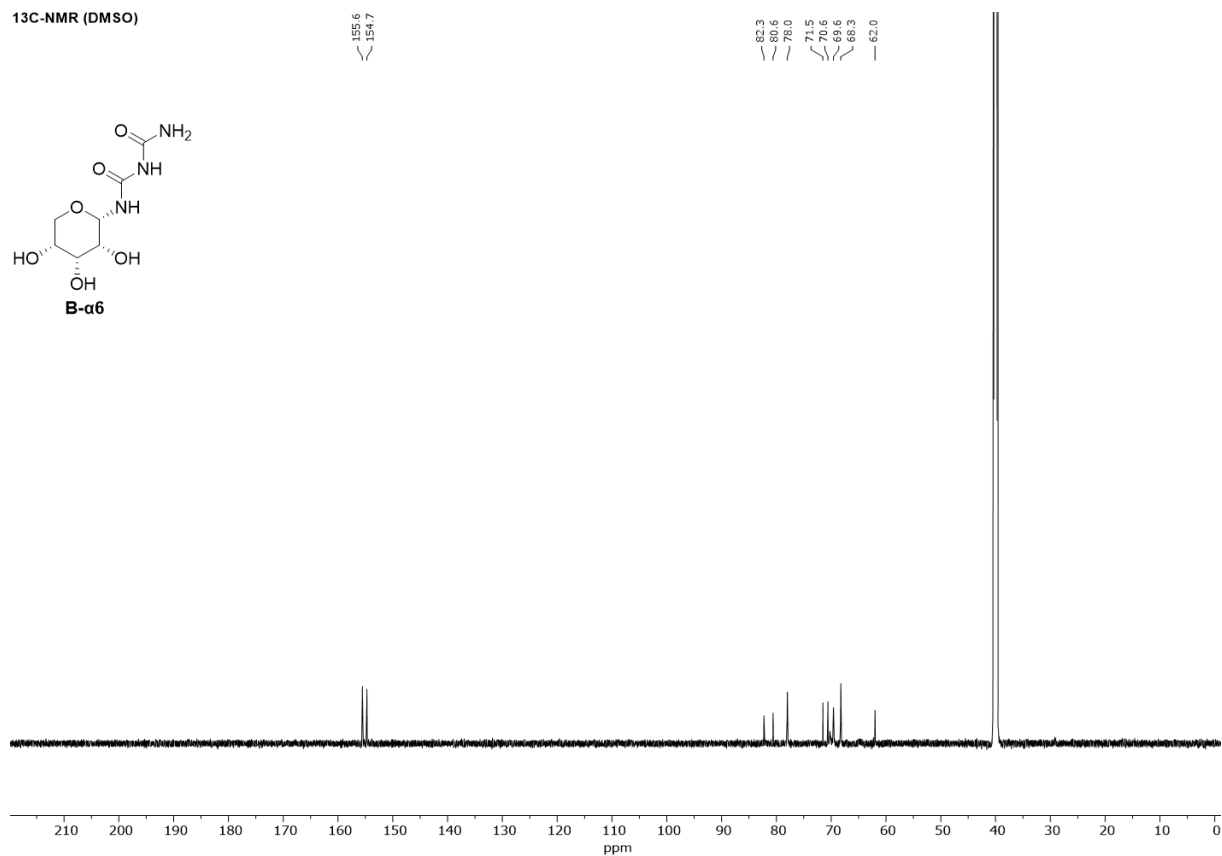
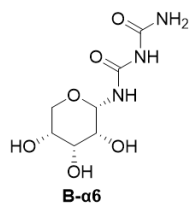


¹H-NMR (D₂O)

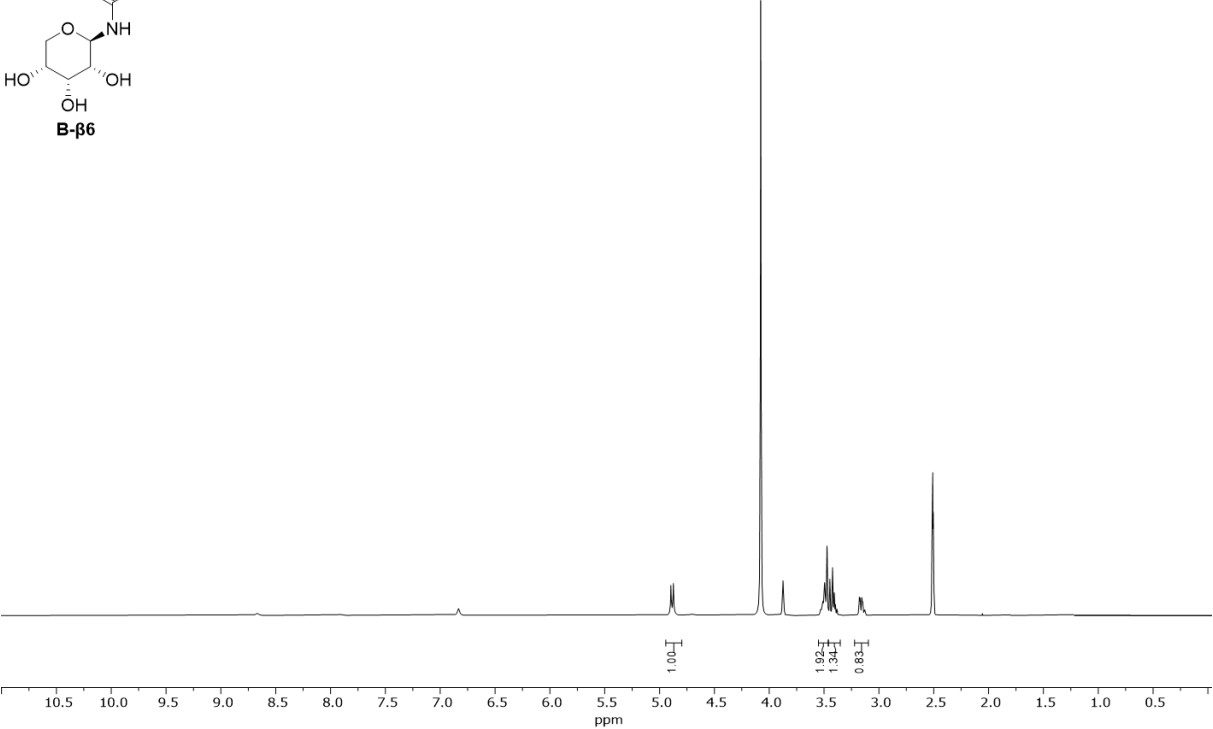
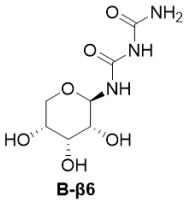


¹³C-NMR (D₂O)

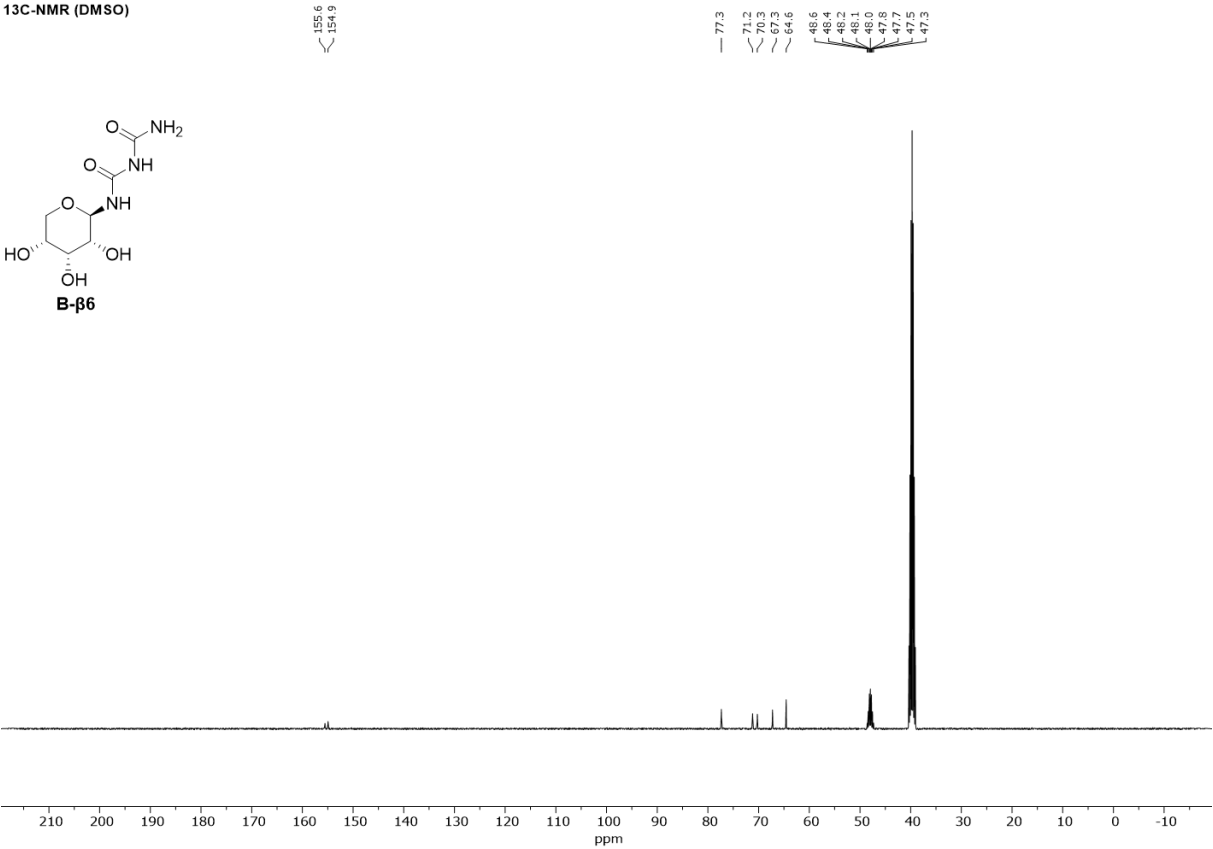
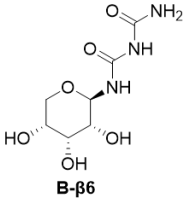


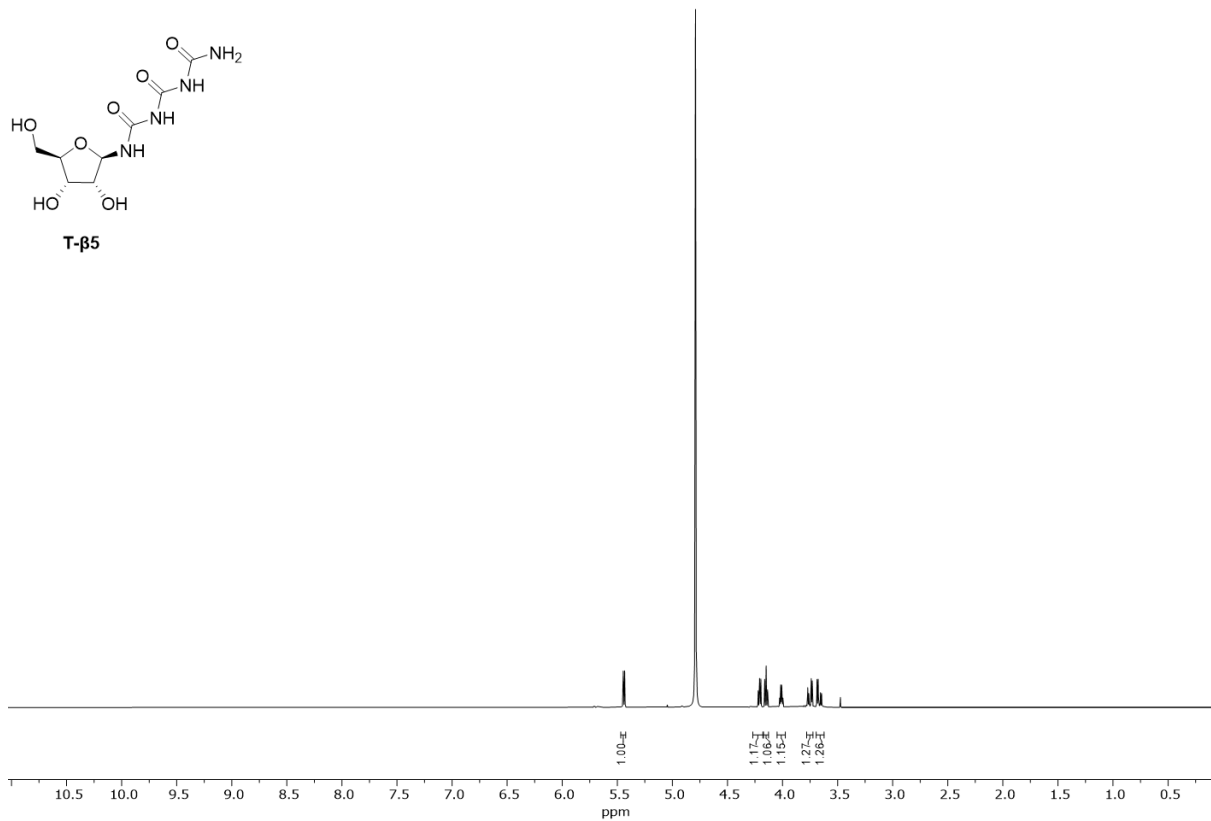
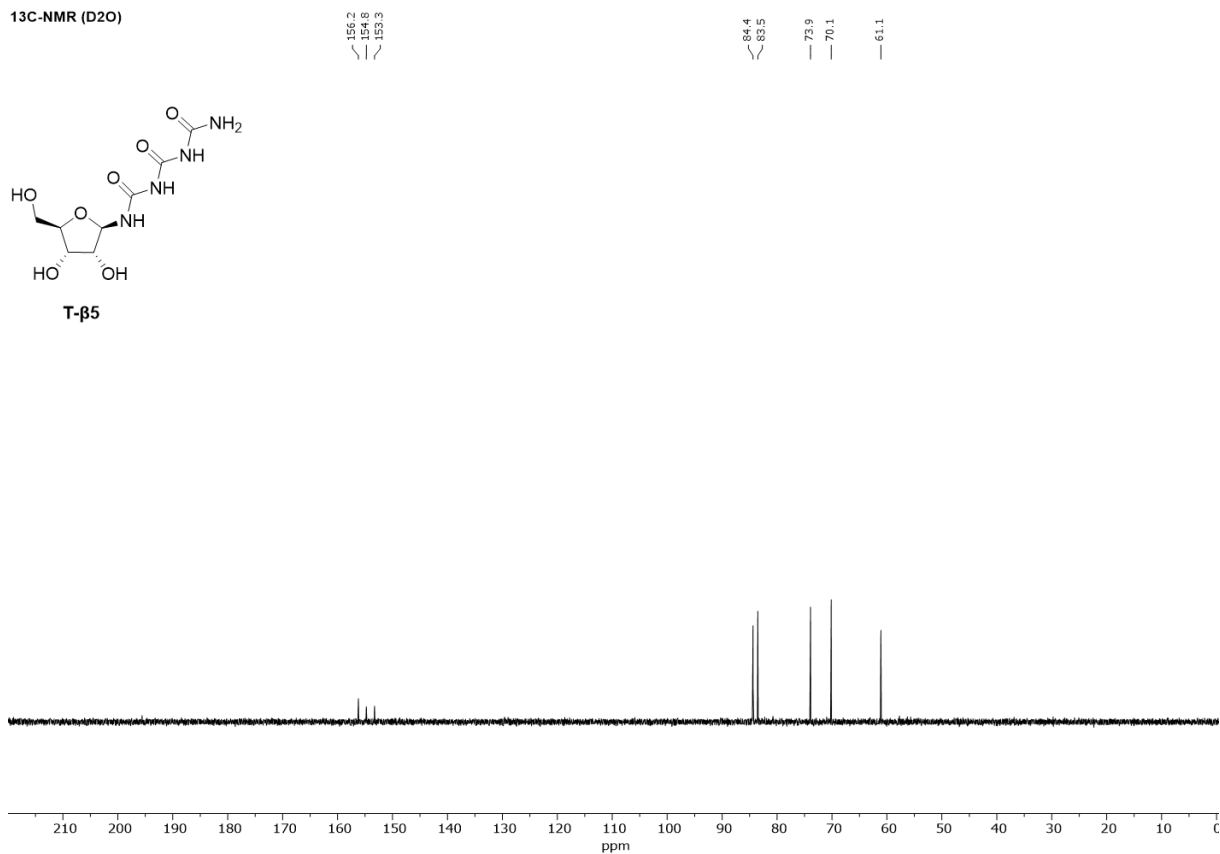
¹H-NMR (MeOD)**¹³C-NMR (DMSO)**

¹H-NMR (DMSO)

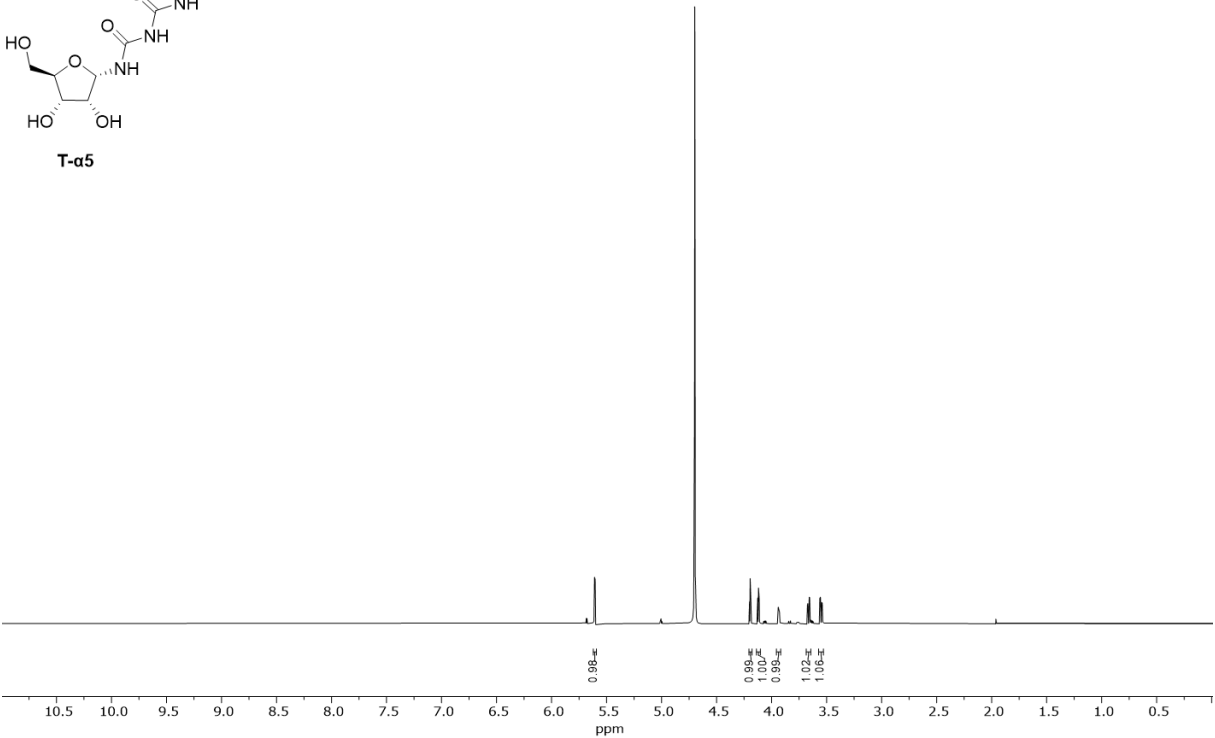
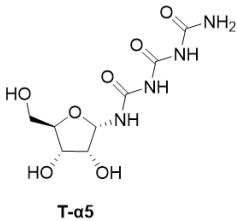


¹³C-NMR (DMSO)

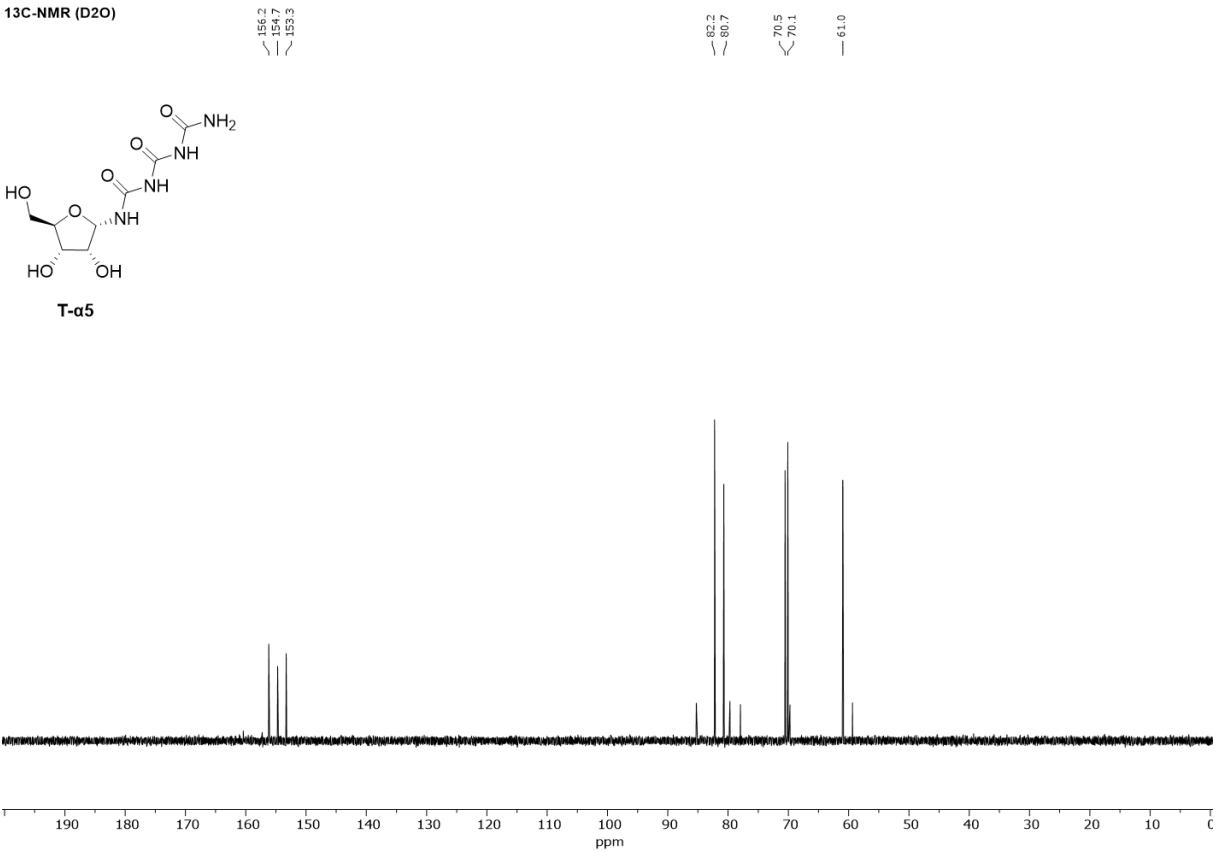
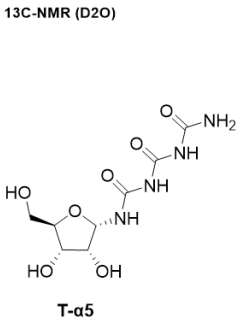


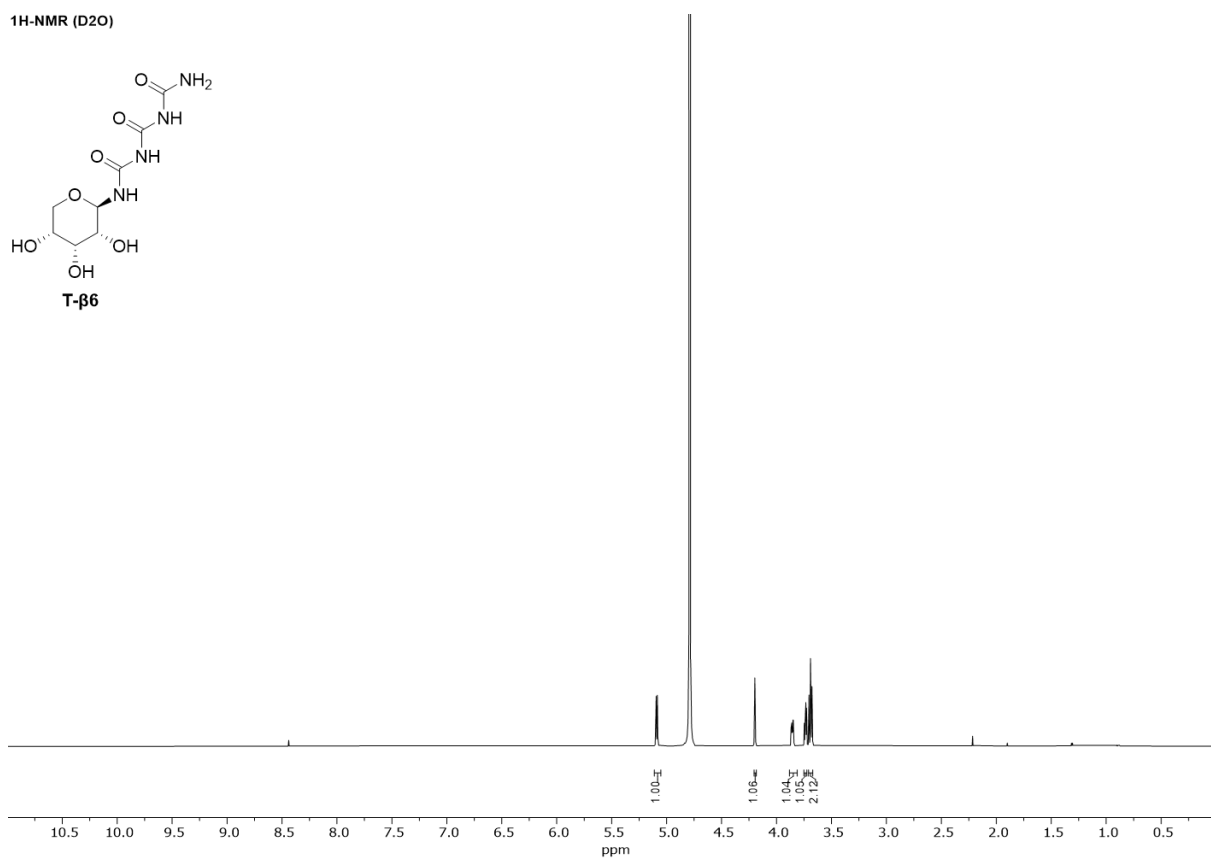
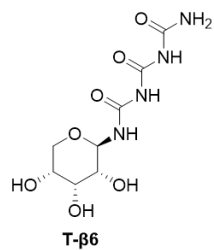
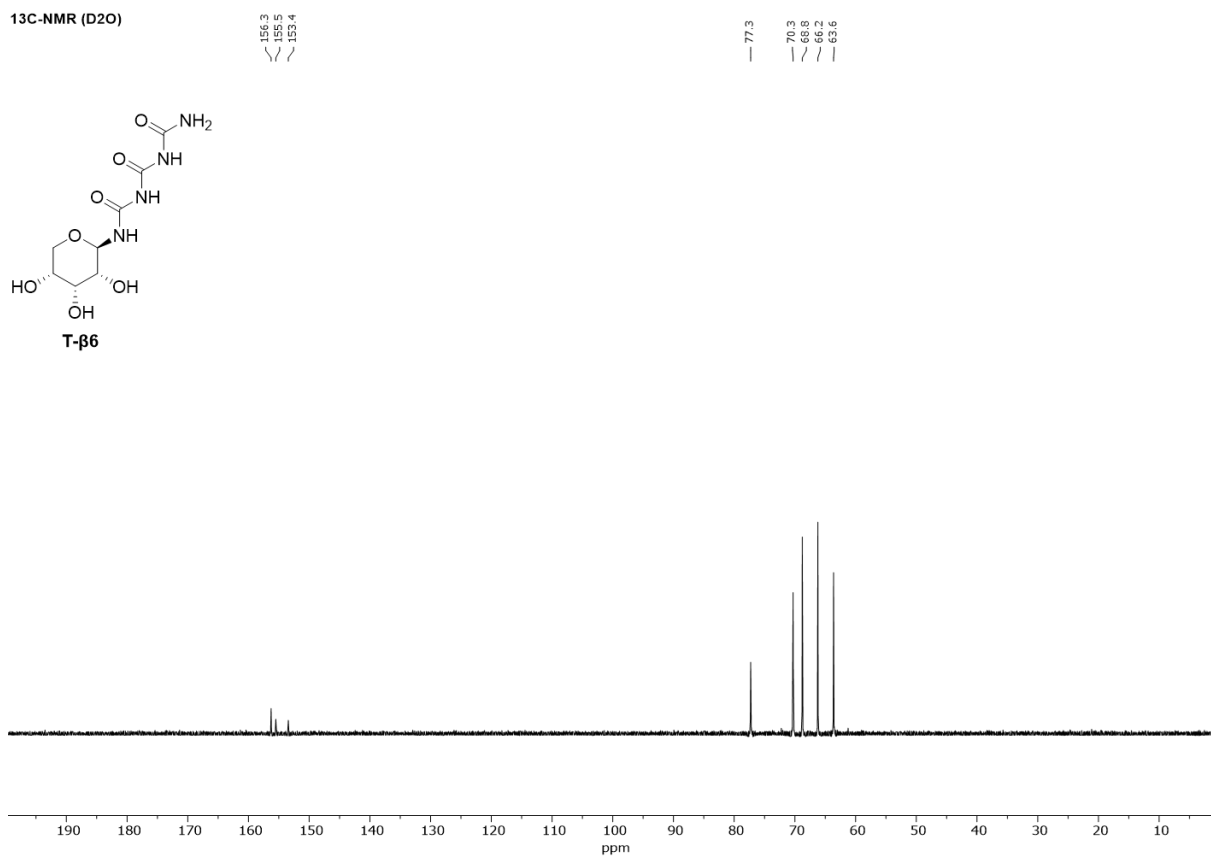
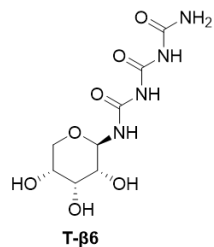
¹H-NMR (D₂O)**¹³C-NMR (D₂O)**

¹H-NMR (D₂O)

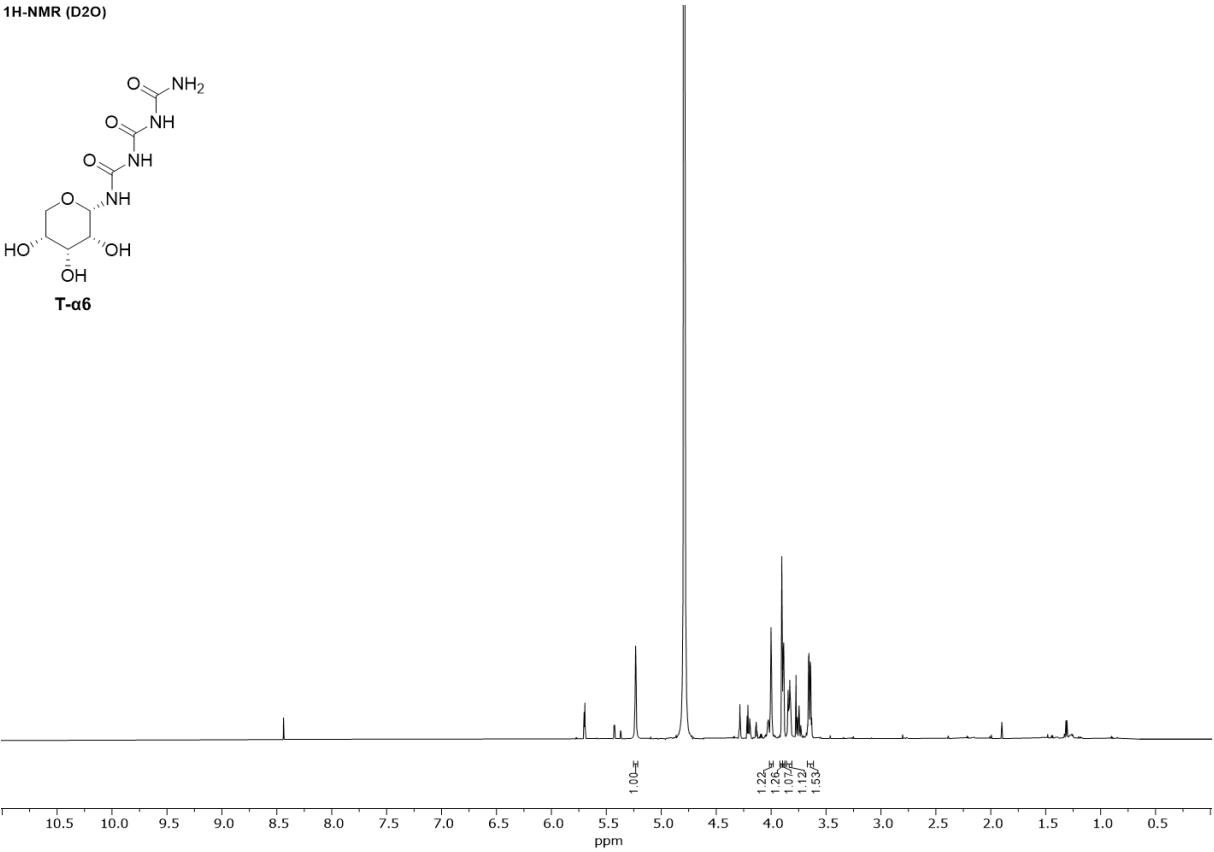
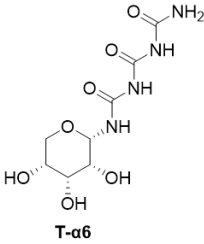


¹³C-NMR (D₂O)

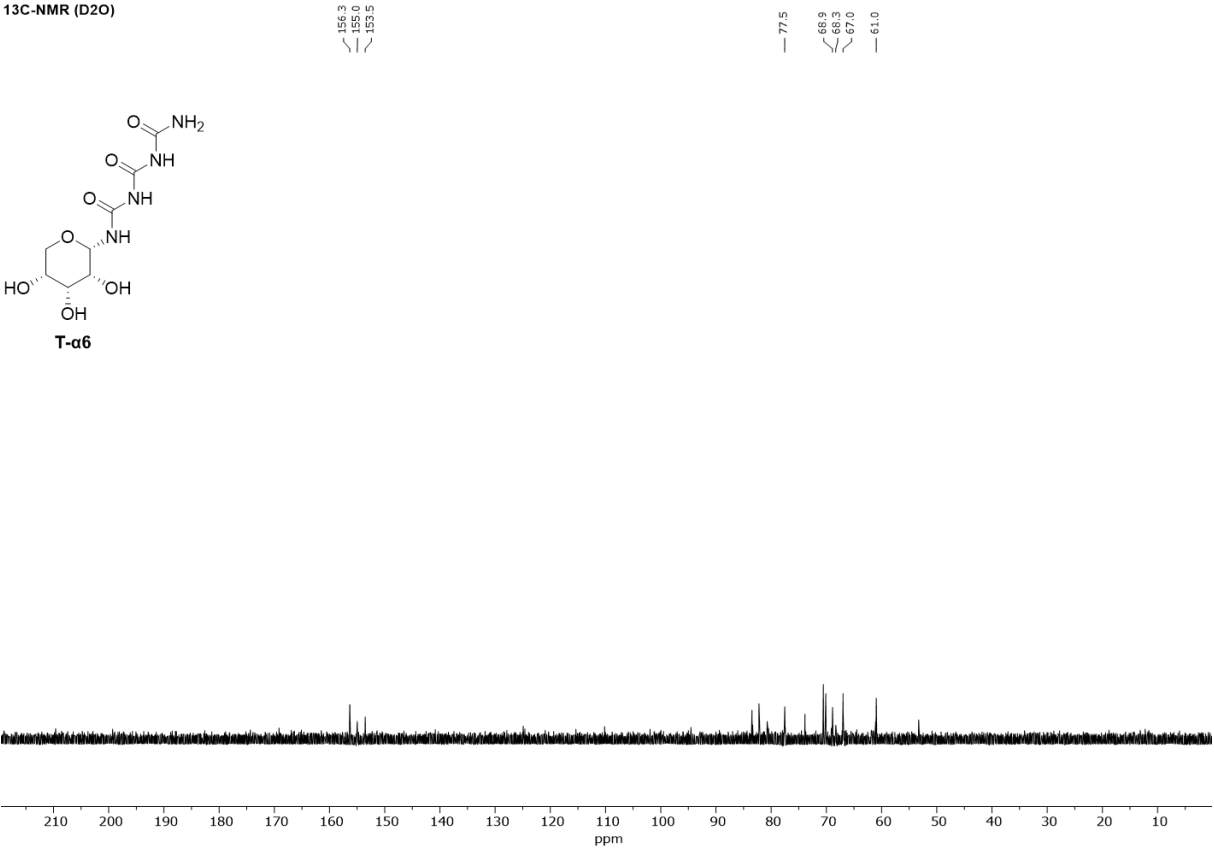
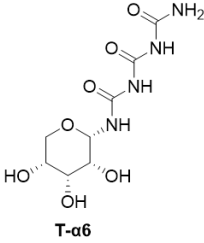


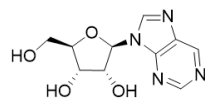
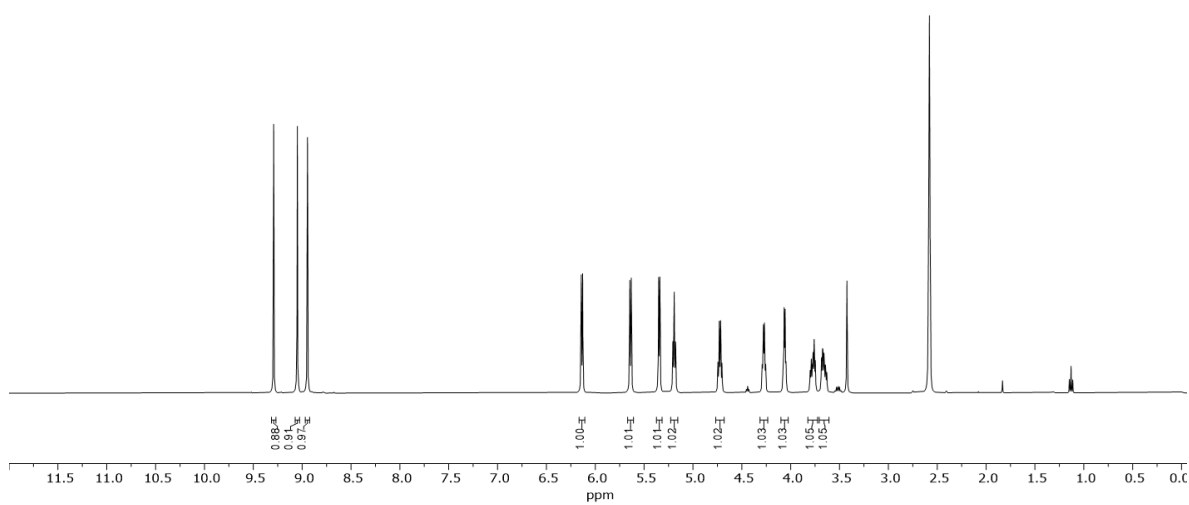
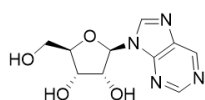
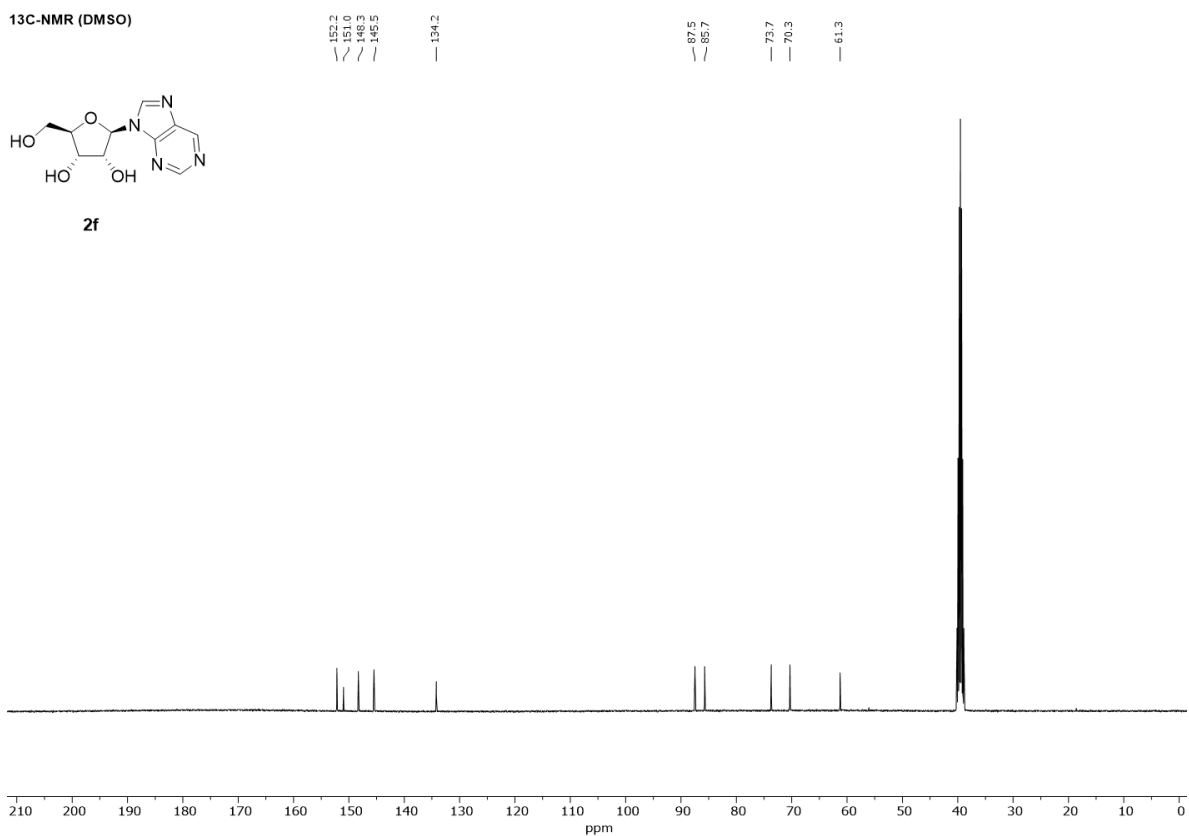
¹H-NMR (D₂O)**¹³C-NMR (D₂O)**

¹H-NMR (D₂O)

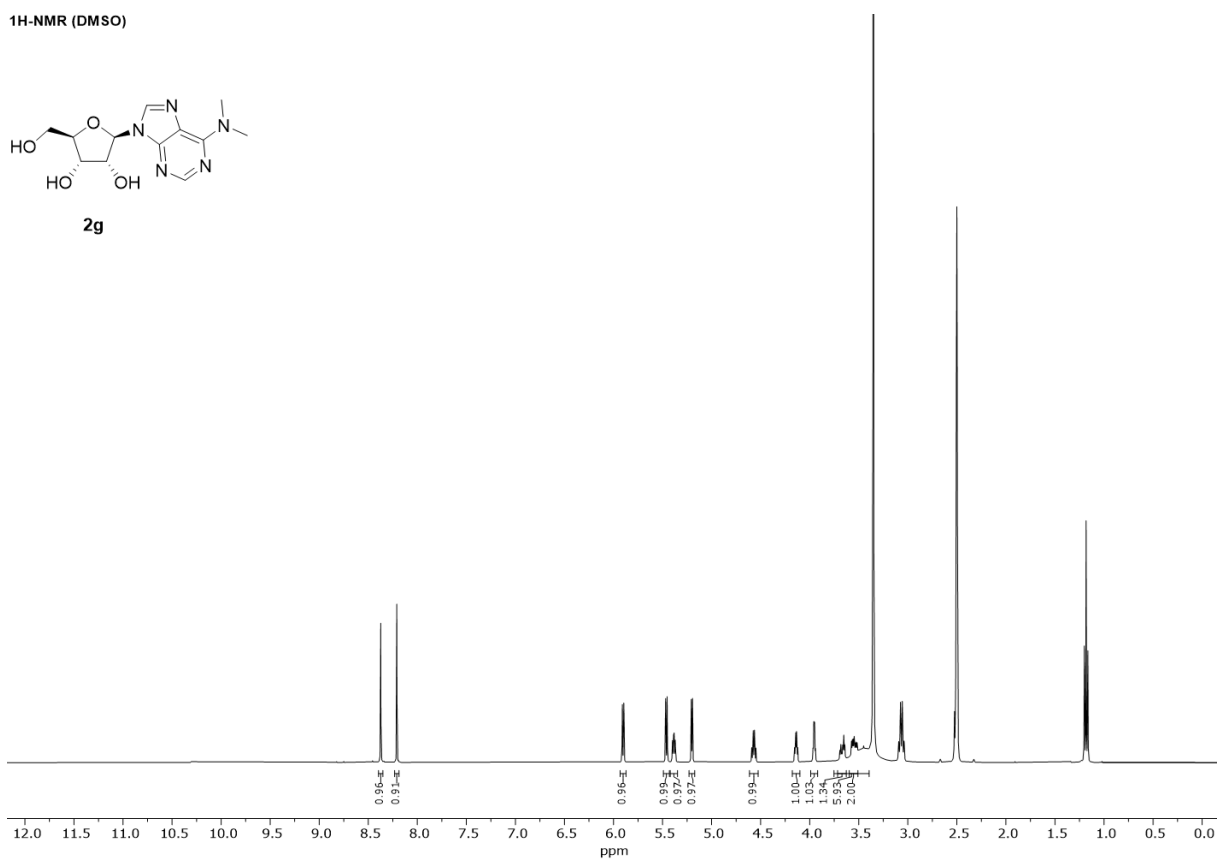
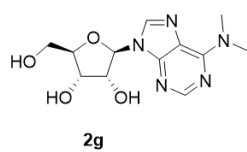


¹³C-NMR (D₂O)

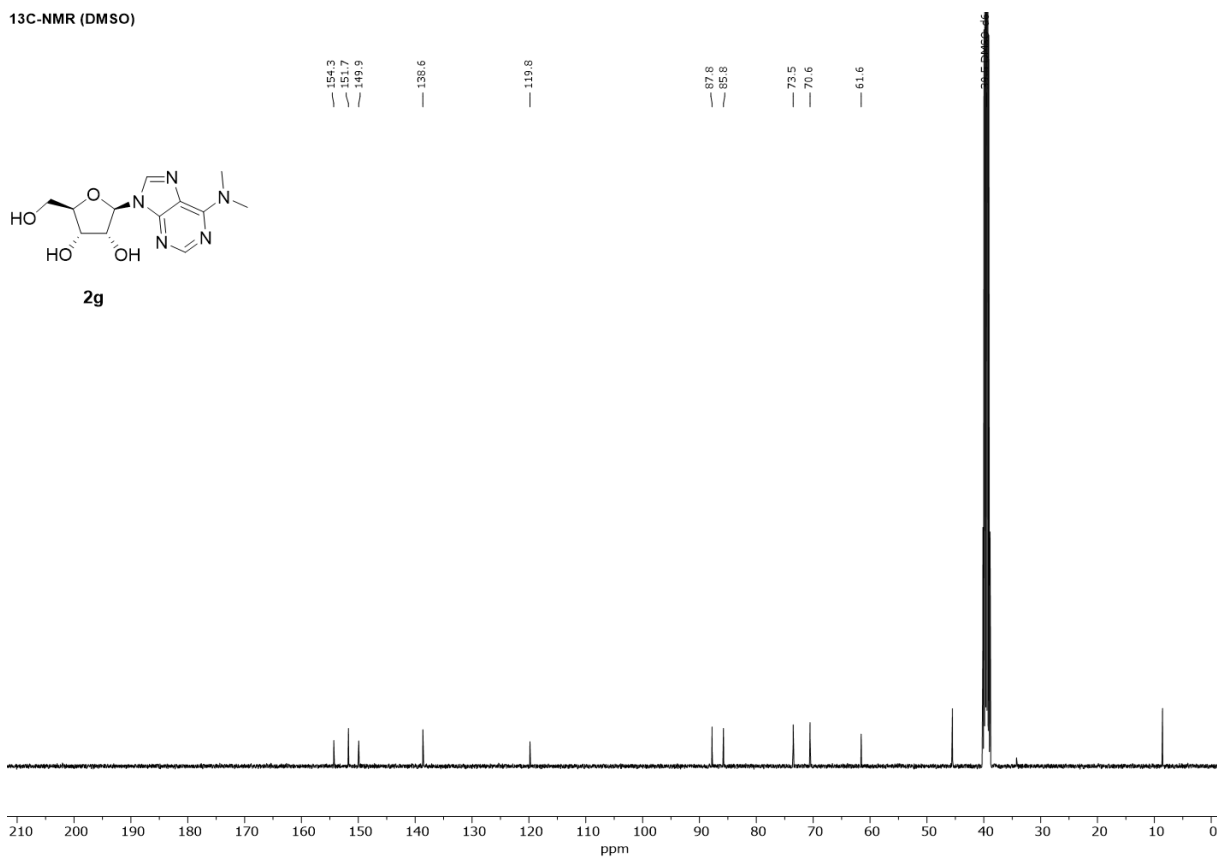
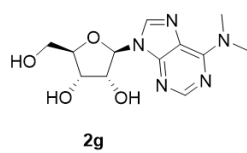


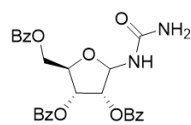
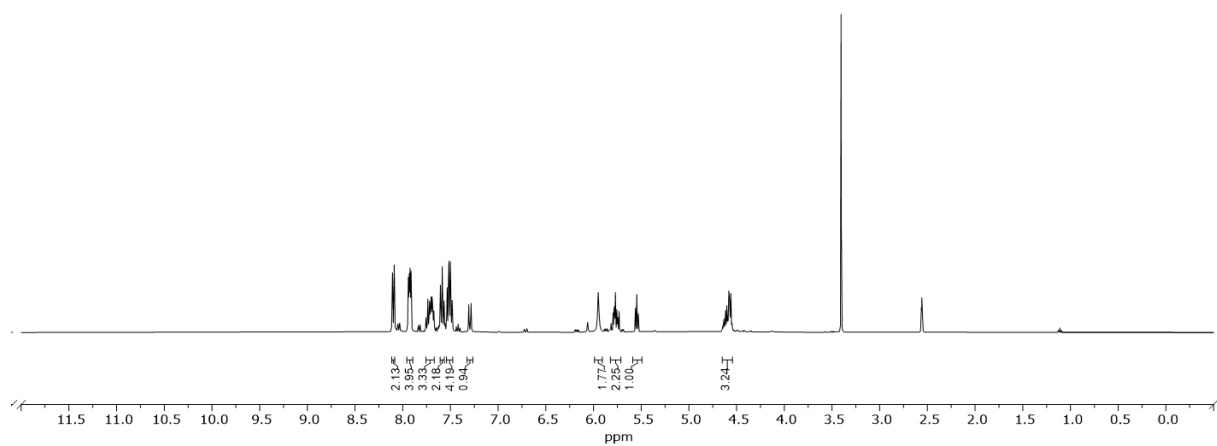
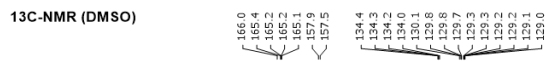
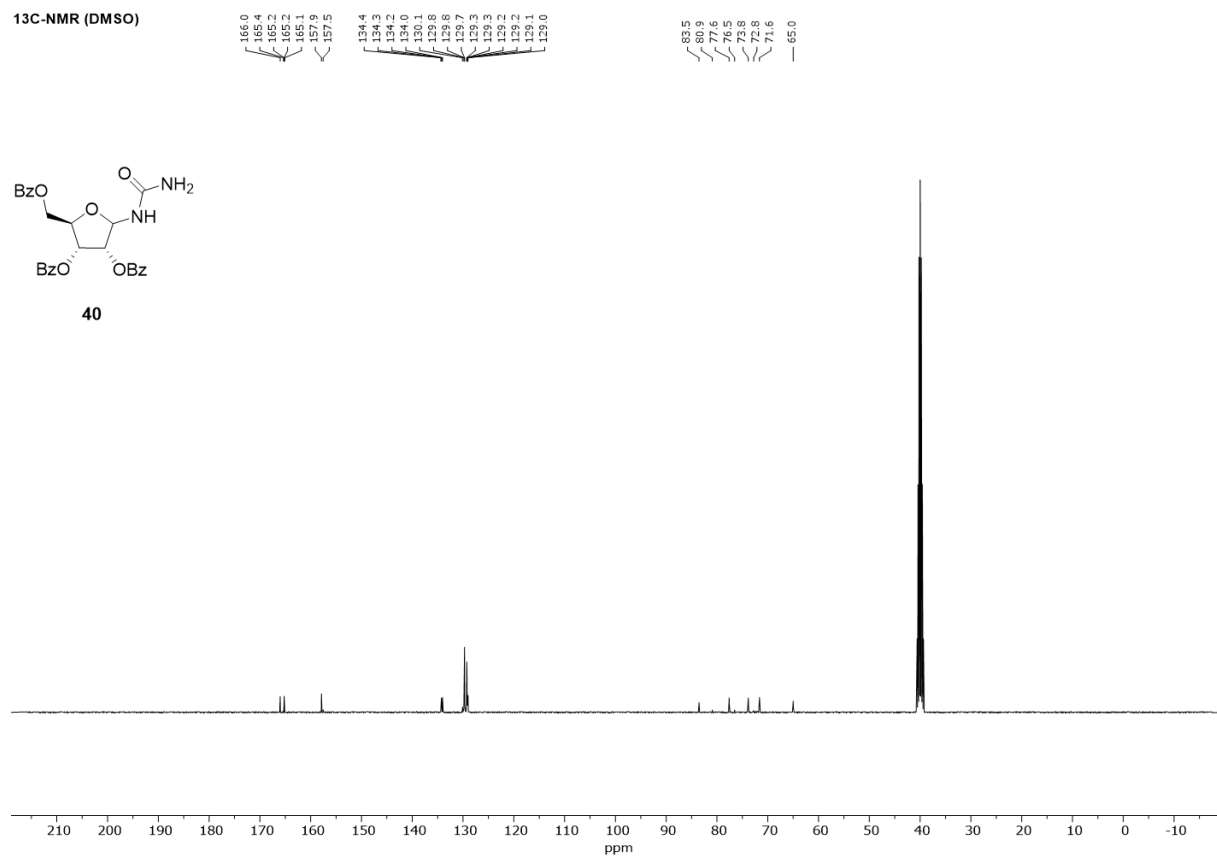
¹H-NMR (DMSO)**2f**¹³C-NMR (DMSO)**2f**

¹H-NMR (DMSO)

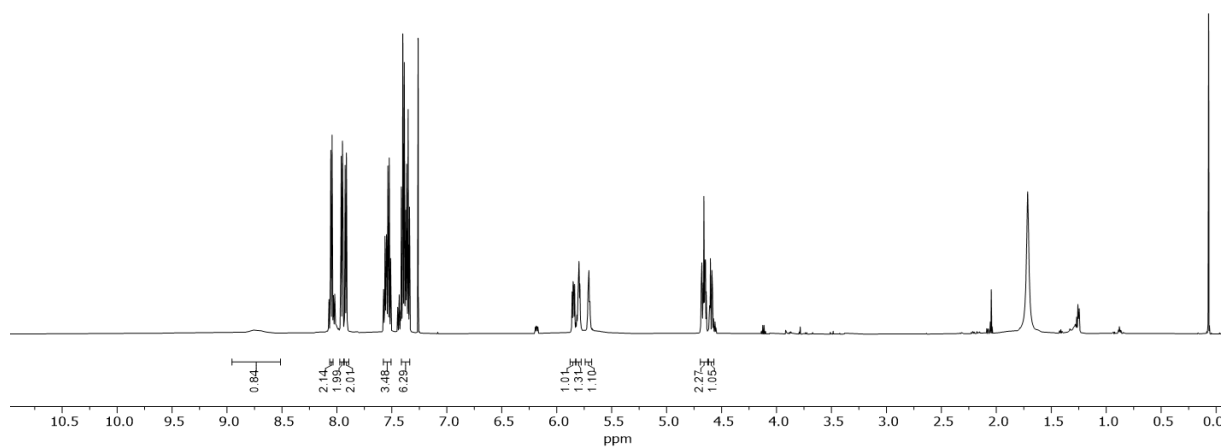
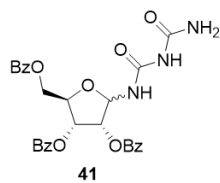


¹³C-NMR (DMSO)

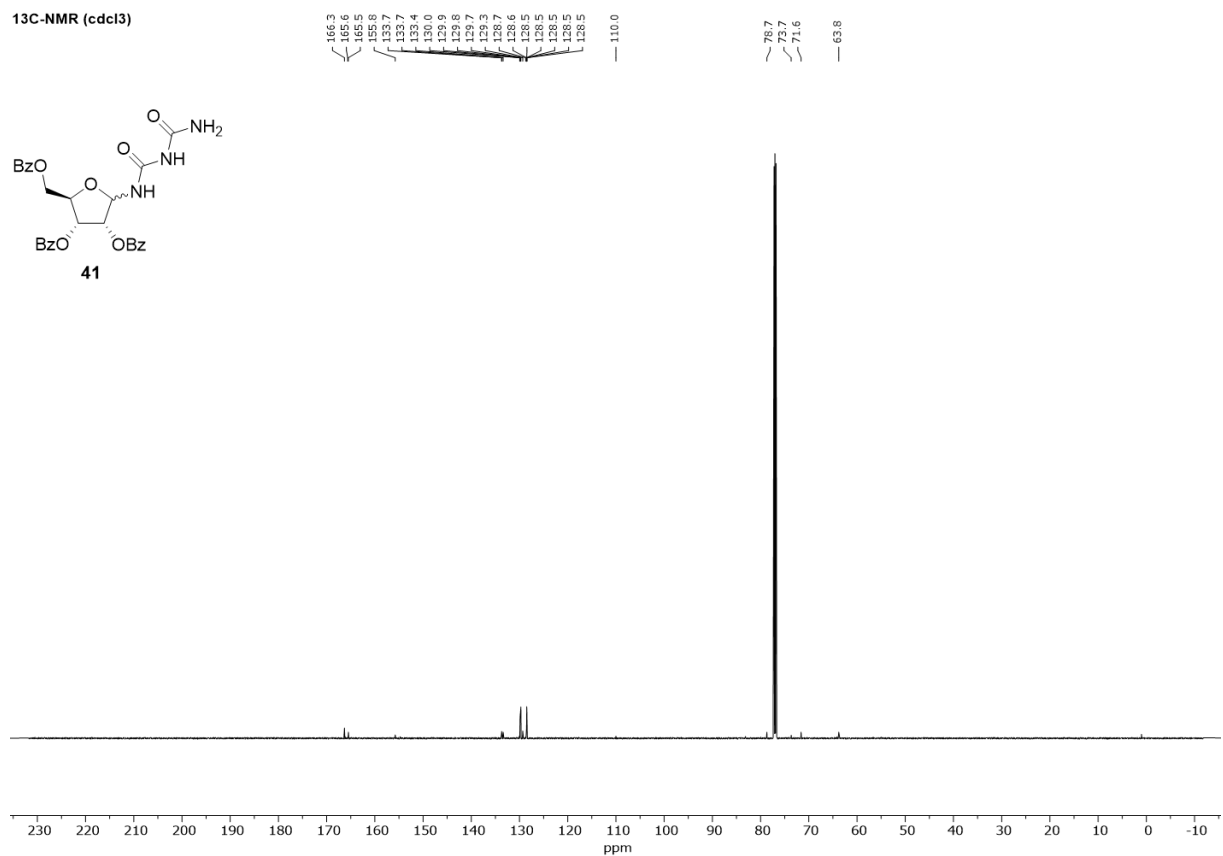
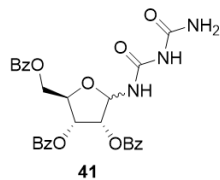


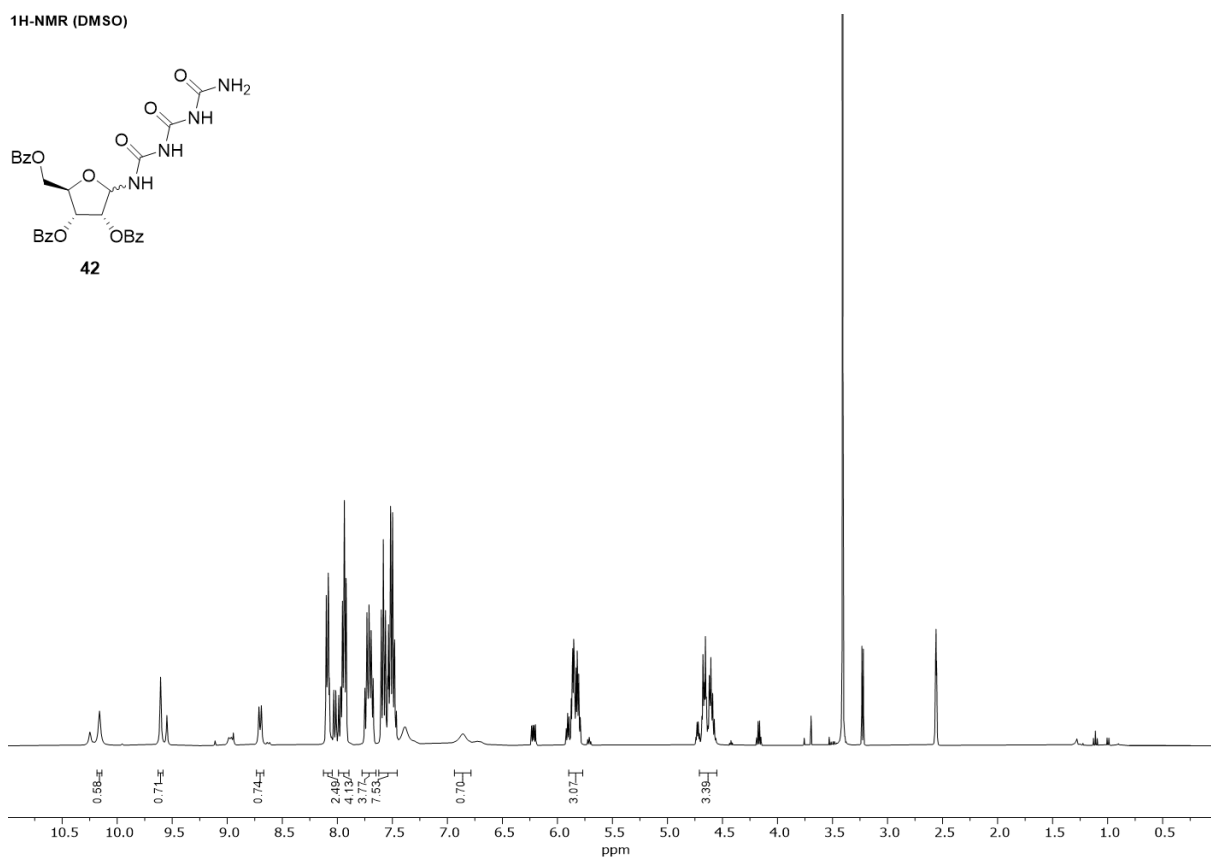
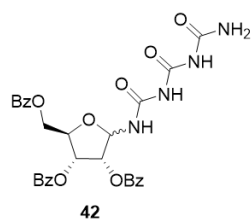
¹H-NMR (DMSO)**40****¹³C-NMR (DMSO)****40**

¹H-NMR (cdcl₃)

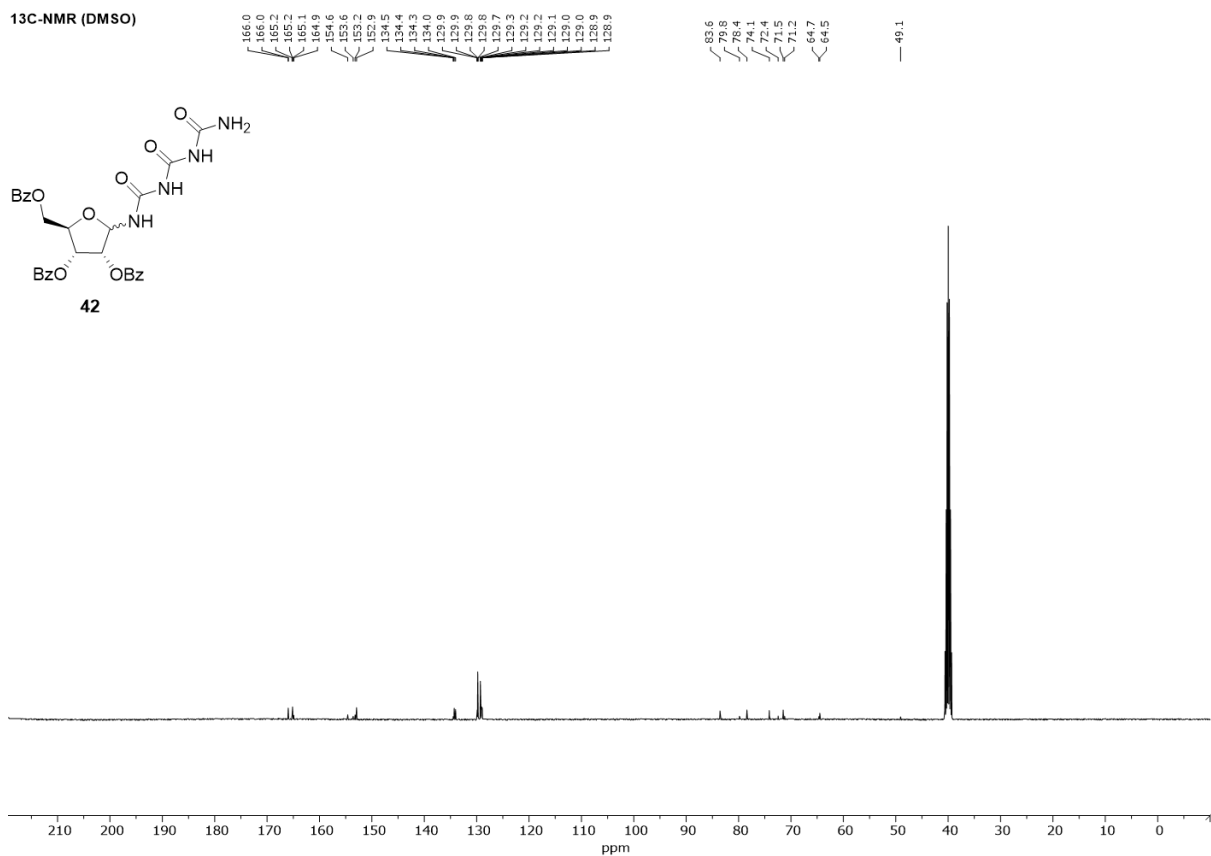
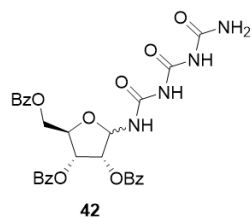


¹³C-NMR (cdcl₃)

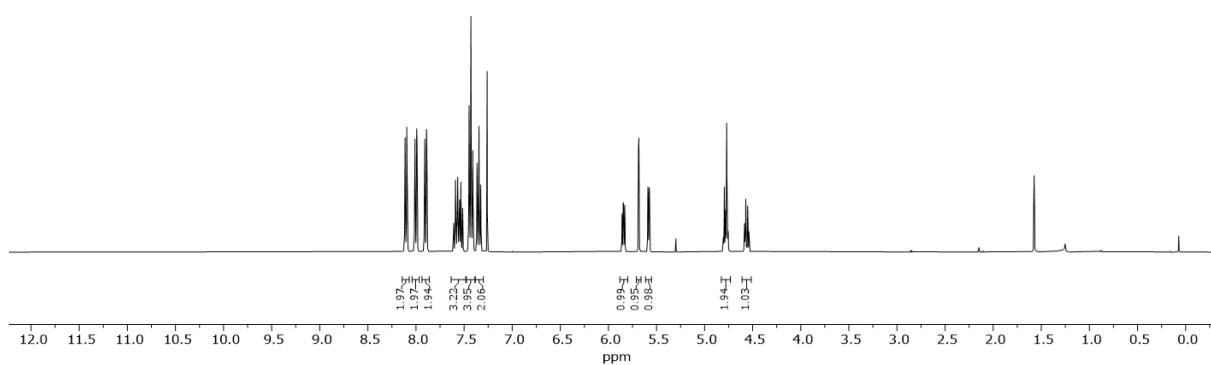
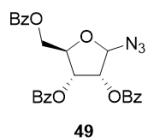




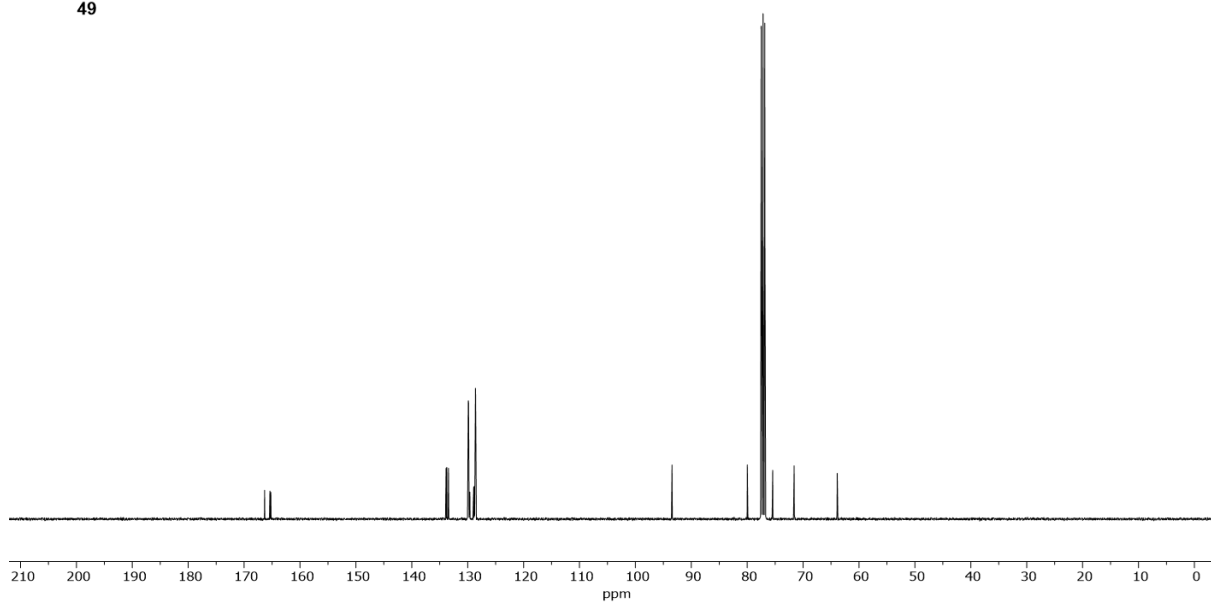
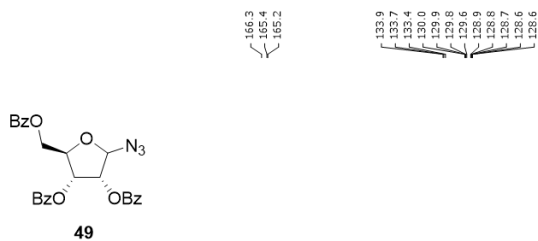
¹³C-NMR (DMSO)

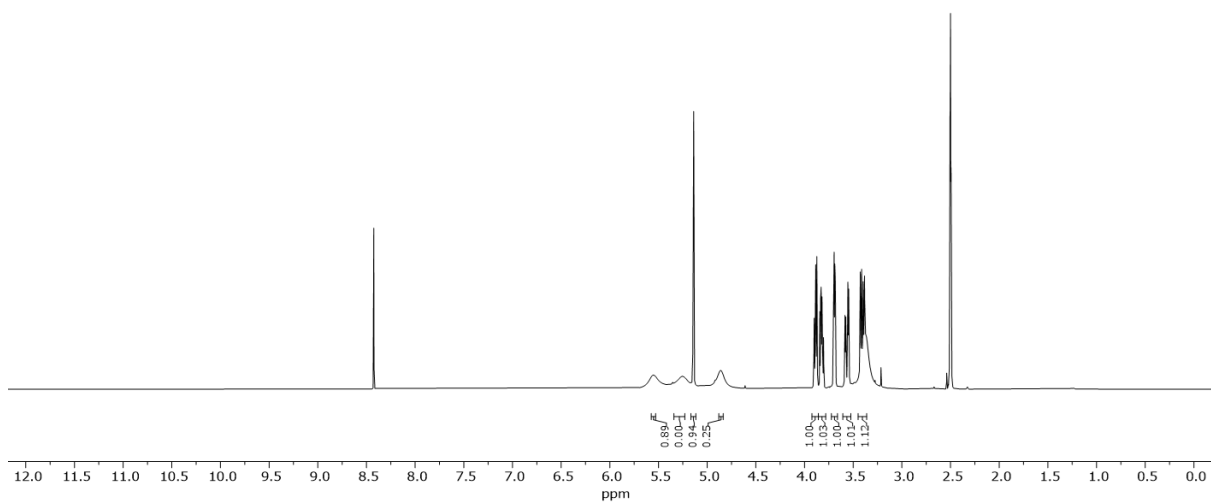
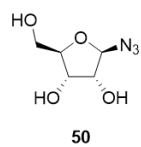
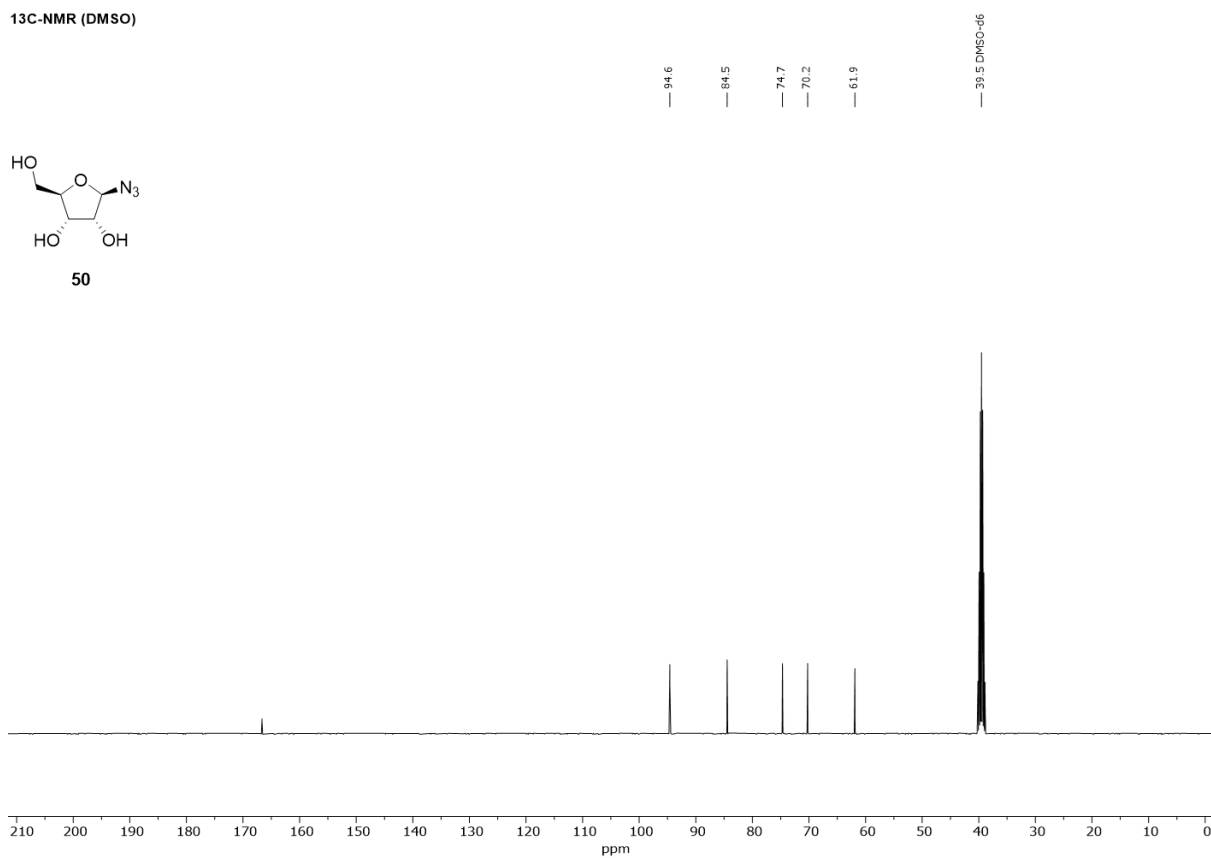
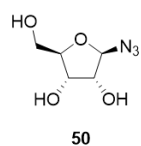


¹H-NMR (CDCl₃)

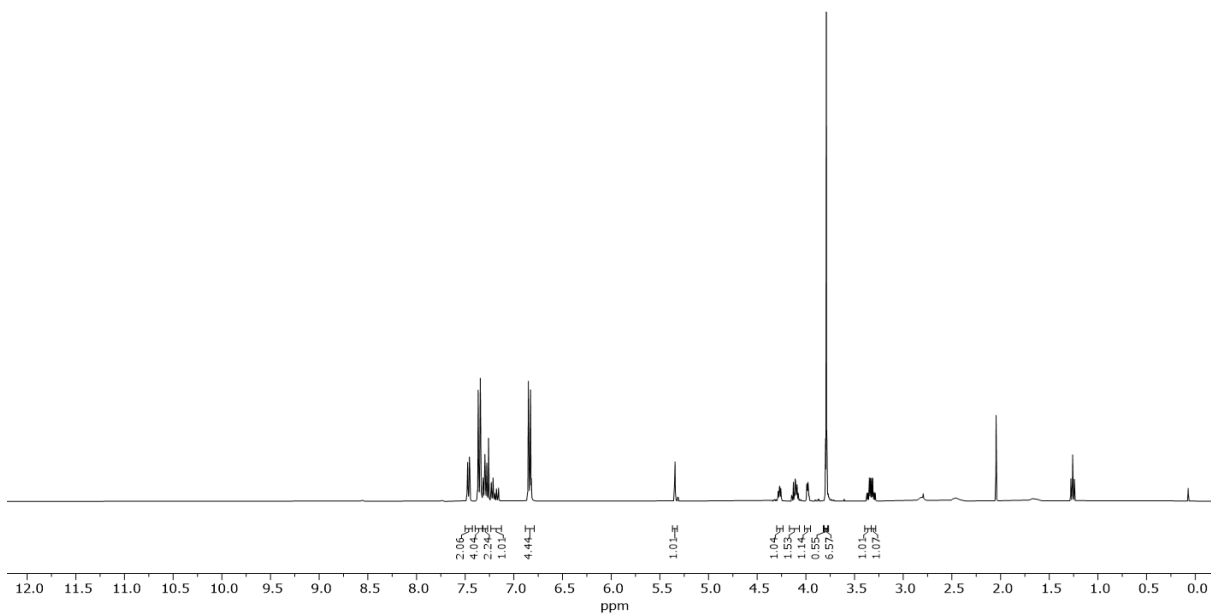
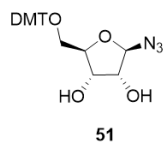


¹³C-NMR (CDCl₃)

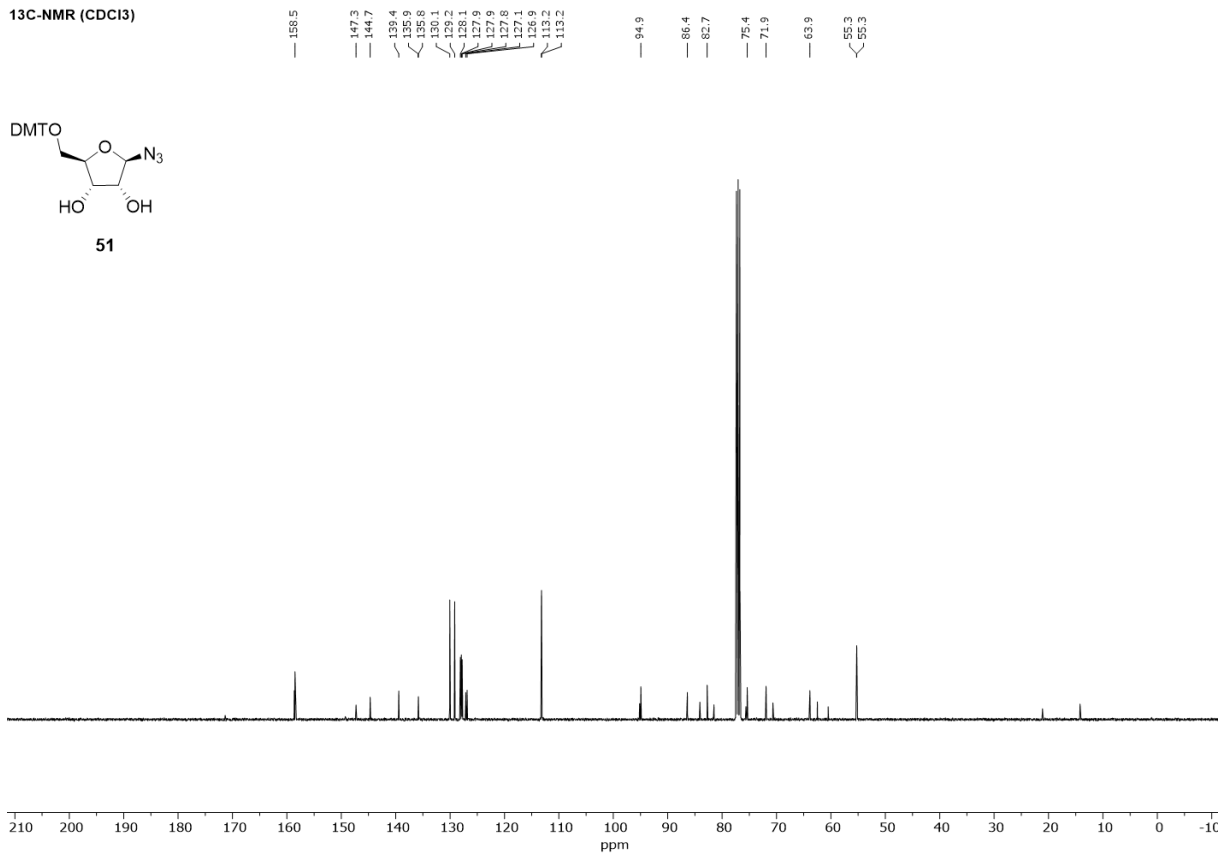
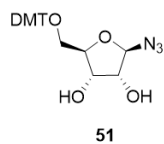


¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

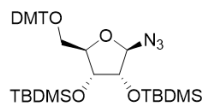
¹H-NMR (CDCl₃)



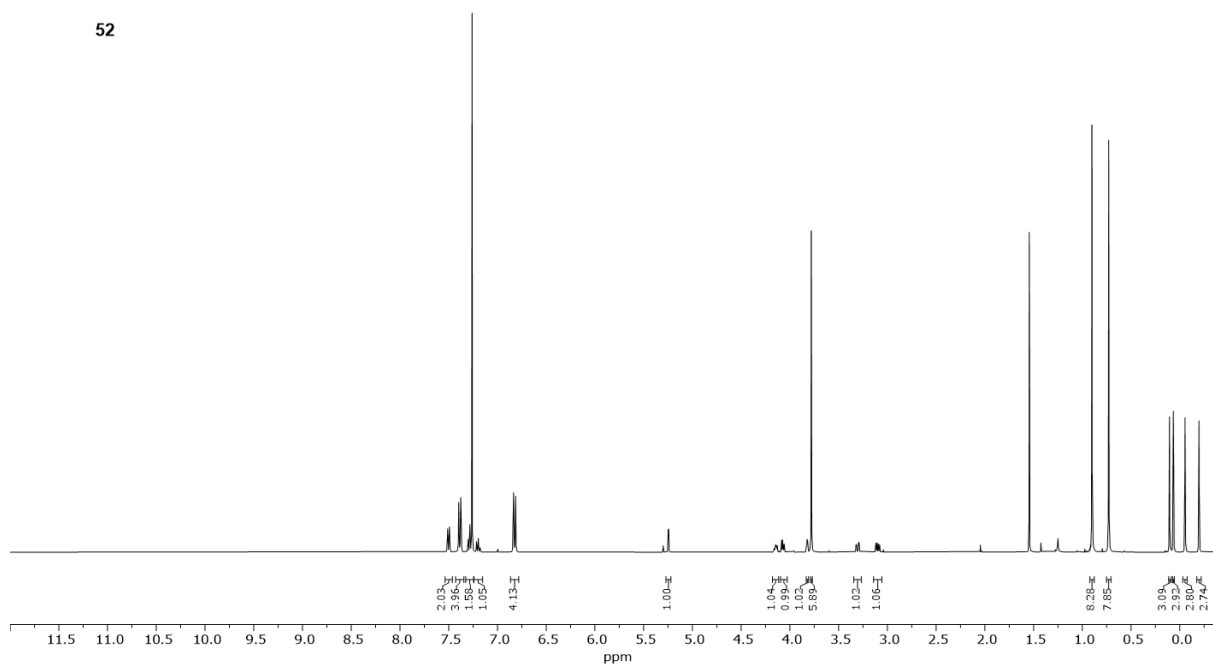
¹³C-NMR (CDCl₃)



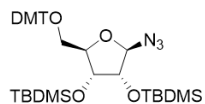
¹H-NMR (CDCl₃)



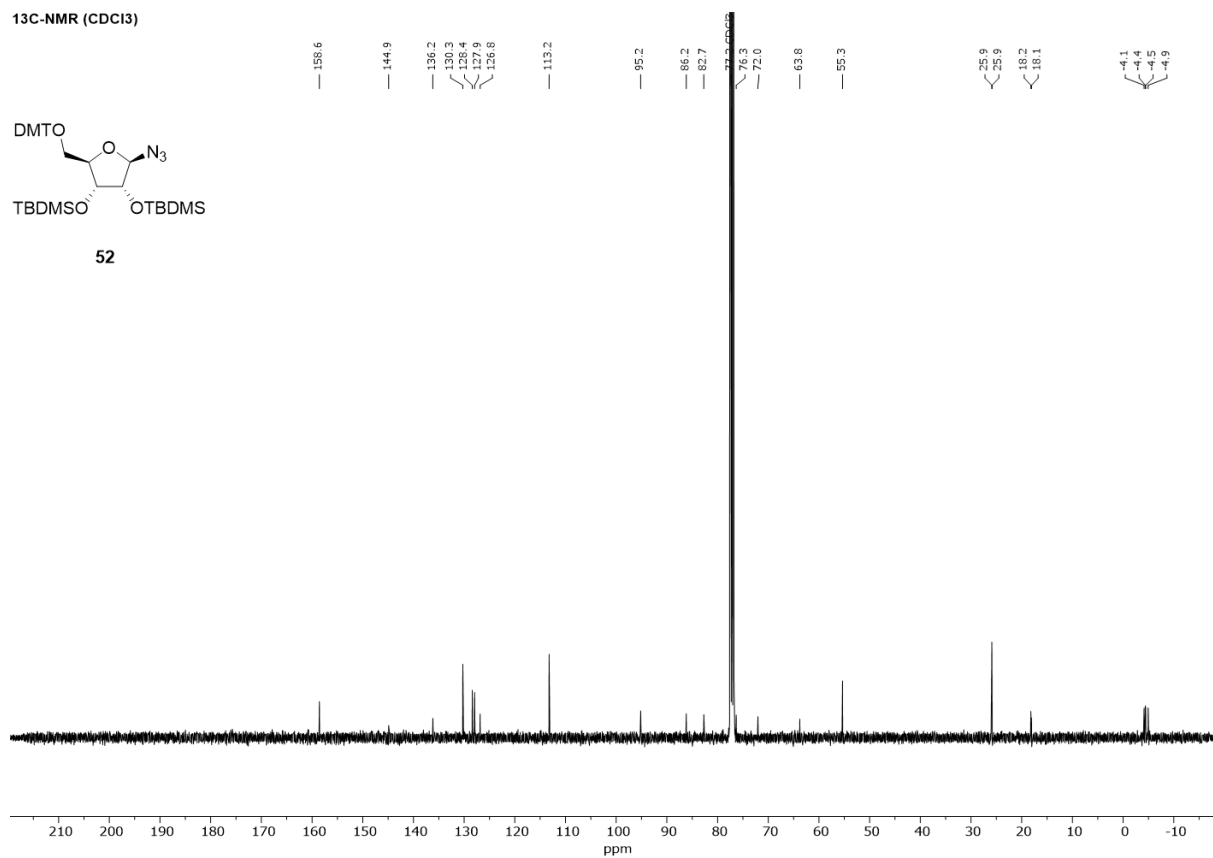
52



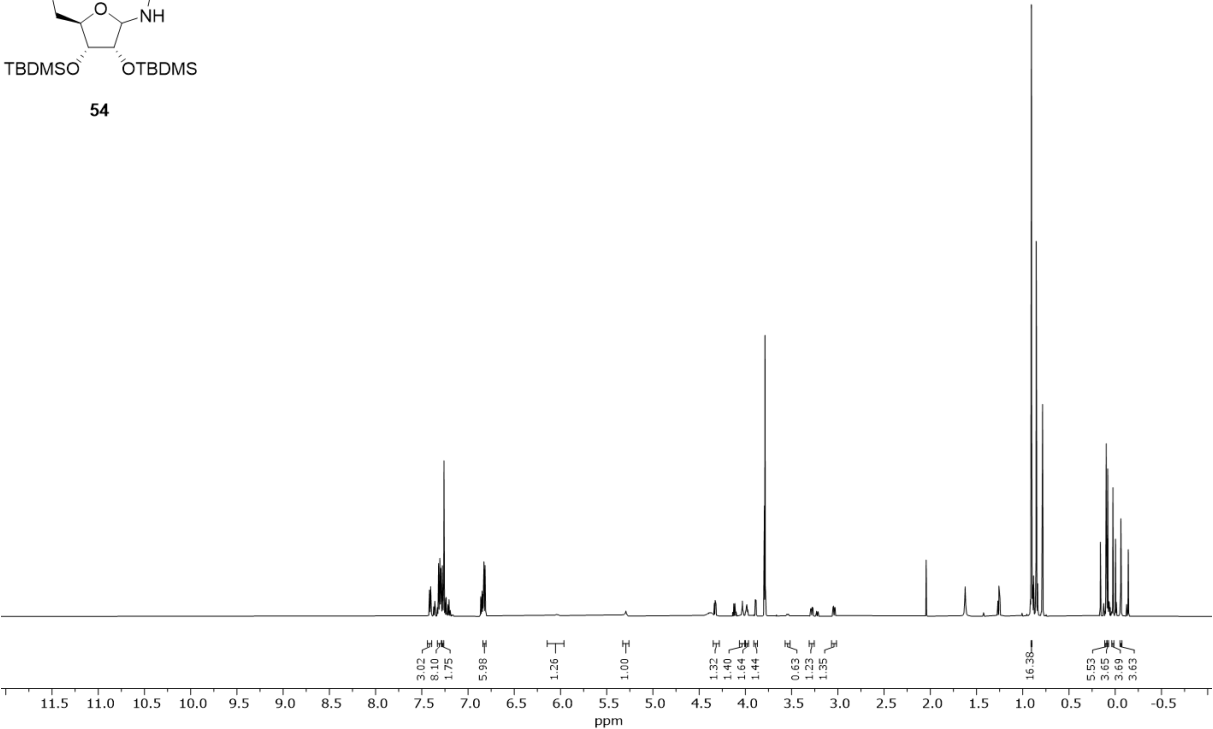
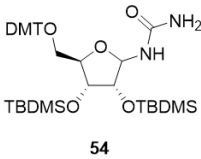
¹³C-NMR (CDCl₃)



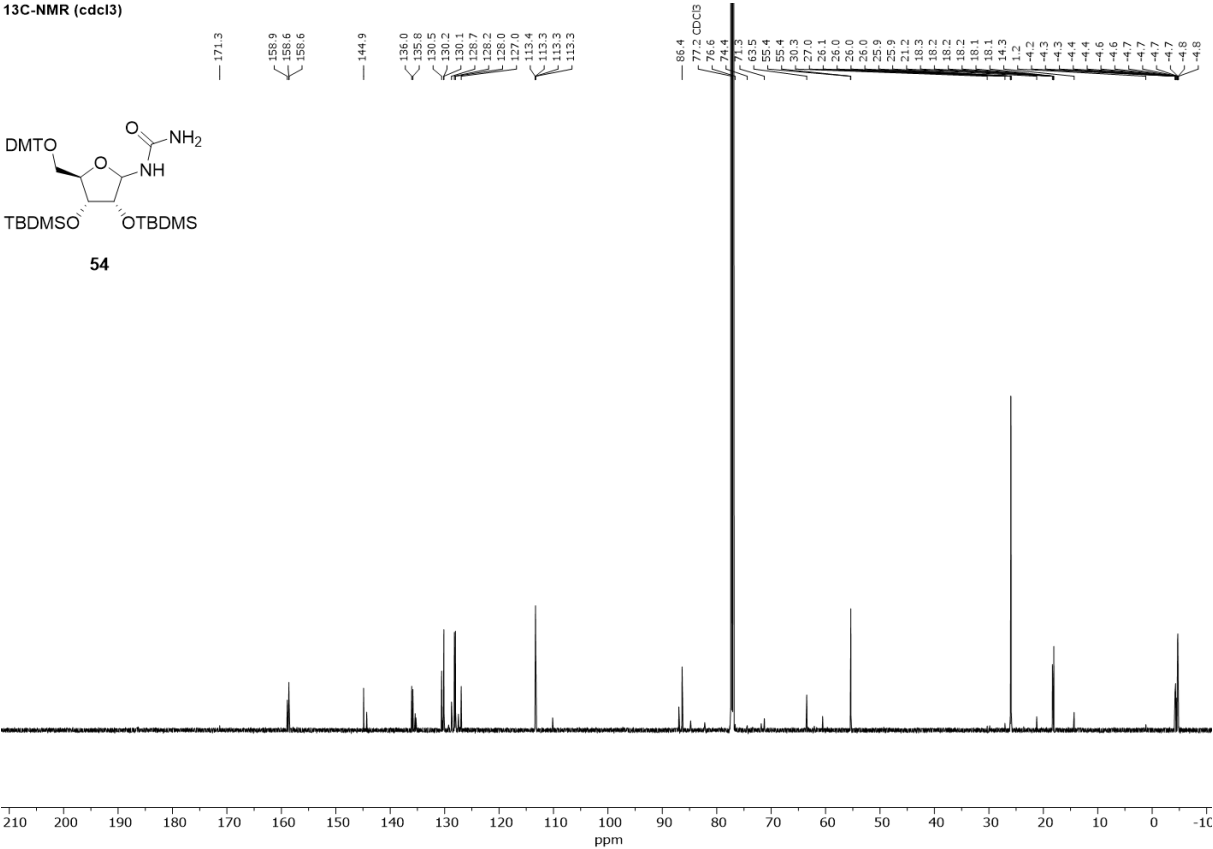
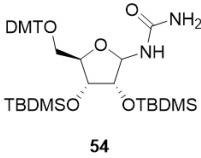
52



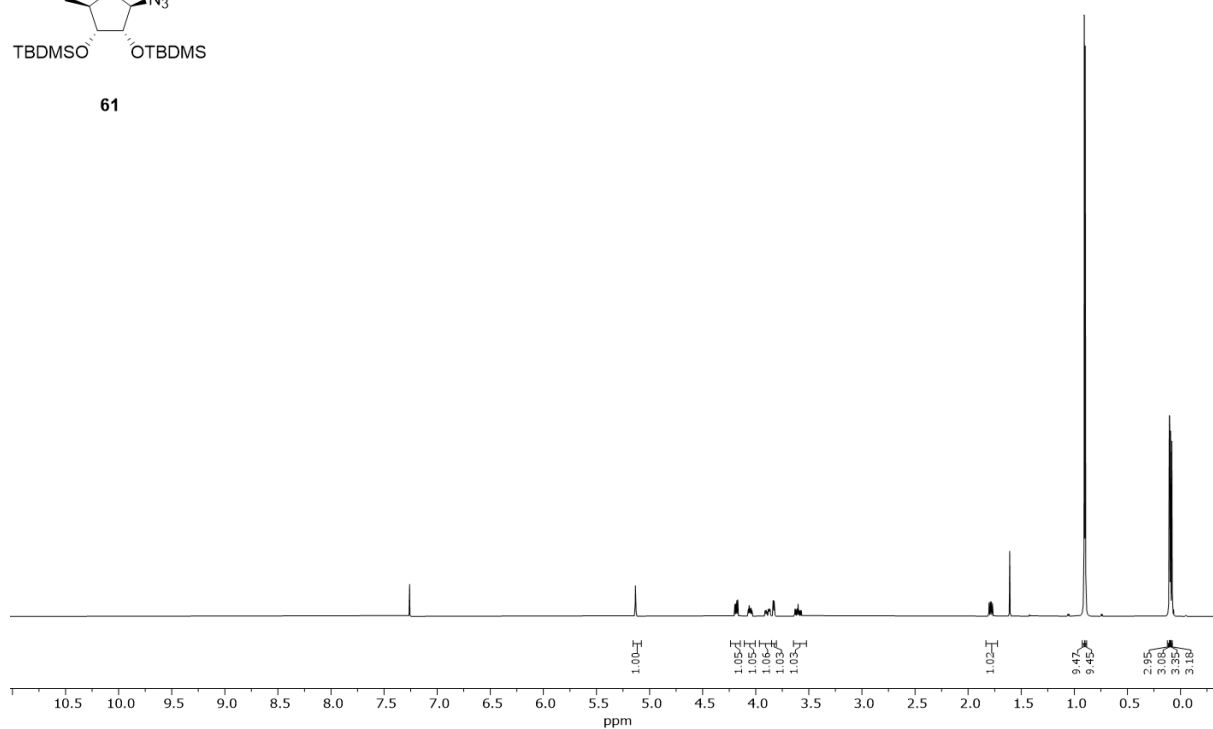
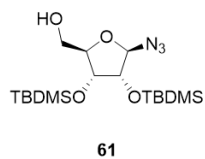
¹H-NMR (cdcl₃)



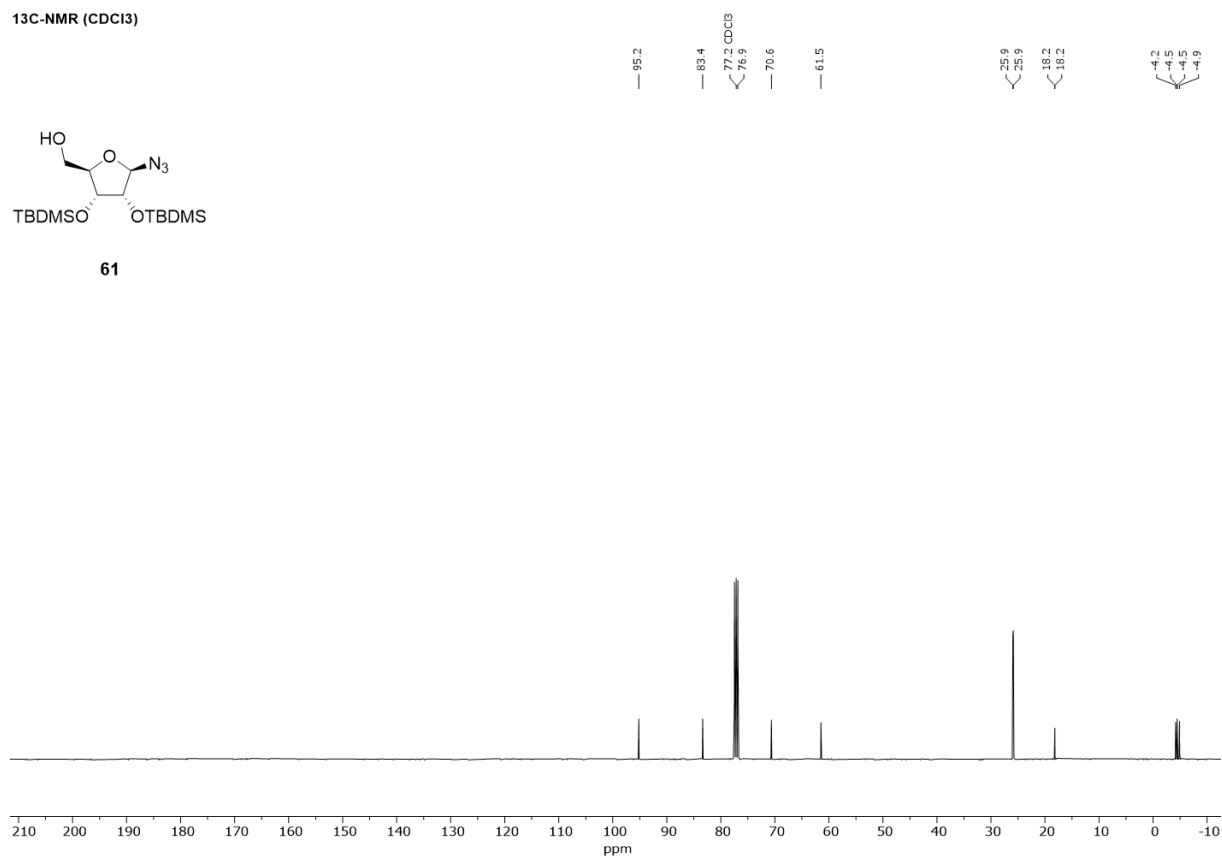
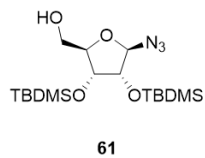
¹³C-NMR (cdcl₃)



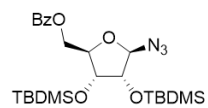
¹H-NMR (CDCl₃)



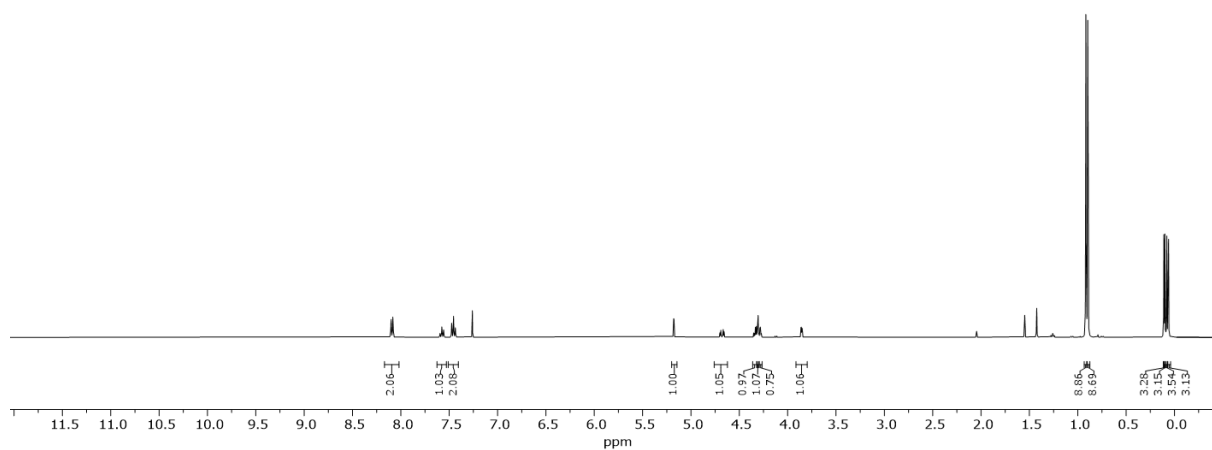
¹³C-NMR (CDCl₃)



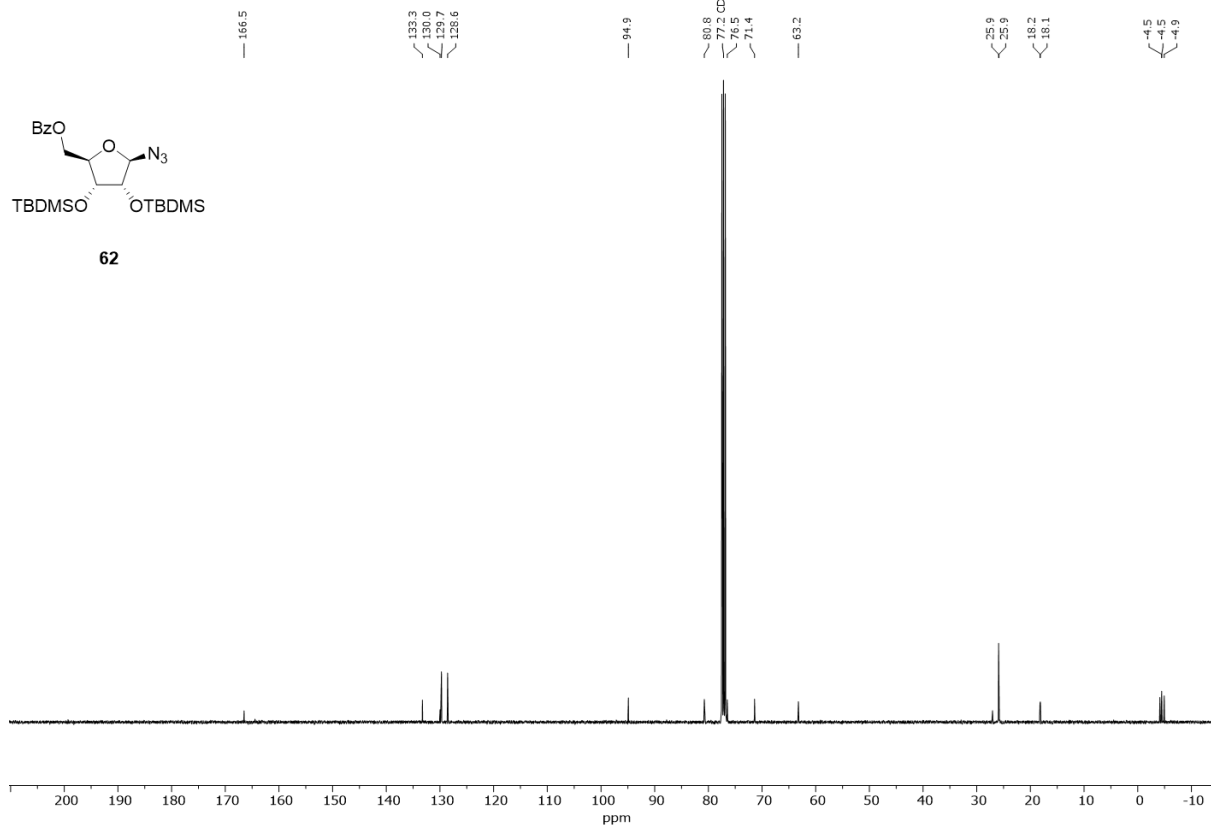
¹H-NMR (CDCl₃)



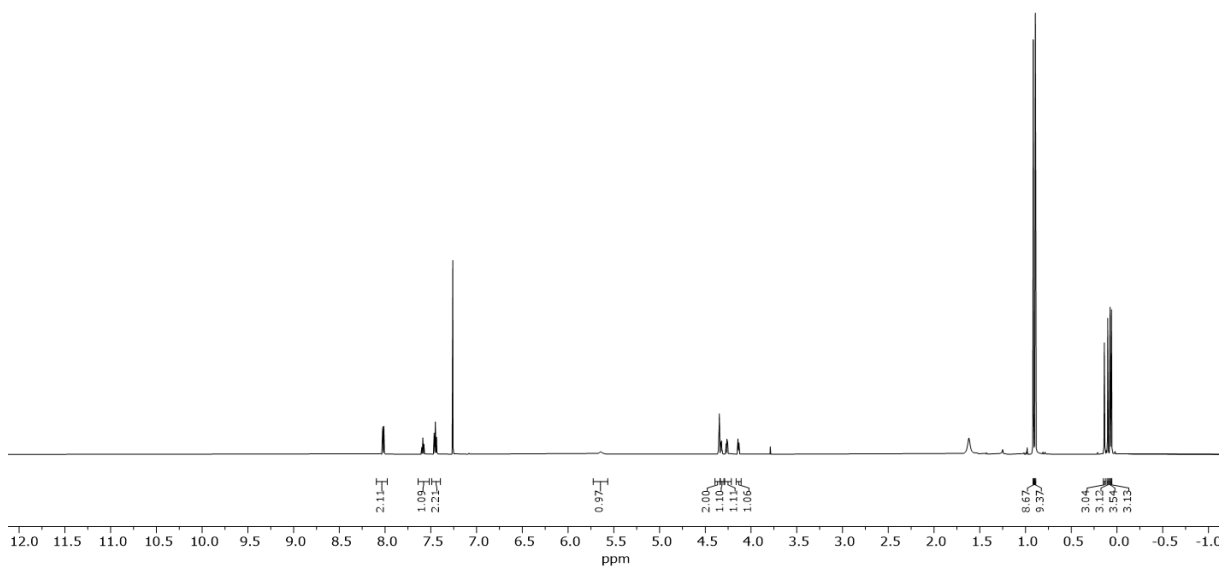
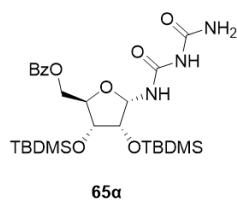
62



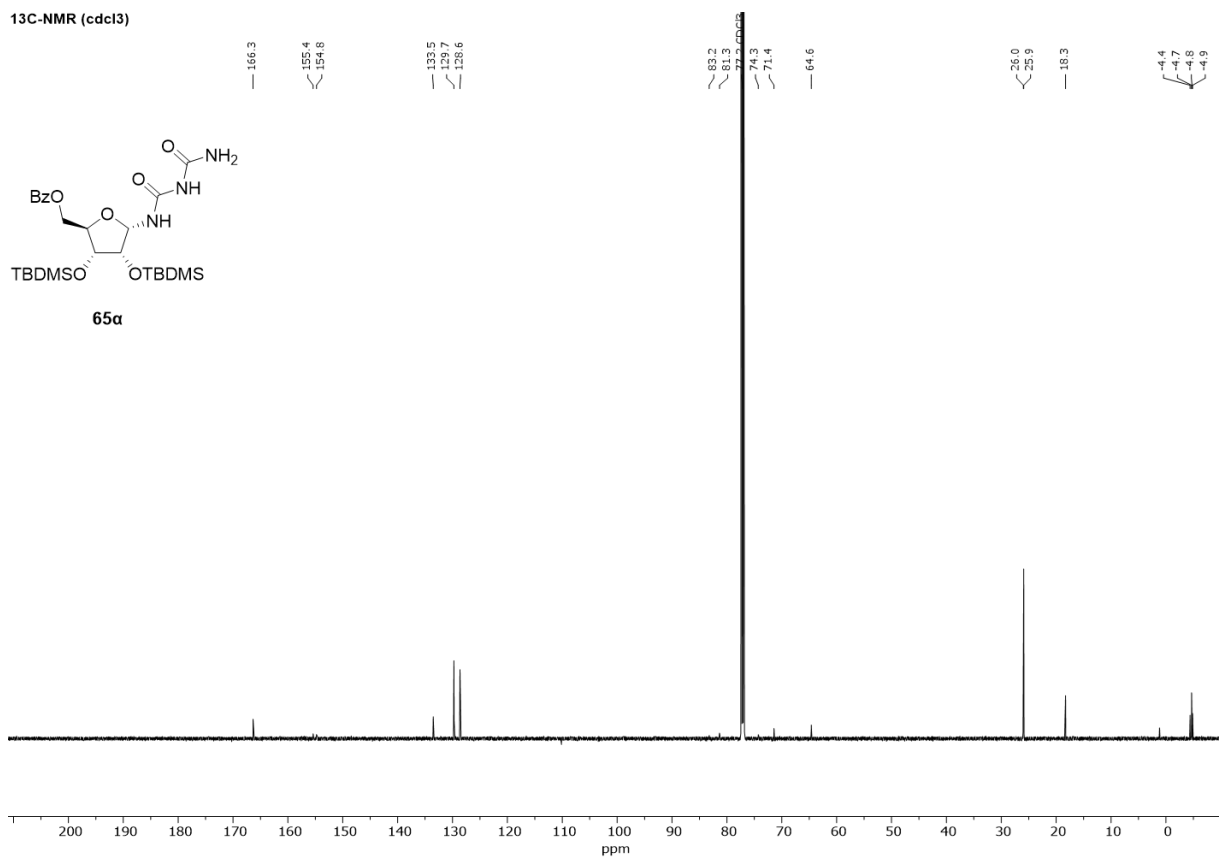
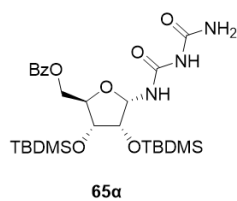
¹³C-NMR (CDCl₃)



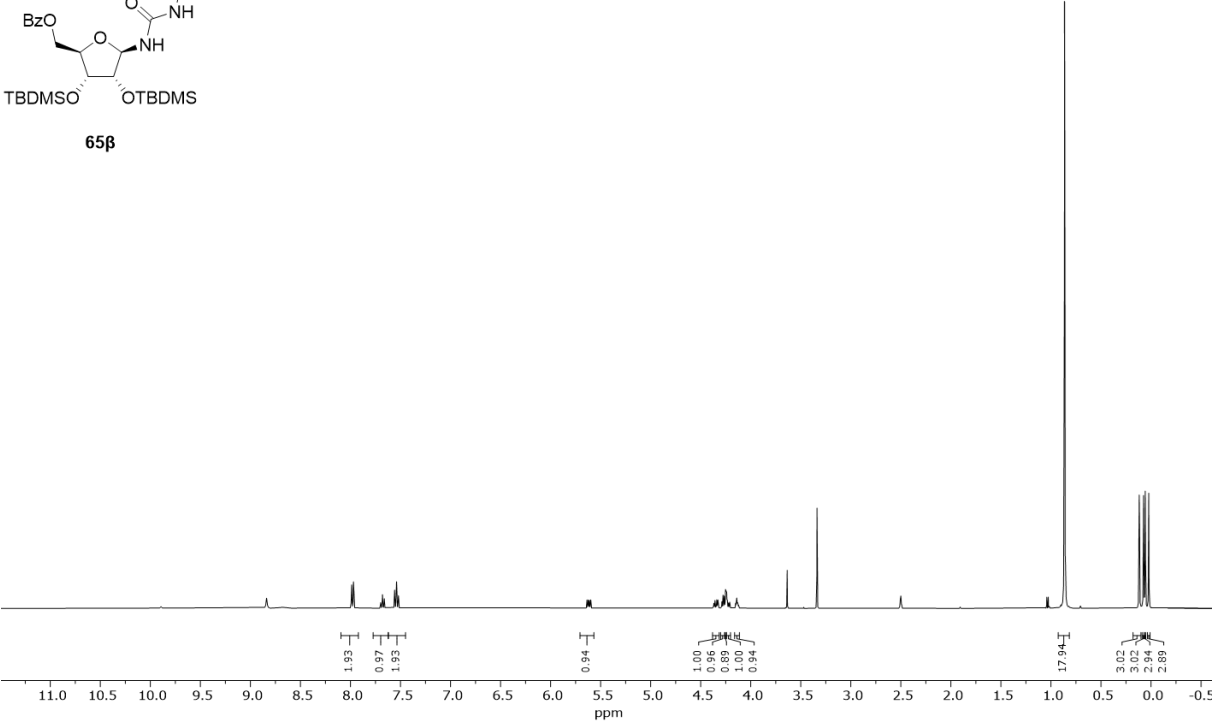
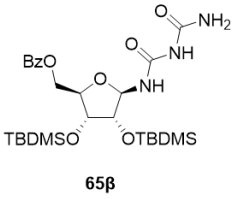
¹H-NMR (cdcl₃)



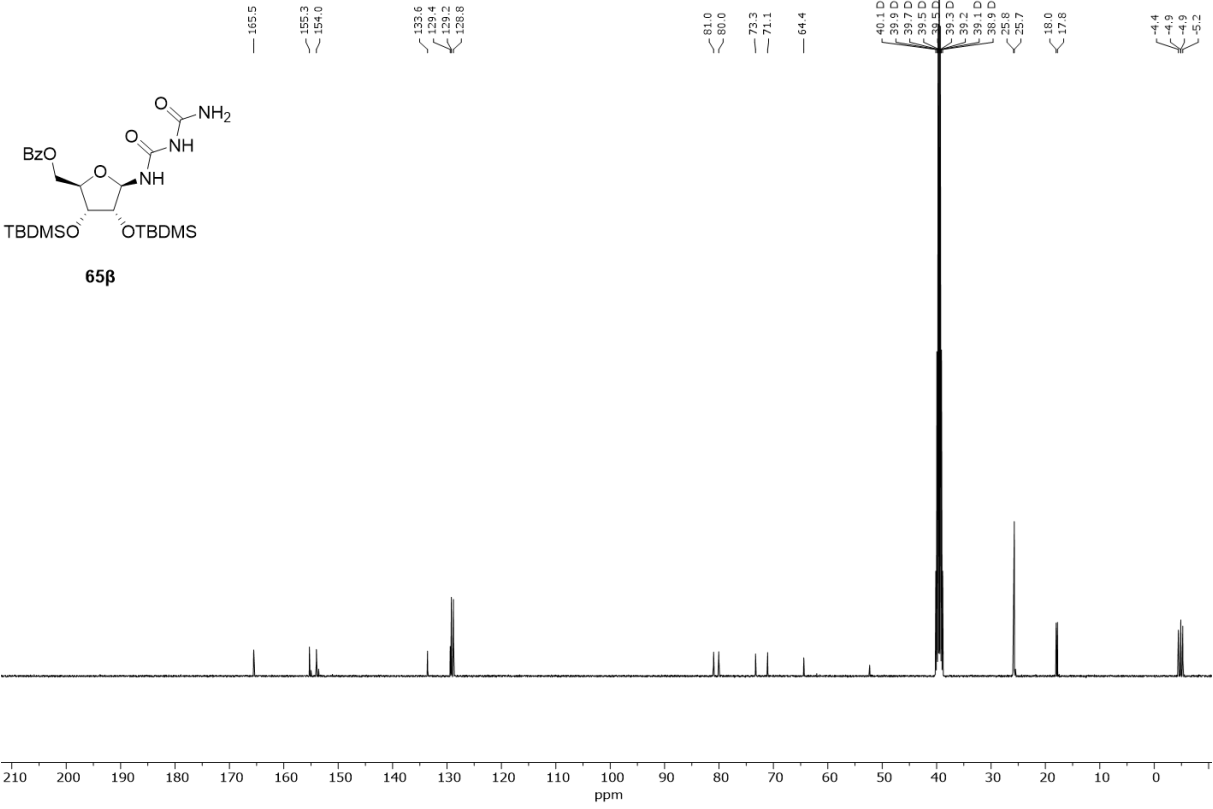
¹³C-NMR (cdcl₃)

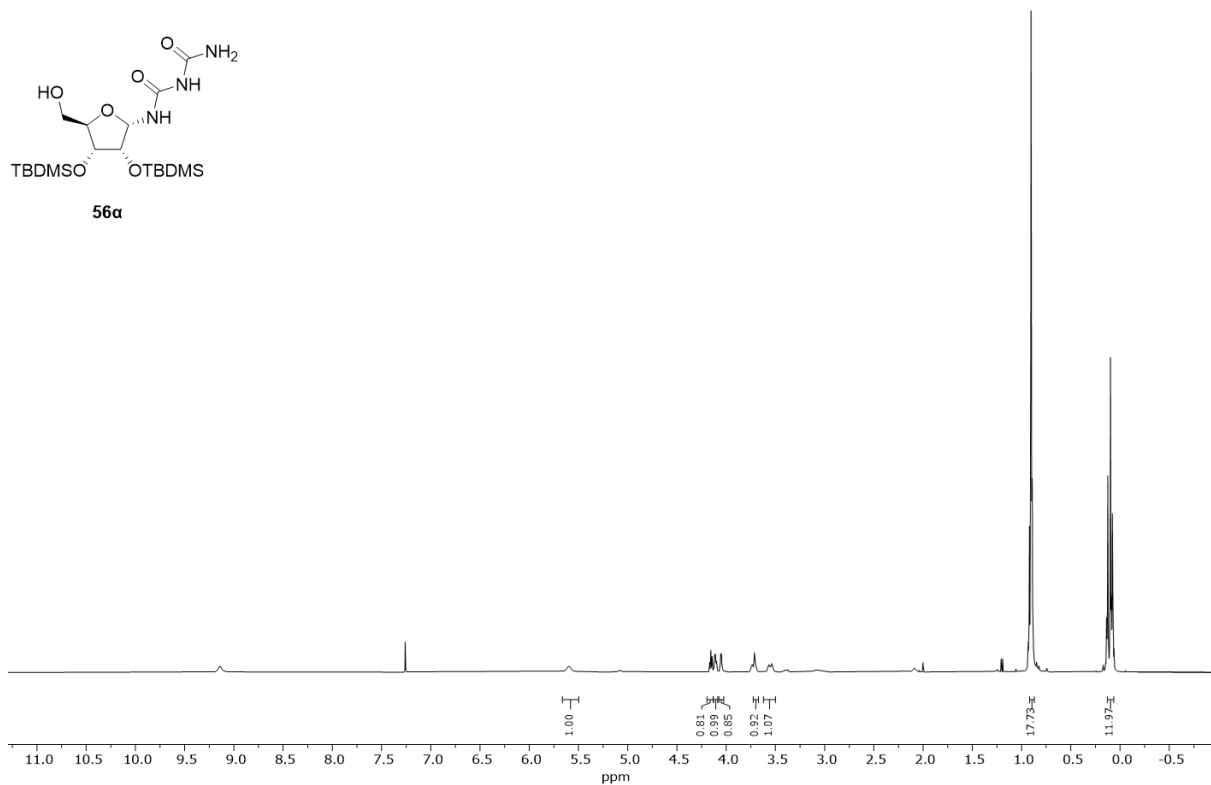
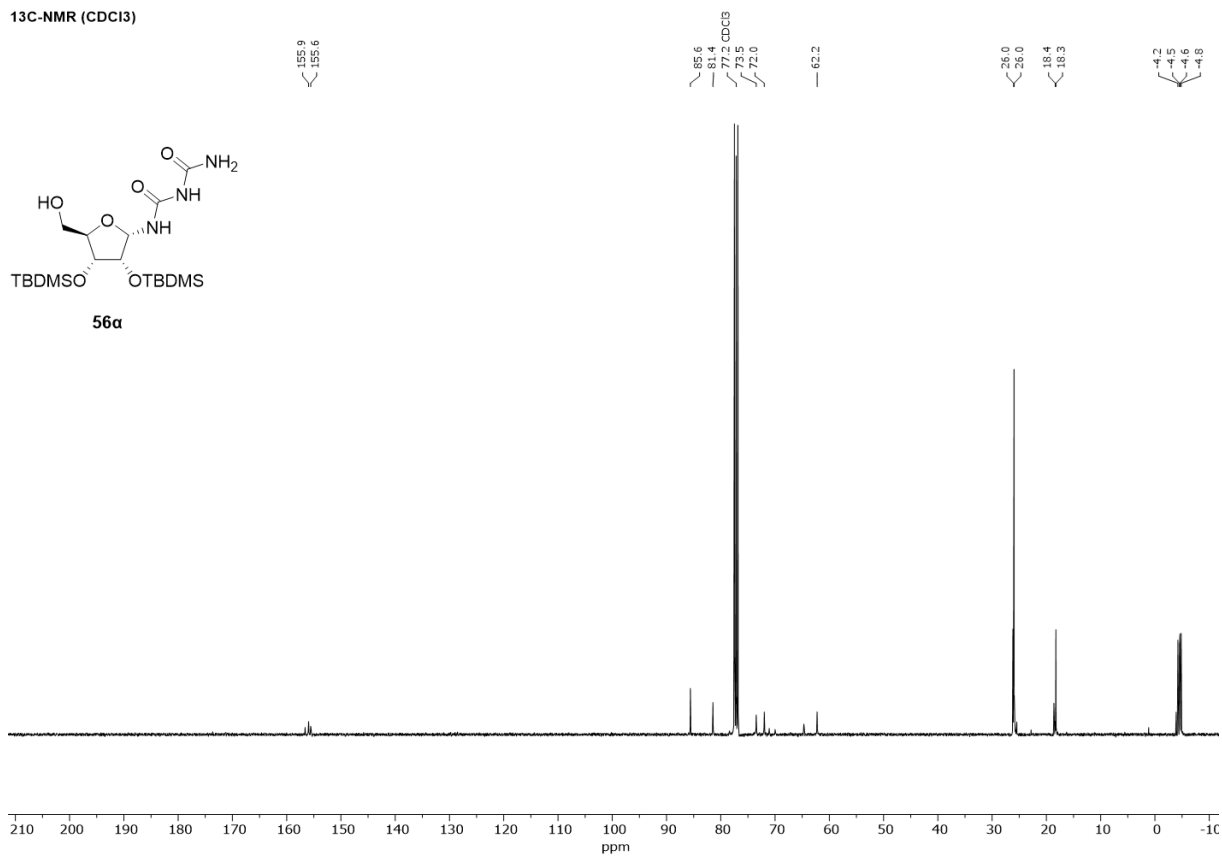


¹H-NMR (DMSO)

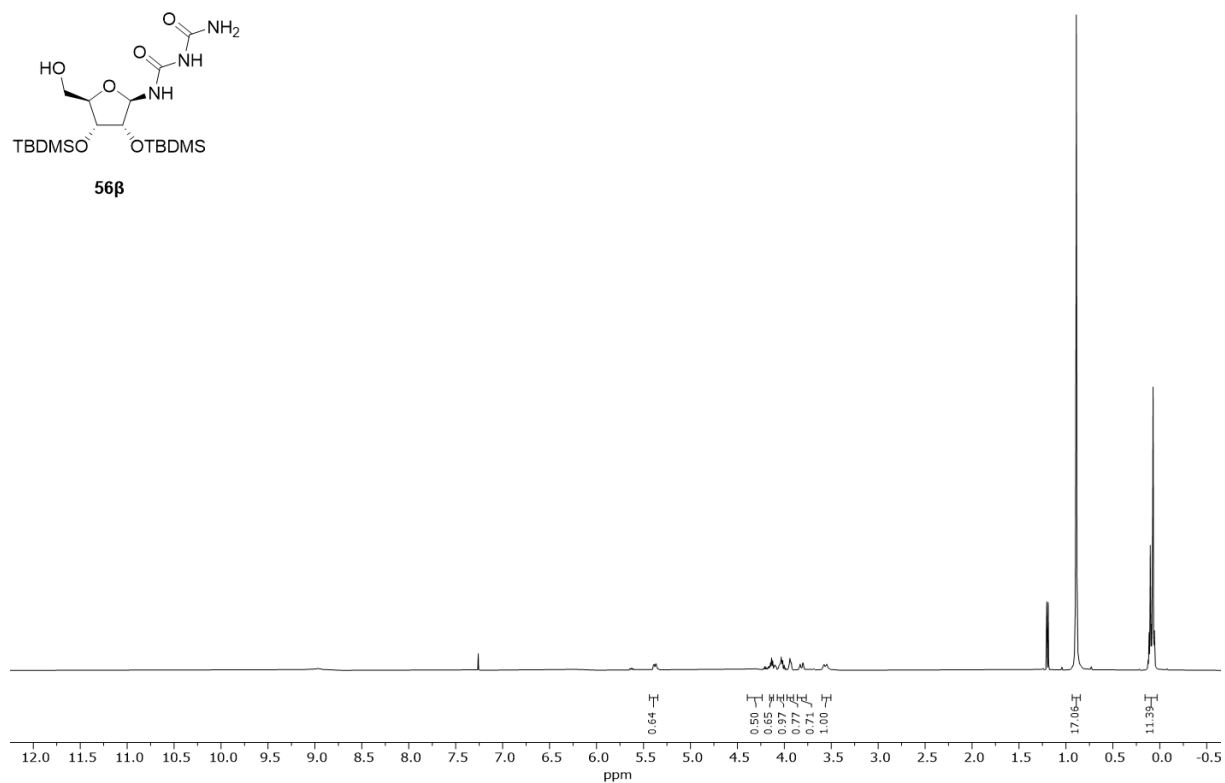
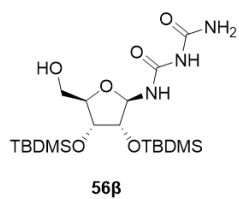


¹³C-NMR (DMSO)

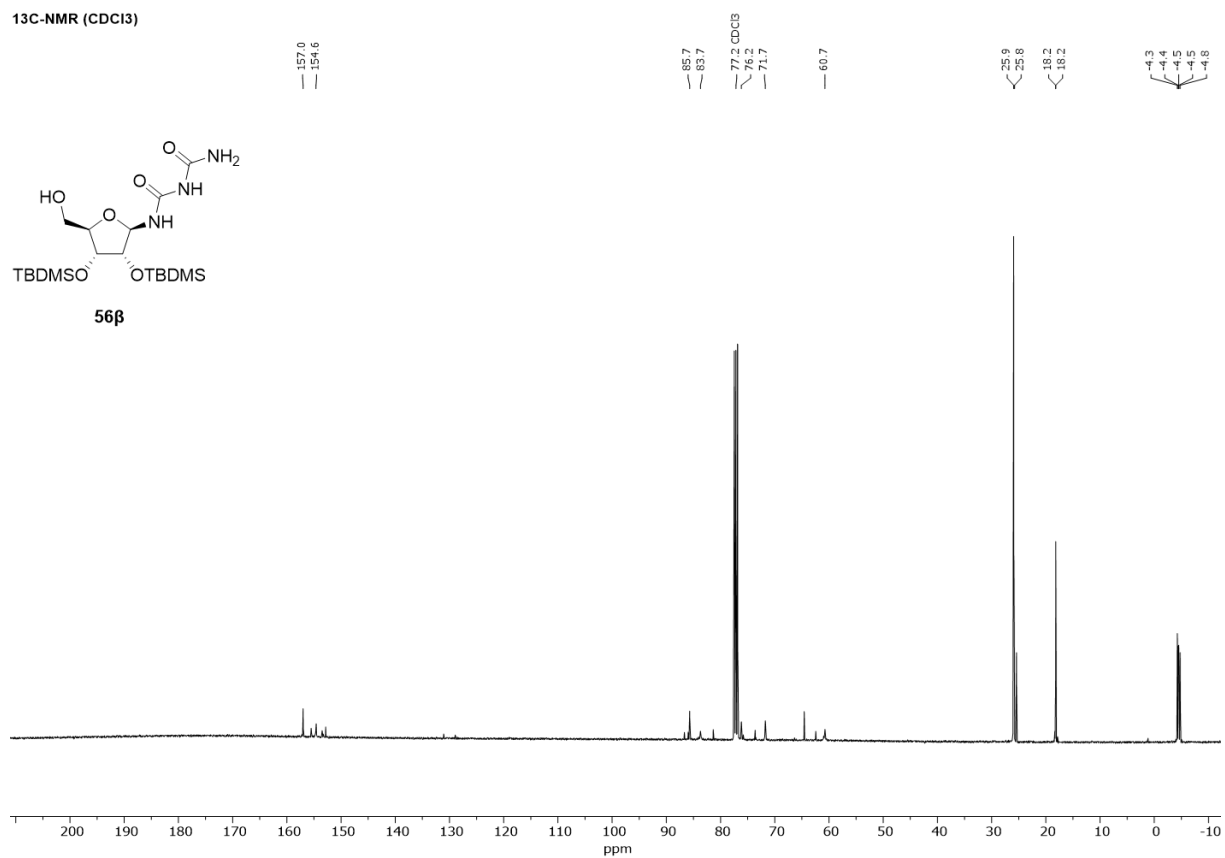
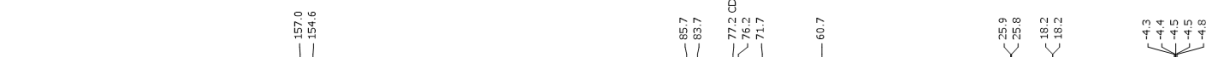


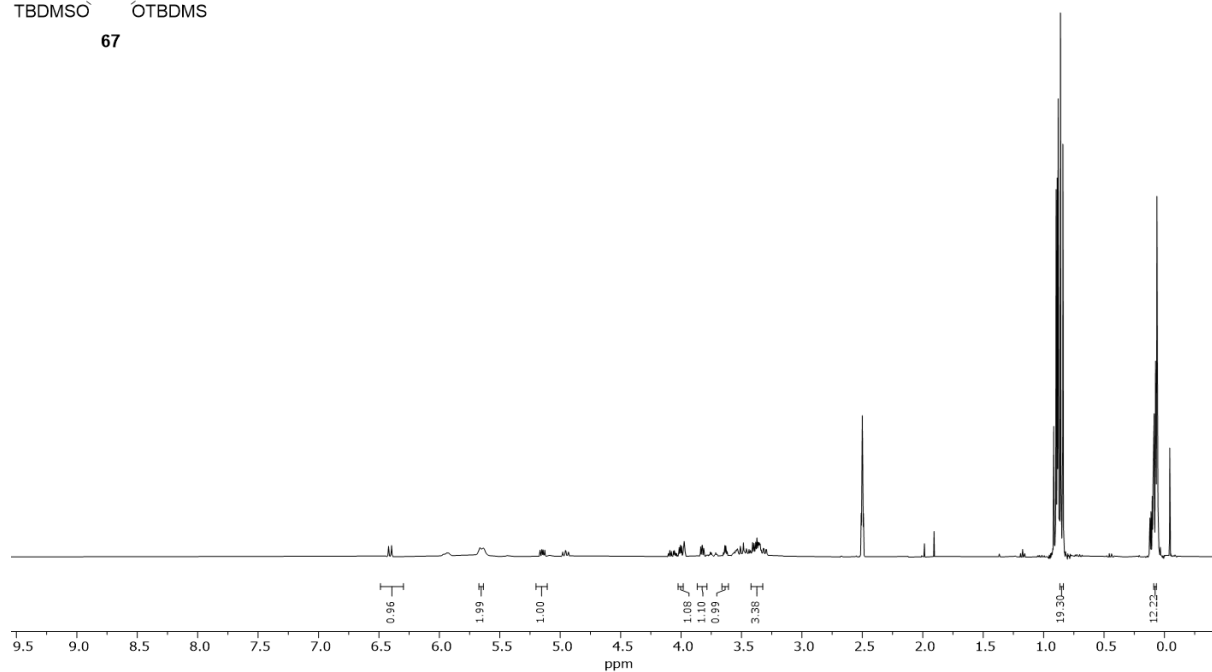
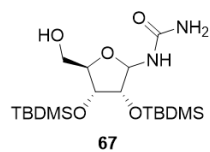
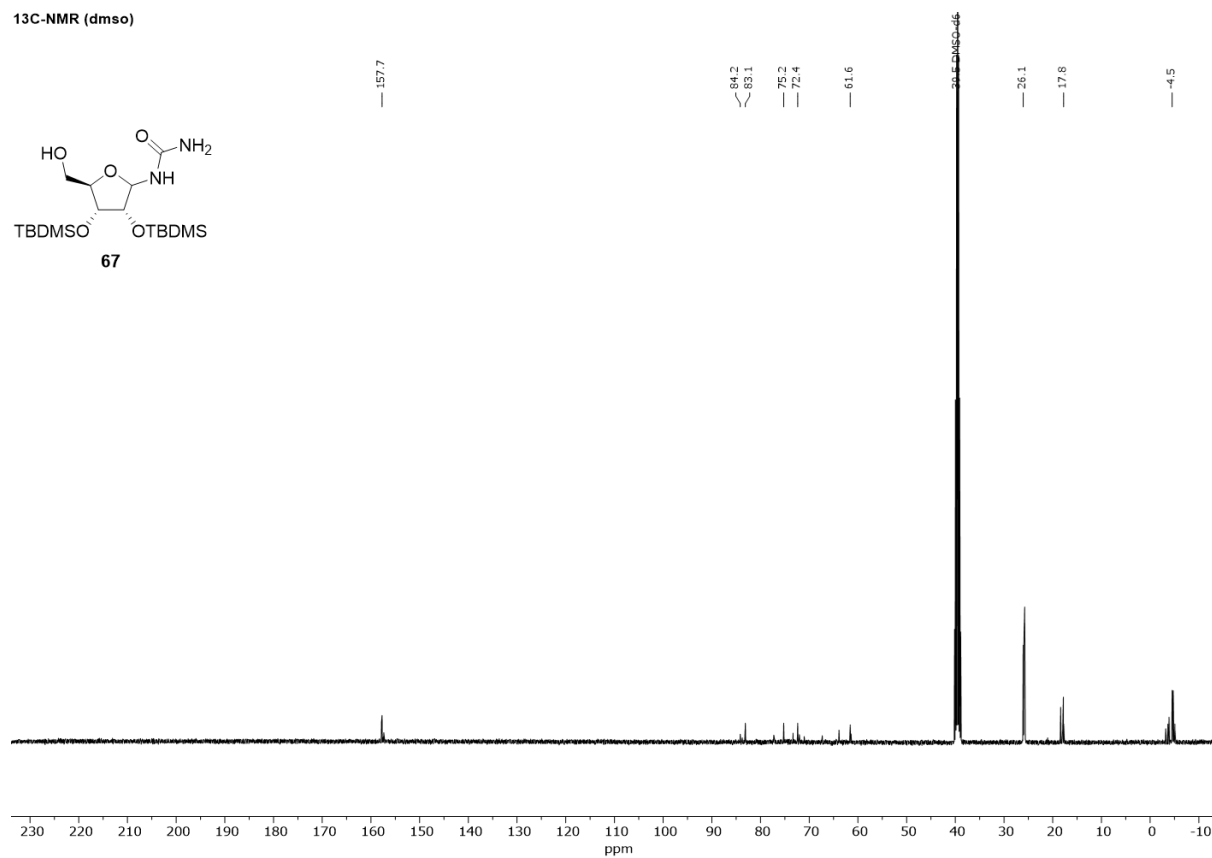
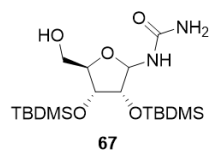
¹H-NMR (CDCl₃)¹³C-NMR (CDCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃)

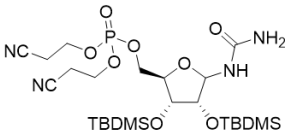


¹³C-NMR (CDCl₃)

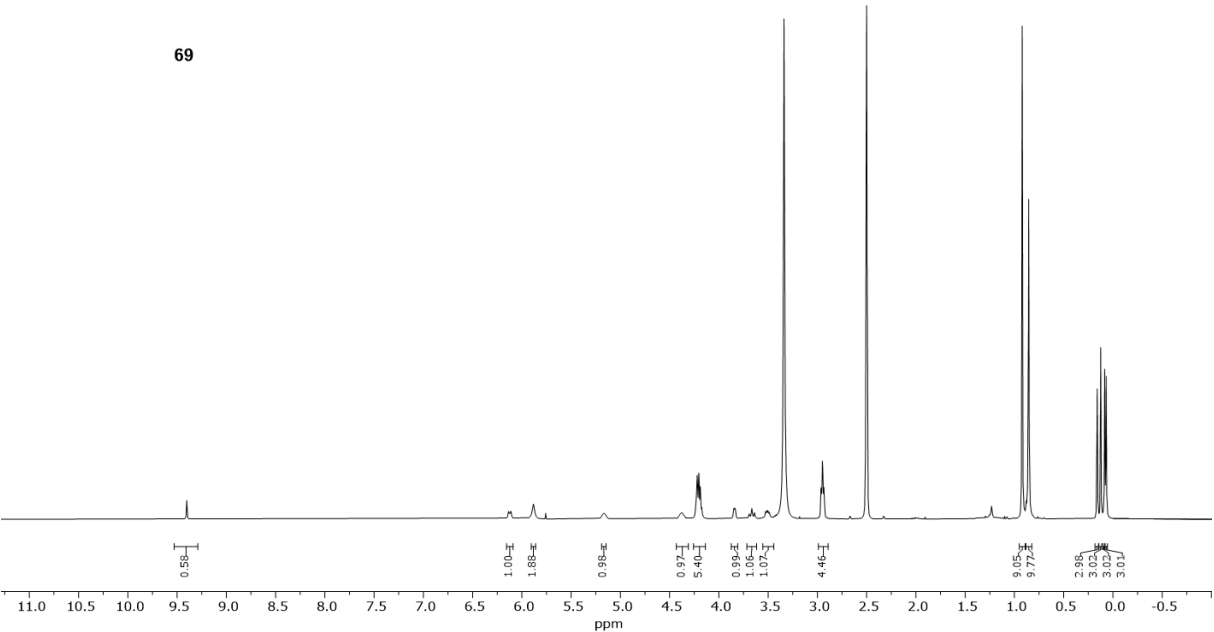


¹H-NMR (dmso)¹³C-NMR (dmso)

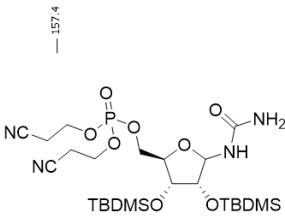
¹H-NMR (DMSO)



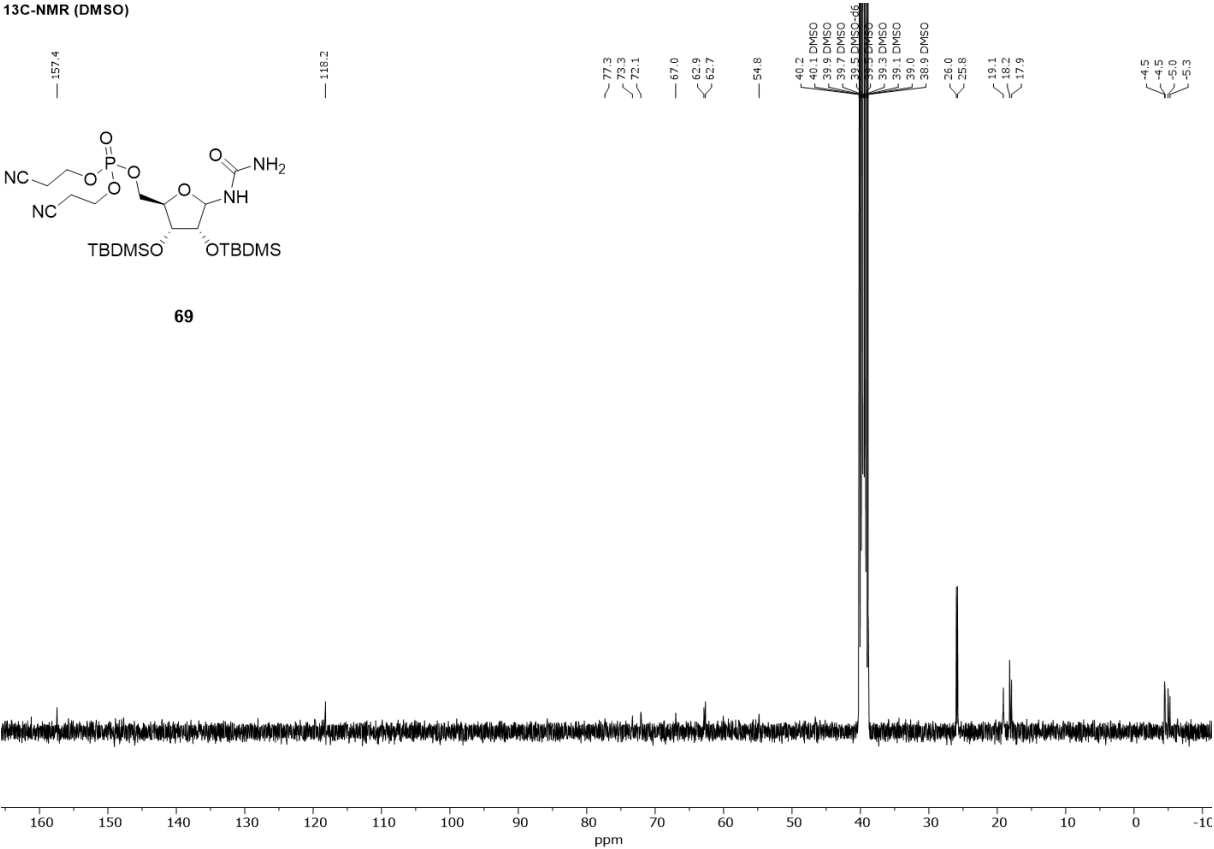
69



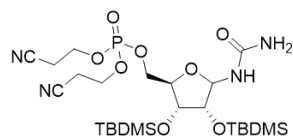
¹³C-NMR (DMSO)



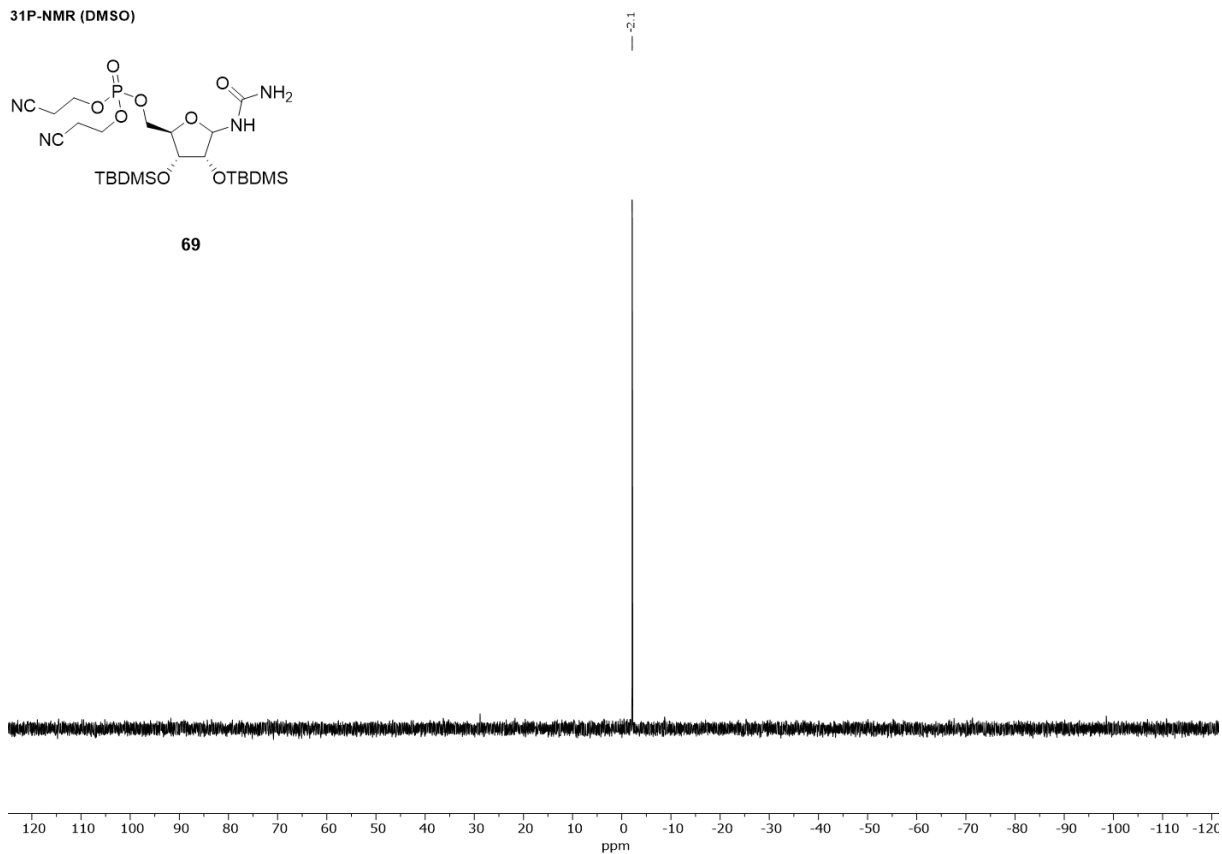
69



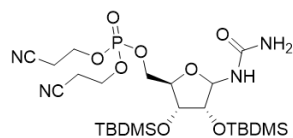
³¹P-NMR (DMSO)



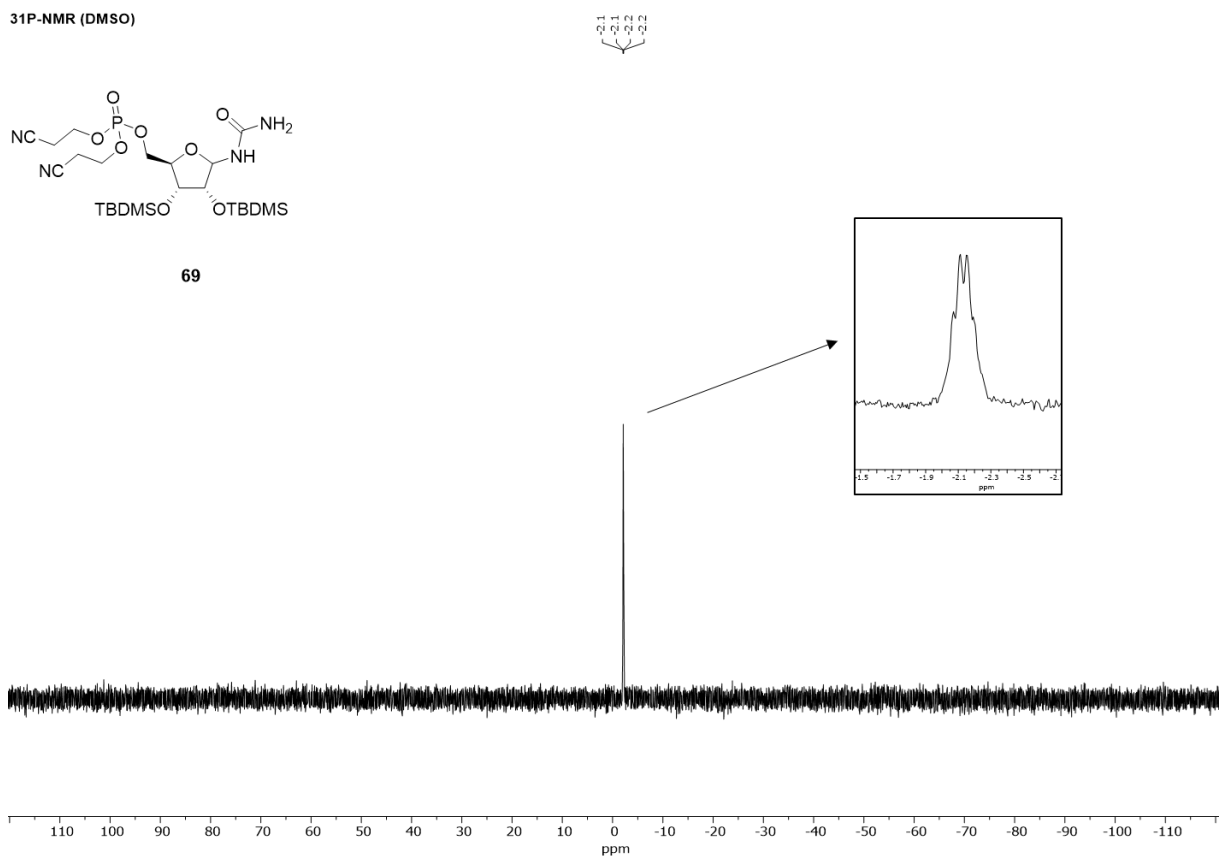
69



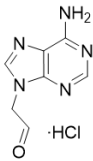
³¹P-NMR (DMSO)



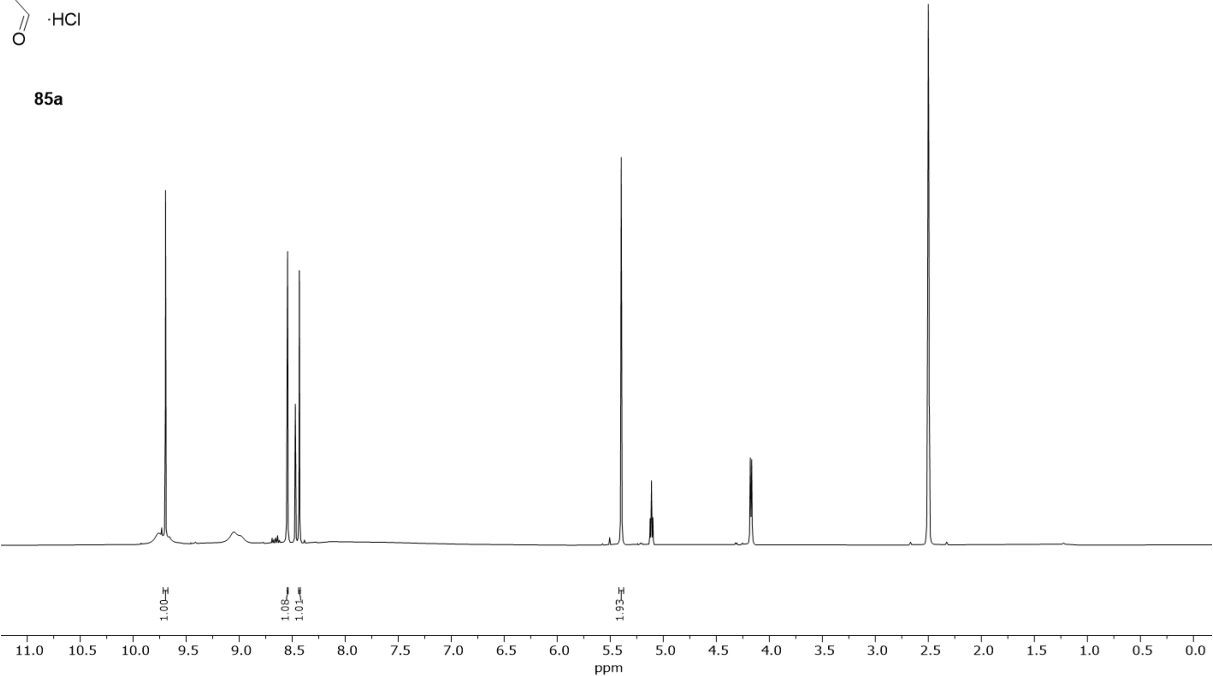
69



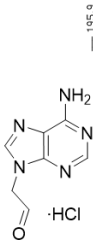
¹H-NMR (DMSO)



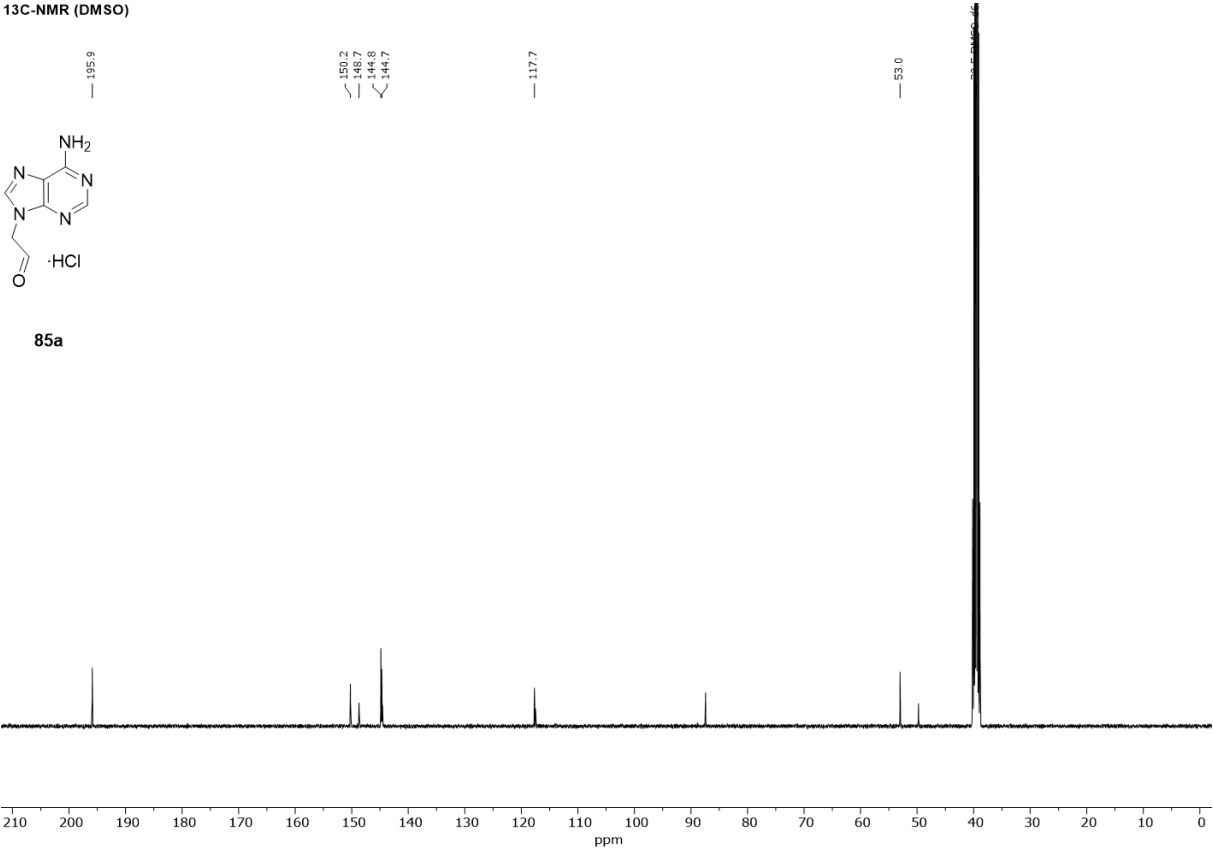
85a



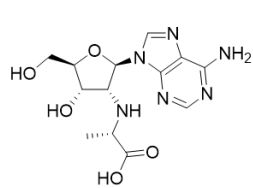
¹³C-NMR (DMSO)



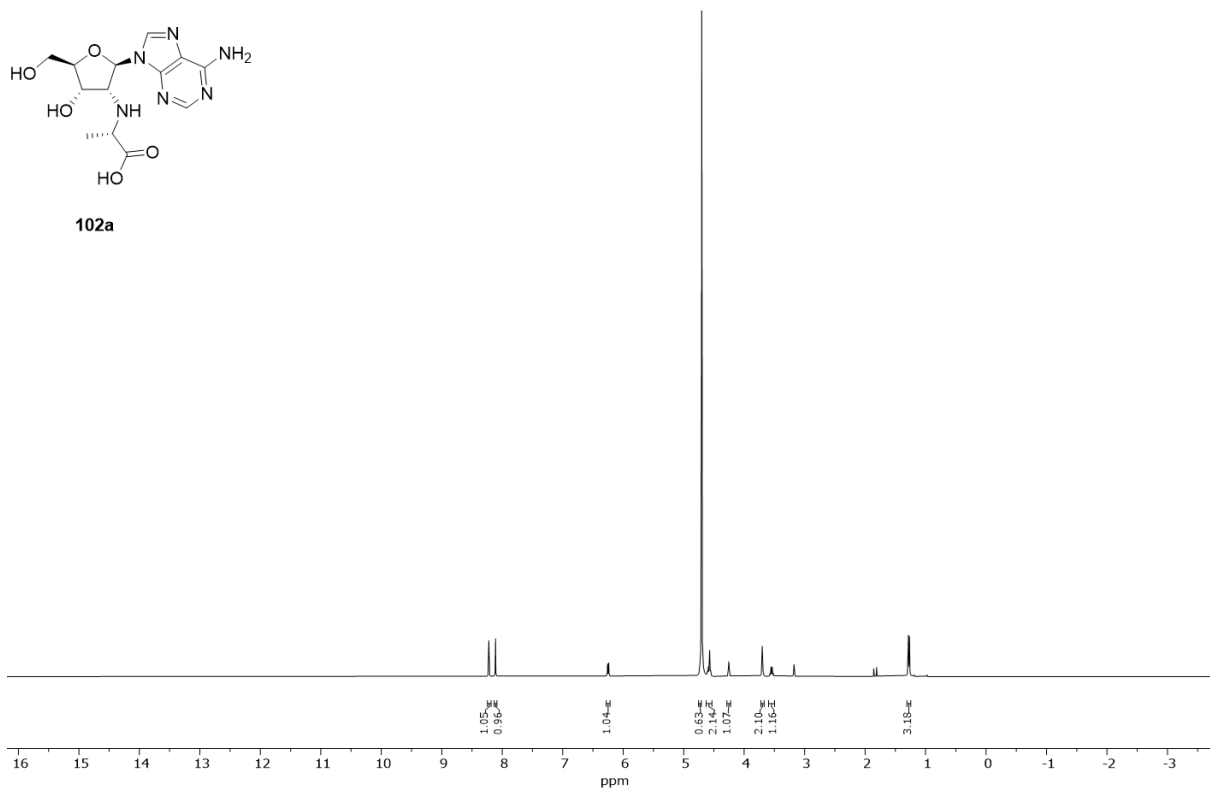
85a



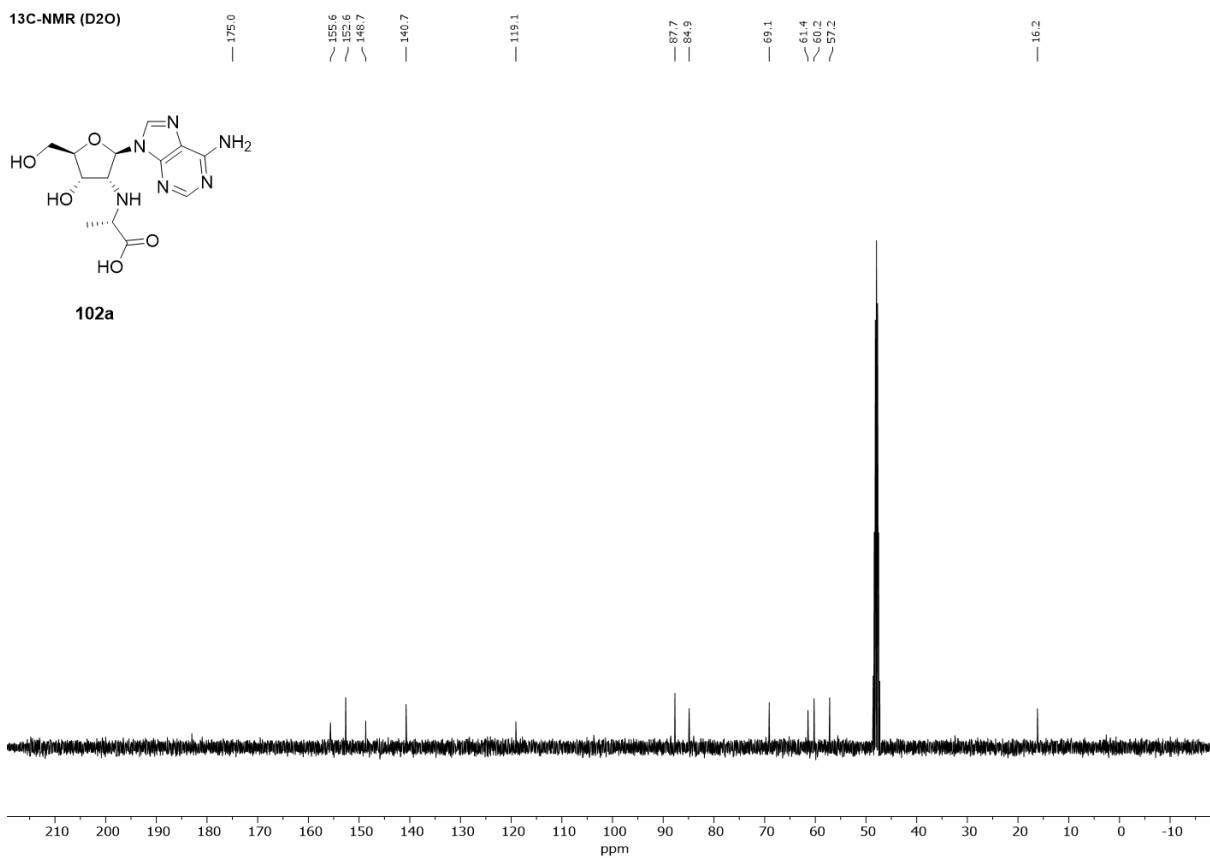
¹H-NMR (D₂O)



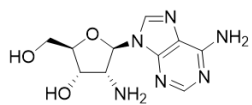
102a



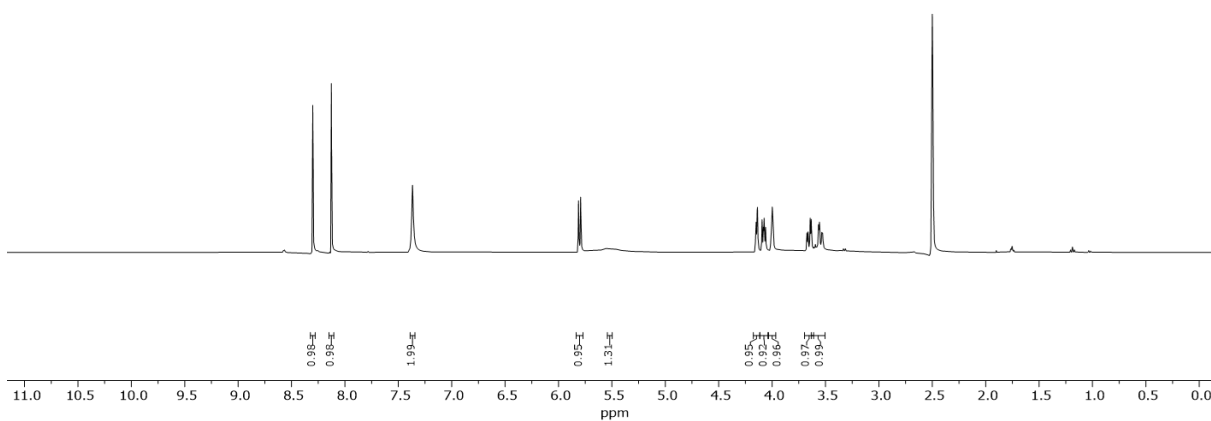
¹³C-NMR (D₂O)



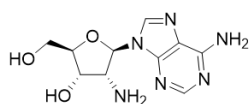
¹H-NMR (DMSO)



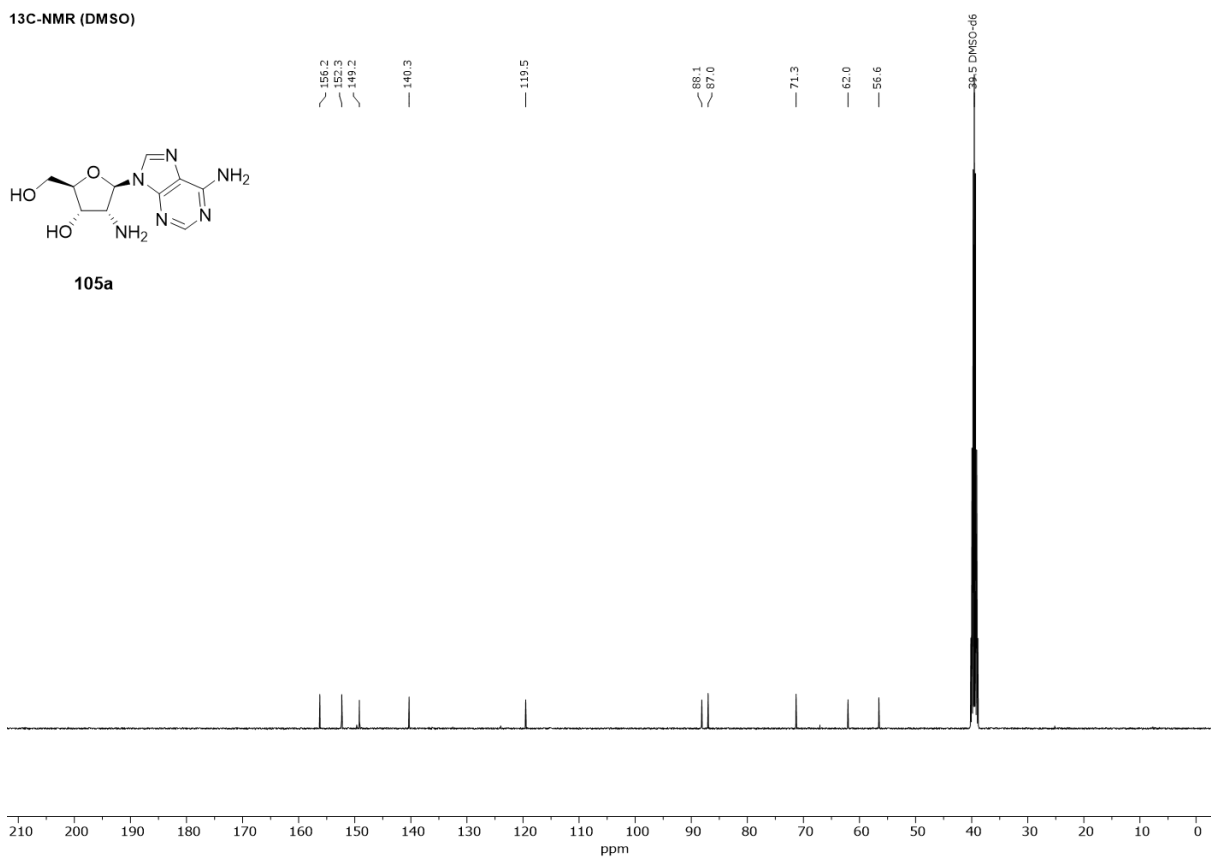
105a

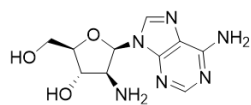
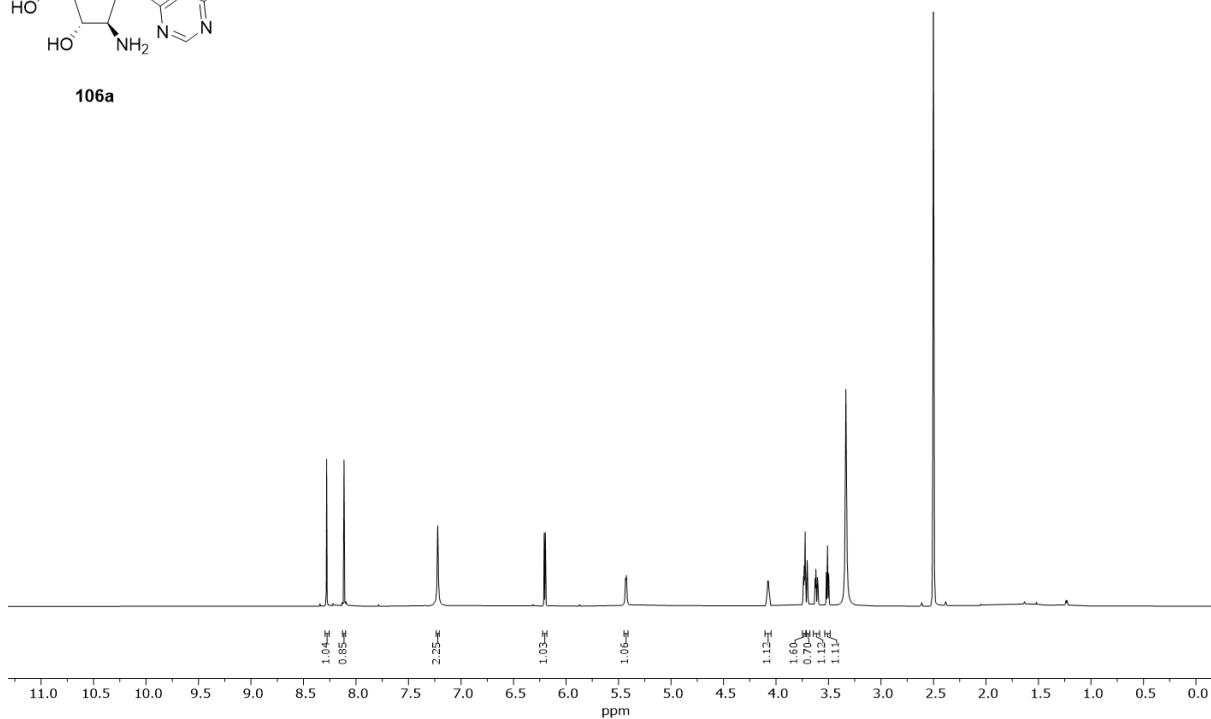
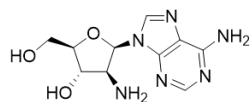
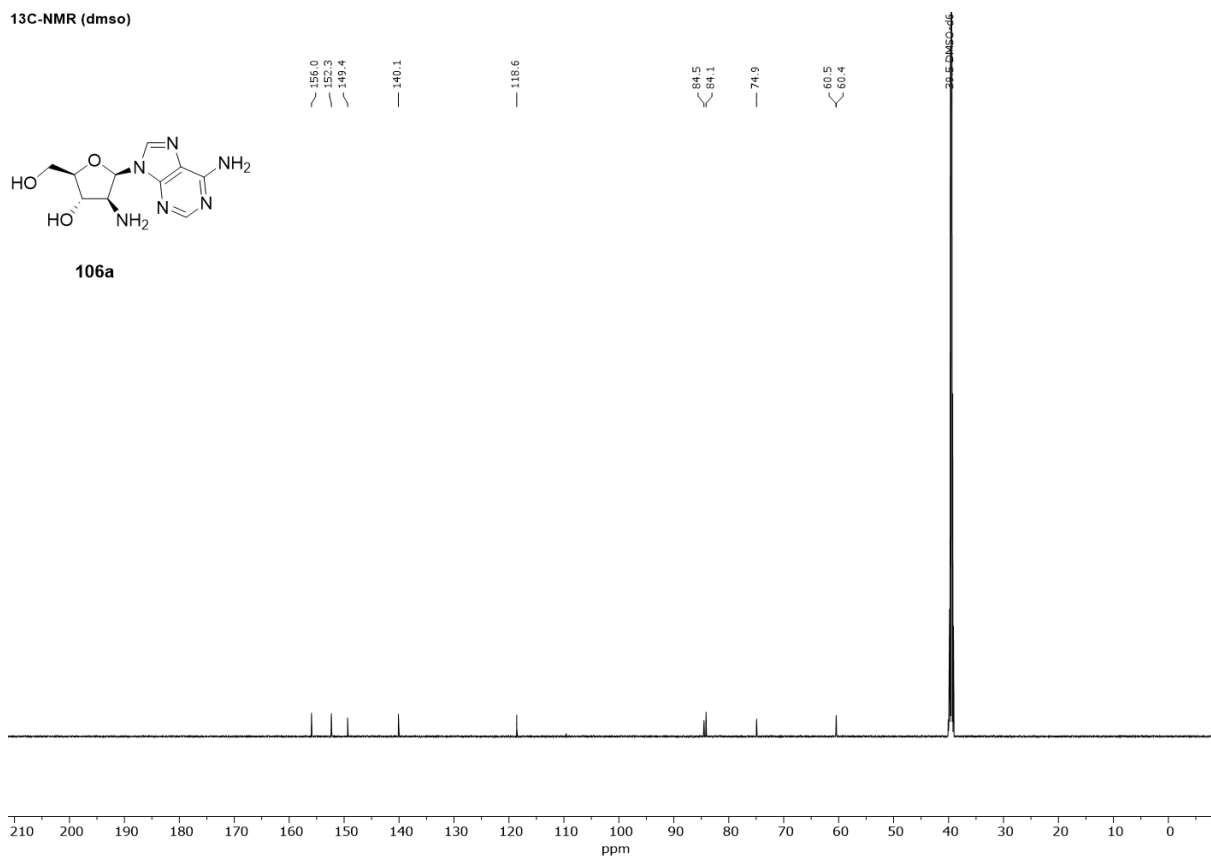


¹³C-NMR (DMSO)

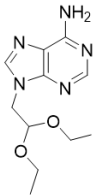


105a

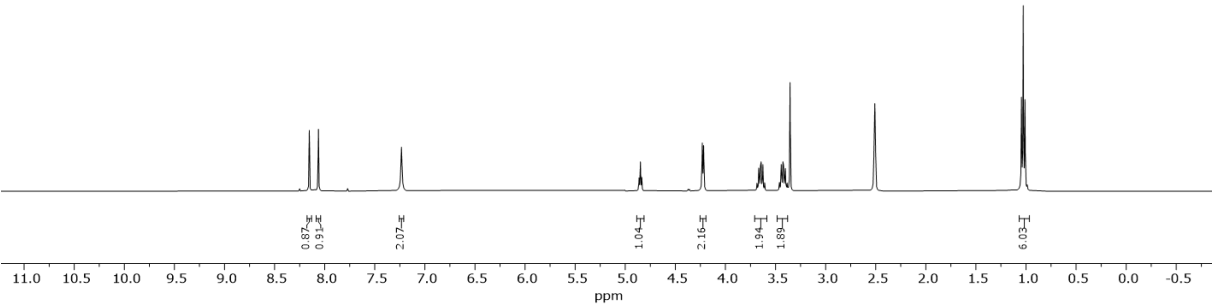


¹H-NMR (dmso)**106a****¹³C-NMR (dmso)****106a**

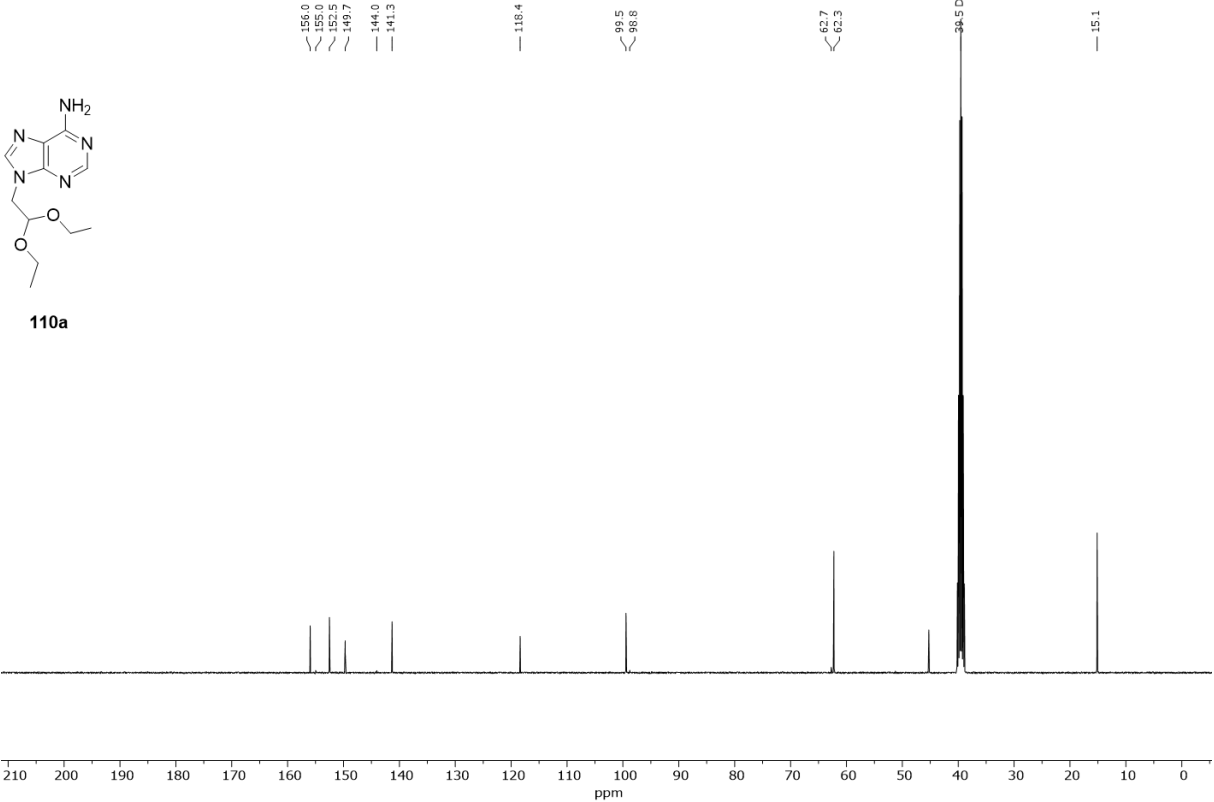
¹H-NMR (DMSO)

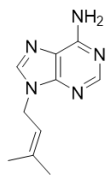
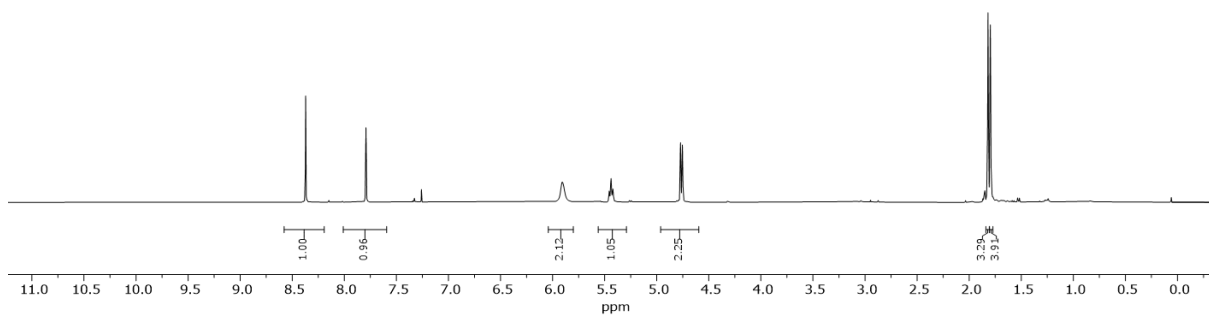
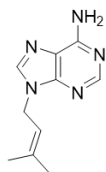
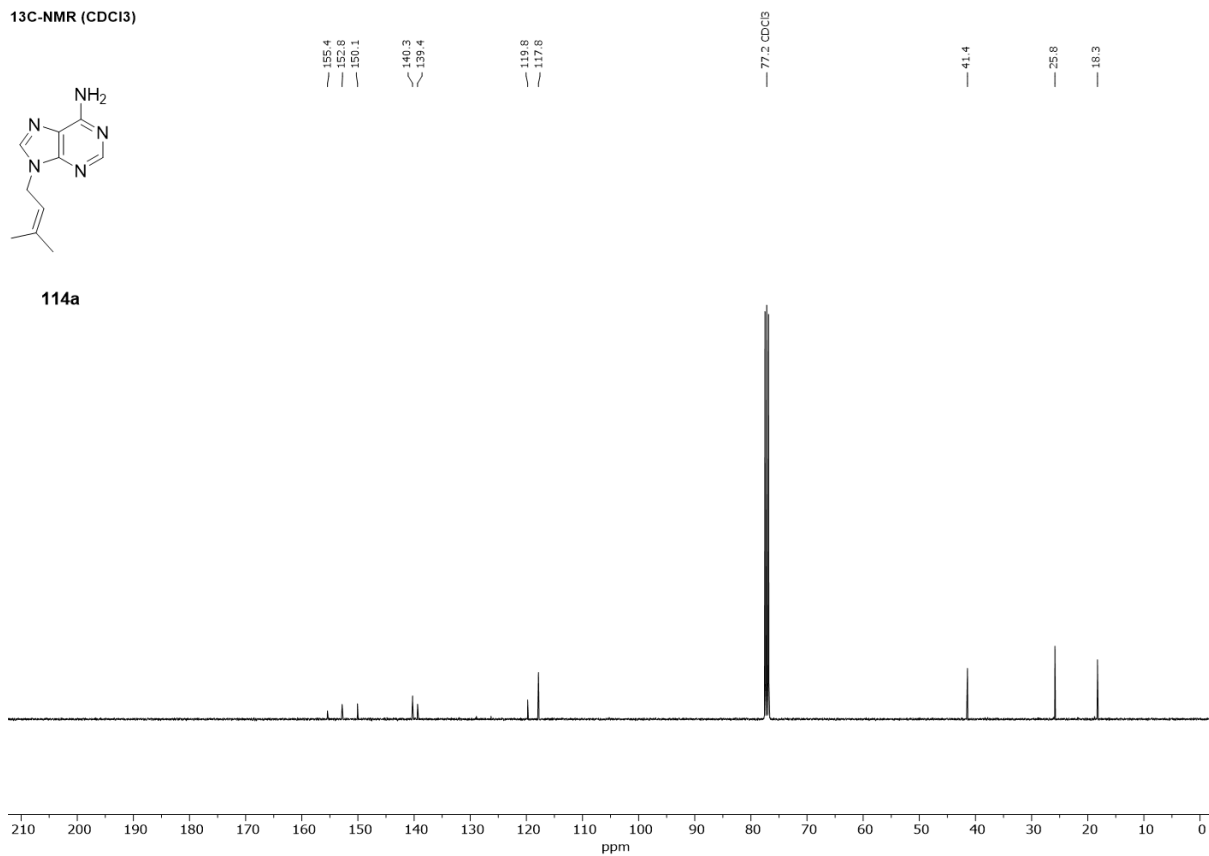


110a

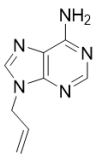


¹³C-NMR (DMSO)

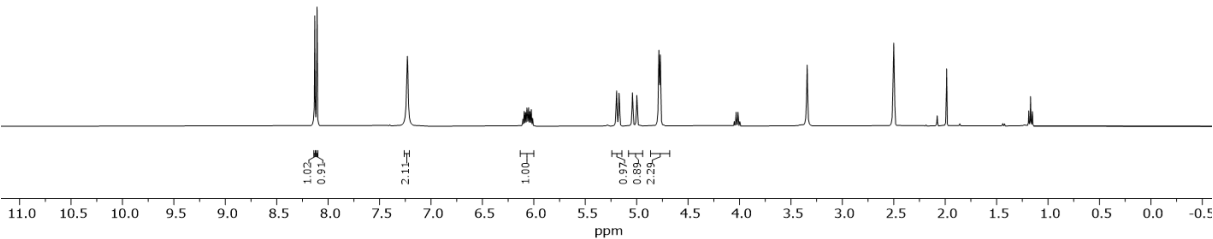


¹H-NMR (CDCl₃)**114a**¹³C-NMR (CDCl₃)**114a**

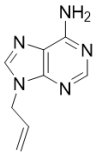
¹H-NMR (DMSO)



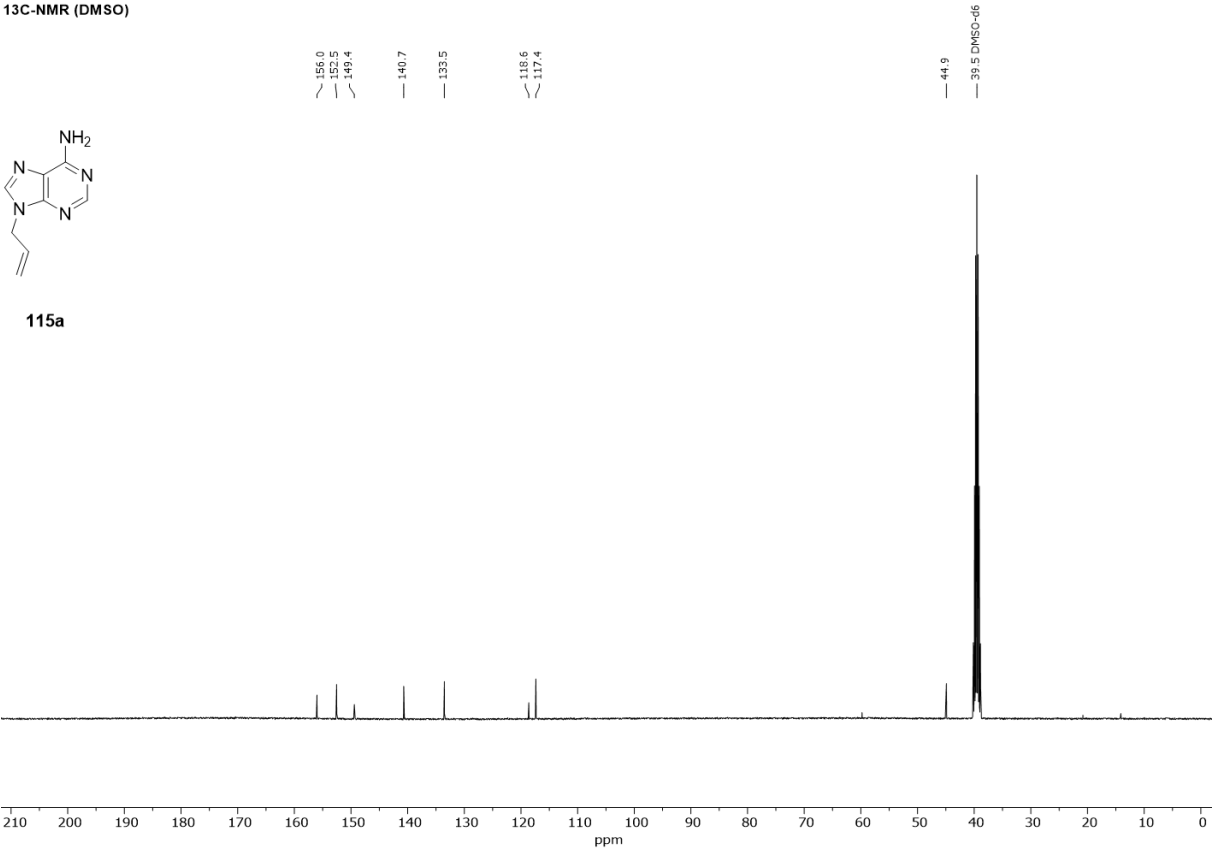
115a

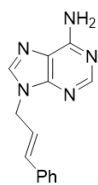
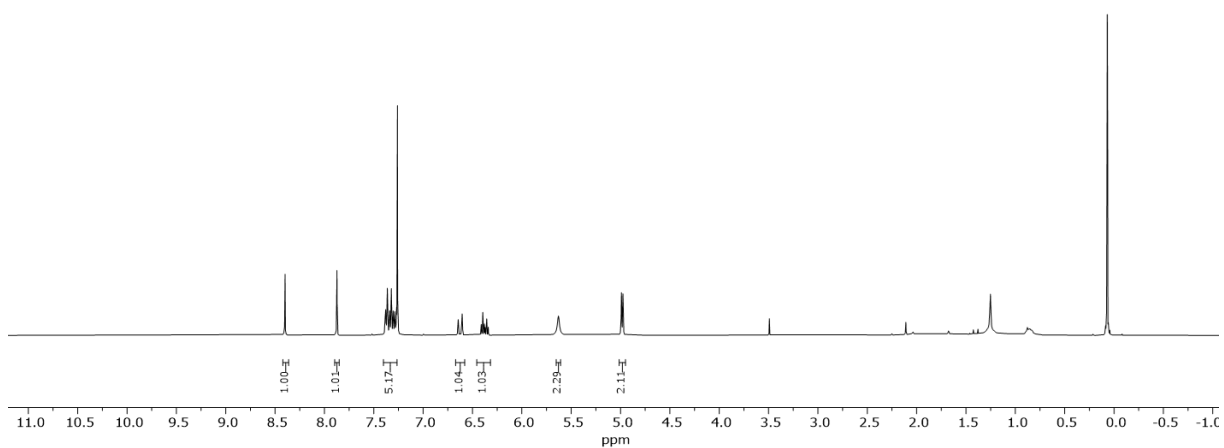
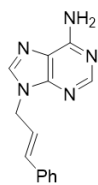
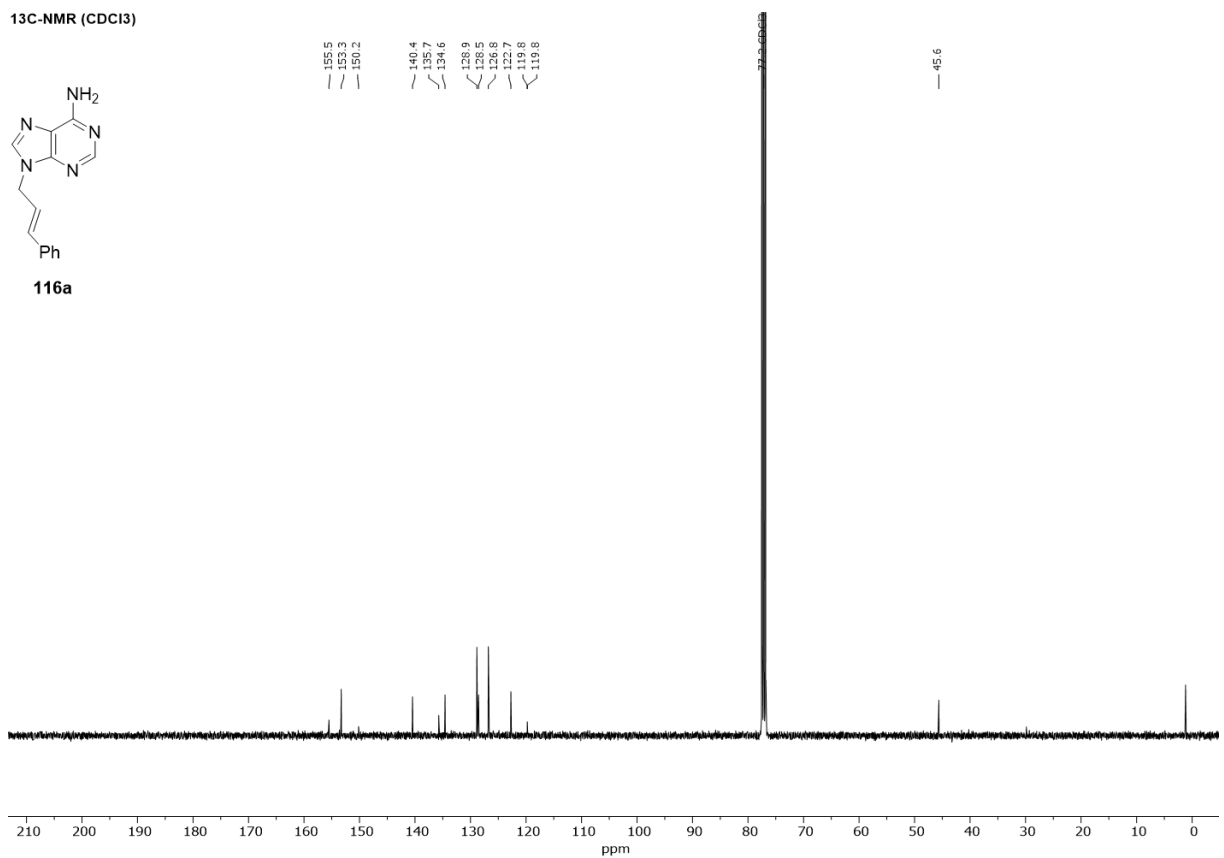


¹³C-NMR (DMSO)

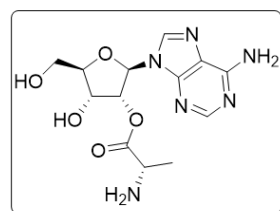


115a

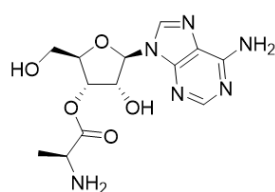


¹H-NMR (CDCl₃)**116a**¹³C-NMR (CDCl₃)**116a**

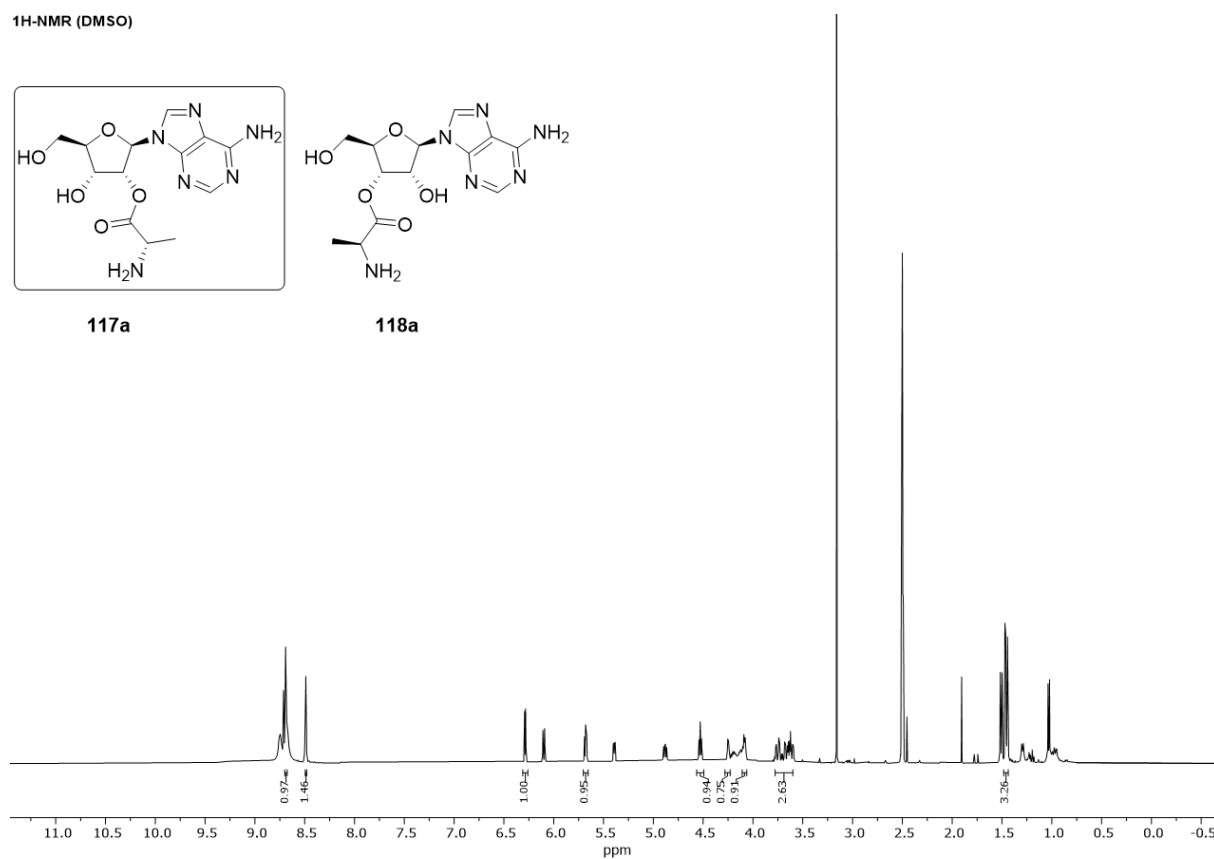
¹H-NMR (DMSO)



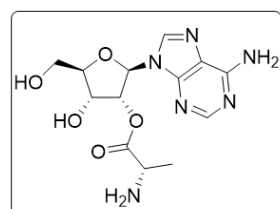
117a



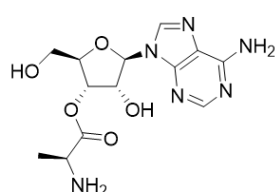
118a



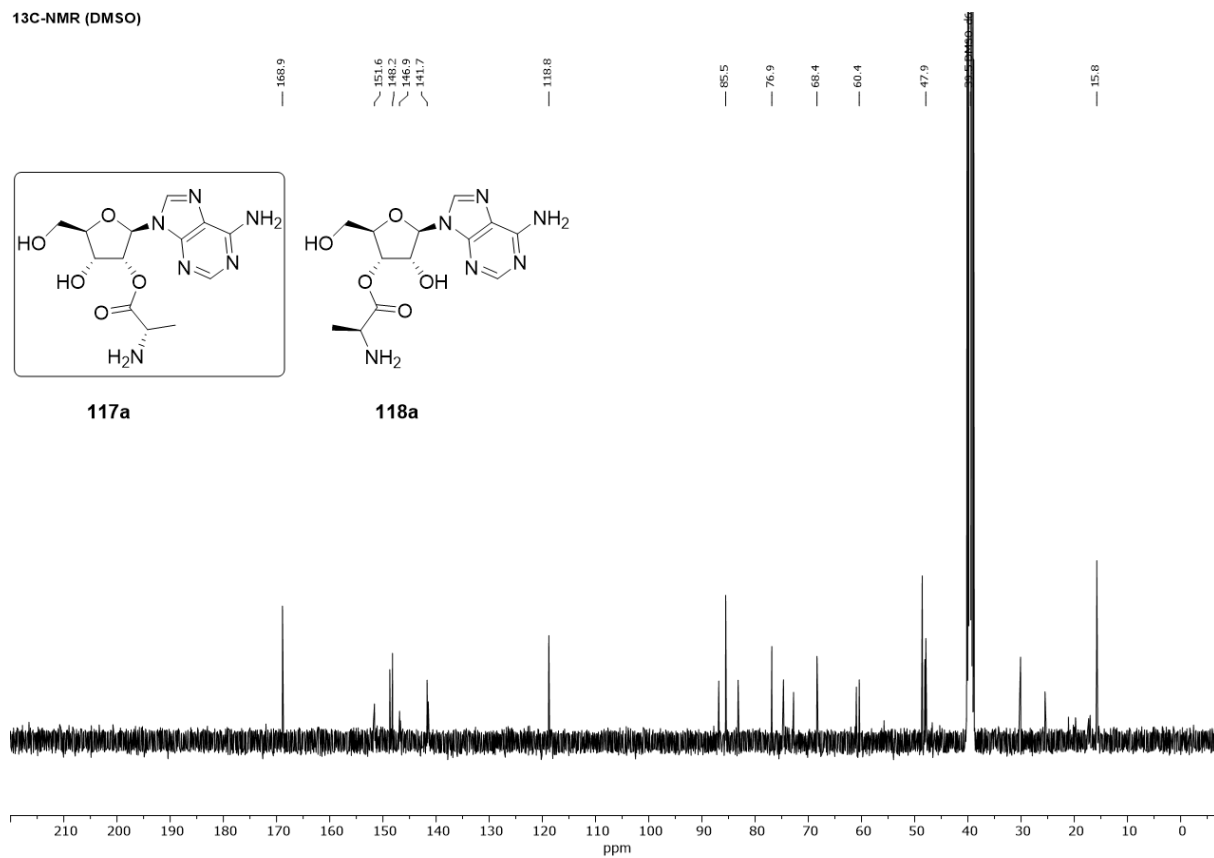
¹³C-NMR (DMSO)

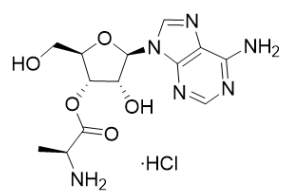
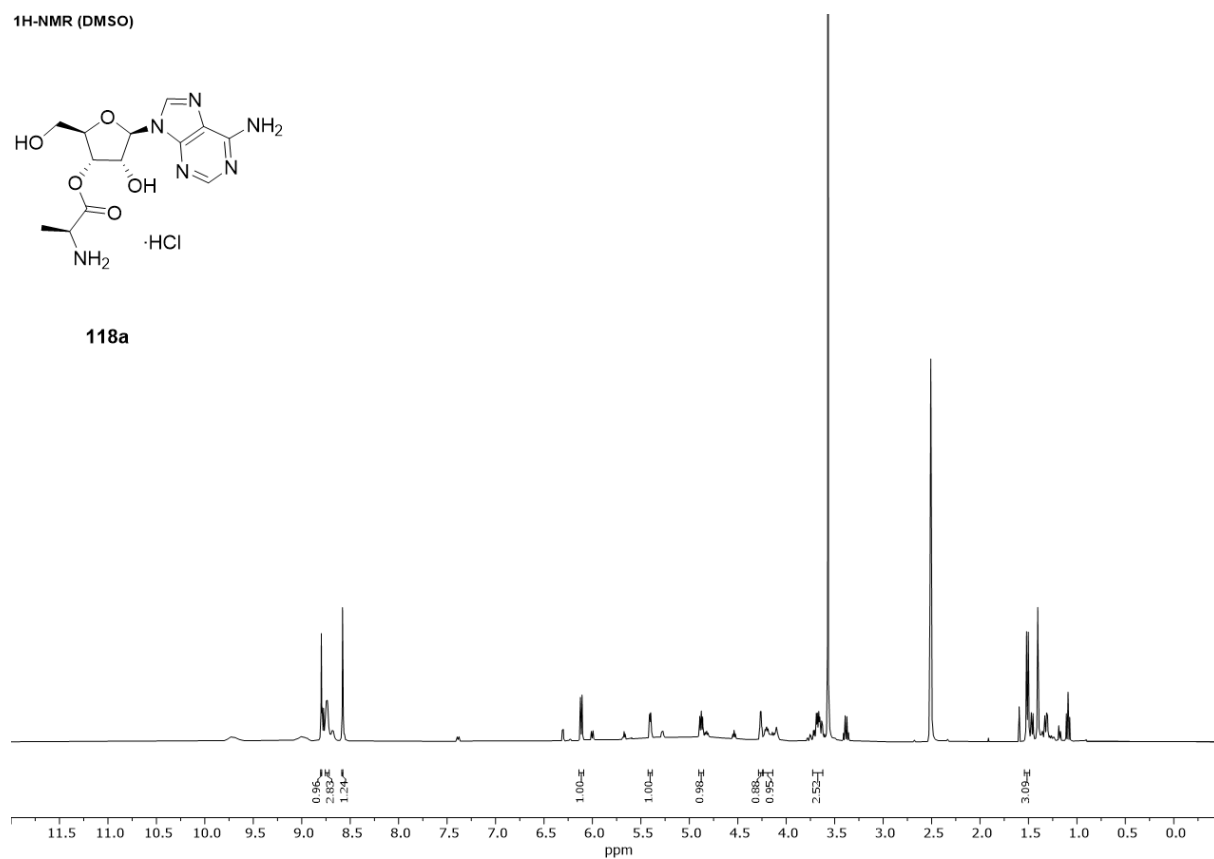
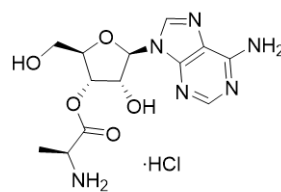
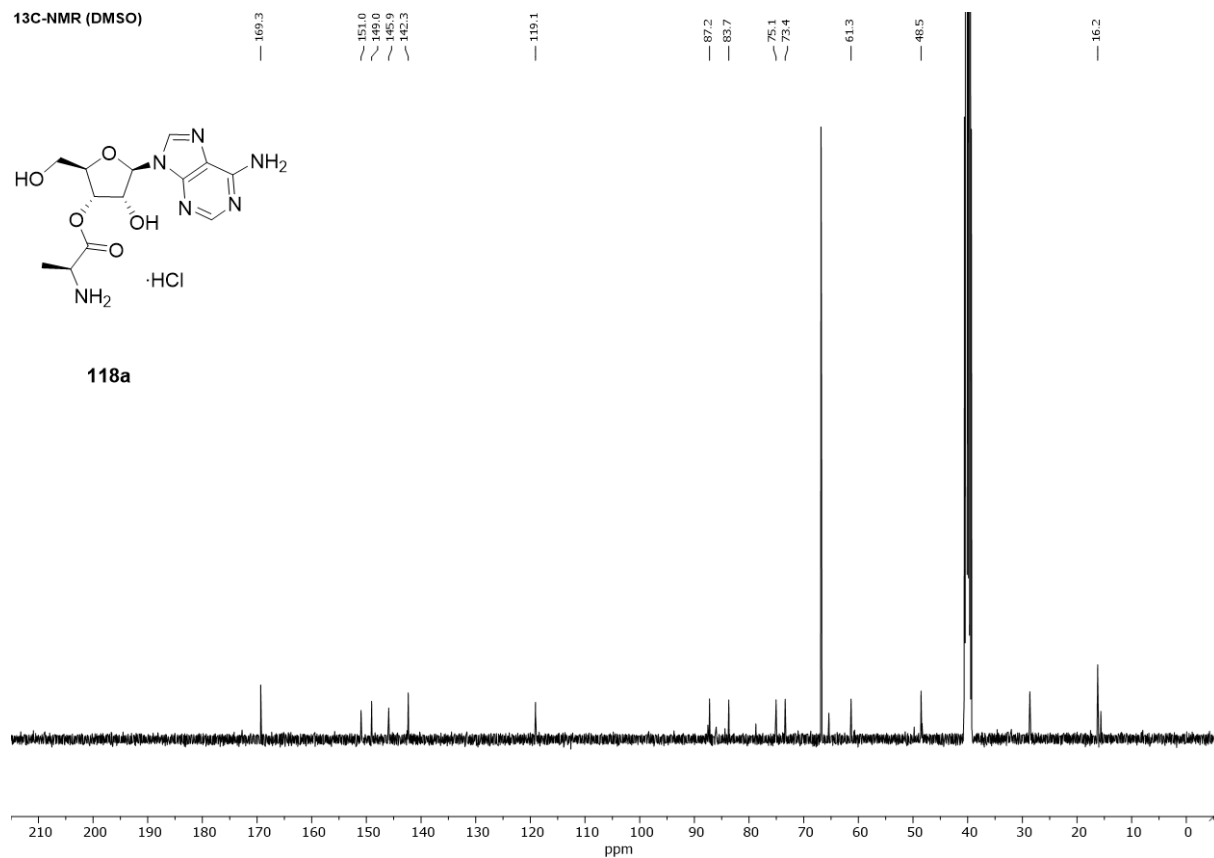


117a

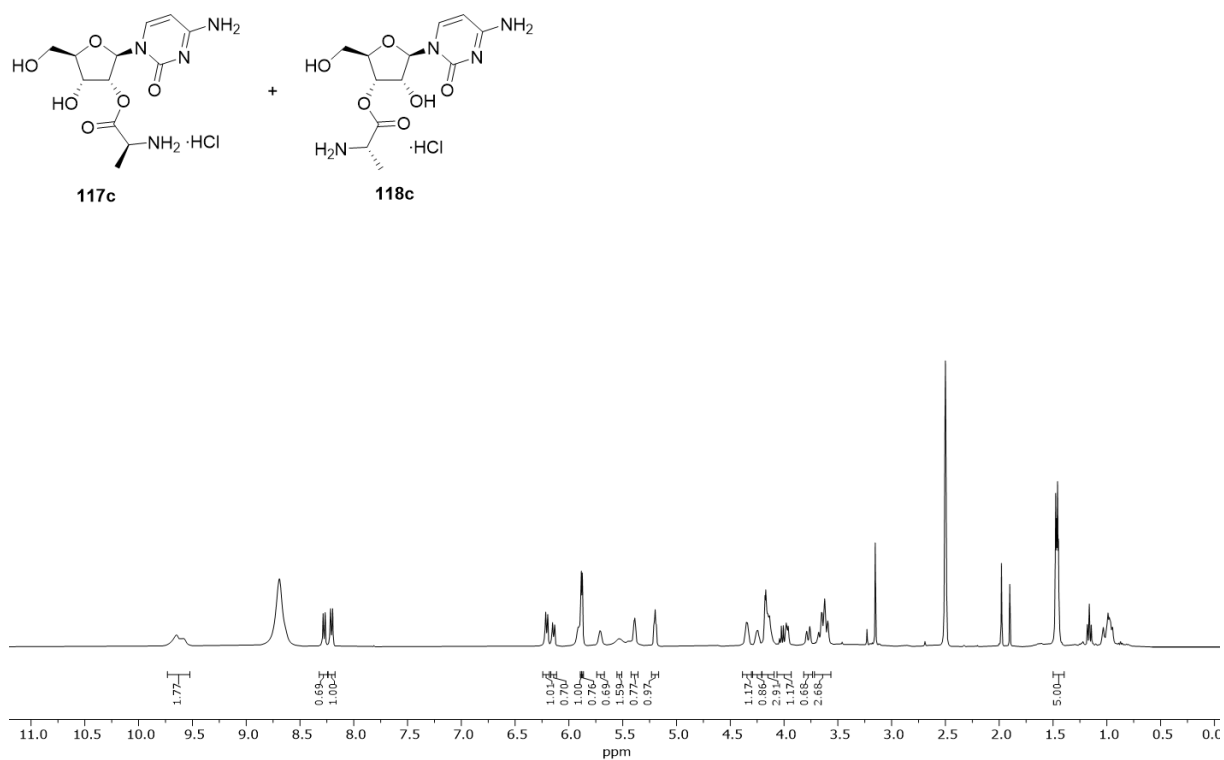


118a

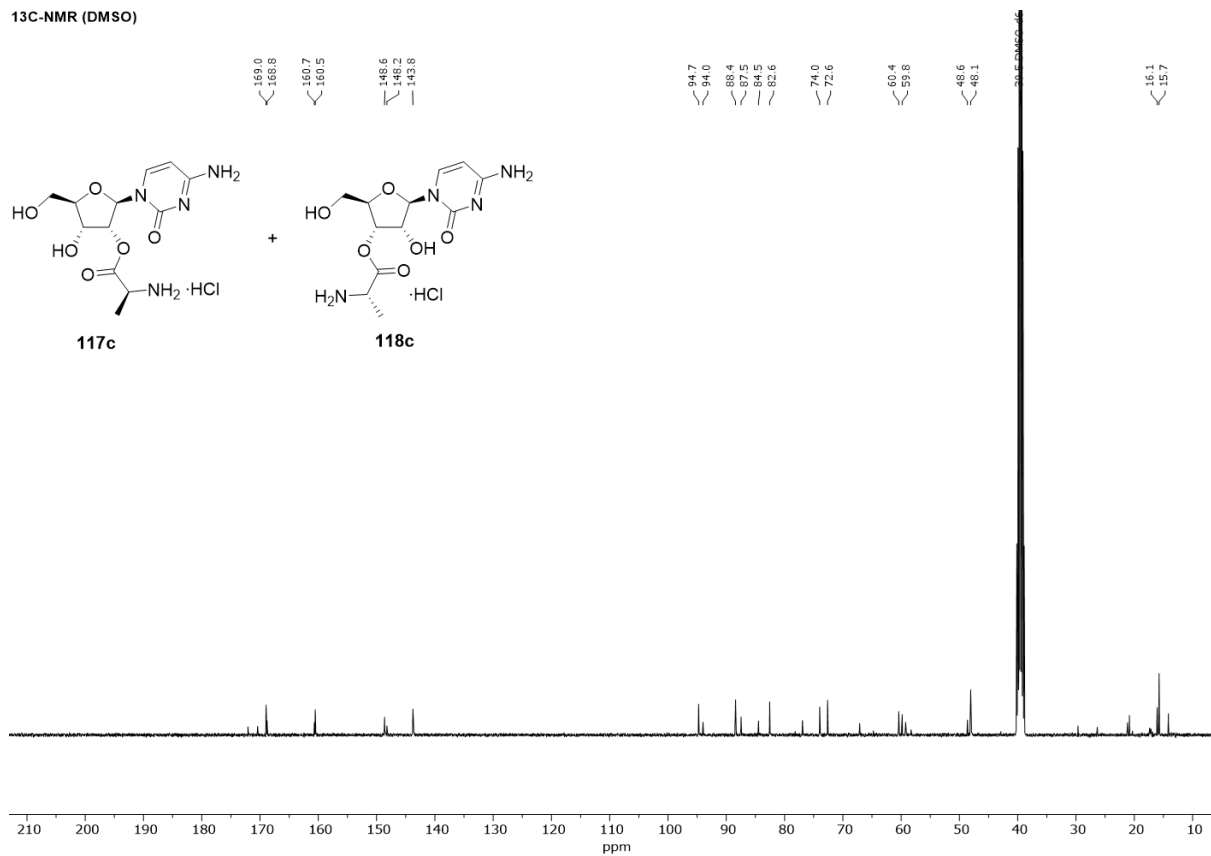


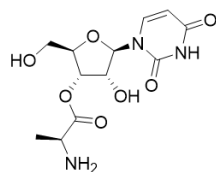
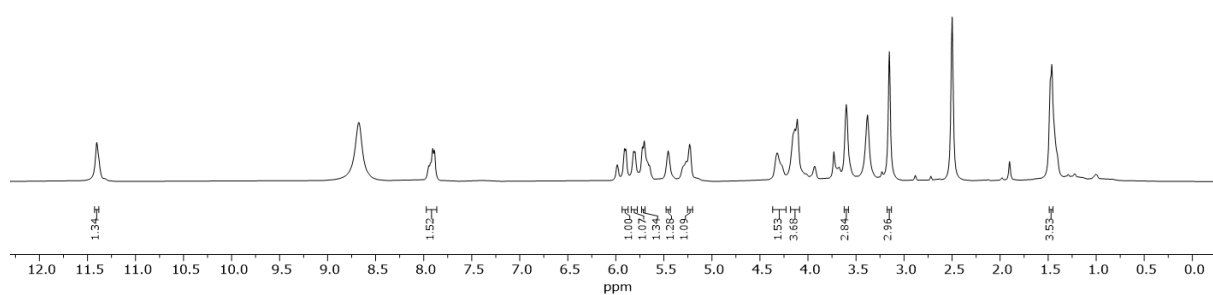
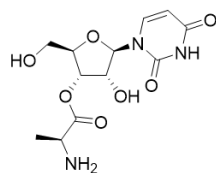
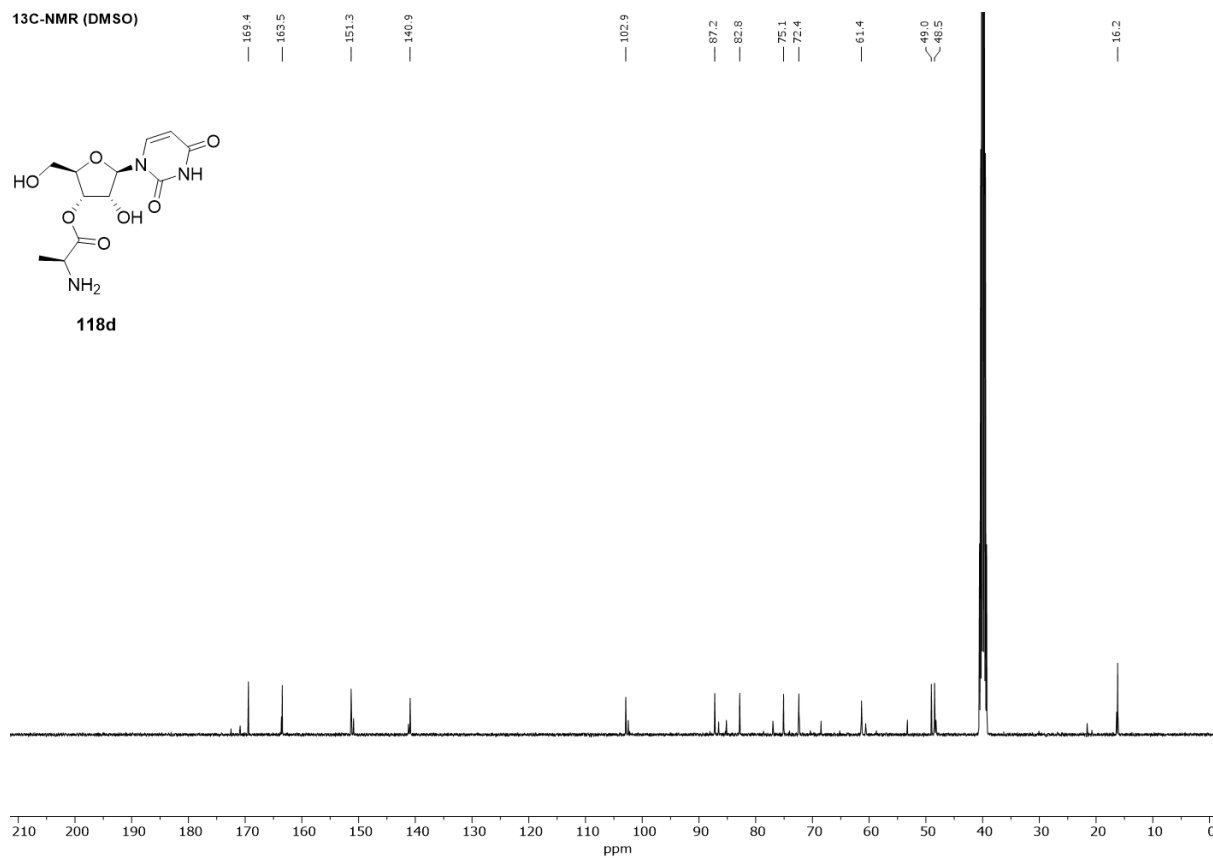
¹H-NMR (DMSO)**118a**¹³C-NMR (DMSO)**118a**

¹H-NMR (DMSO)

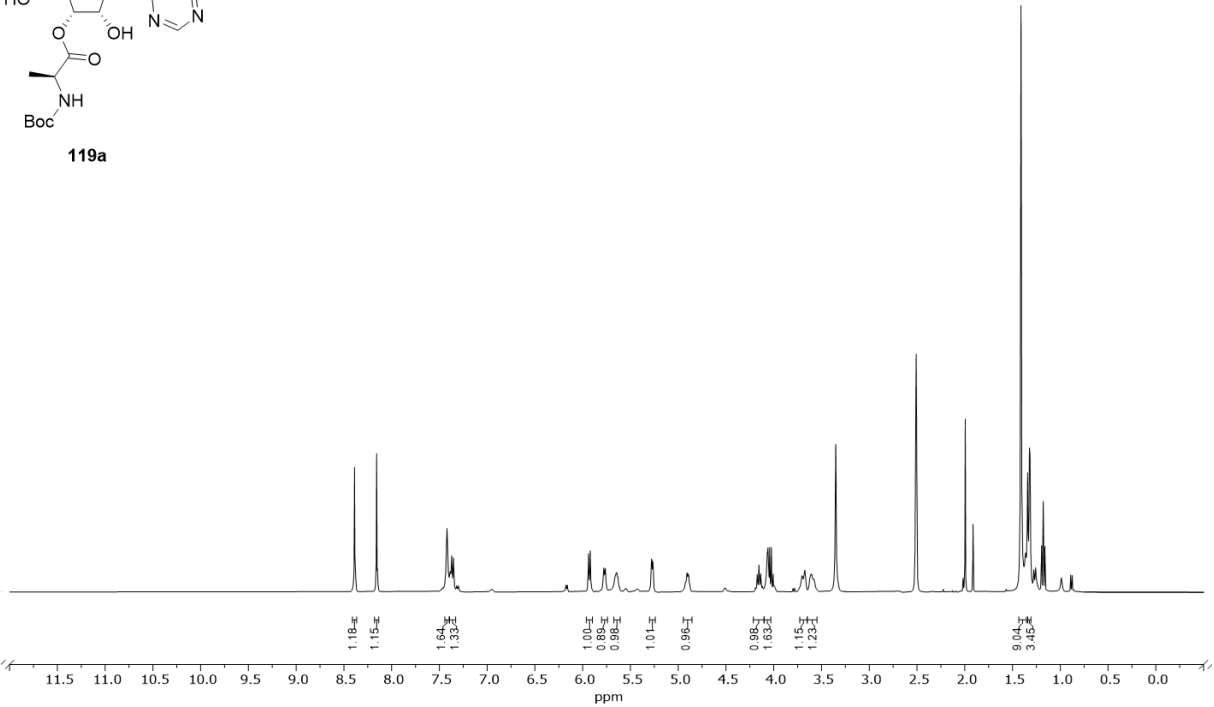
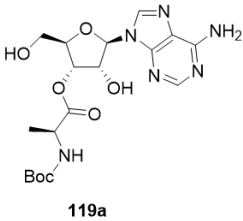


¹³C-NMR (DMSO)

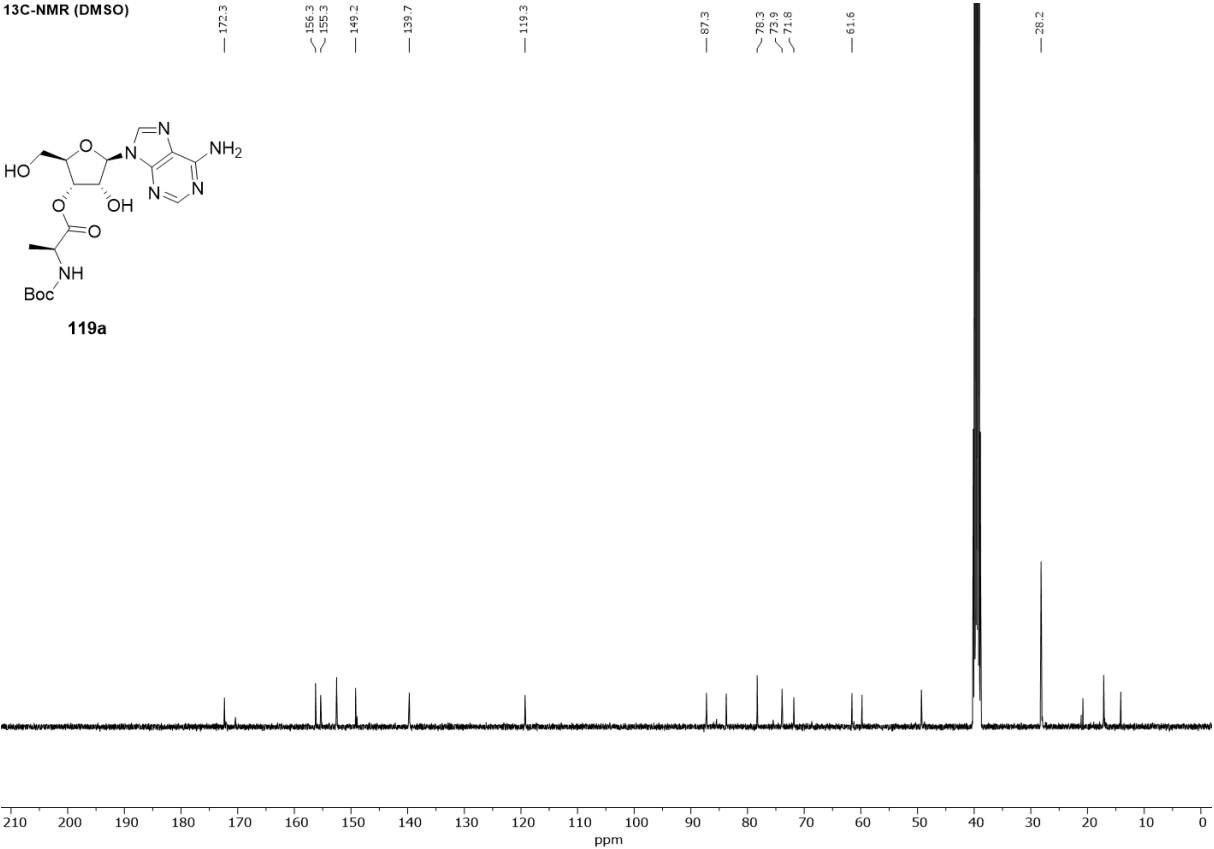


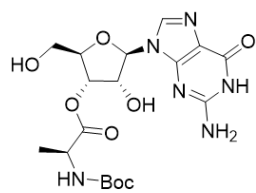
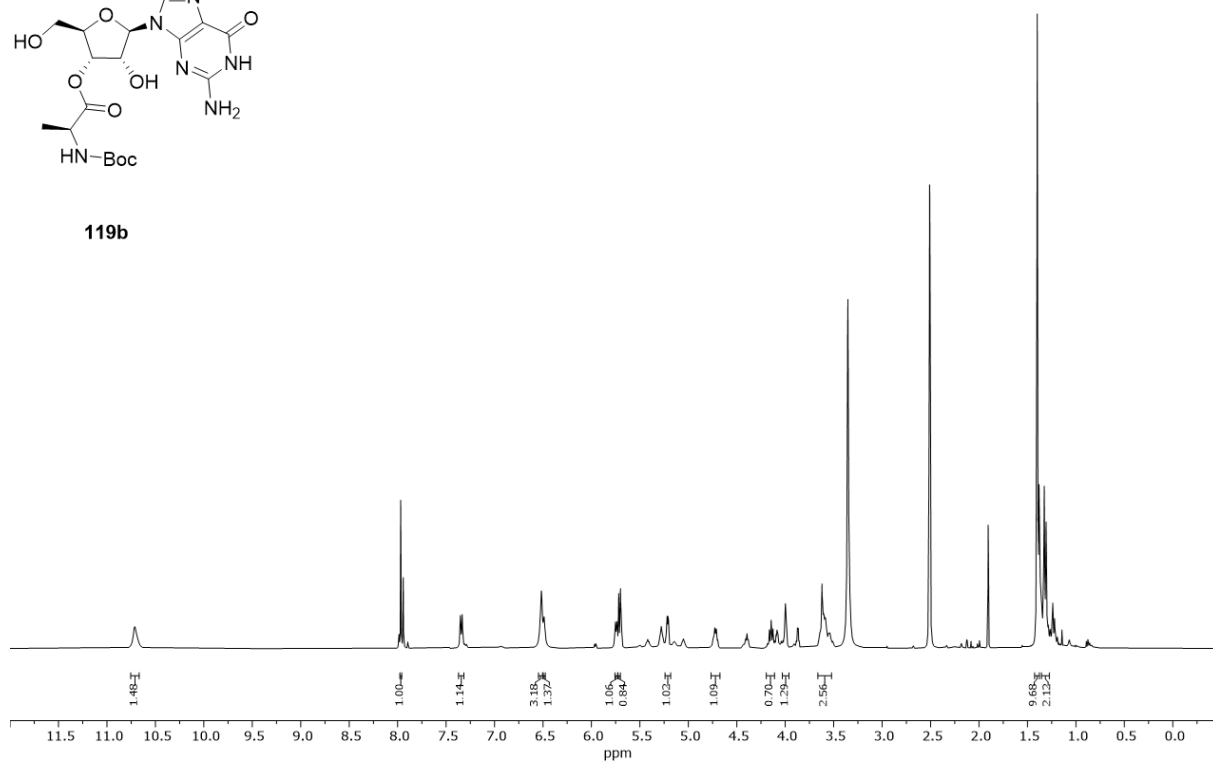
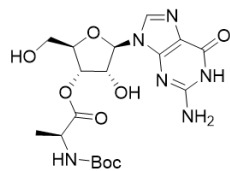
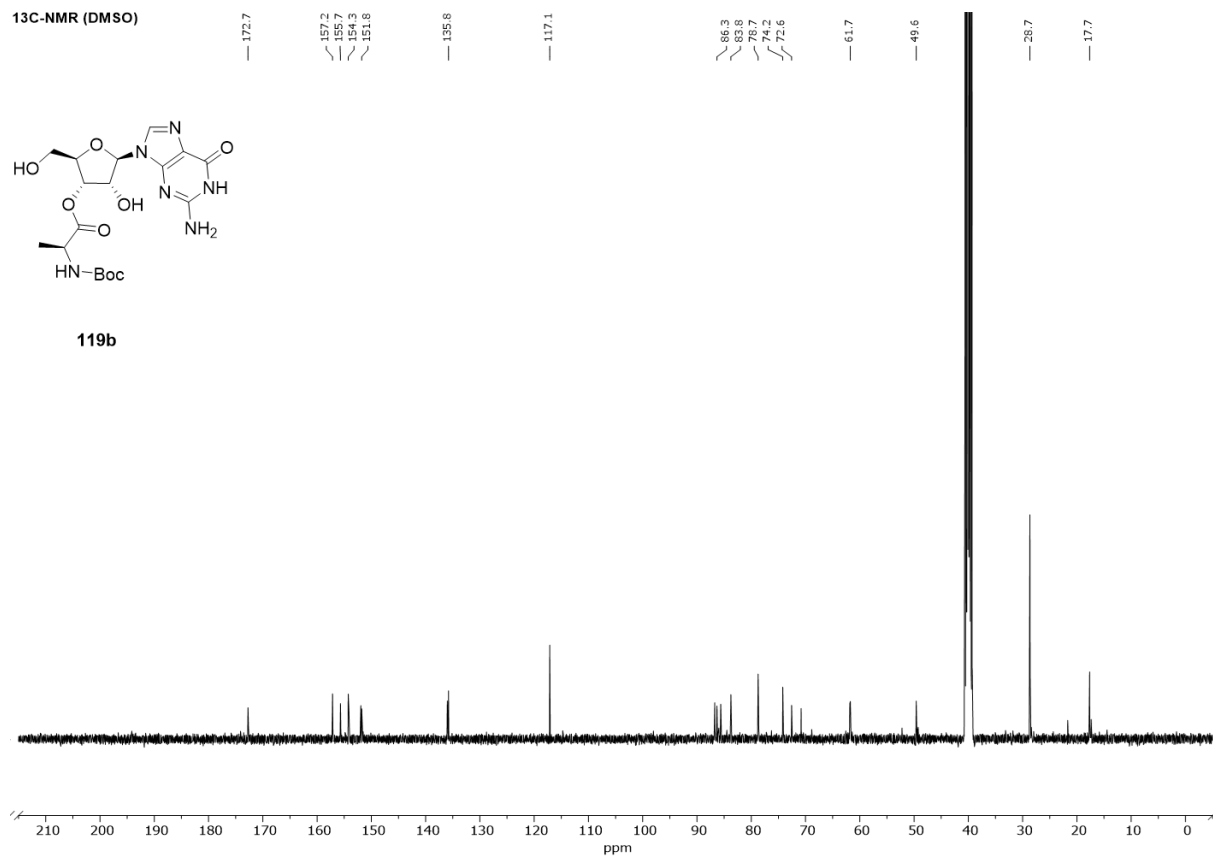
¹H-NMR (DMSO)**118d****¹³C-NMR (DMSO)****118d**

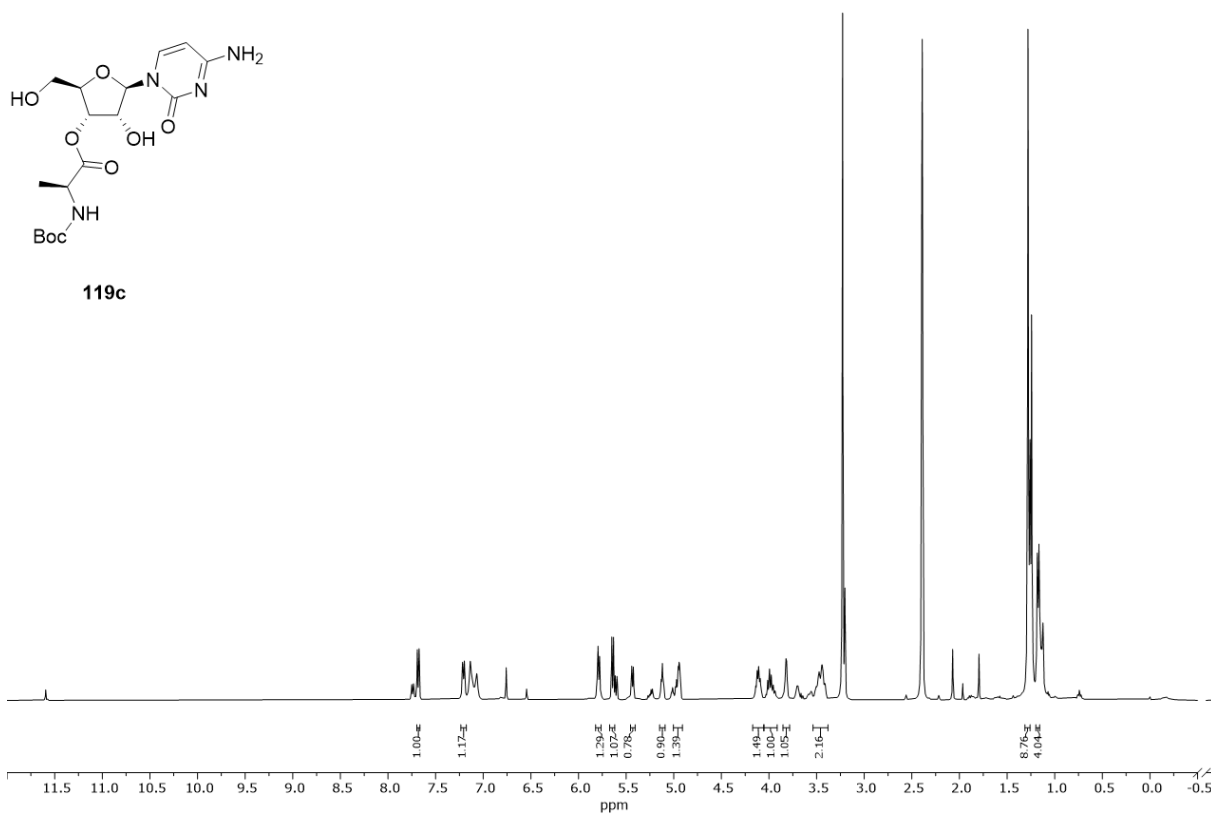
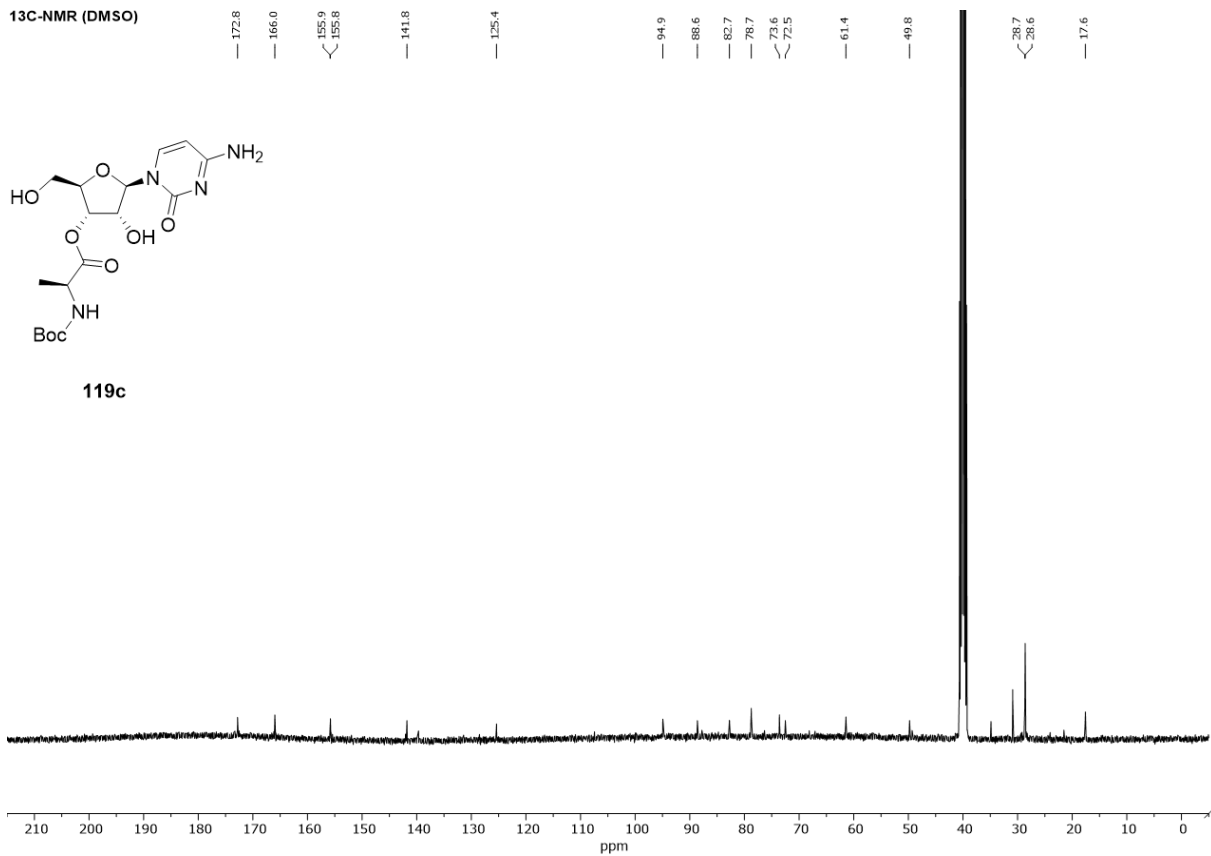
¹H-NMR (DMSO)

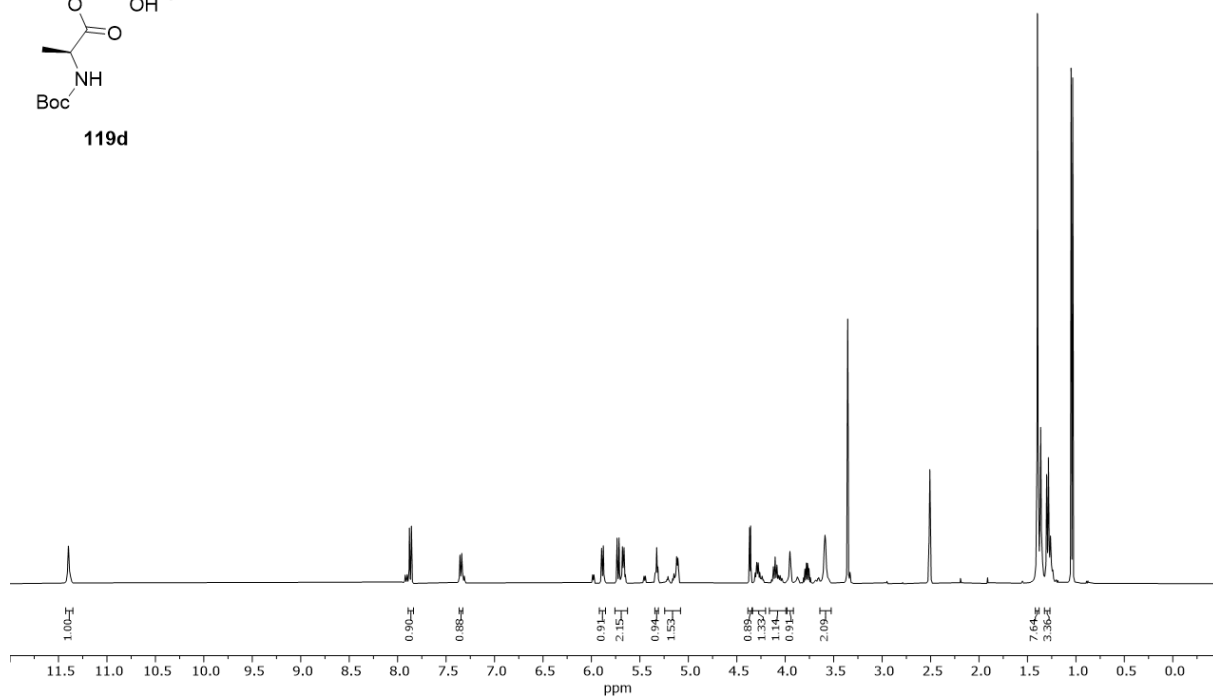
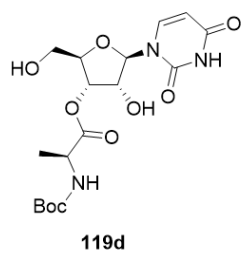
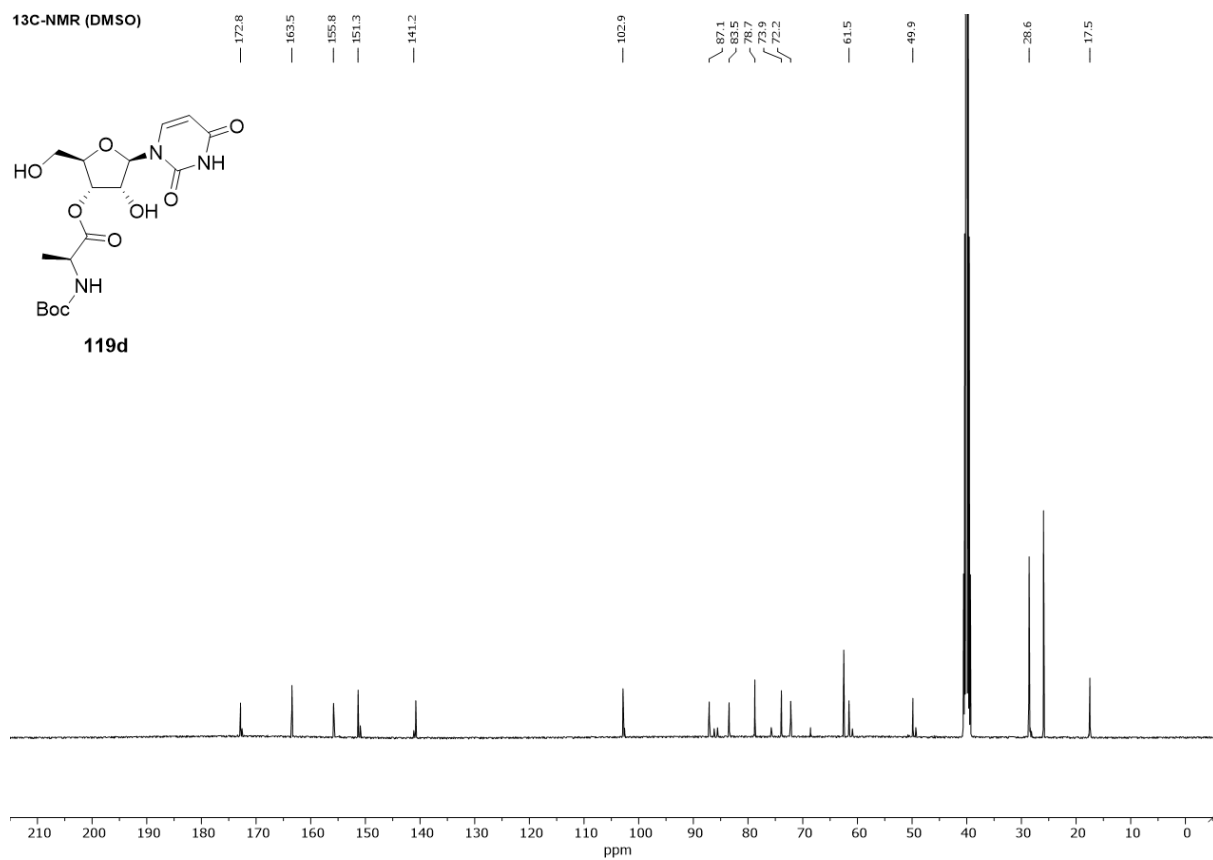
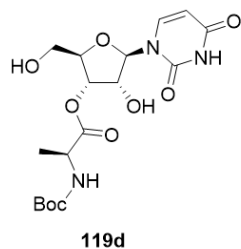


¹³C-NMR (DMSO)

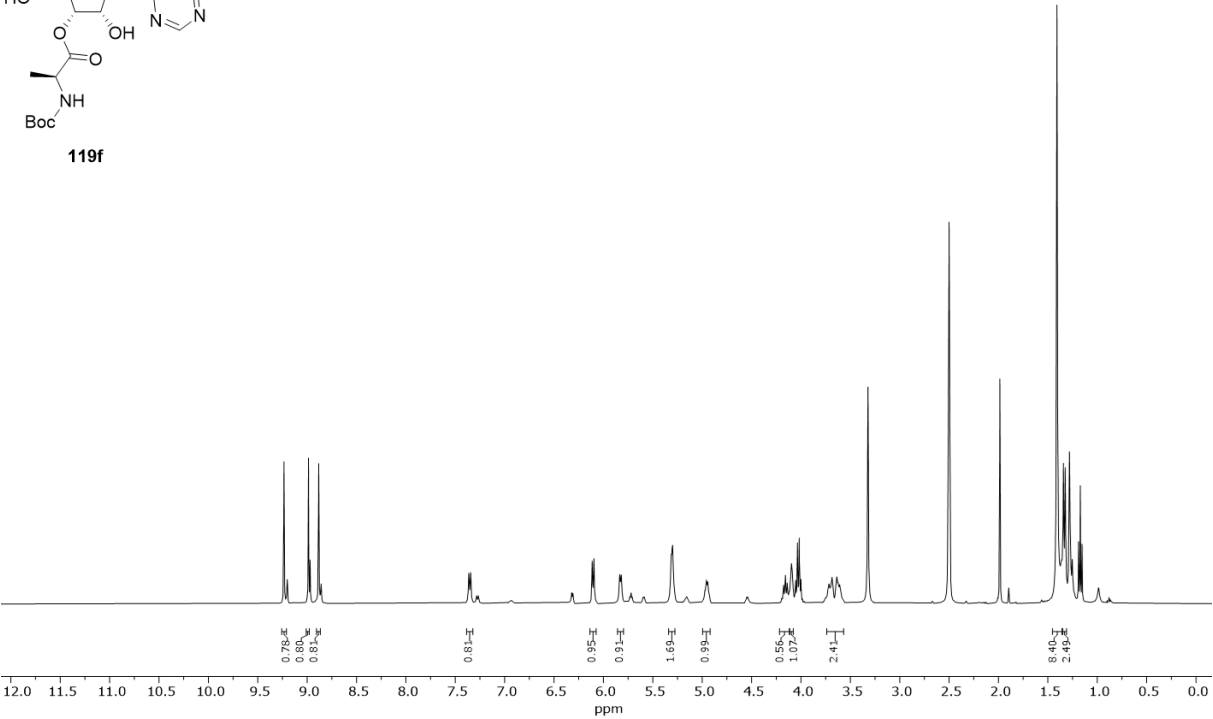
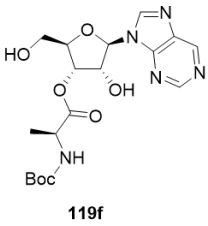


¹H-NMR (DMSO)**119b****¹³C-NMR (DMSO)****119b**

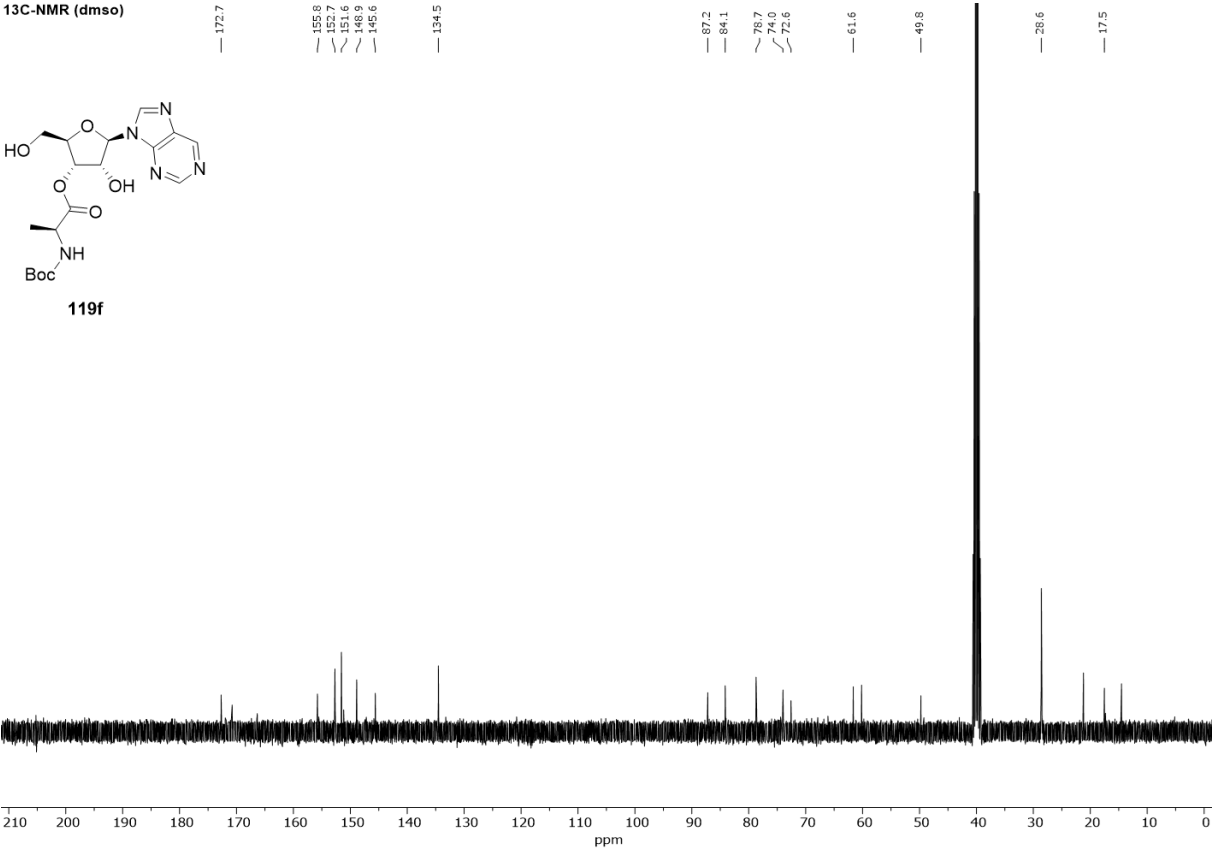
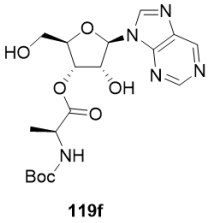
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

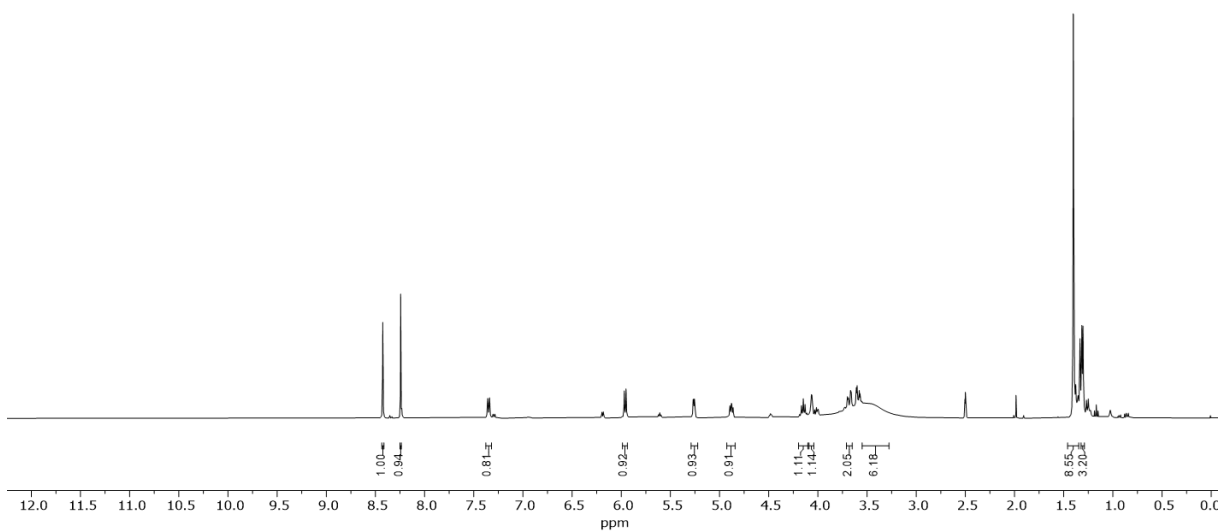
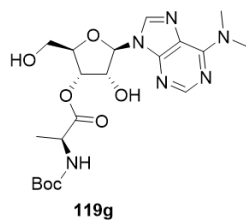
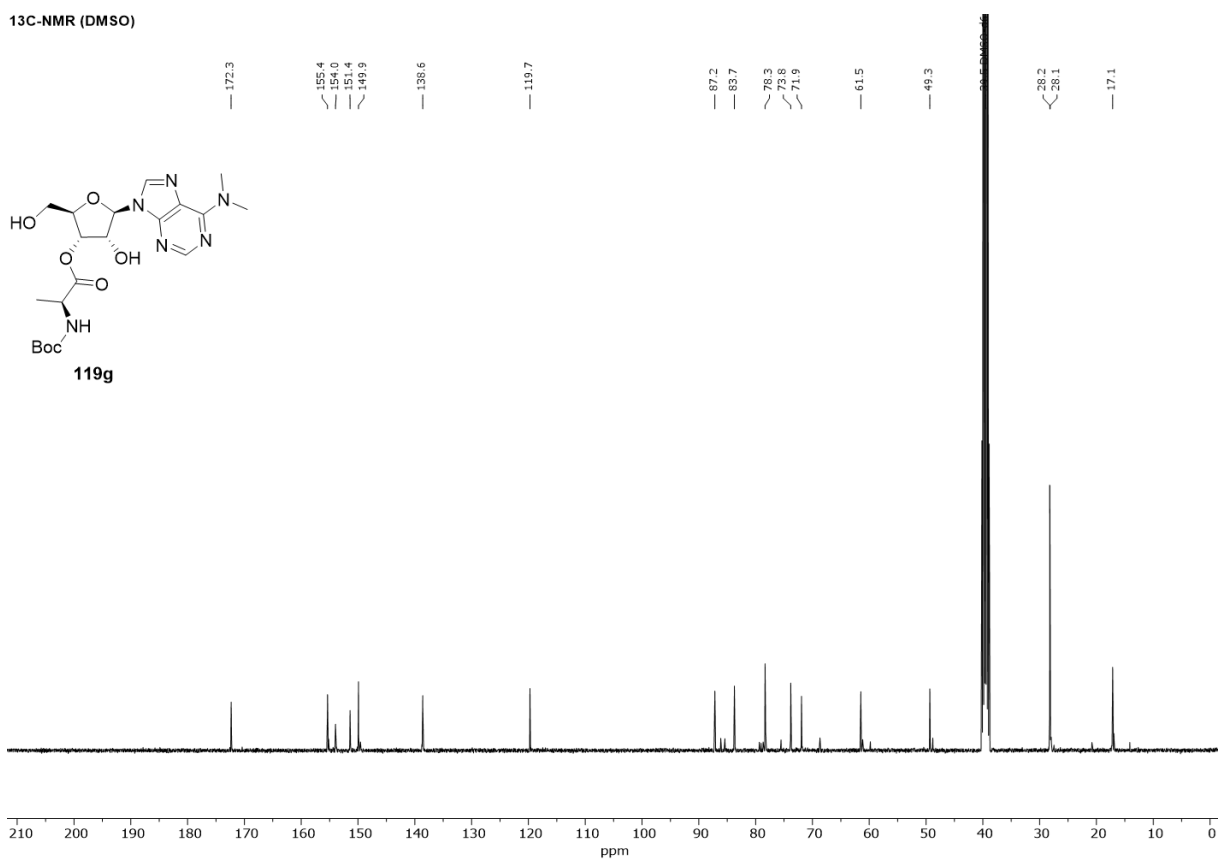
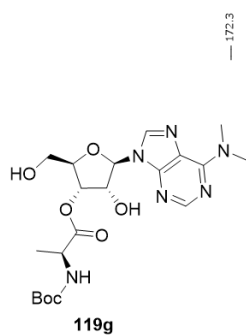
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

¹H-NMR (dmso)

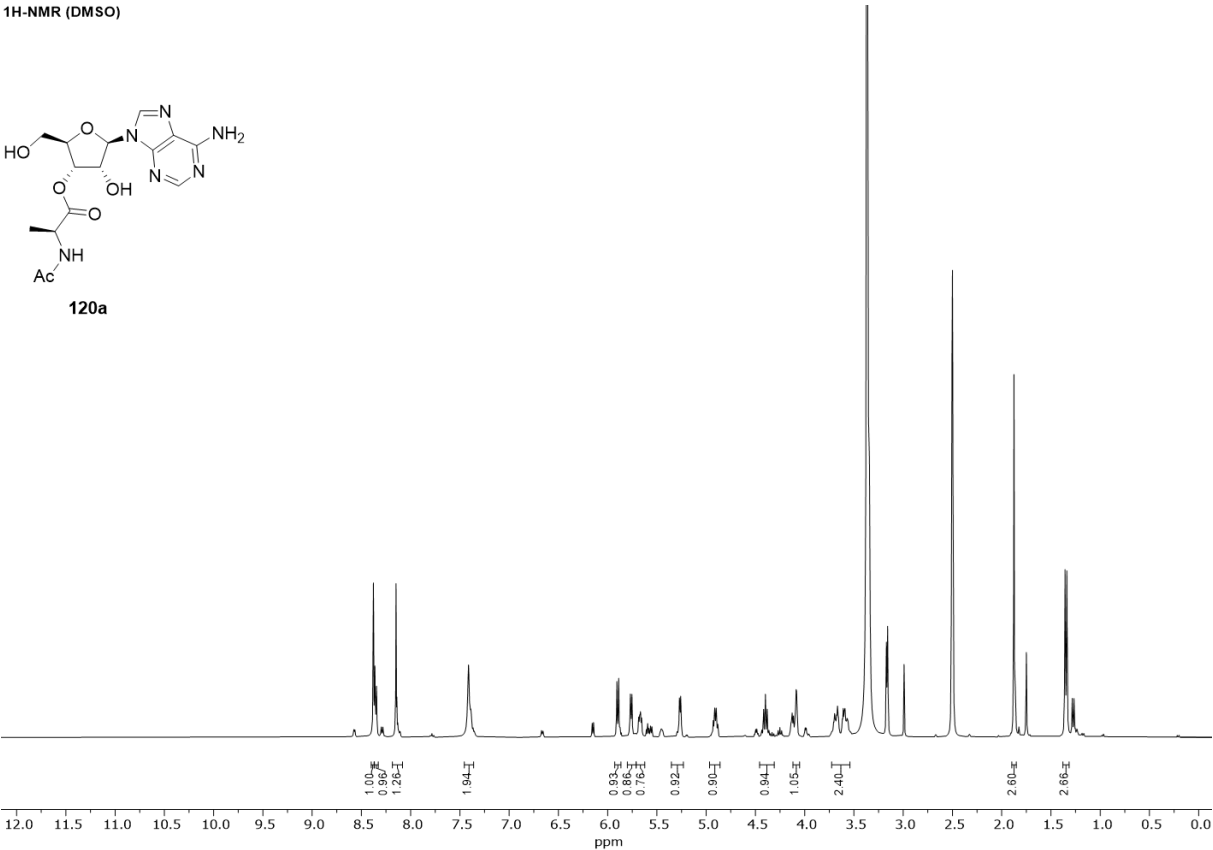
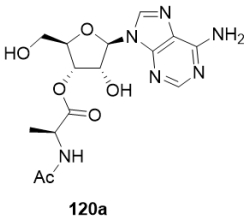


¹³C-NMR (dmso)

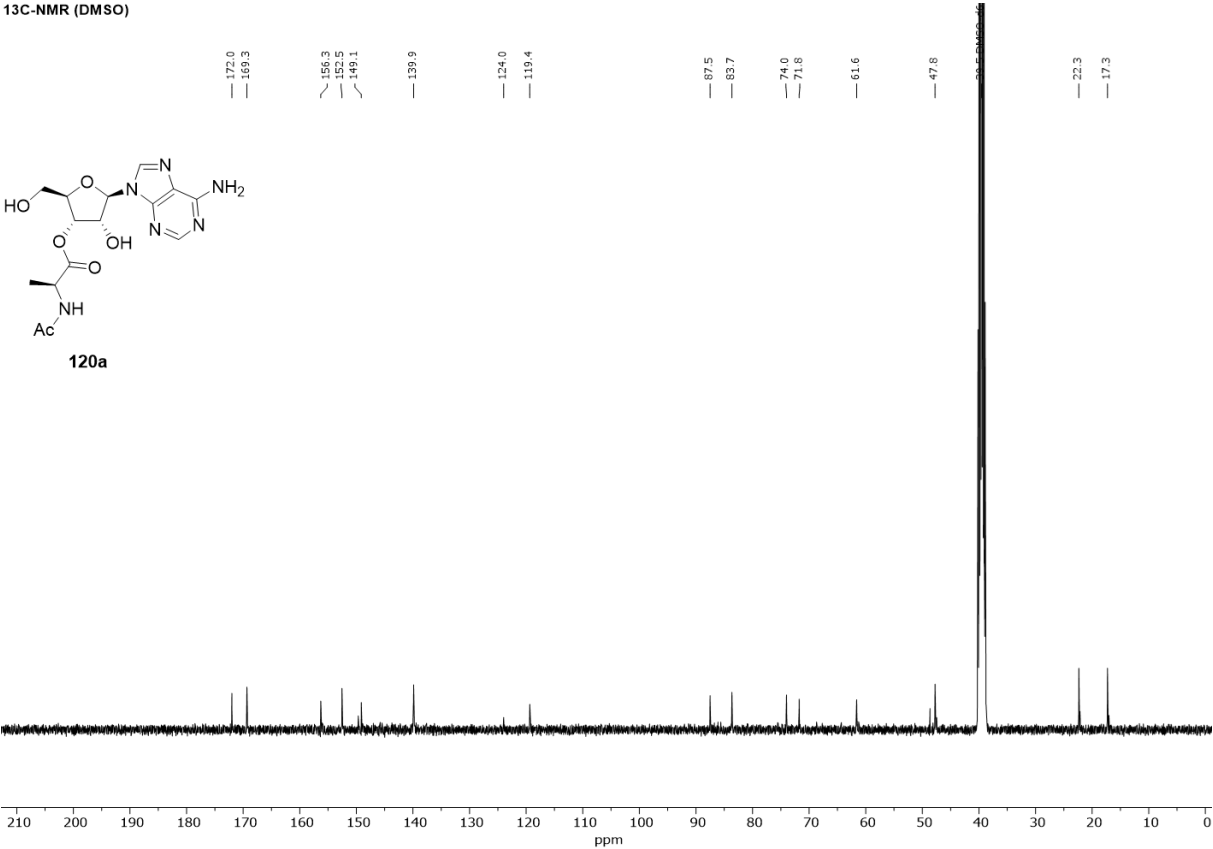
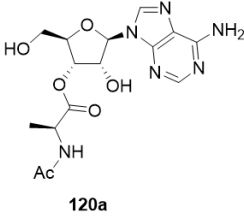


¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

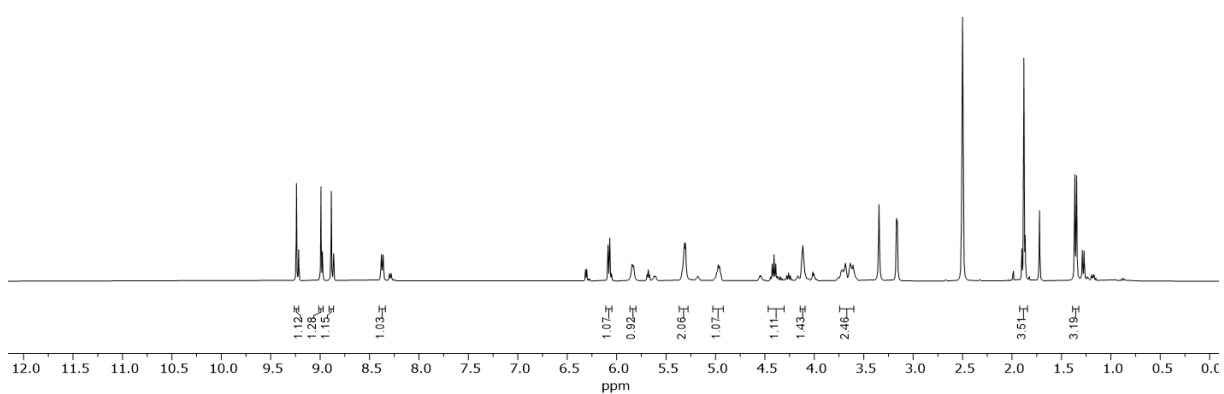
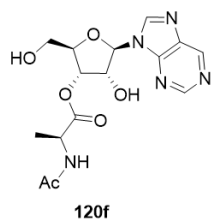
¹H-NMR (DMSO)



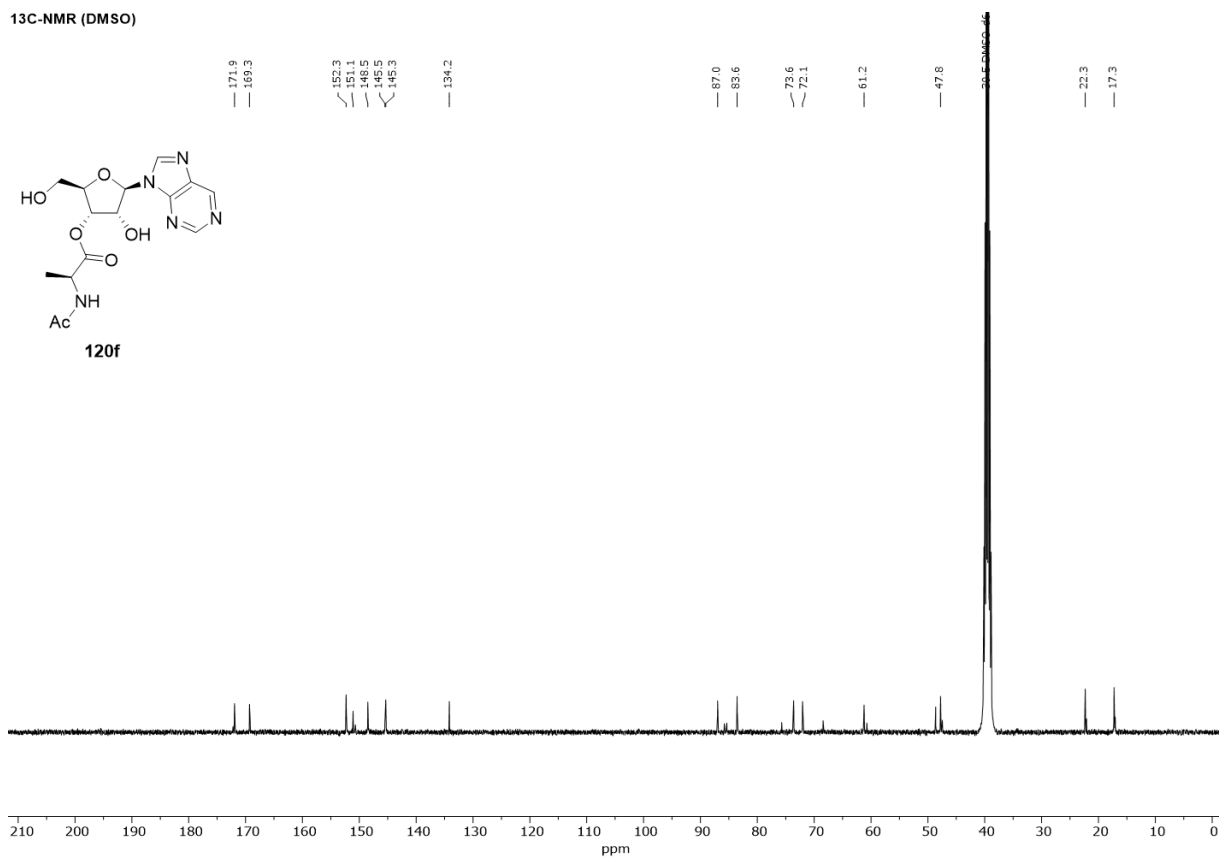
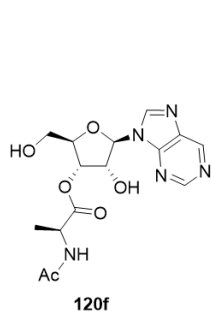
¹³C-NMR (DMSO)



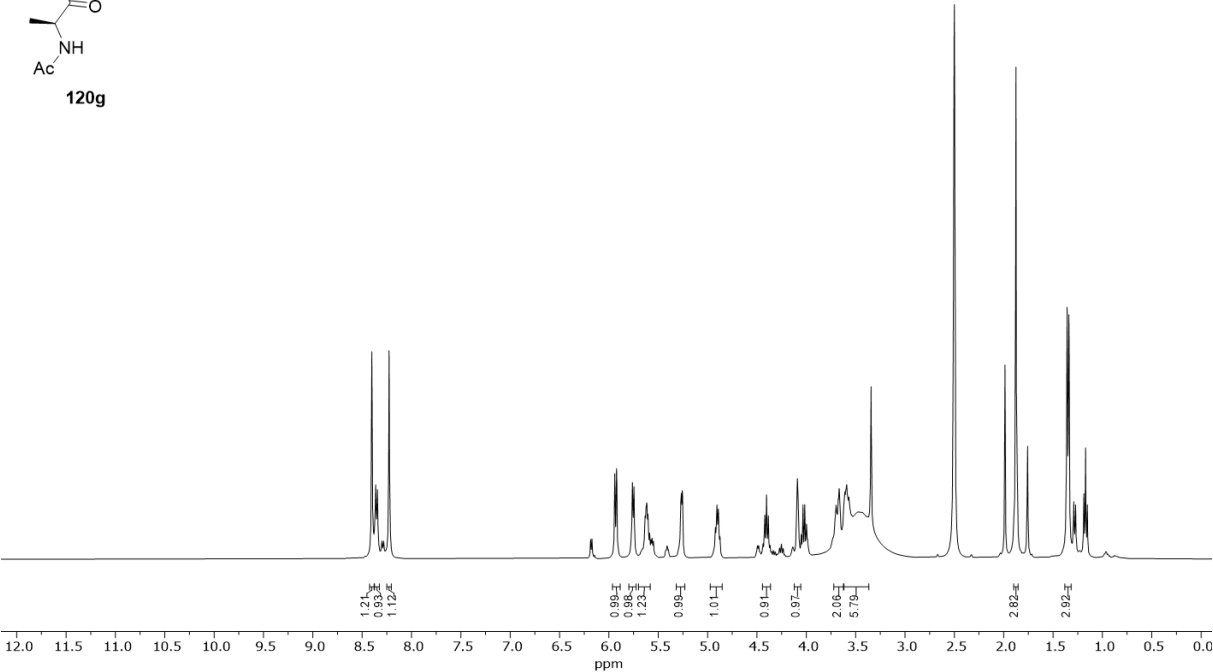
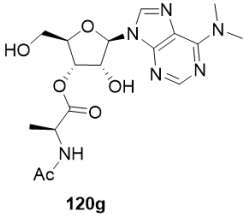
¹H-NMR (DMSO)



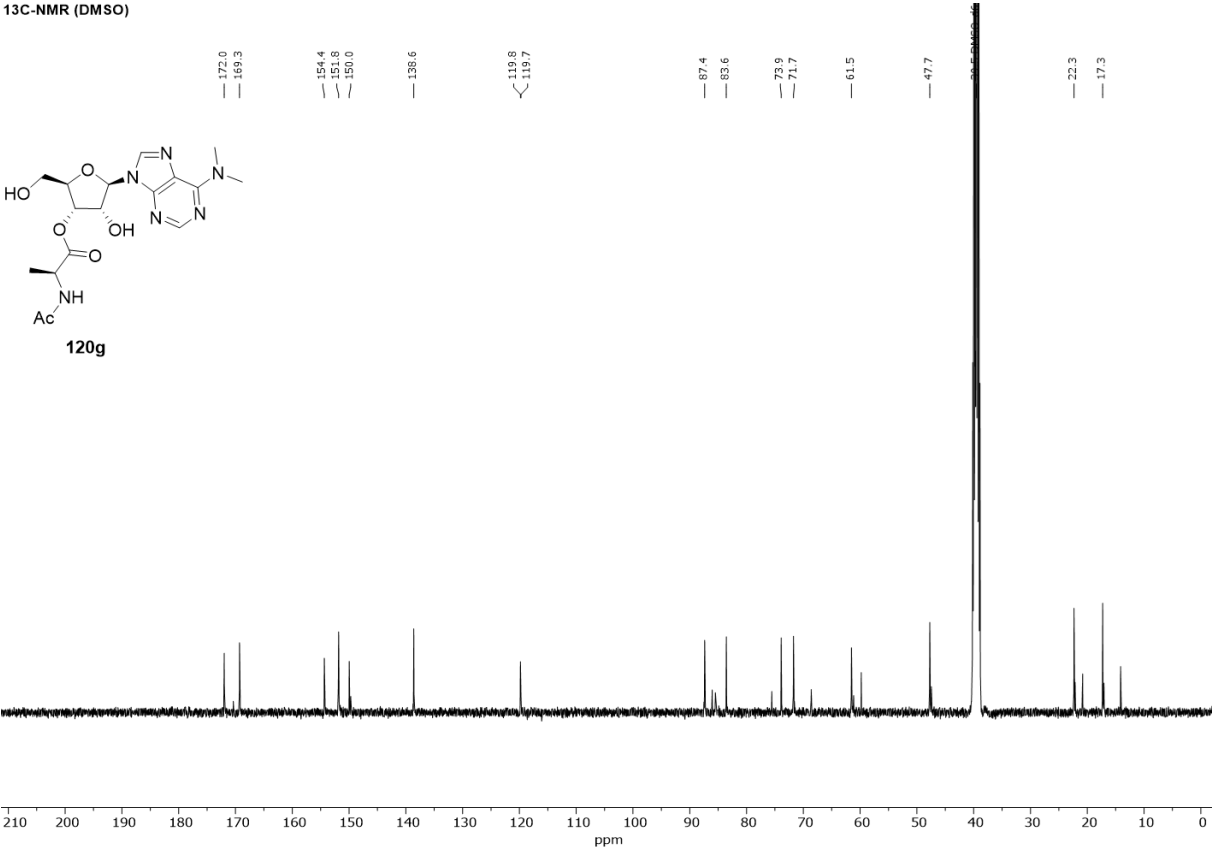
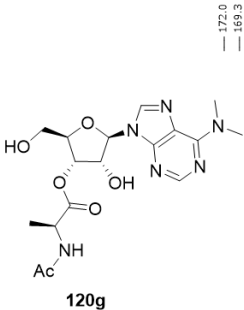
¹³C-NMR (DMSO)

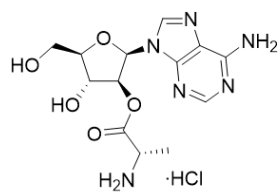
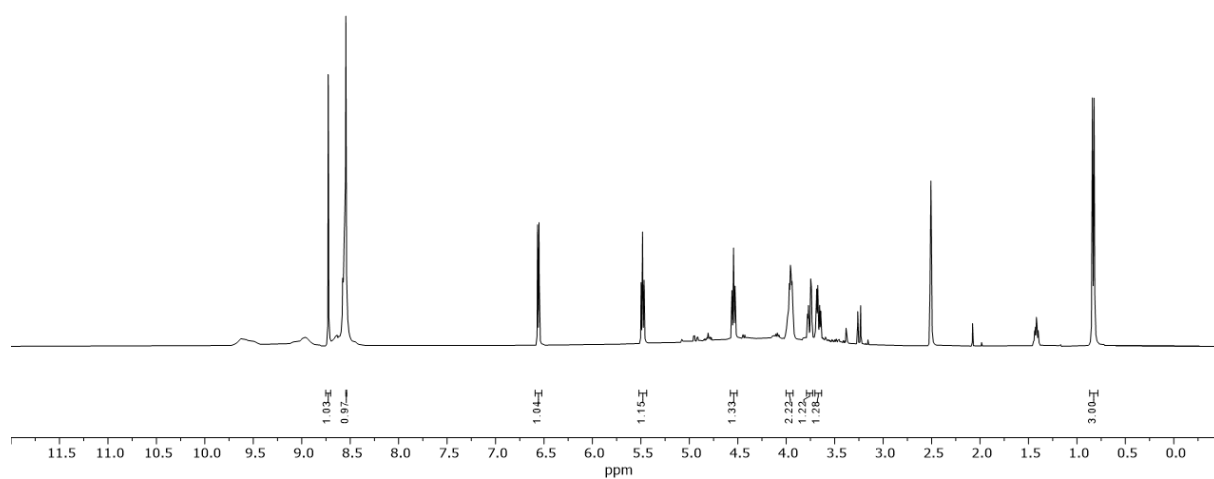
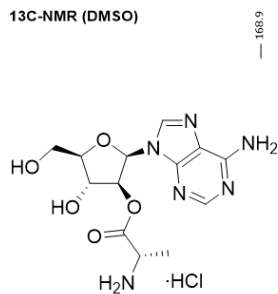
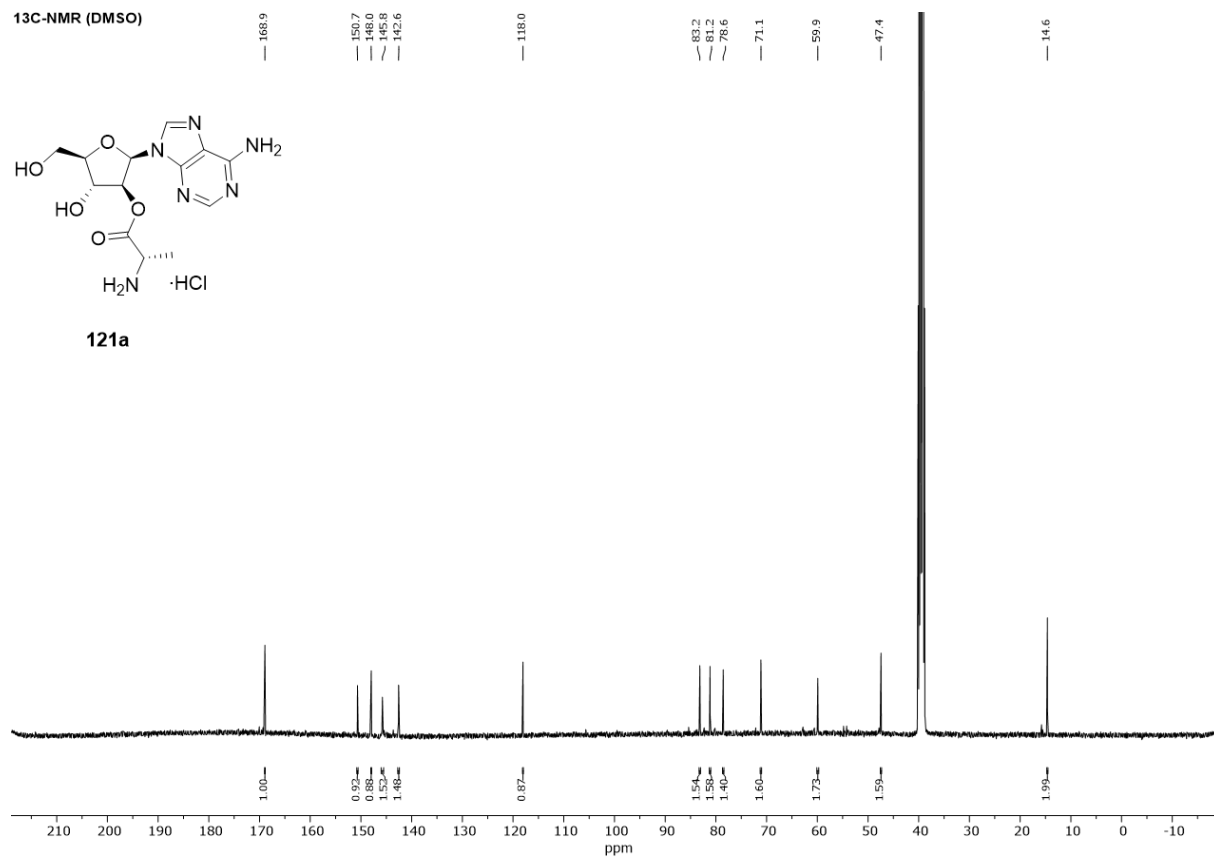


¹H-NMR (DMSO)

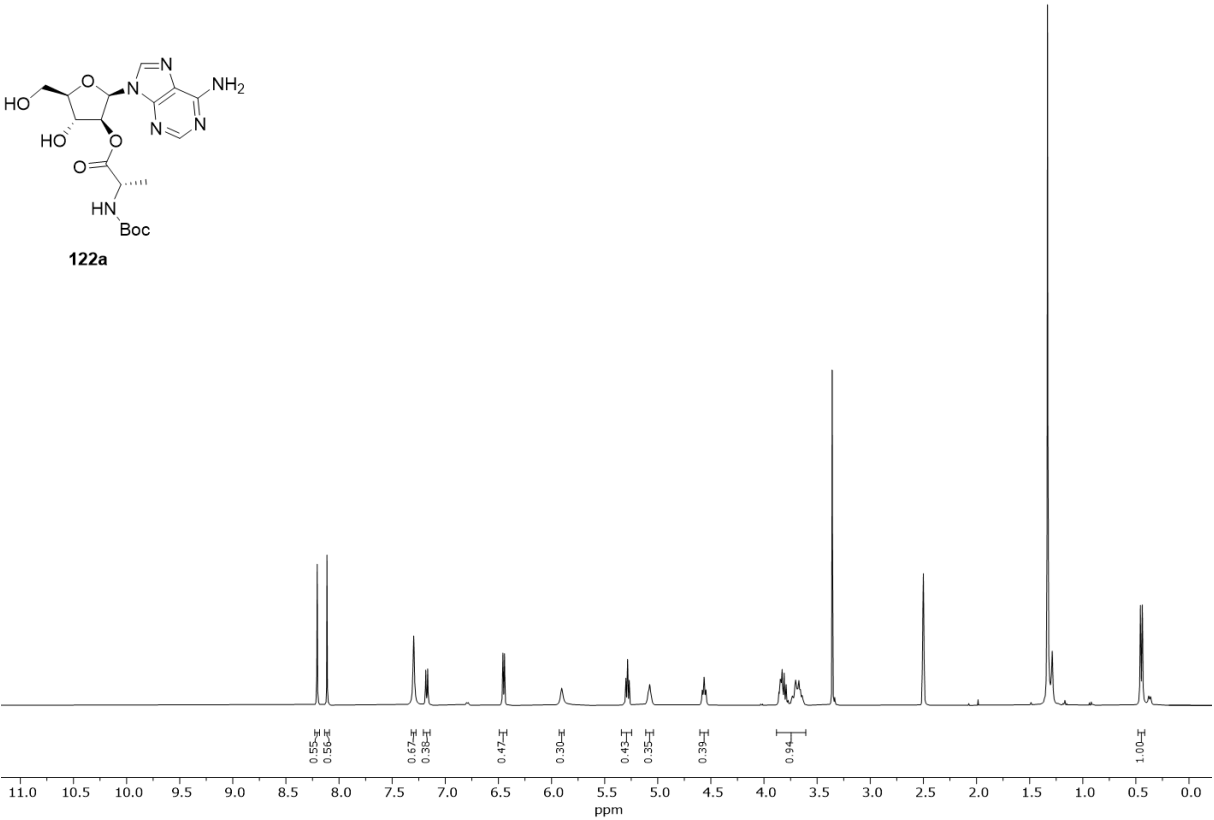


¹³C-NMR (DMSO)

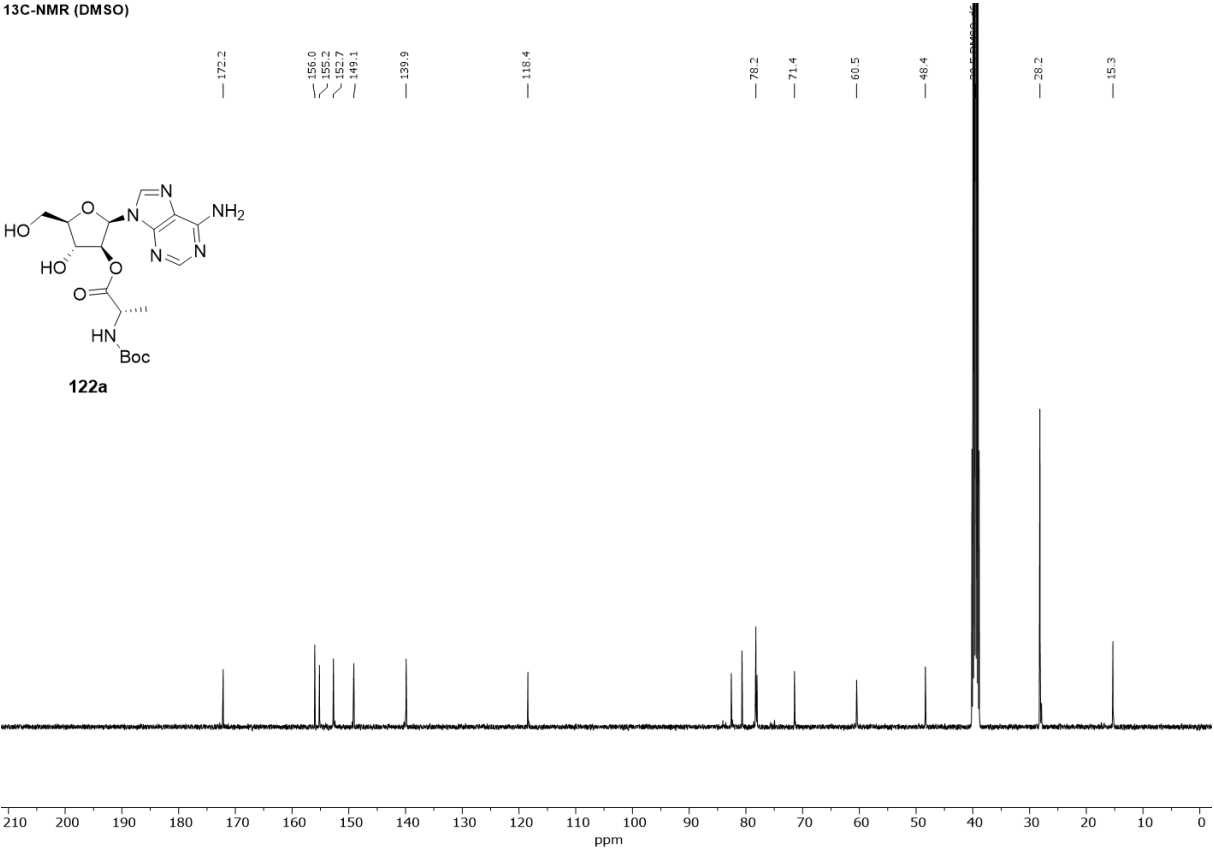


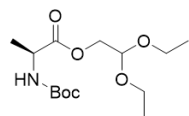
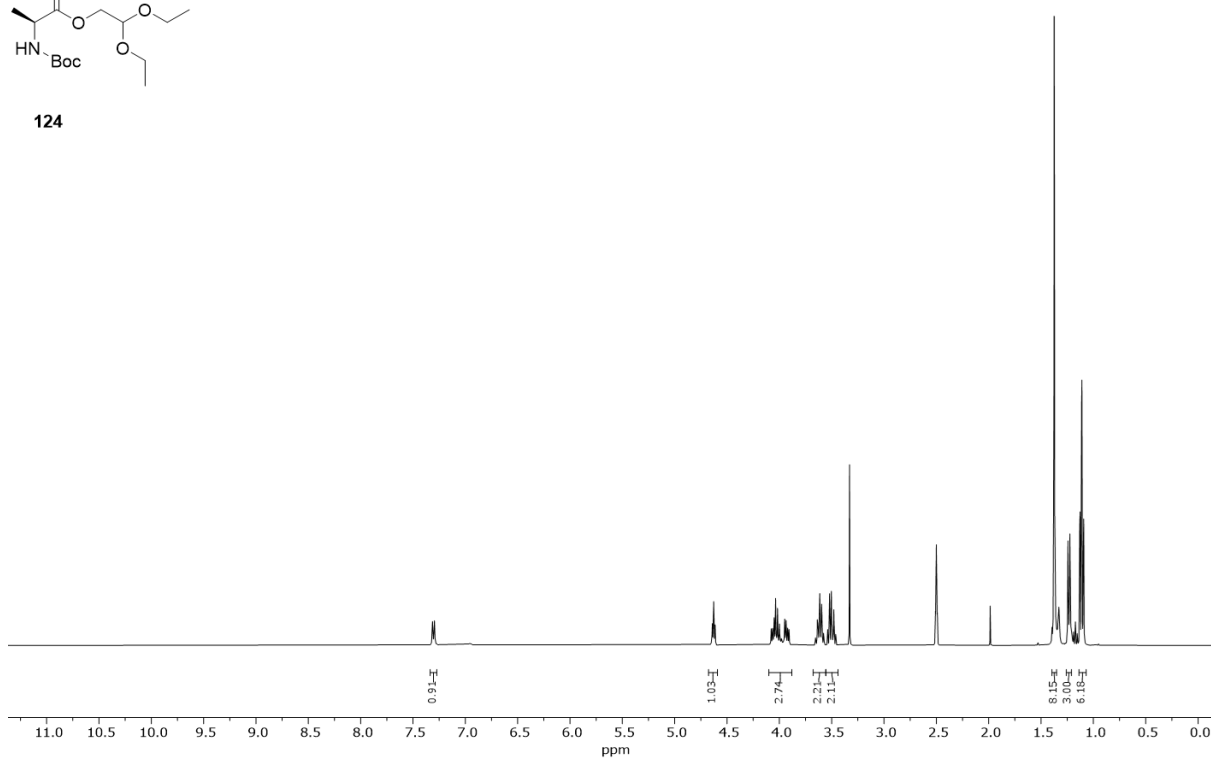
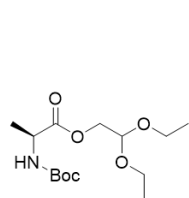
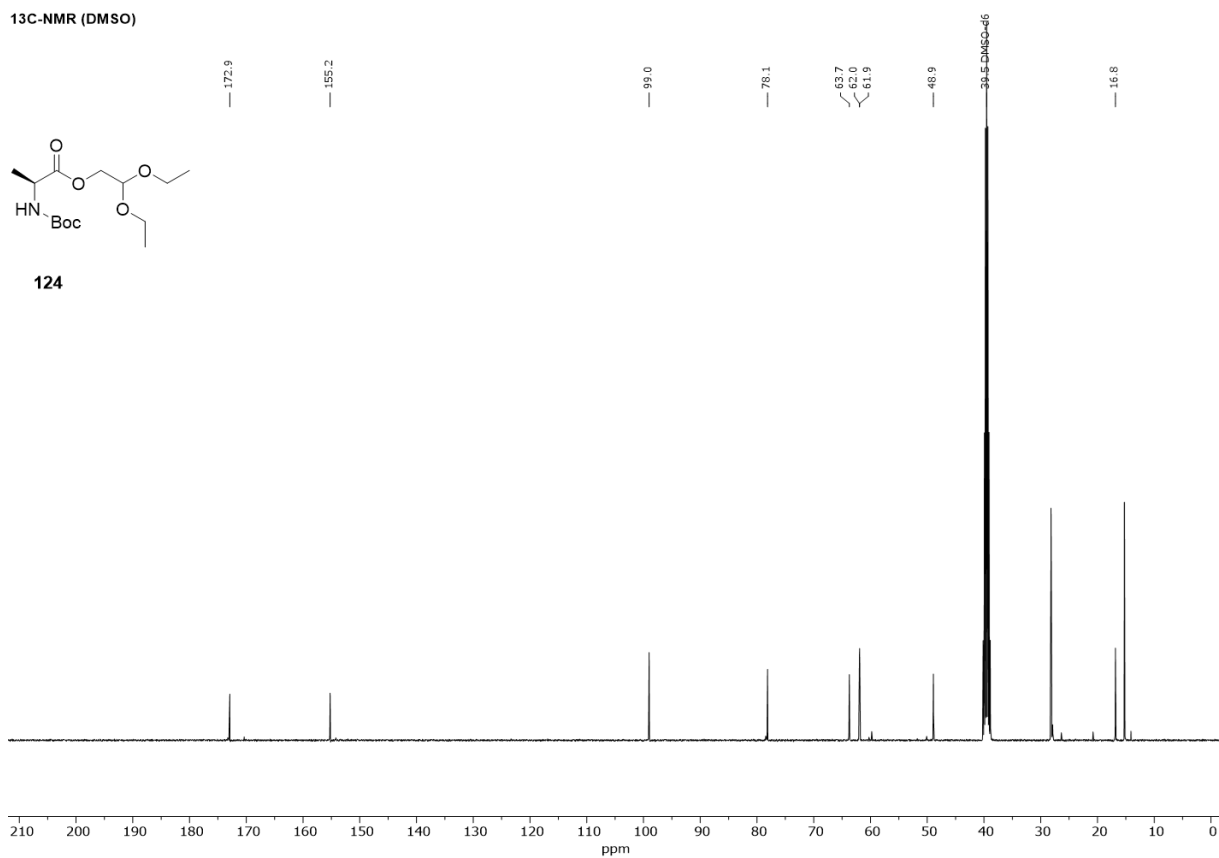
¹H-NMR (DMSO)**121a****¹³C-NMR (DMSO)****121a**

¹H-NMR (DMSO)

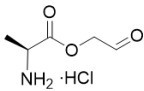


¹³C-NMR (DMSO)

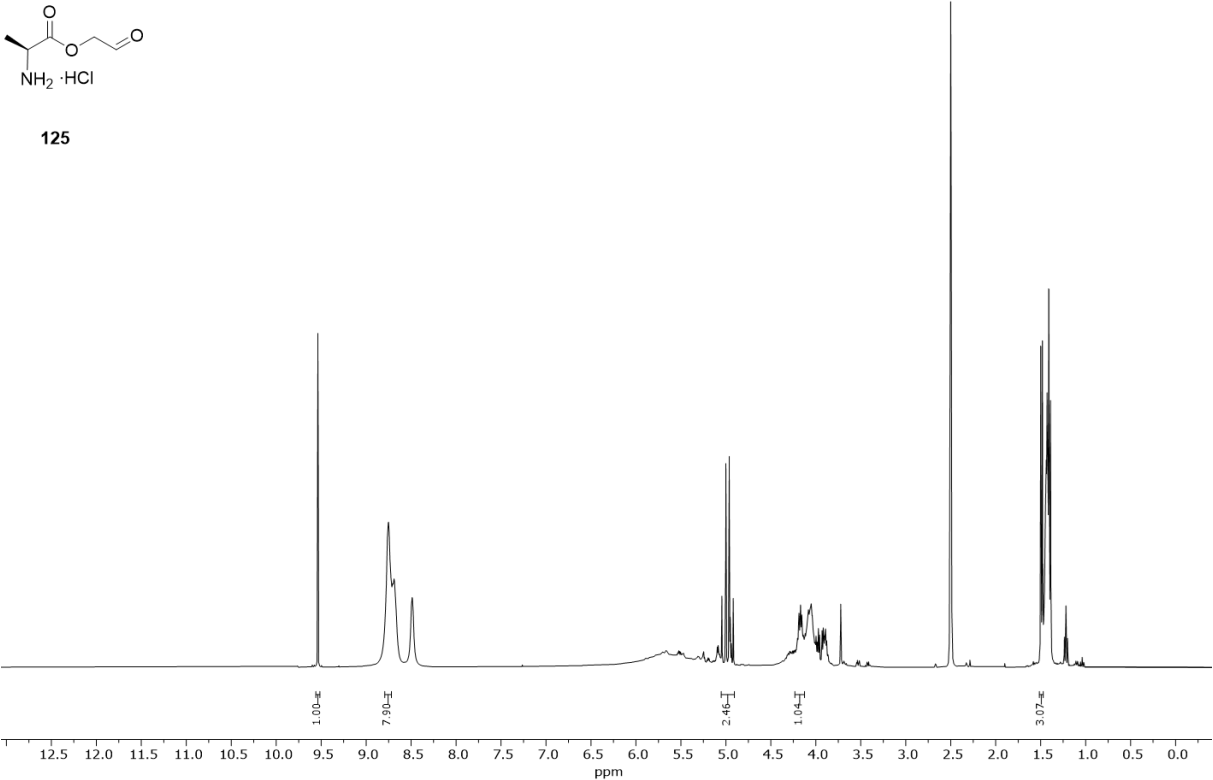


¹H-NMR (DMSO)**124****¹³C-NMR (DMSO)****124**

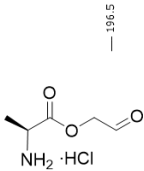
¹H-NMR (DMSO)



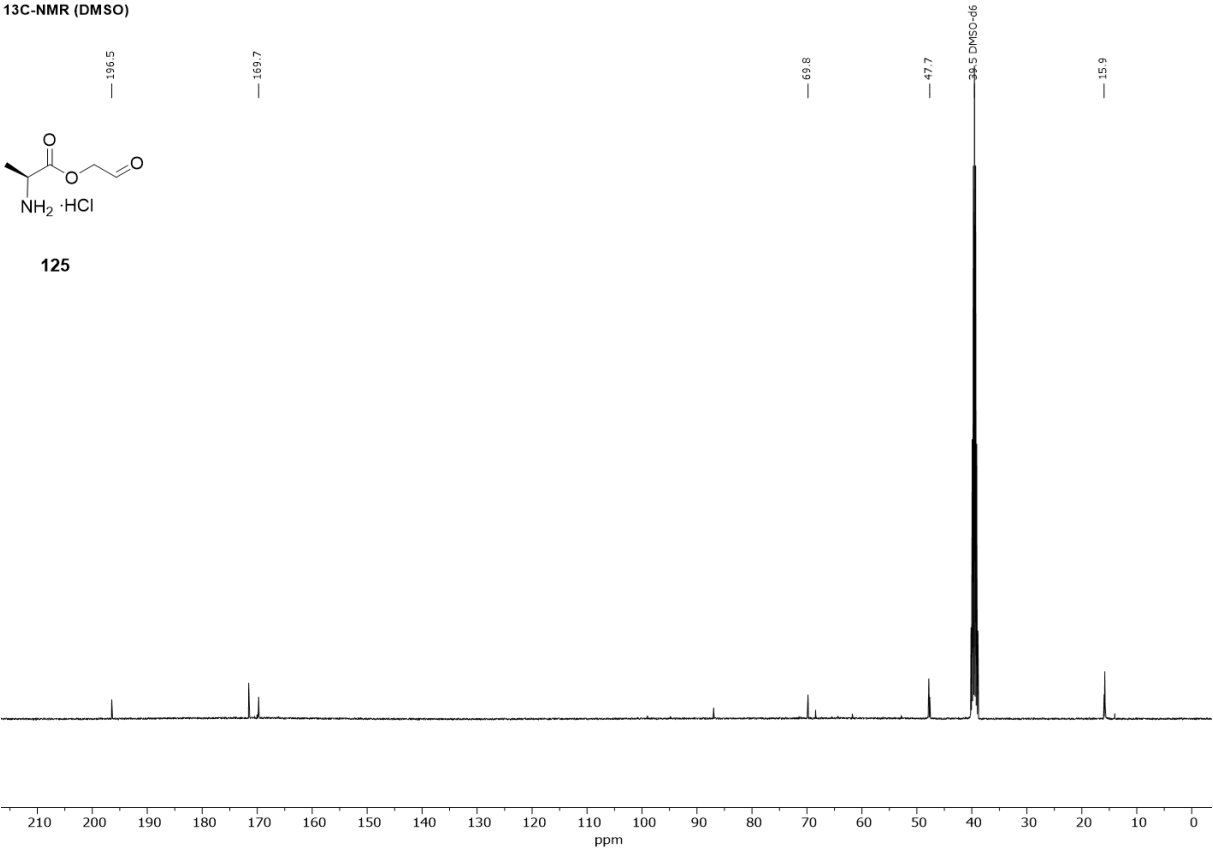
125

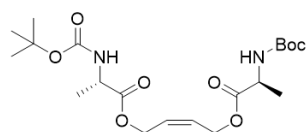
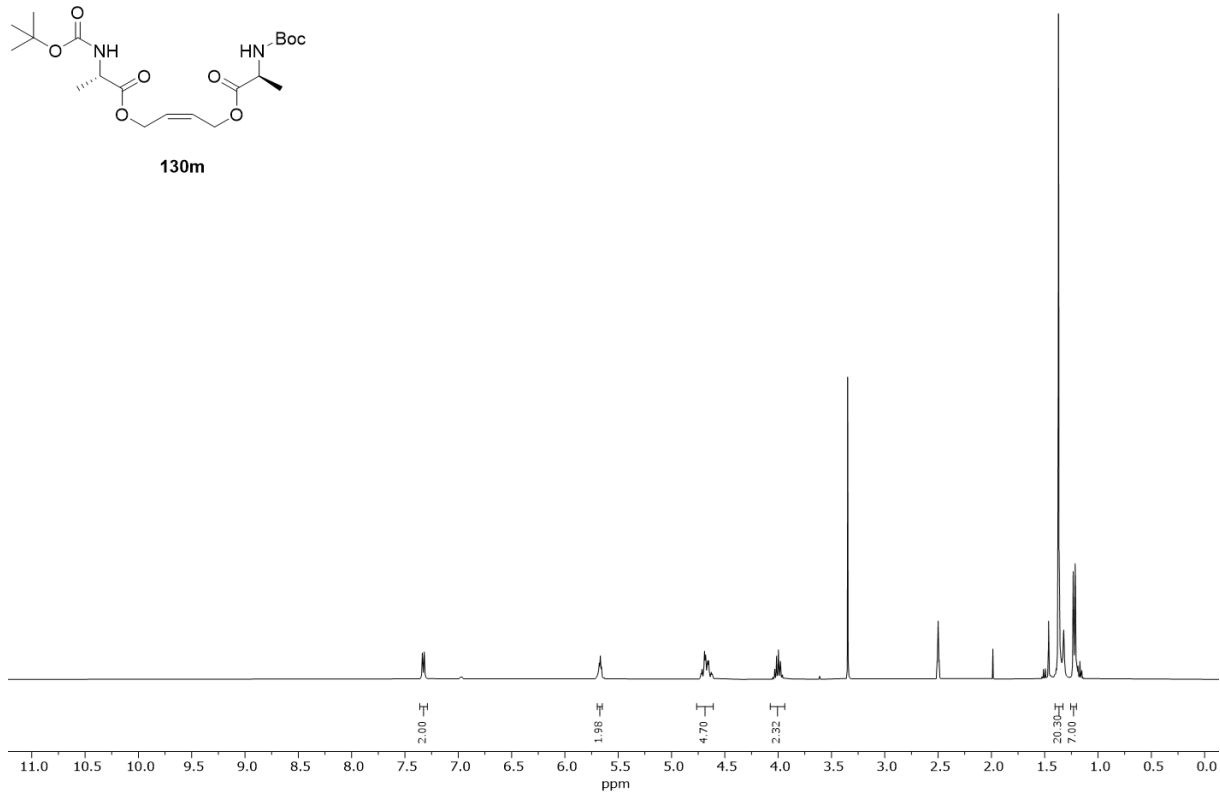
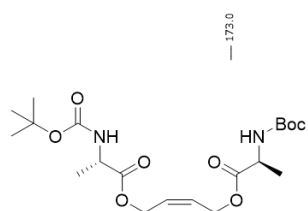
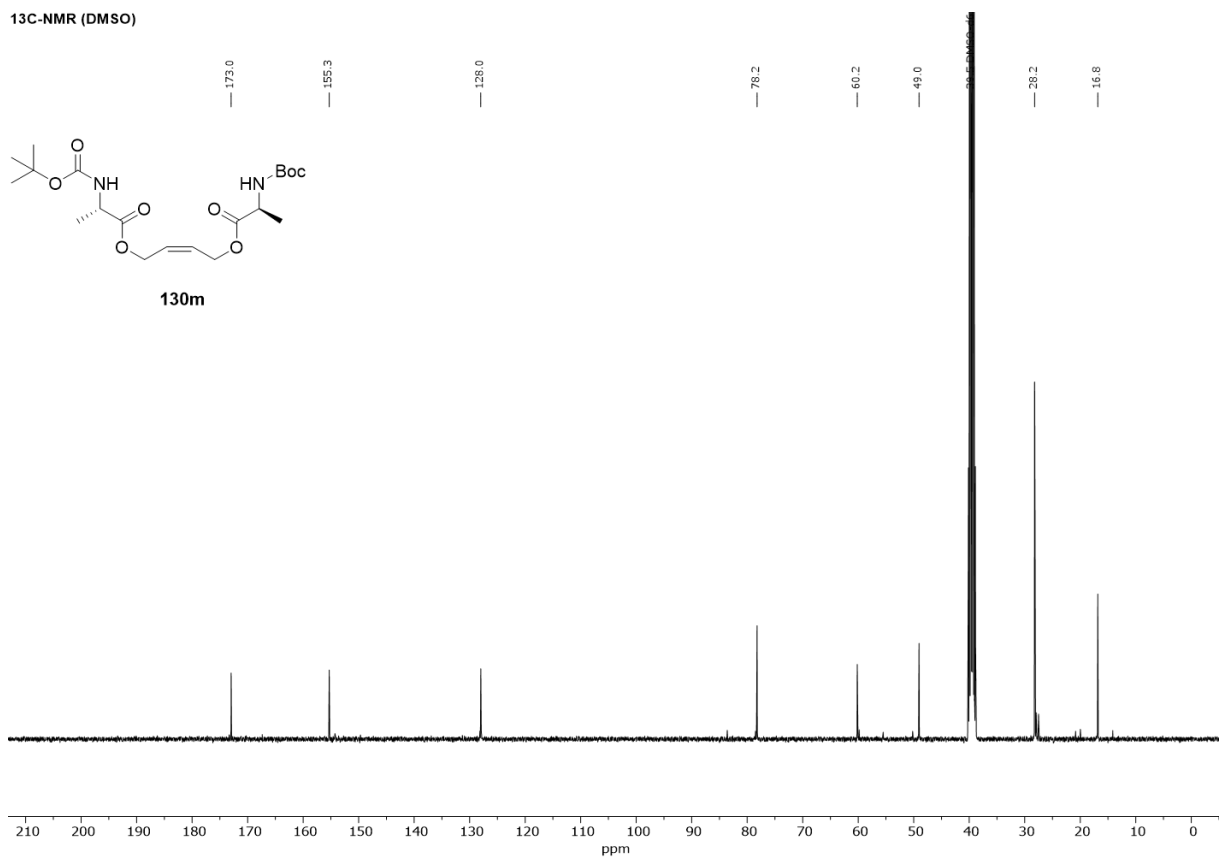


¹³C-NMR (DMSO)

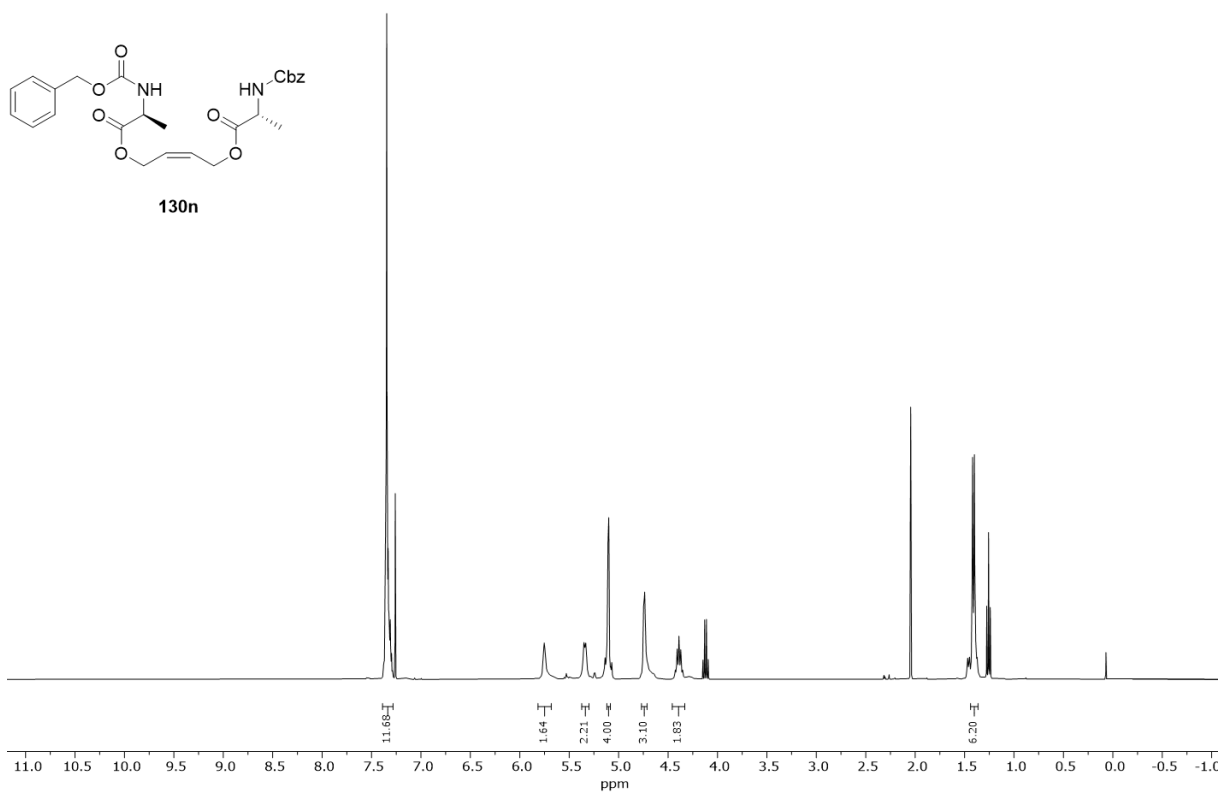


125

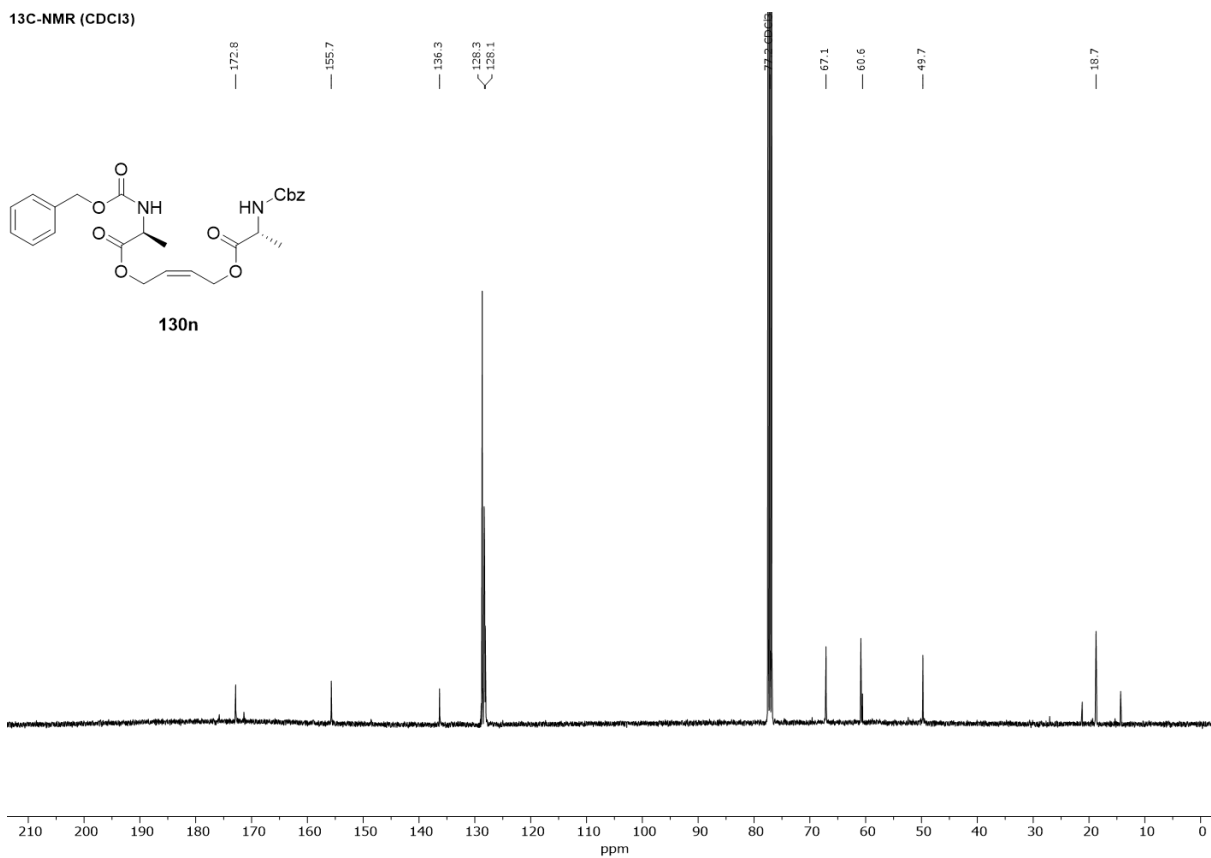


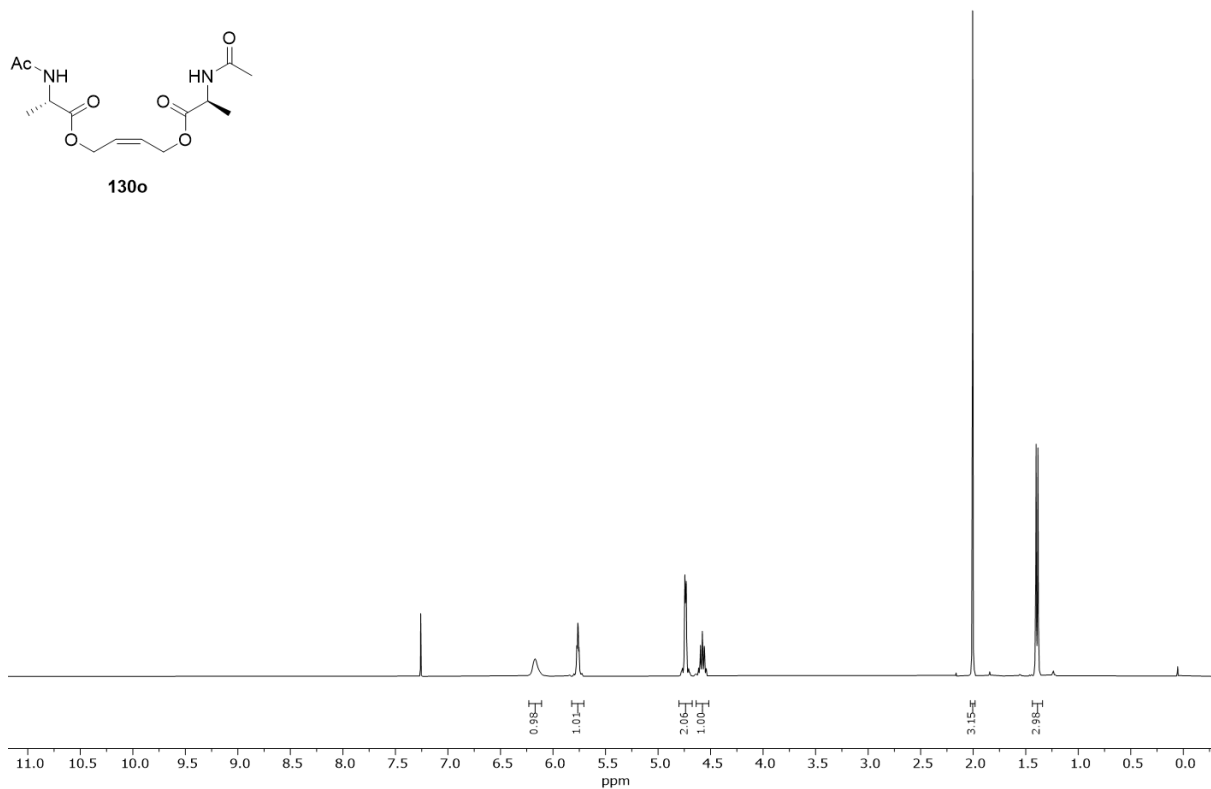
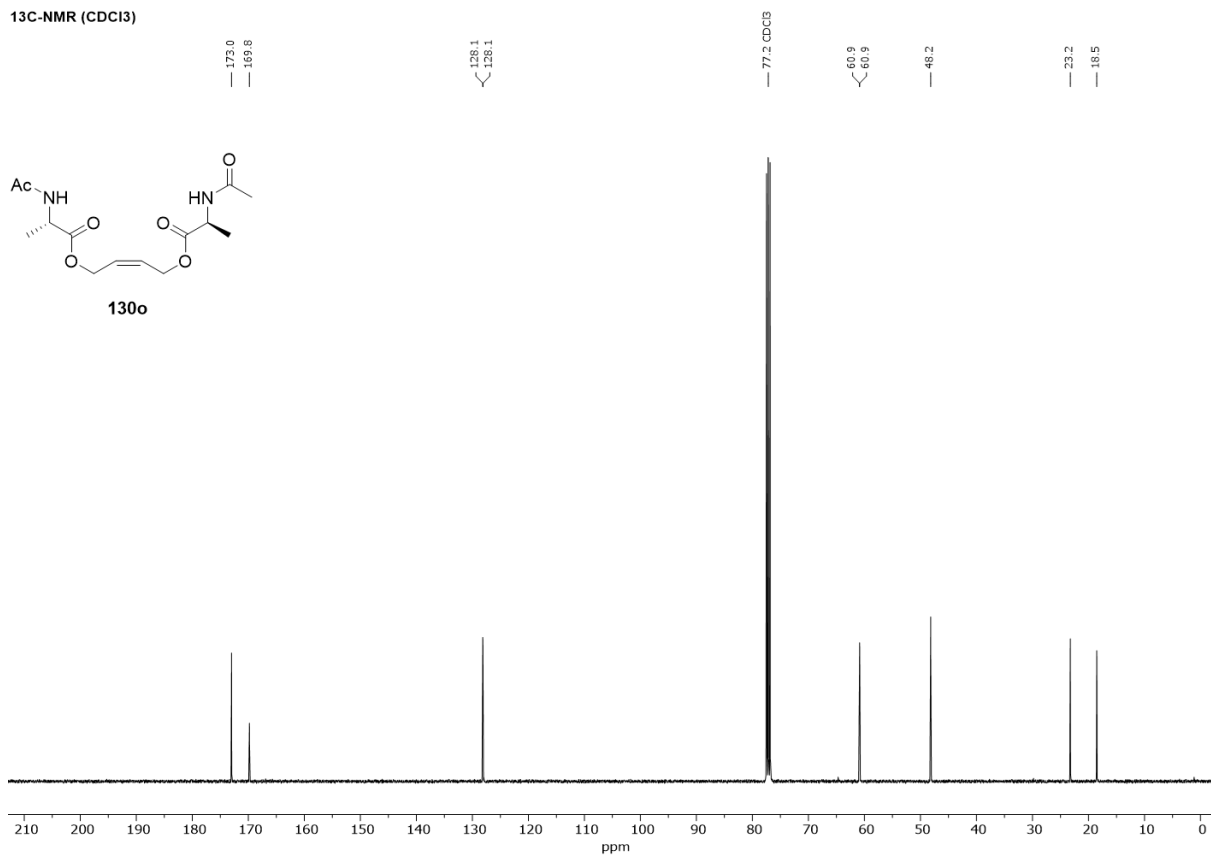
¹H-NMR (DMSO)**130m****¹³C-NMR (DMSO)****130m**

¹H-NMR (CDCl₃)

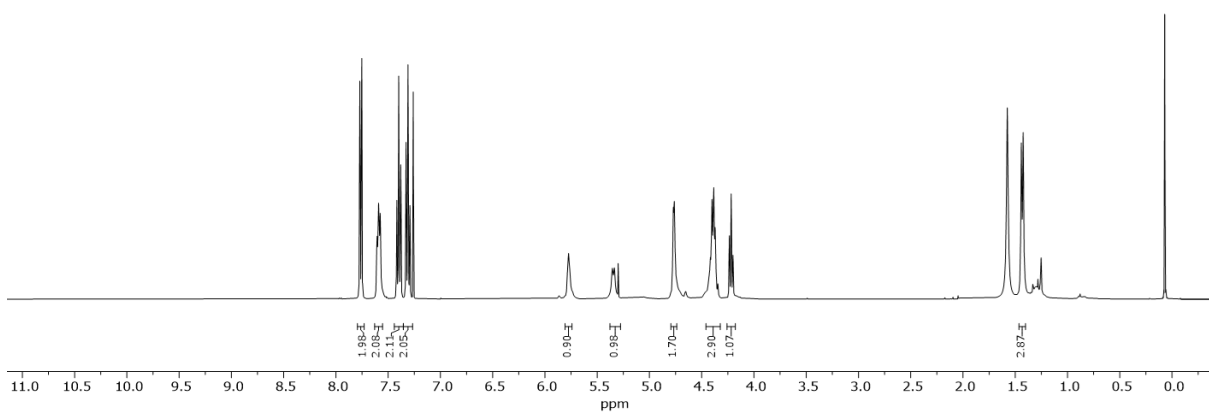
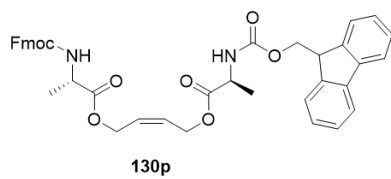


¹³C-NMR (CDCl₃)

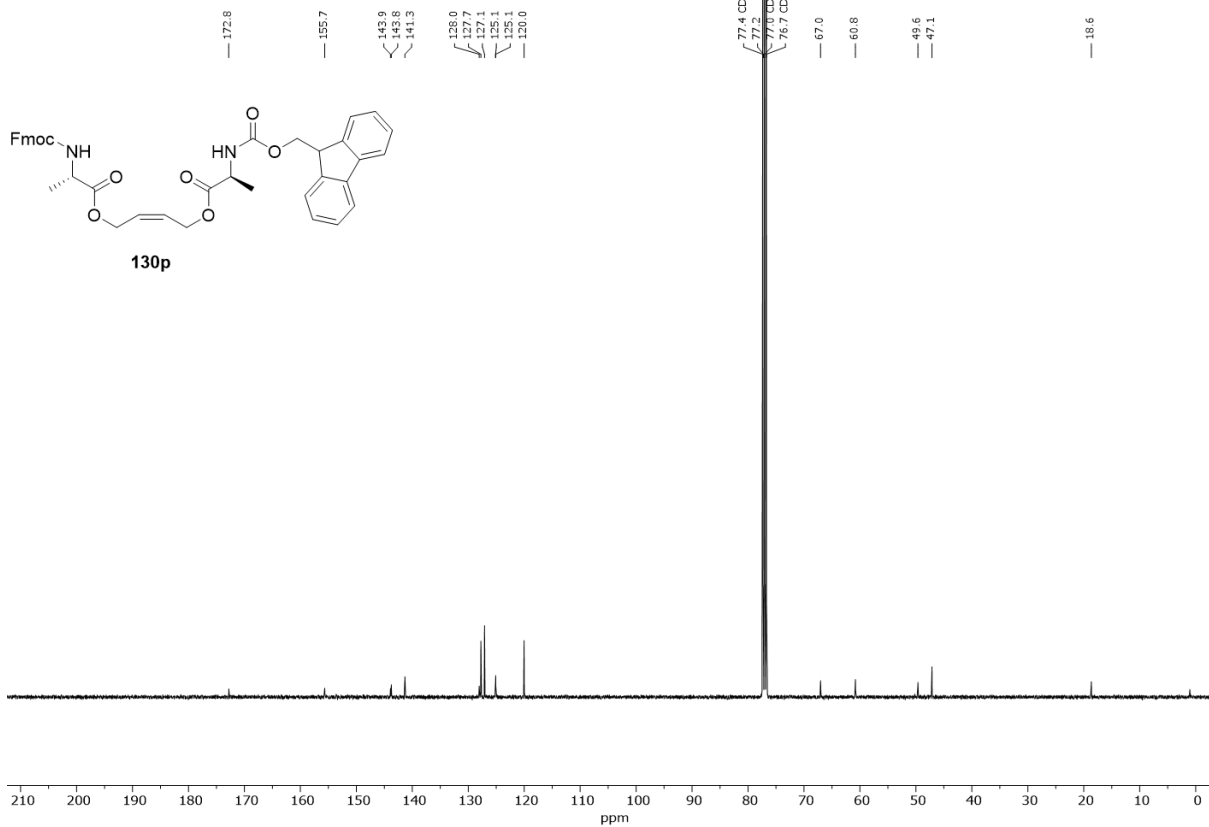


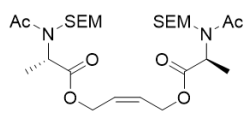
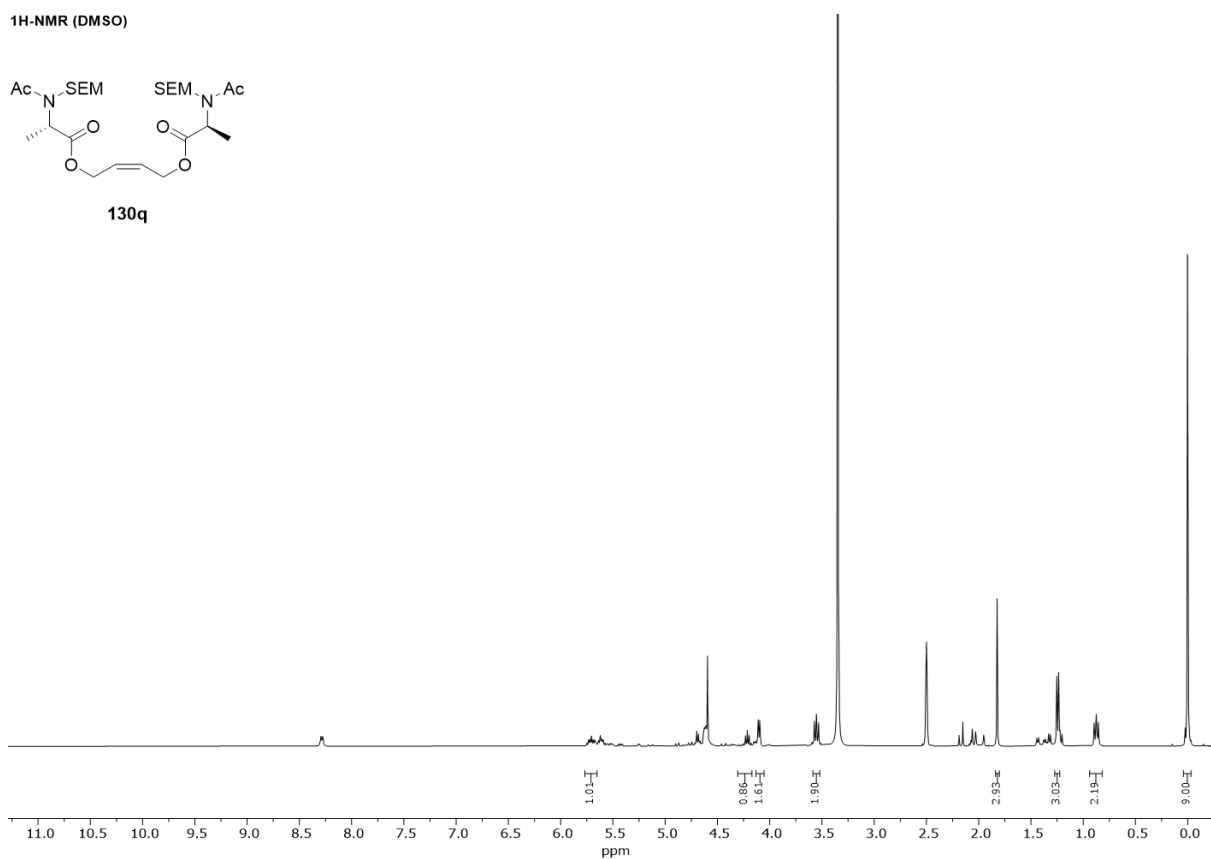
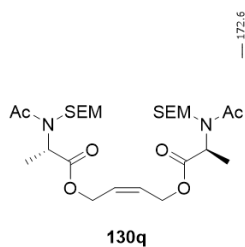
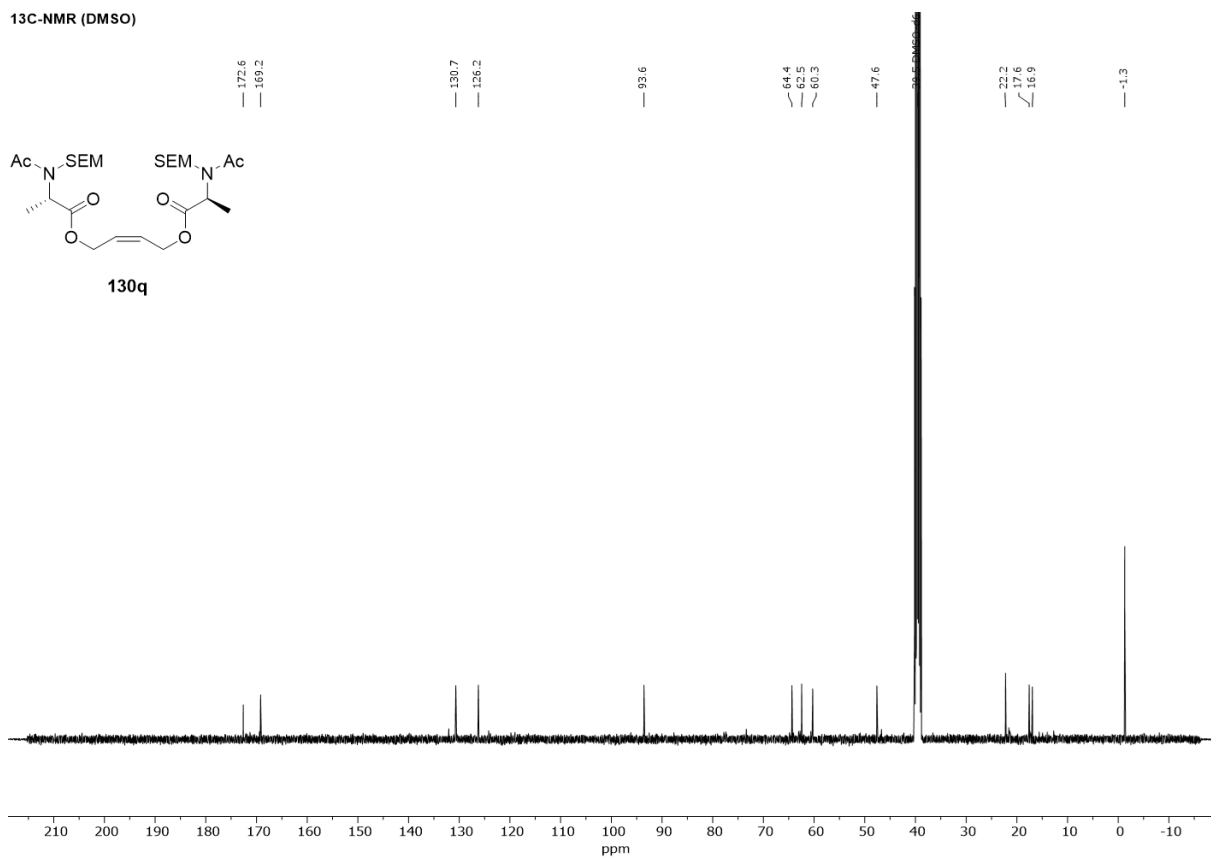
¹H-NMR (CDCl₃)¹³C-NMR (CDCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃)

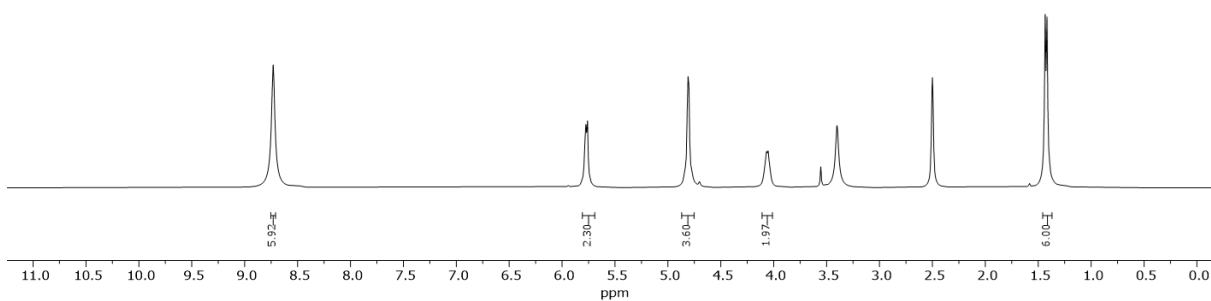
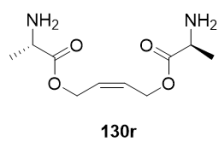


¹³C-NMR (CDCl₃)

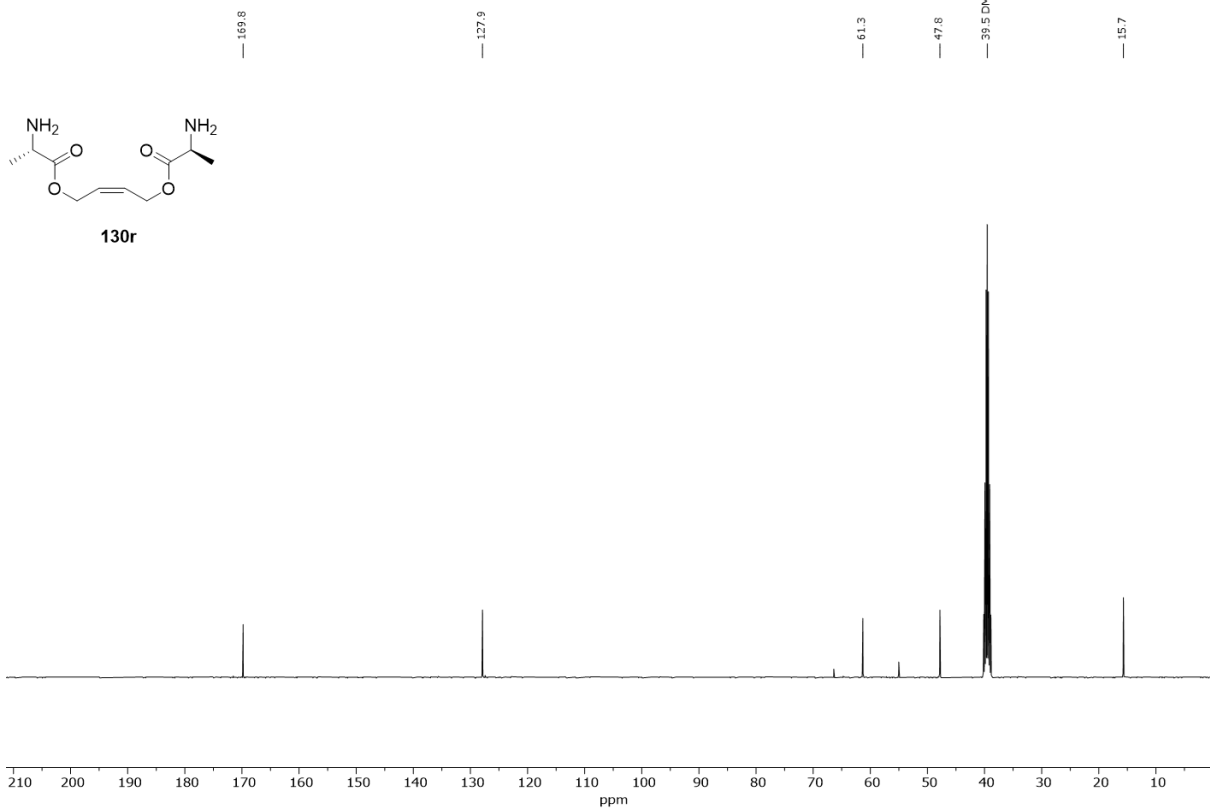


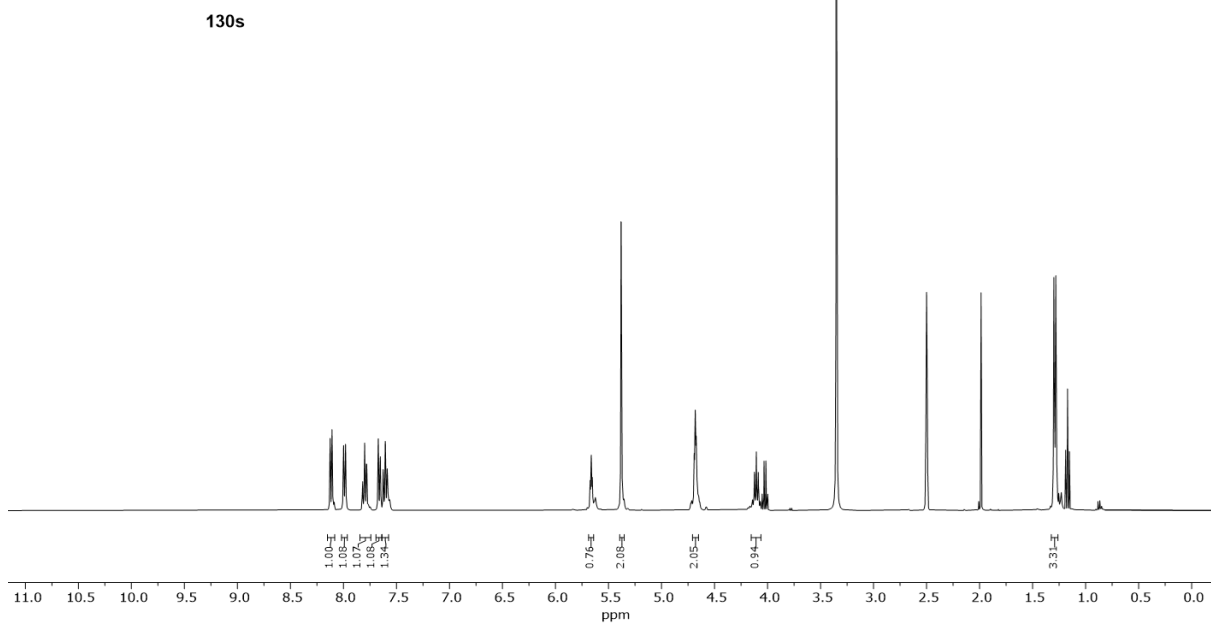
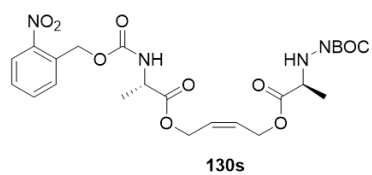
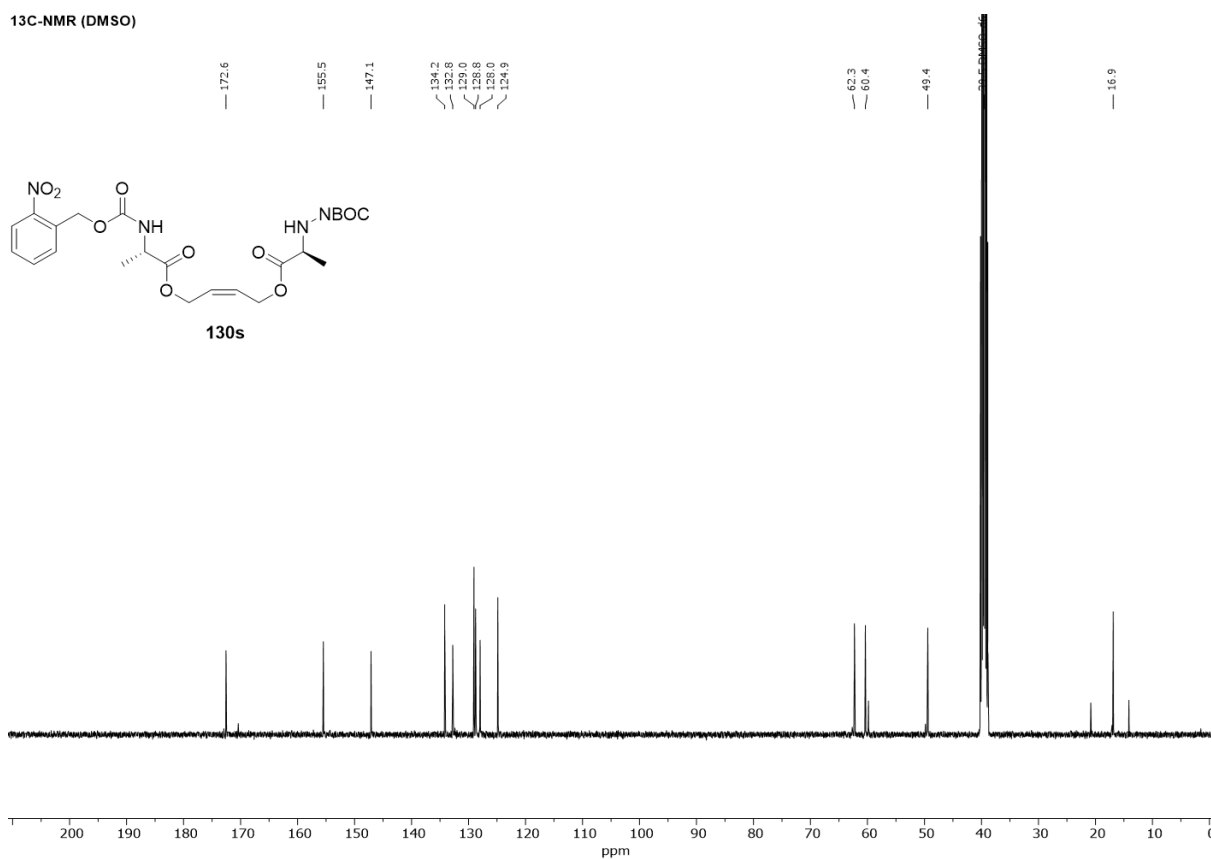
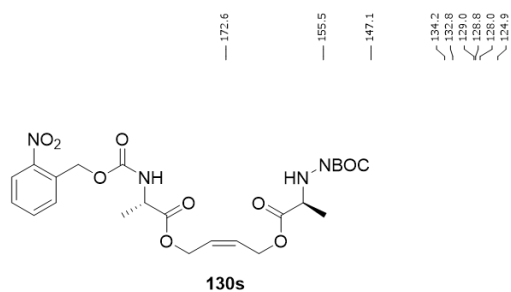
¹H-NMR (DMSO)**130q****¹³C-NMR (DMSO)****130q**

¹H-NMR (DMSO)

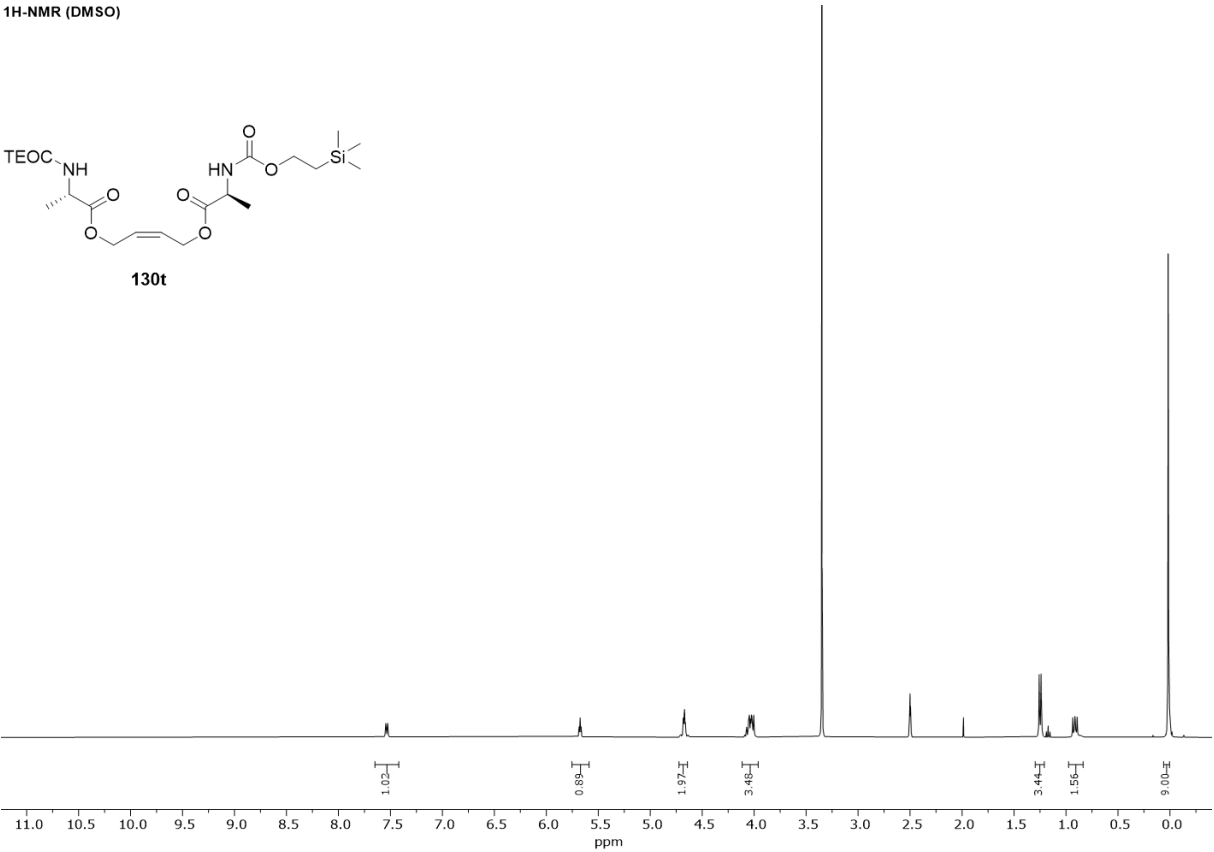


¹³C-NMR (DMSO)

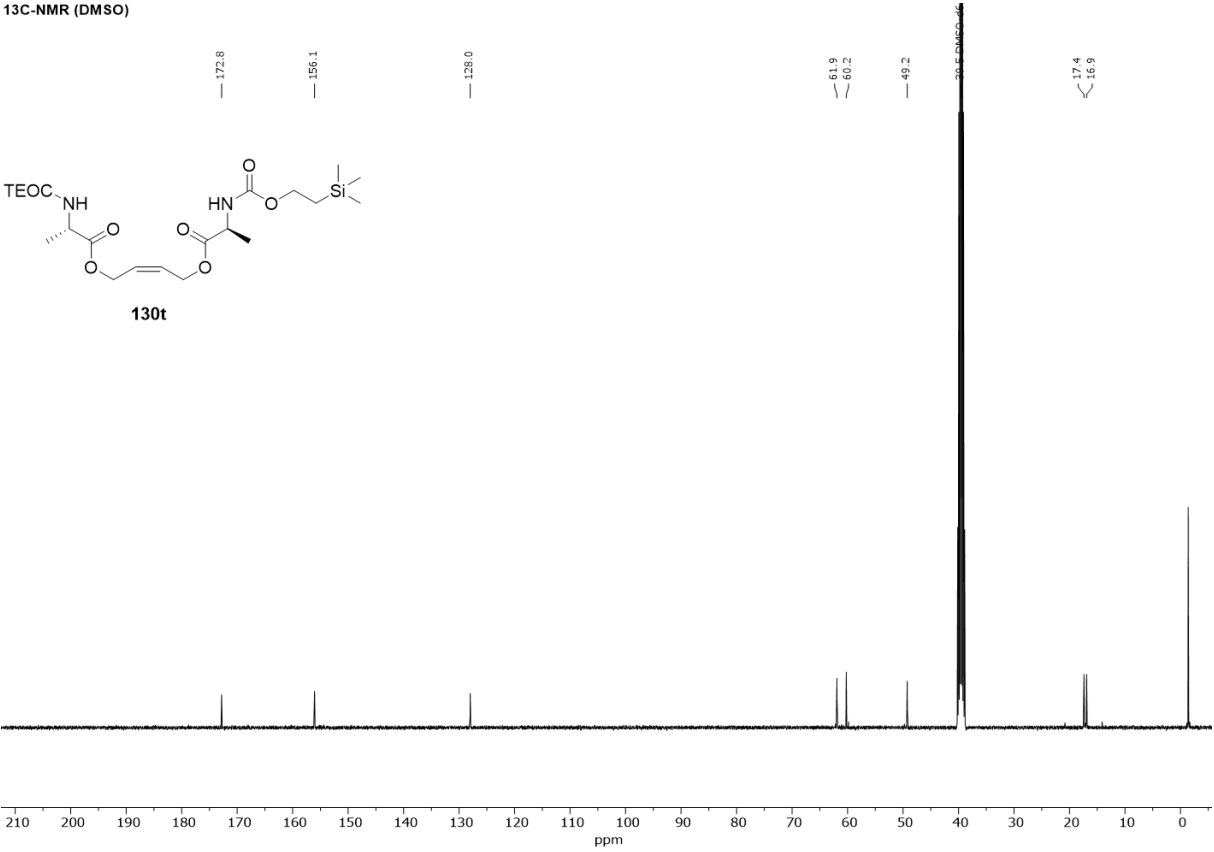


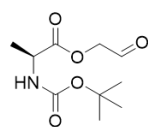
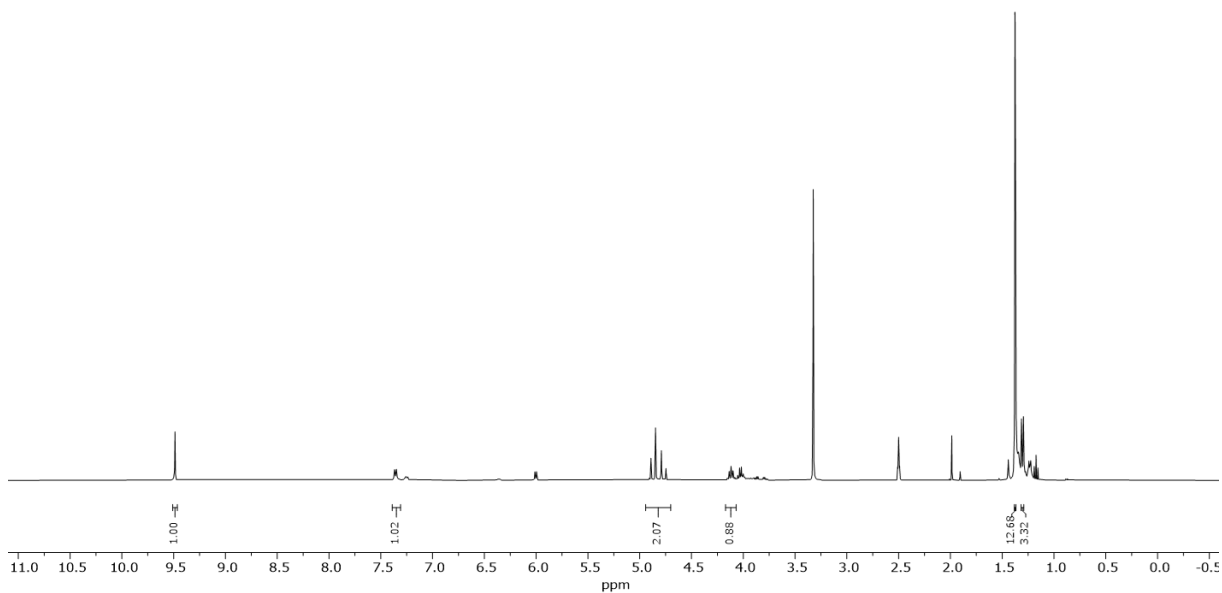
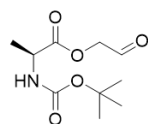
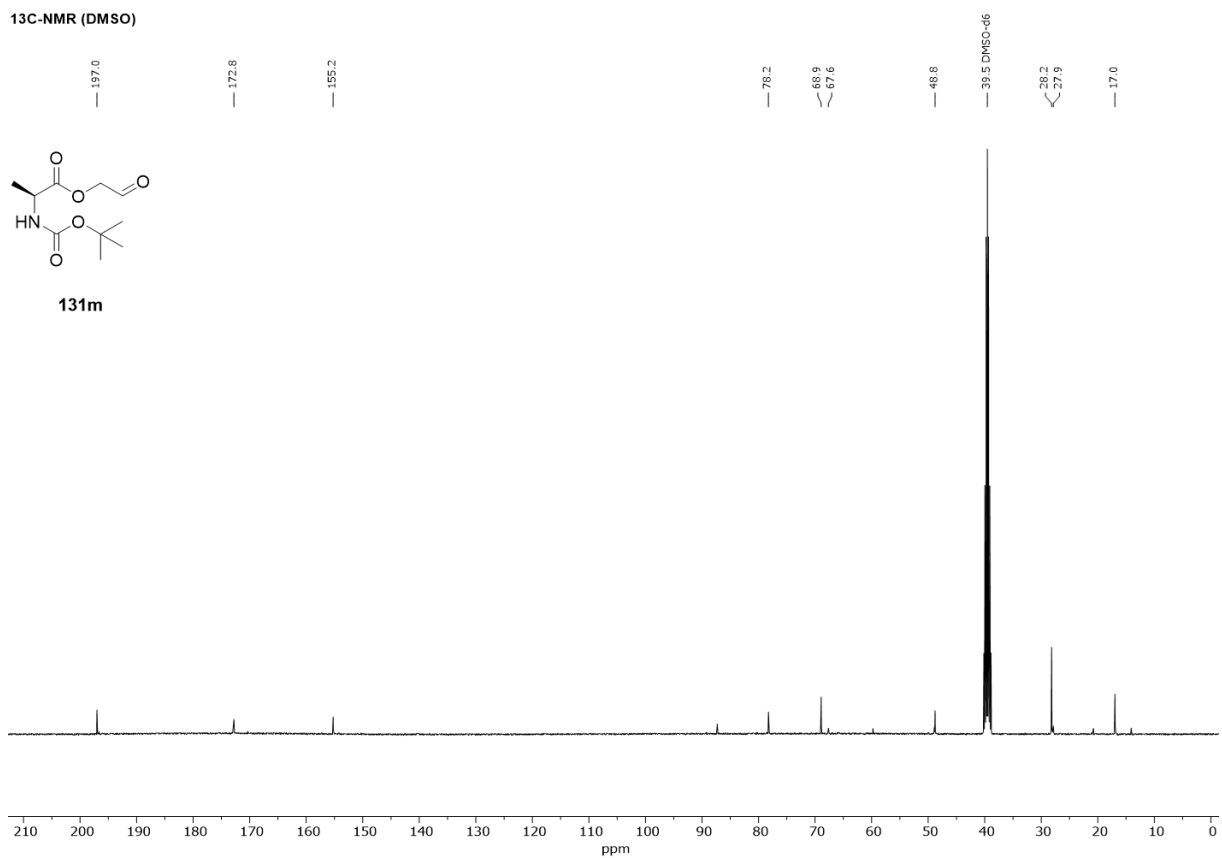
¹H-NMR (DMSO)¹³C-NMR (DMSO)

¹H-NMR (DMSO)

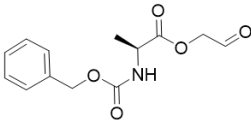


¹³C-NMR (DMSO)

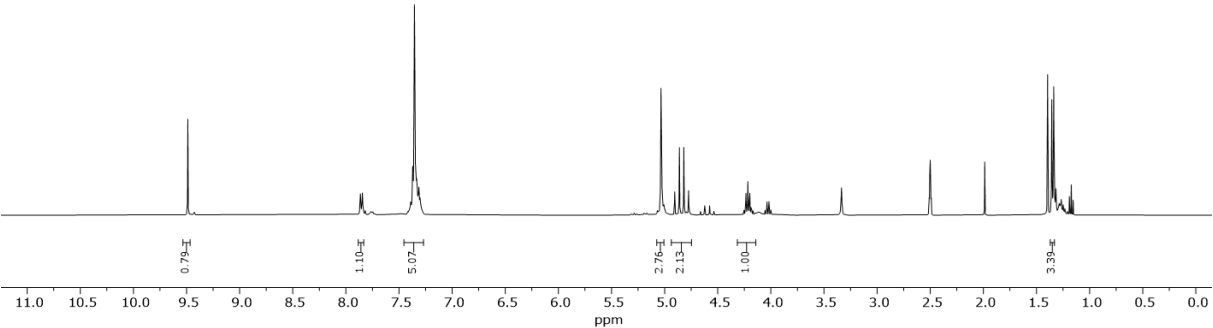


¹H-NMR (DMSO)**131m****¹³C-NMR (DMSO)****131m**

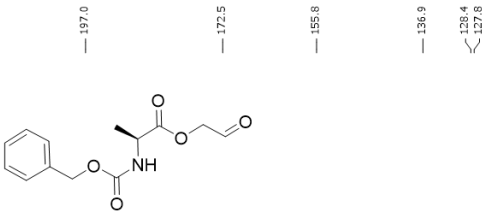
¹H-NMR (DMSO)



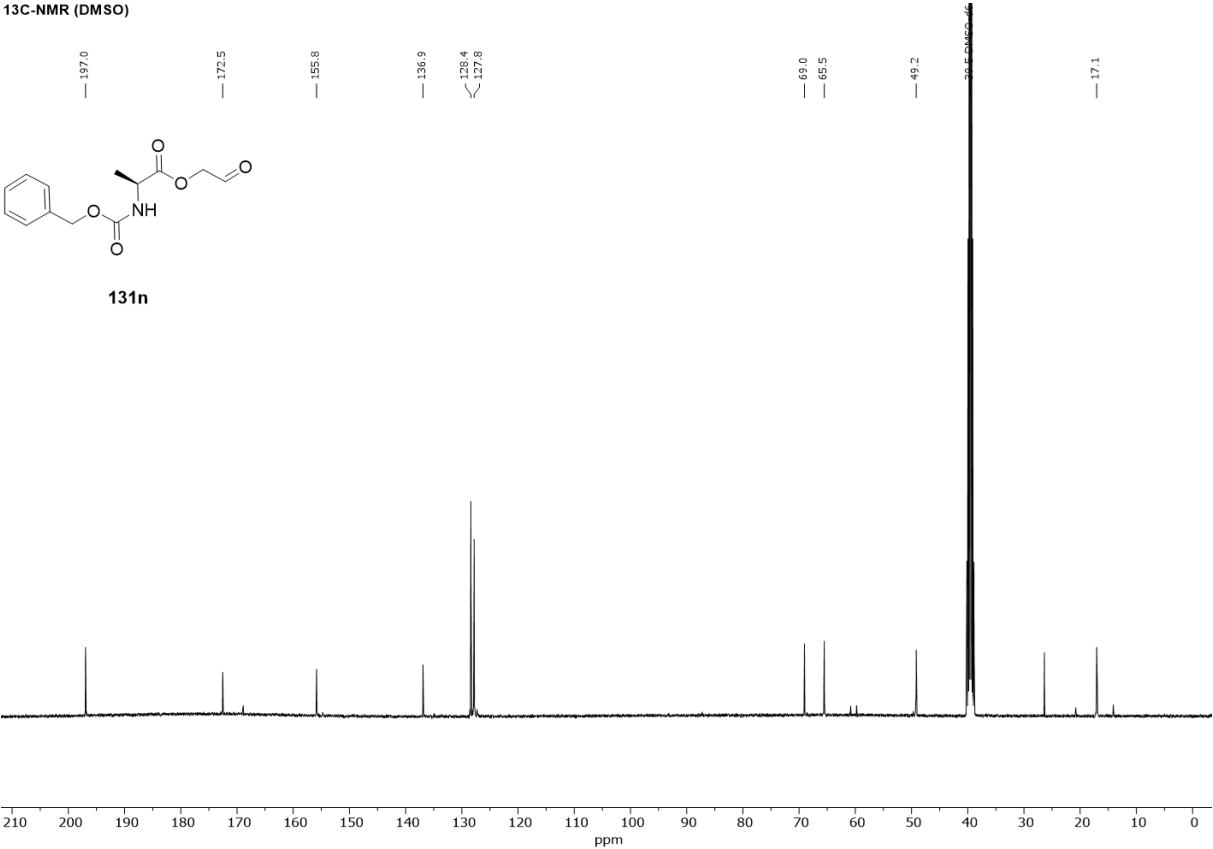
131n

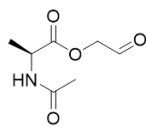
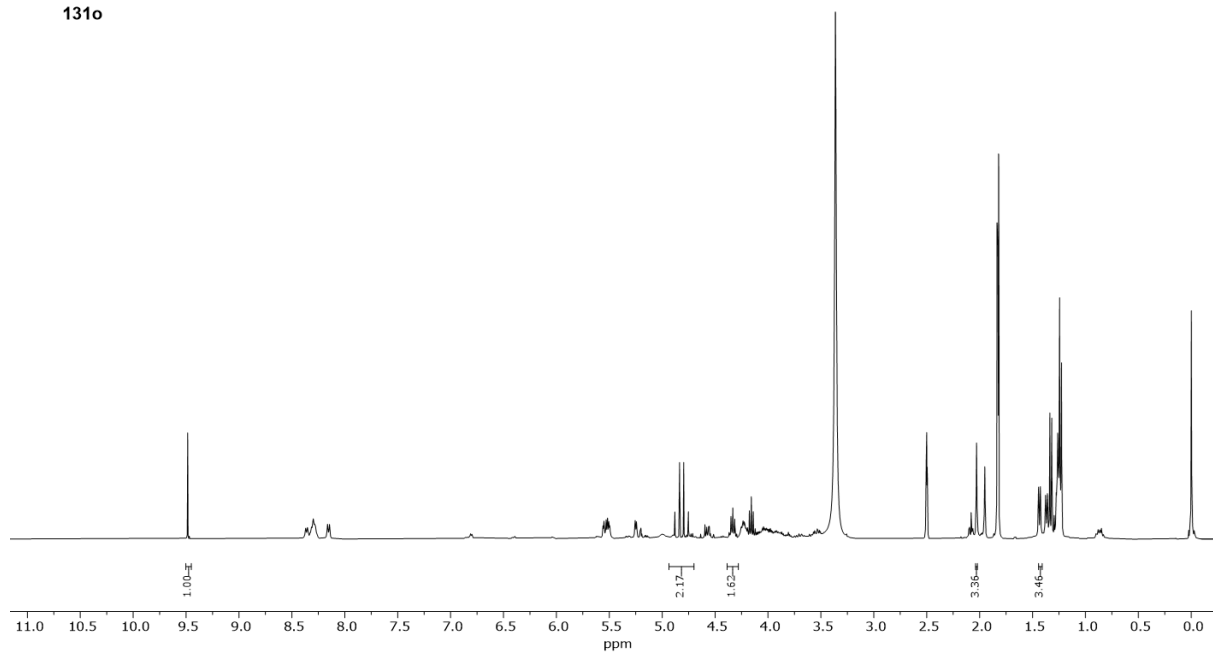


¹³C-NMR (DMSO)

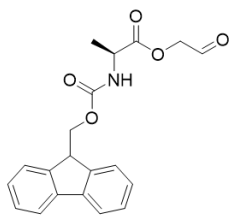


131n

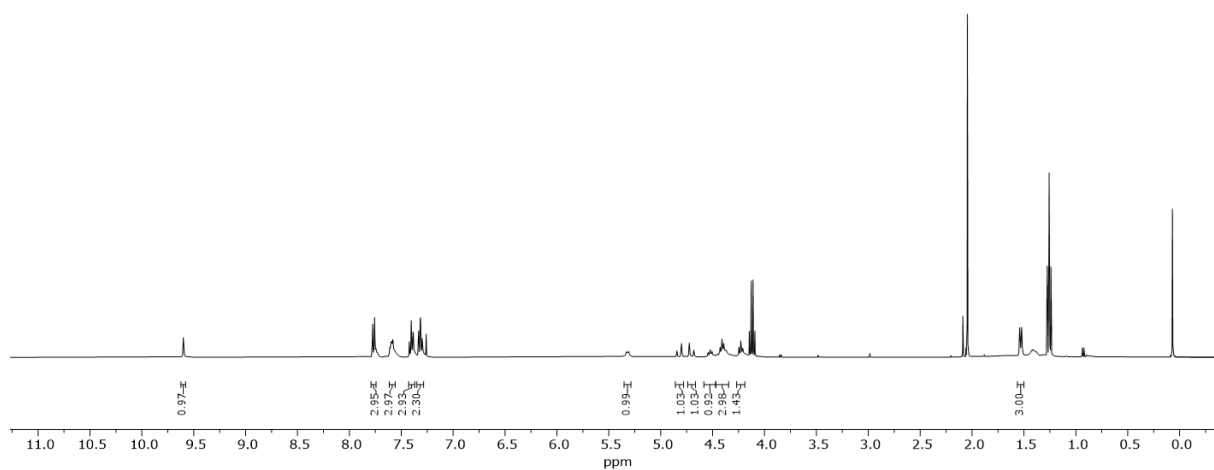


¹H-NMR (DMSO)**131o**

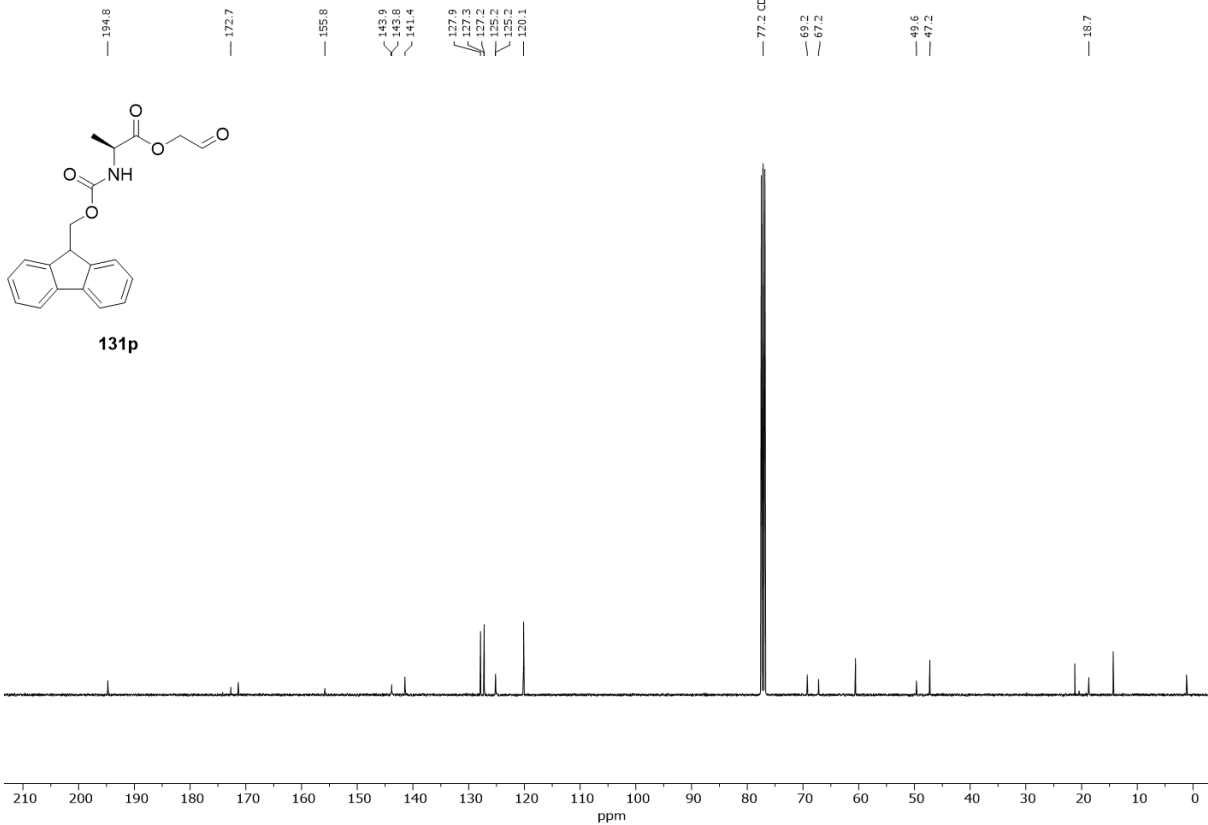
¹H-NMR (CDCl₃)



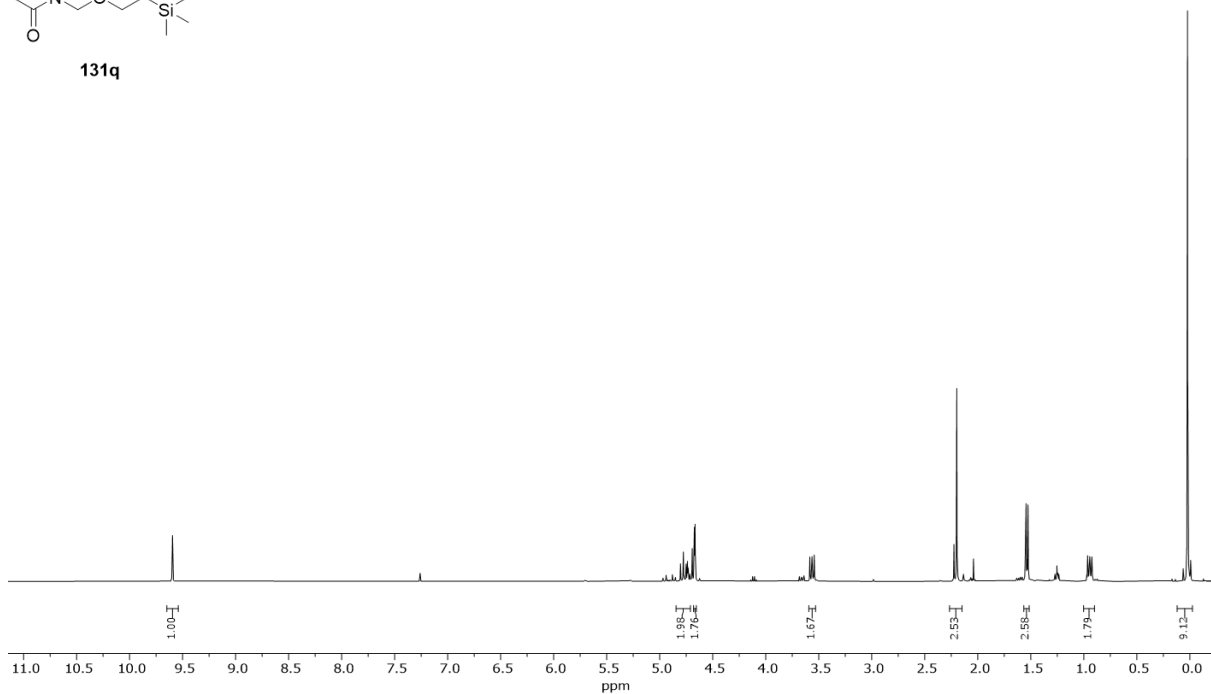
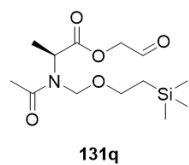
131p



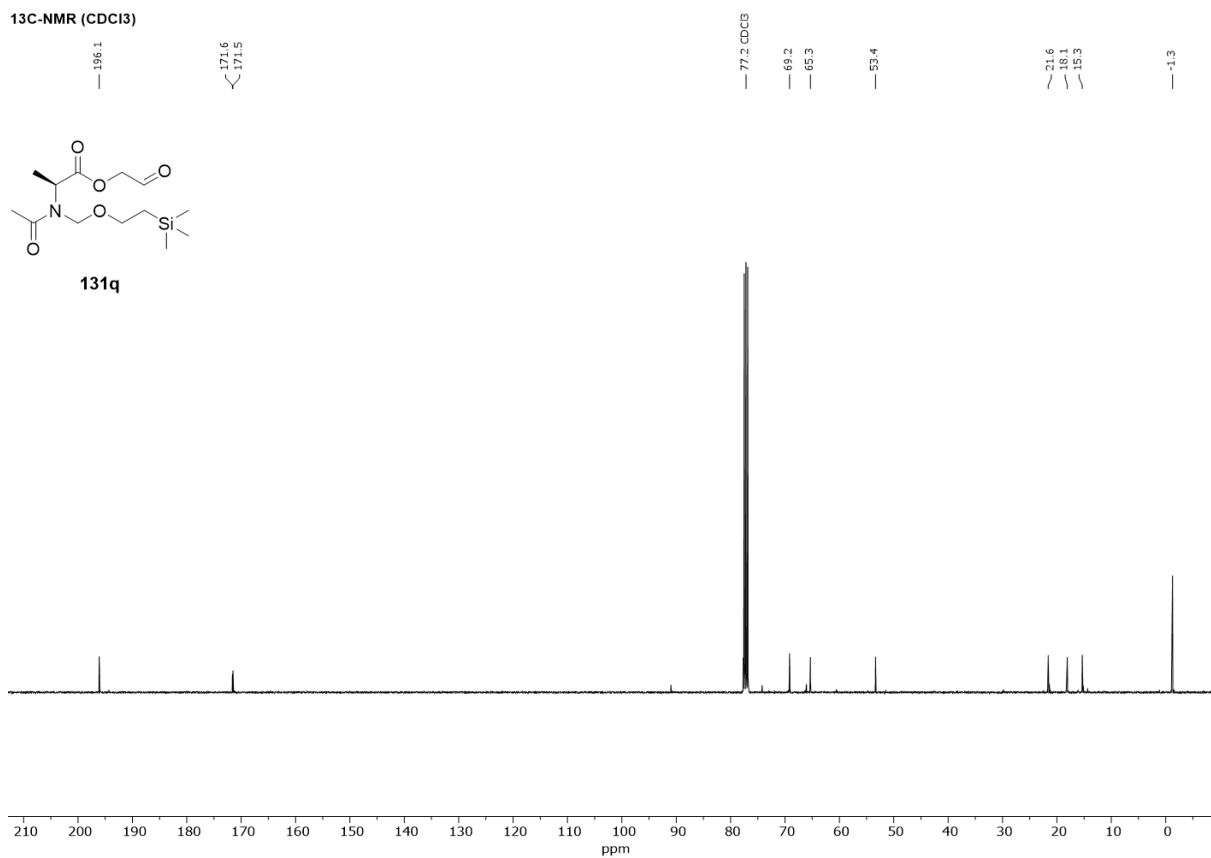
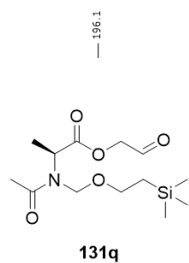
¹³C-NMR (CDCl₃)



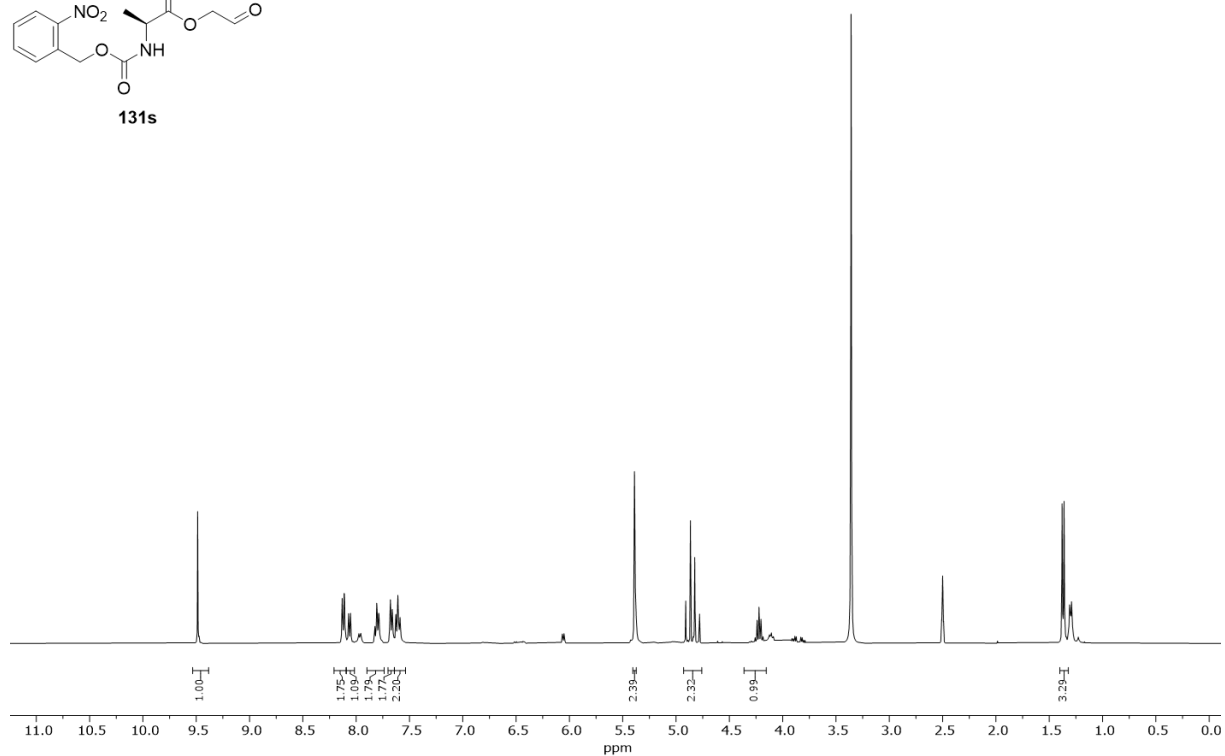
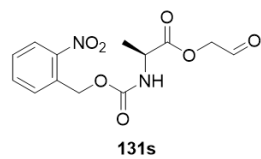
¹H-NMR (CDCl₃)



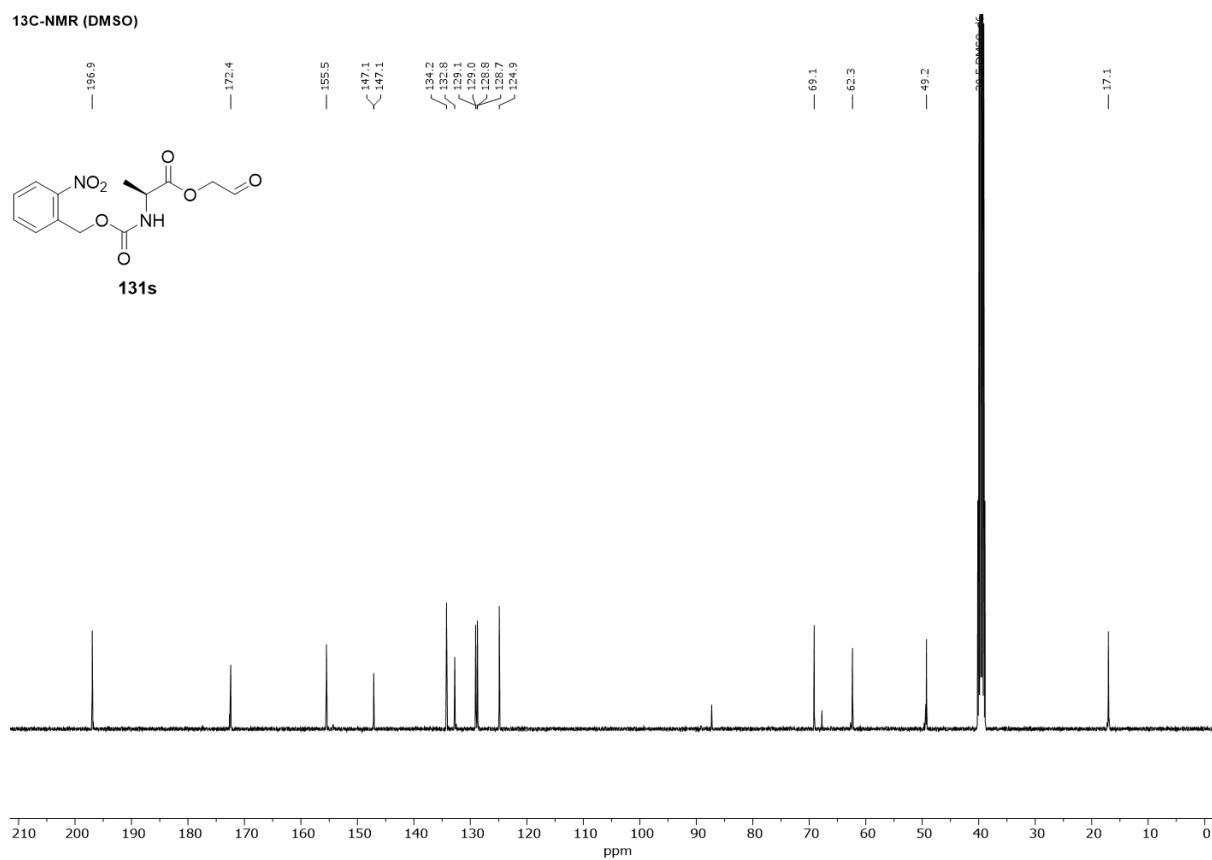
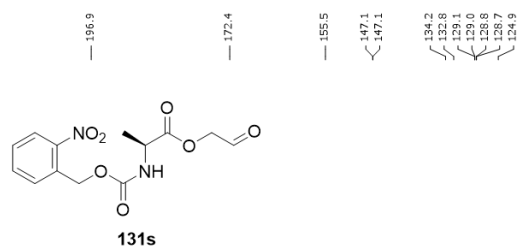
¹³C-NMR (CDCl₃)



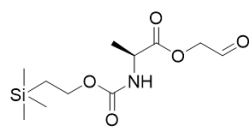
¹H-NMR (DMSO)



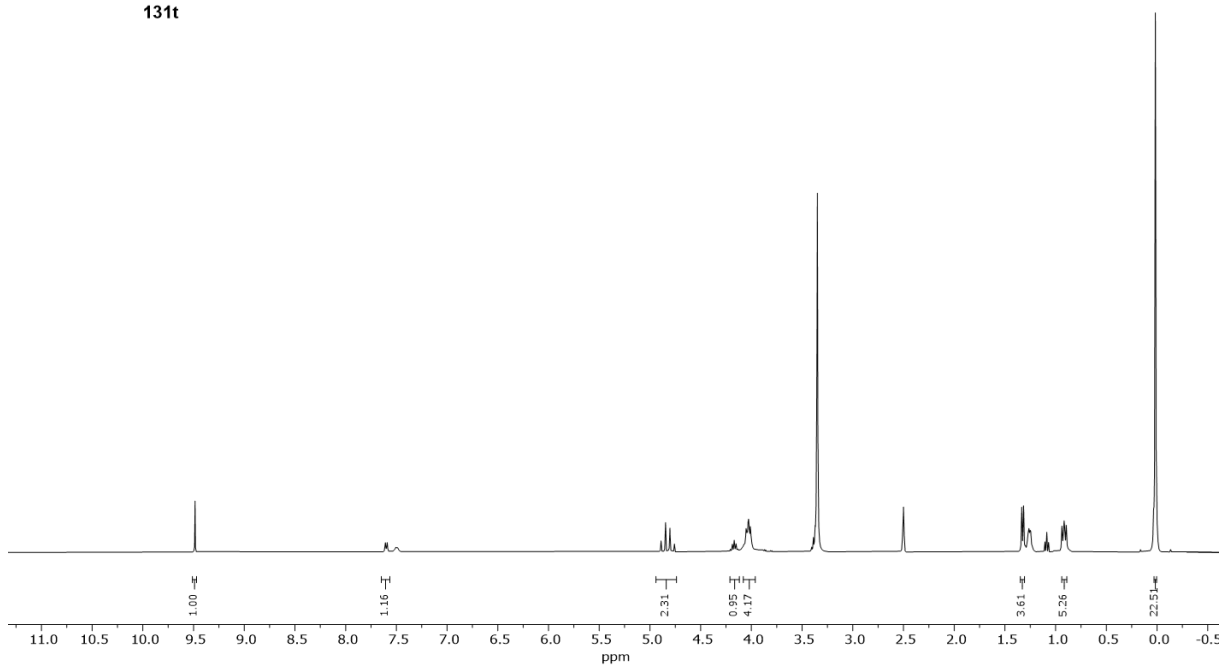
¹³C-NMR (DMSO)



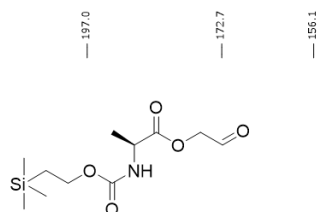
¹H-NMR (DMSO)



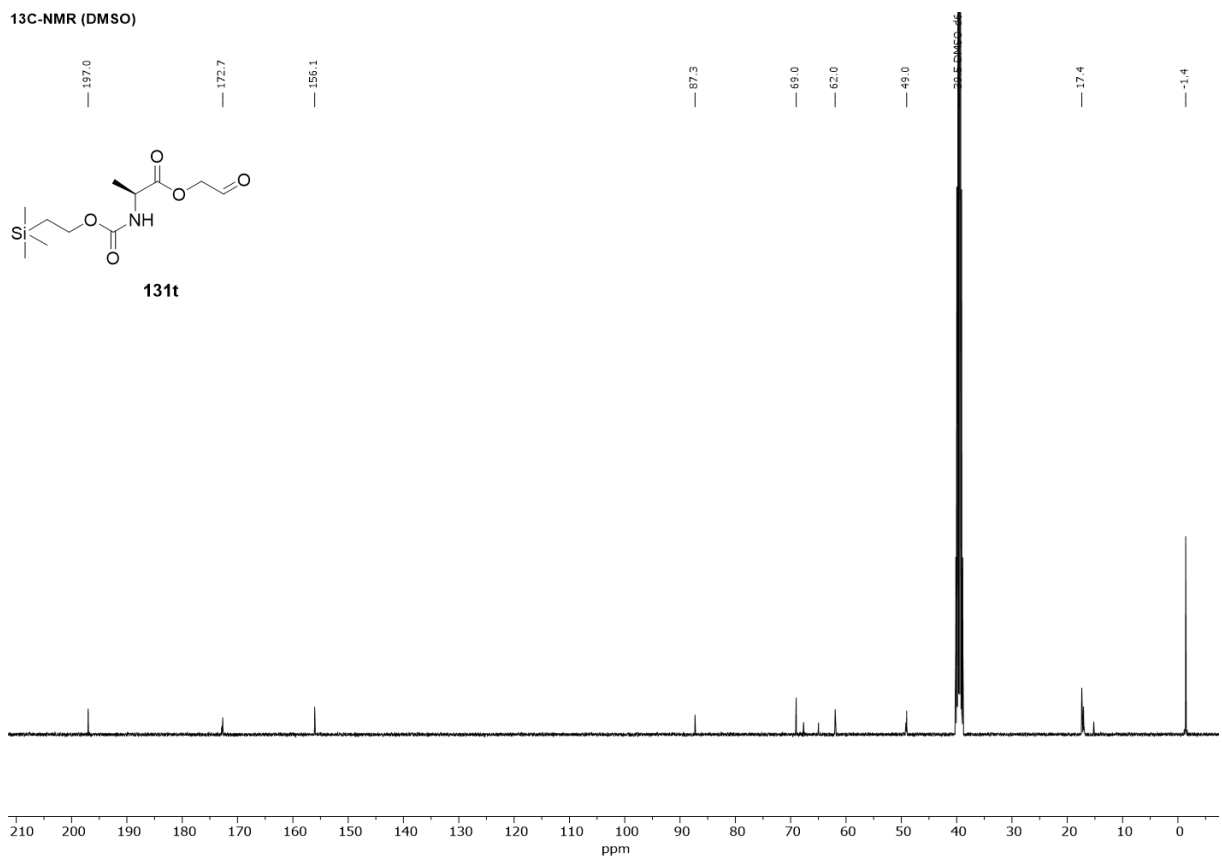
131t



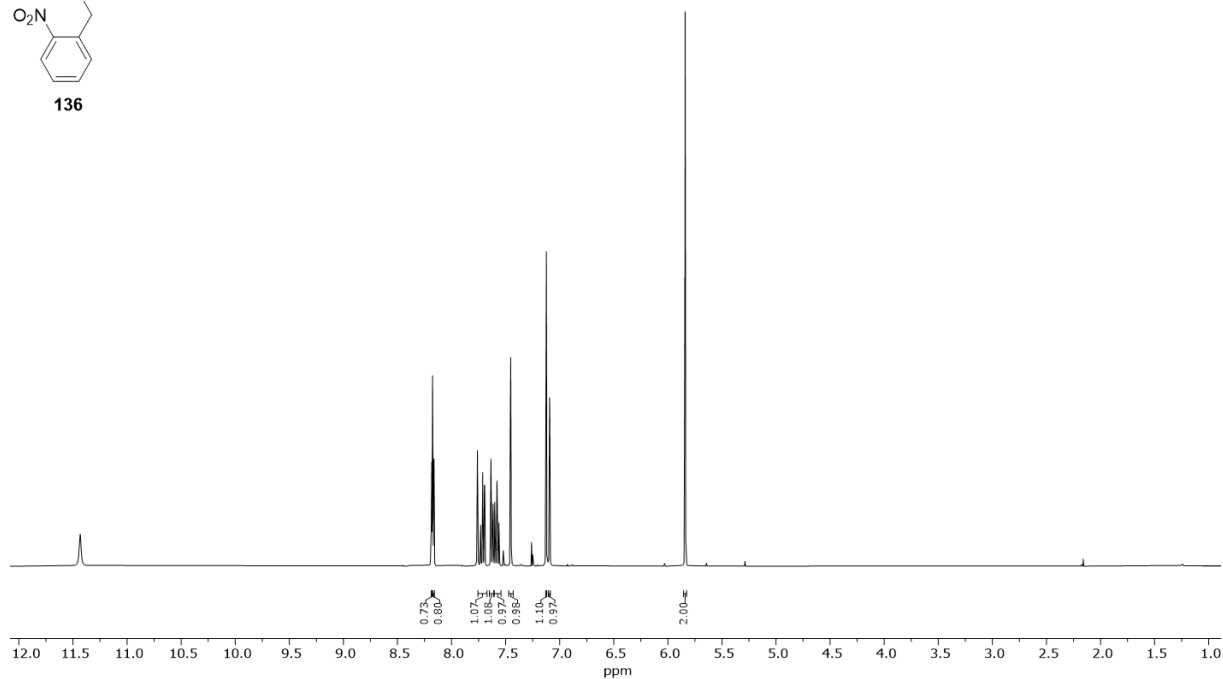
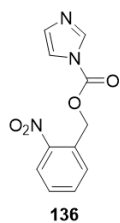
¹³C-NMR (DMSO)



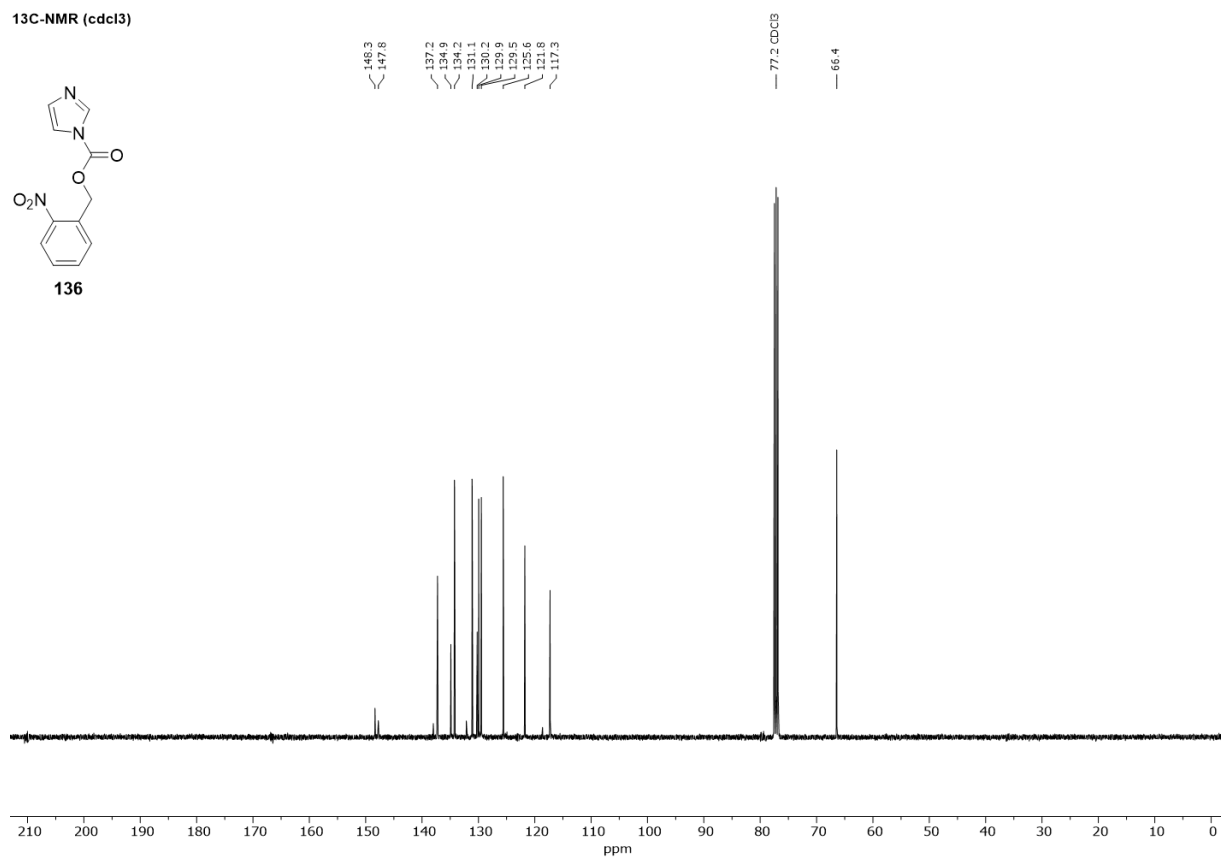
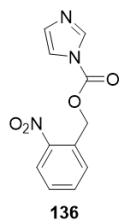
131t

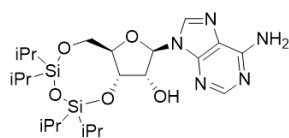
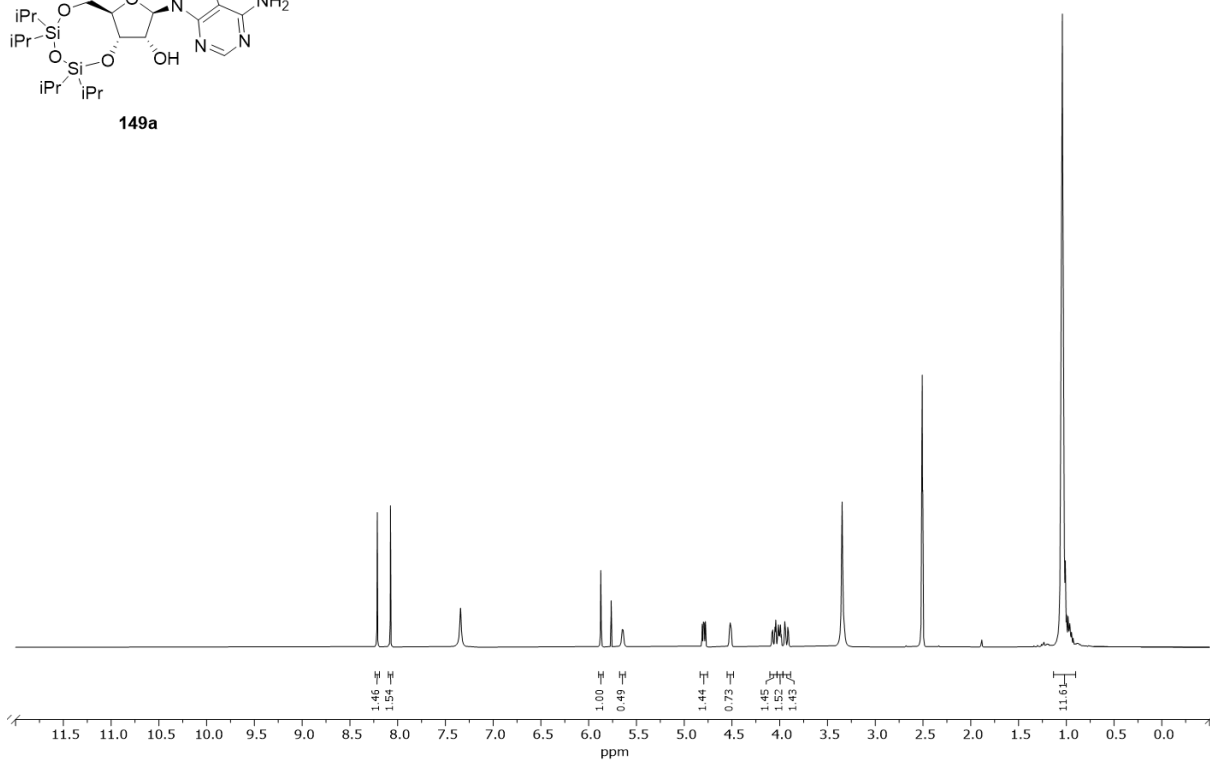
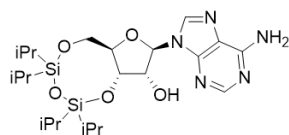
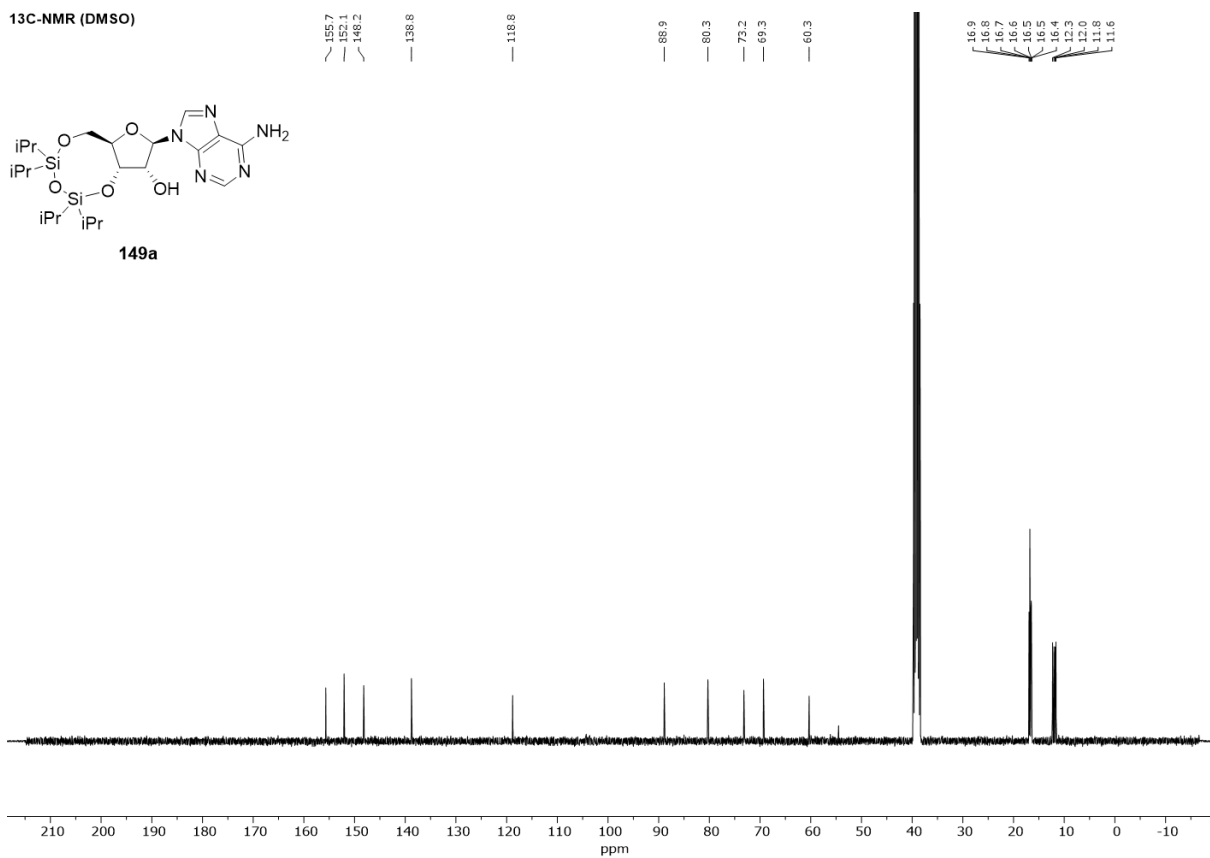


¹H-NMR (cdcl₃)

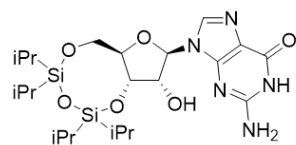


¹³C-NMR (cdcl₃)

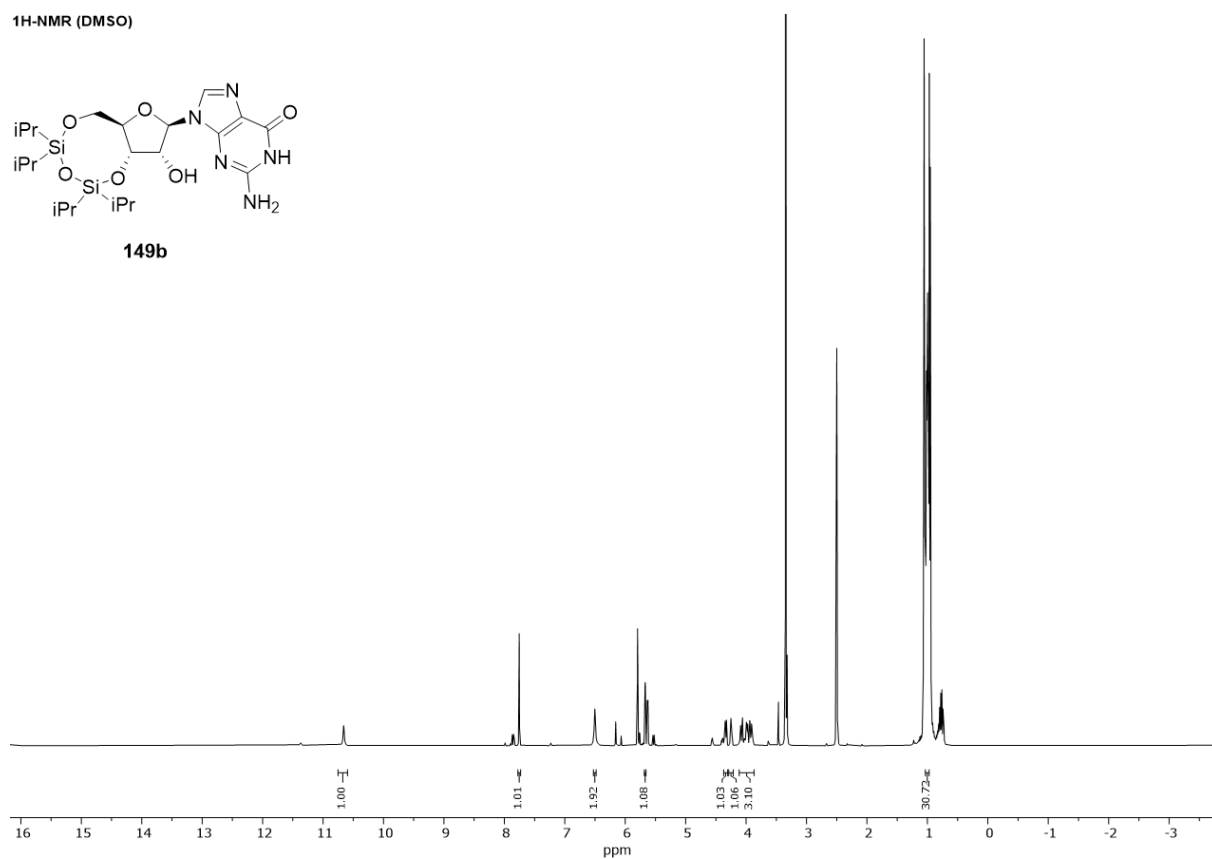


¹H-NMR (DMSO)**149a****¹³C-NMR (DMSO)****149a**

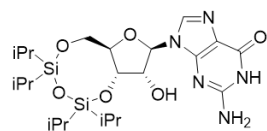
¹H-NMR (DMSO)



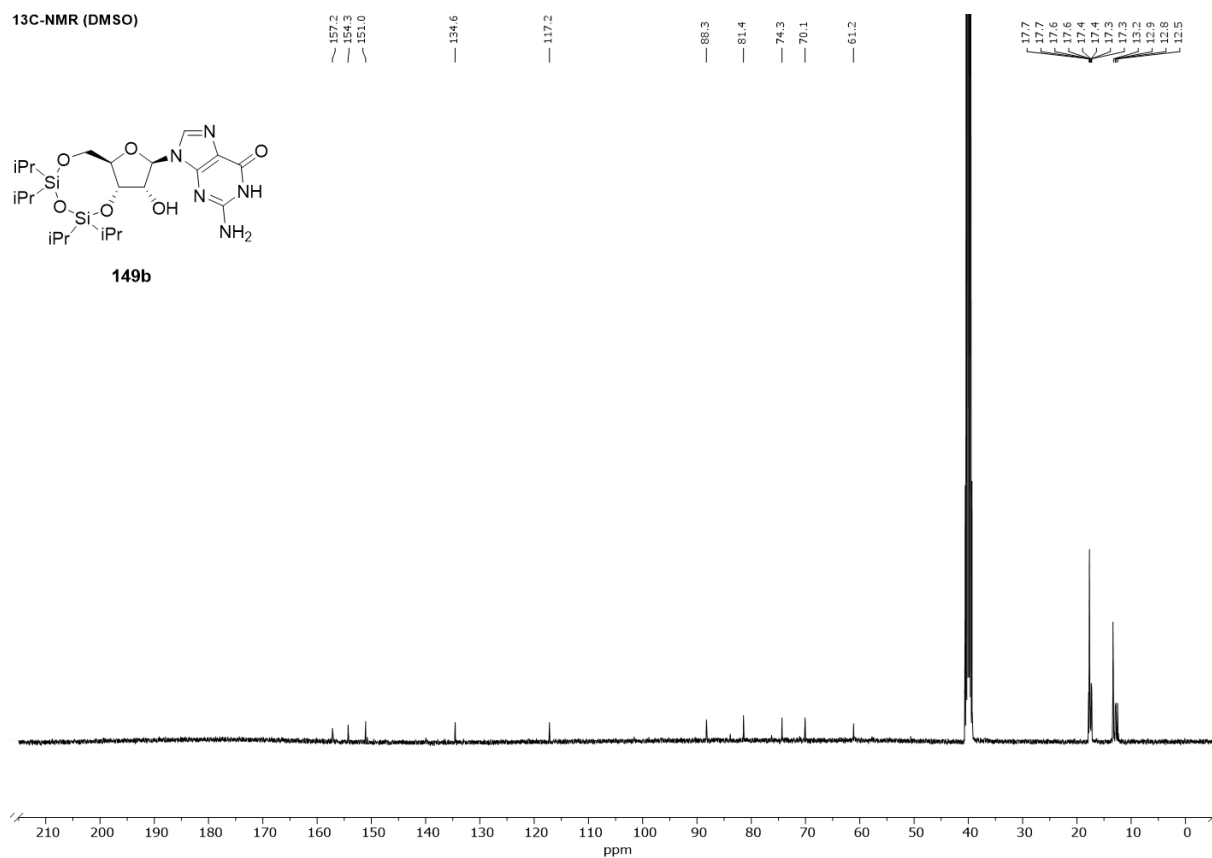
149b

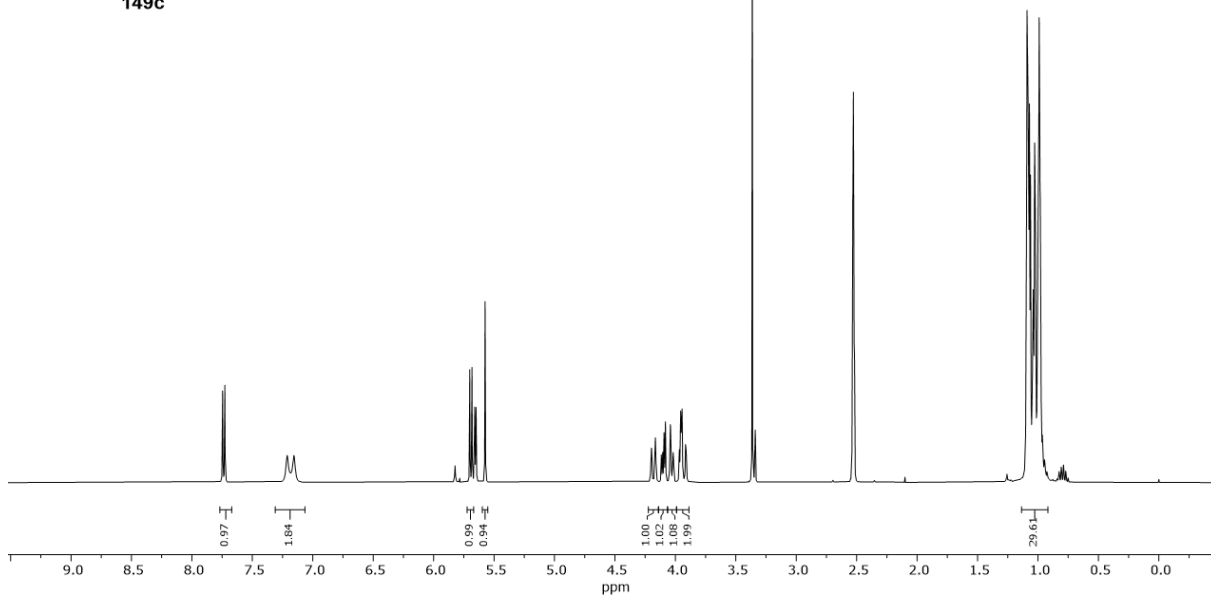
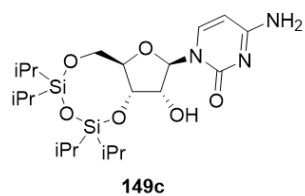
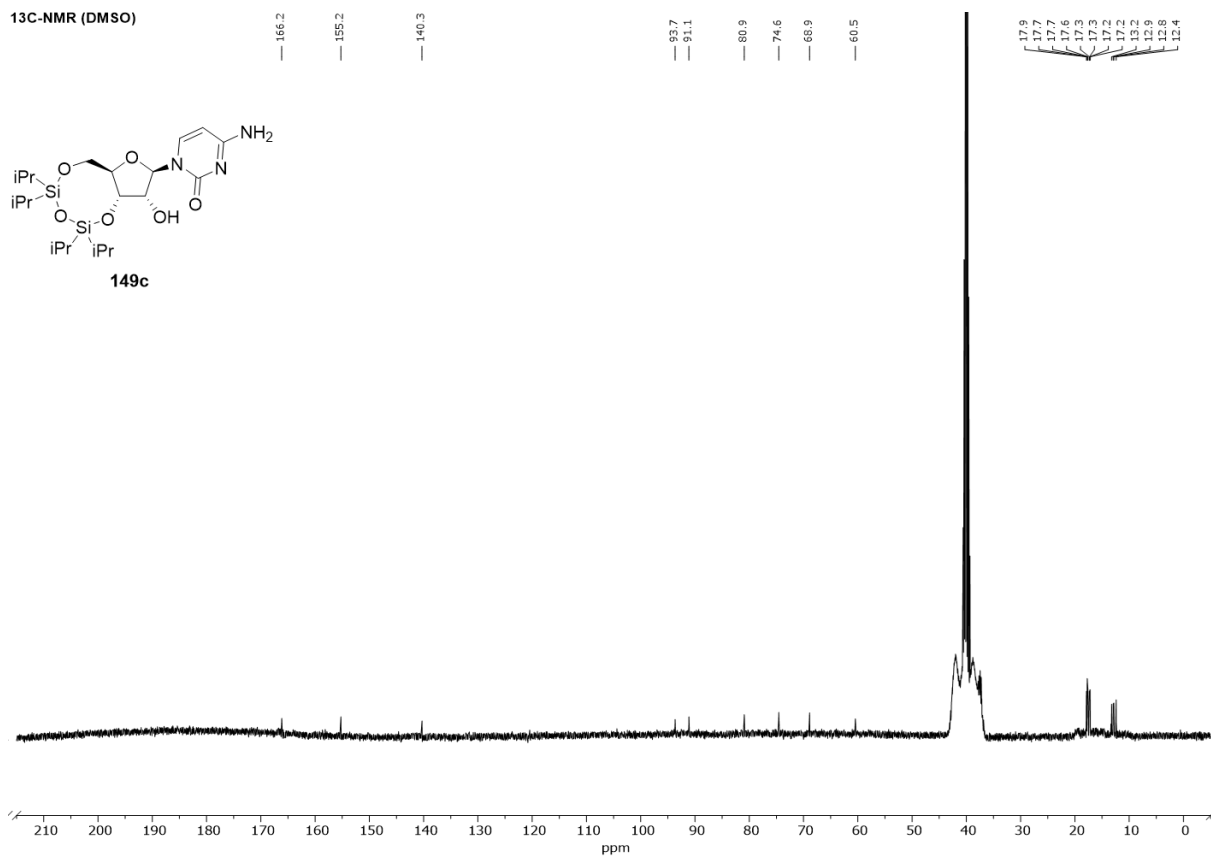
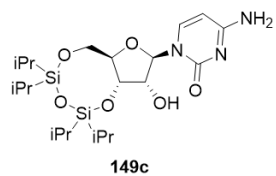


¹³C-NMR (DMSO)

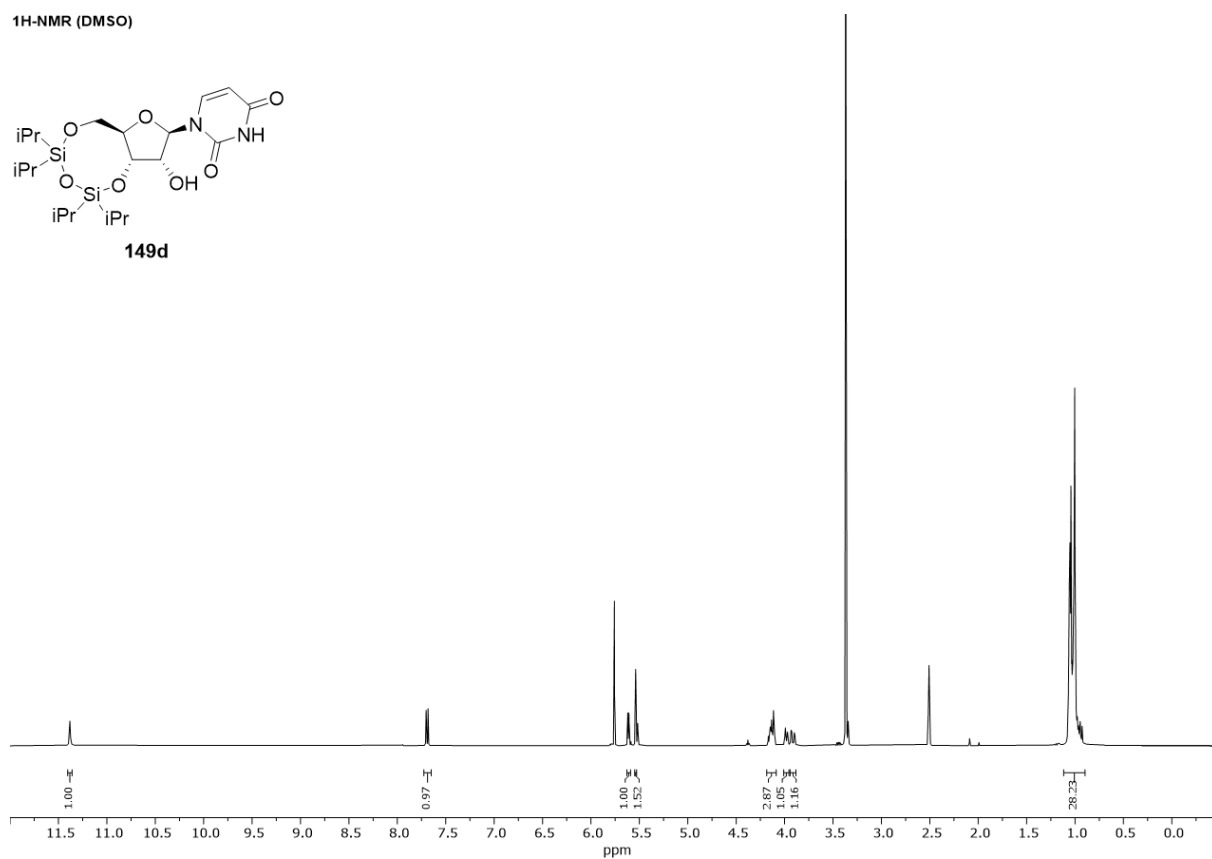
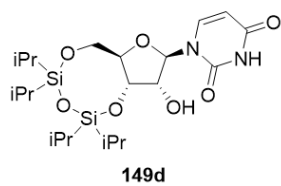


149b

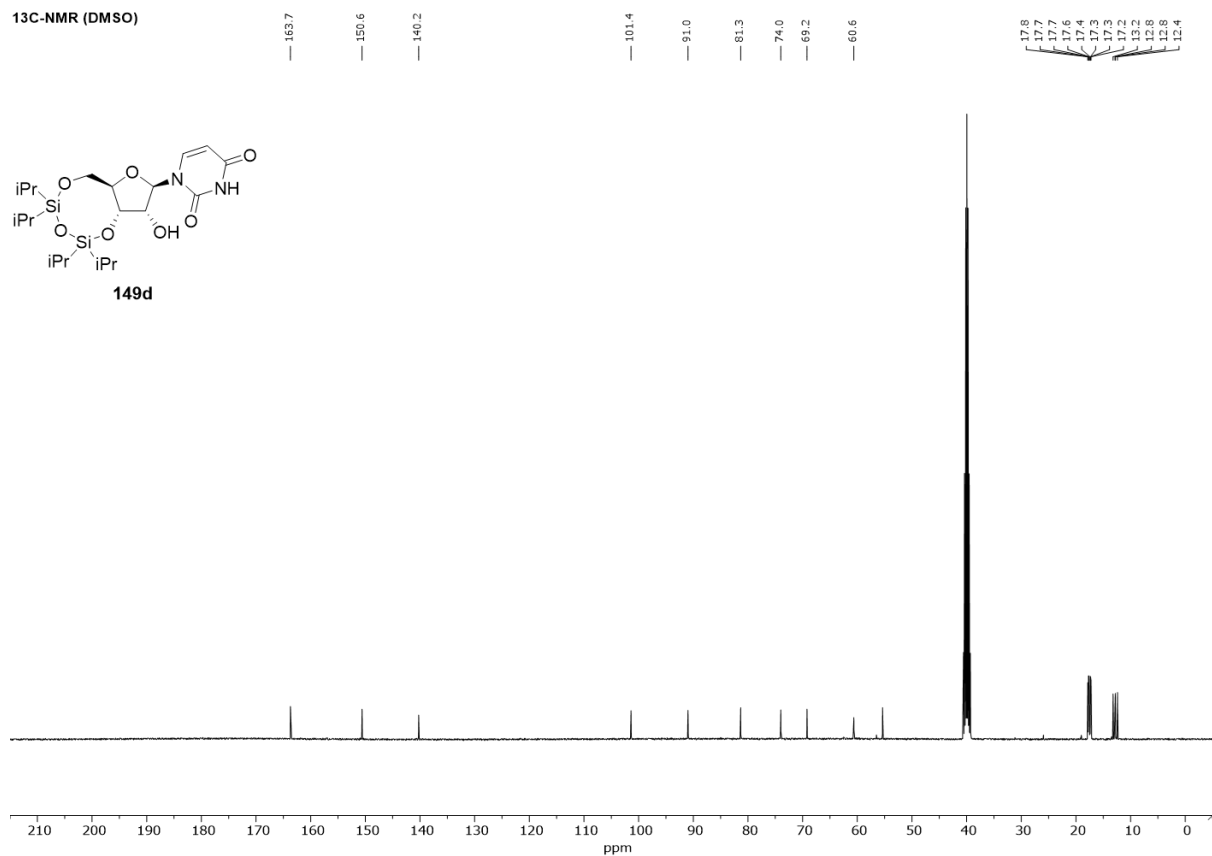
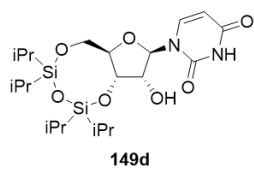


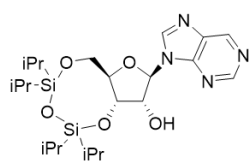
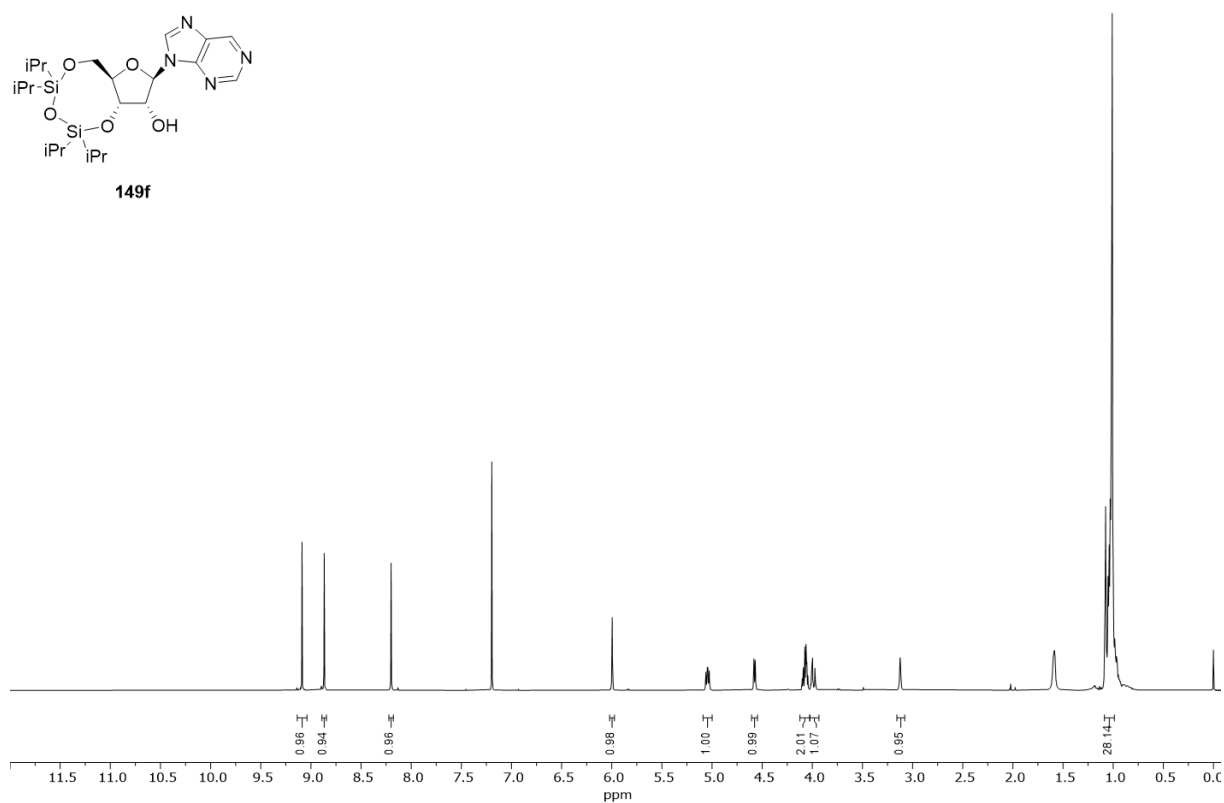
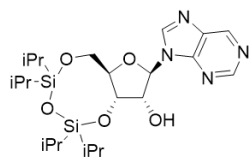
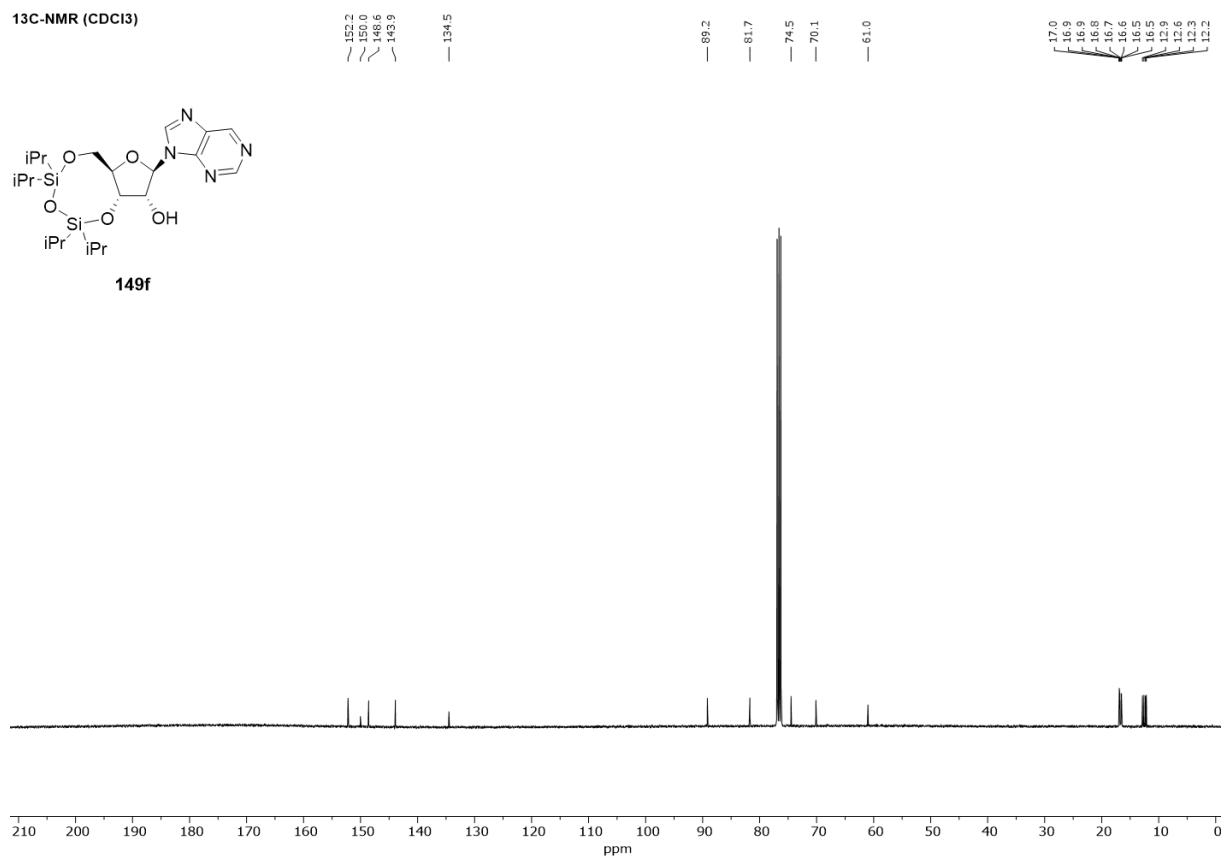
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

¹H-NMR (DMSO)

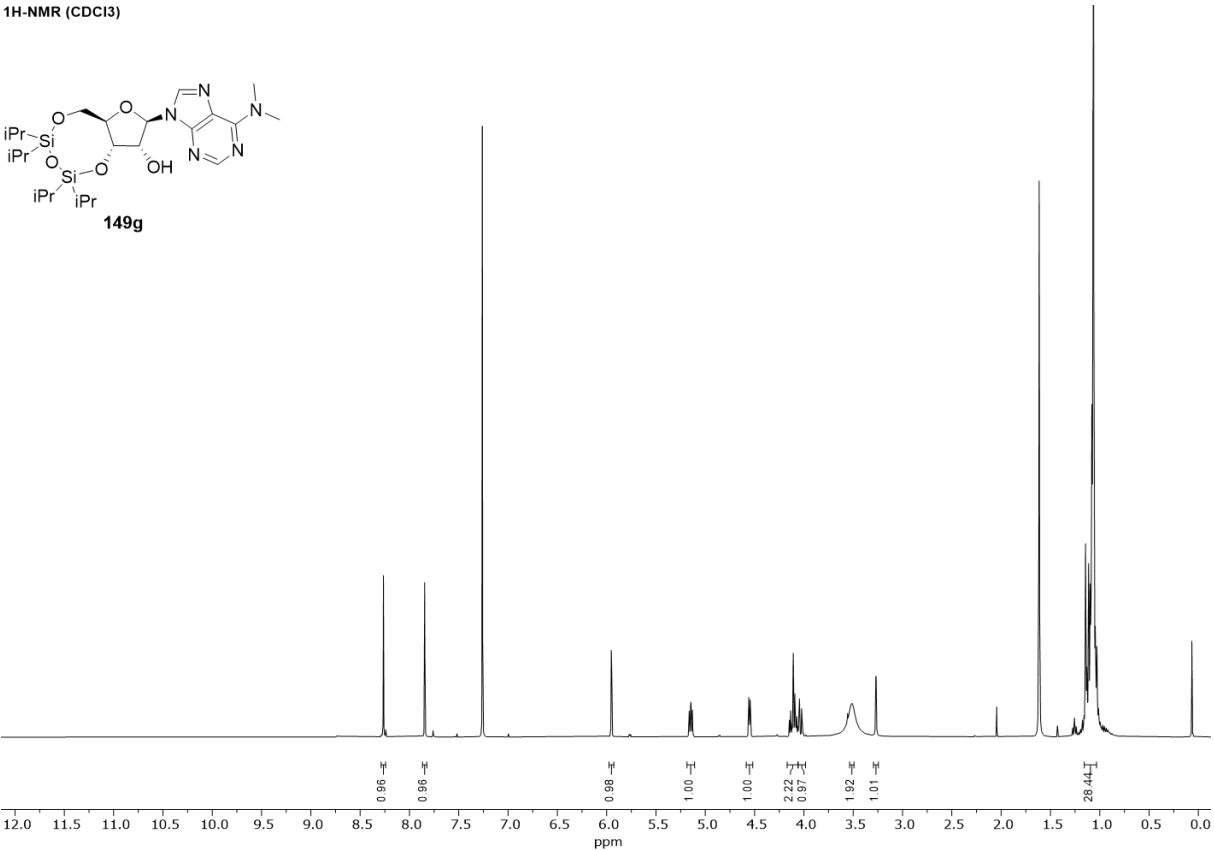


¹³C-NMR (DMSO)

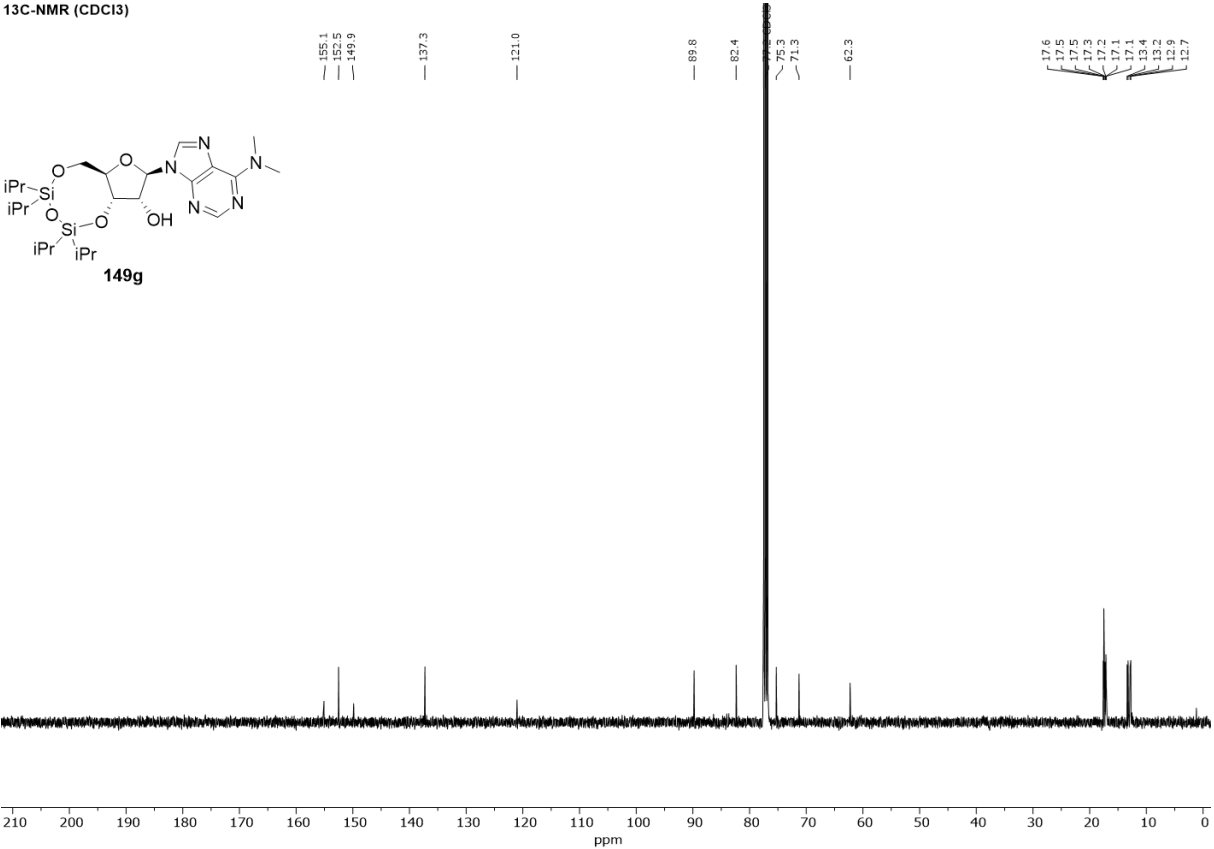


¹H-NMR (CDCl₃)**149f****¹³C-NMR (CDCl₃)****149f**

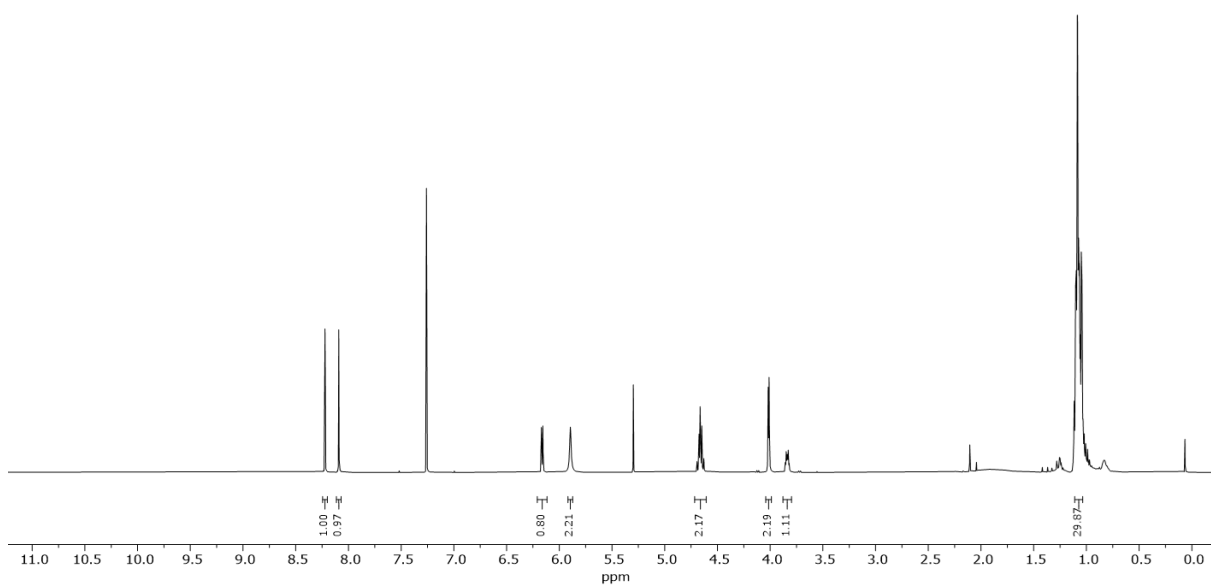
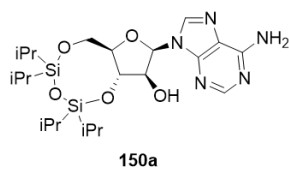
¹H-NMR (CDCl₃)



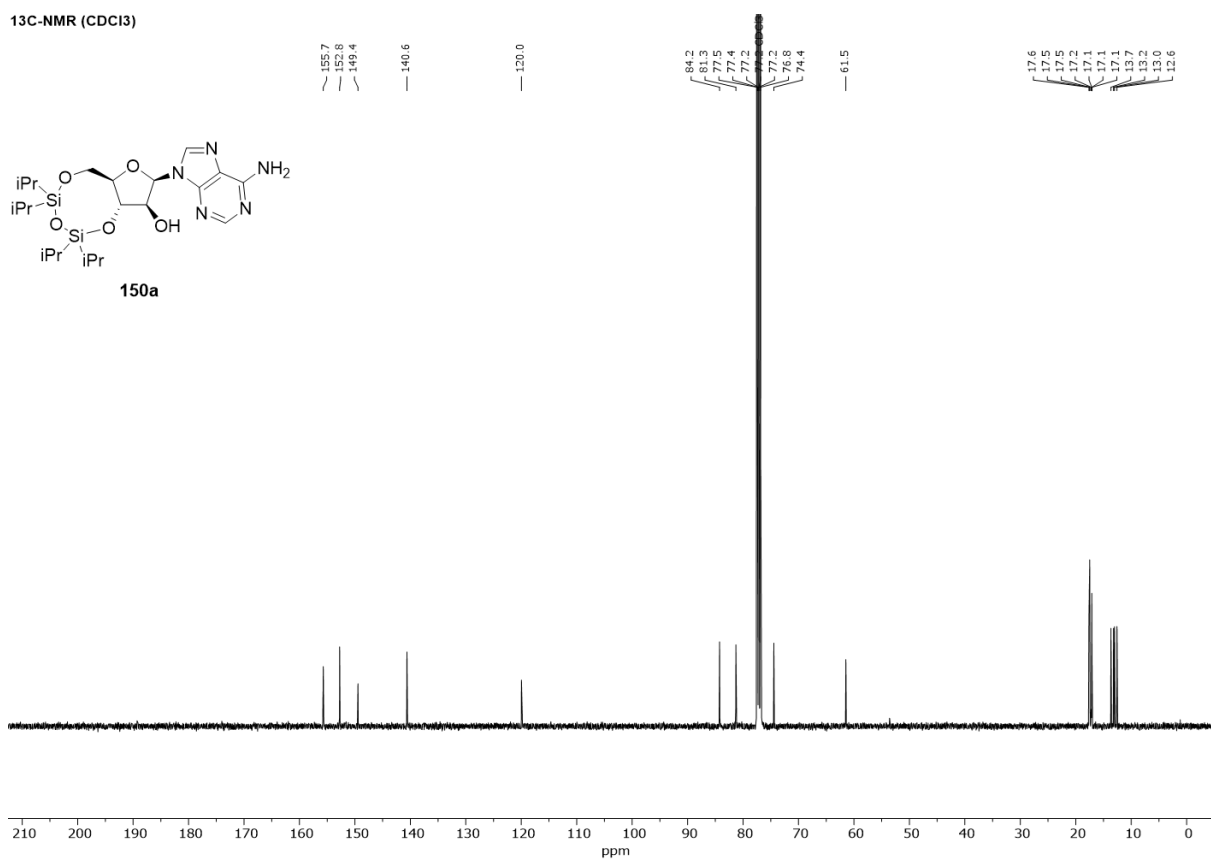
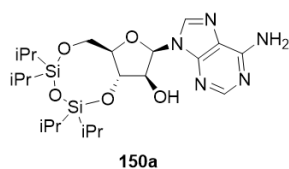
¹³C-NMR (CDCl₃)

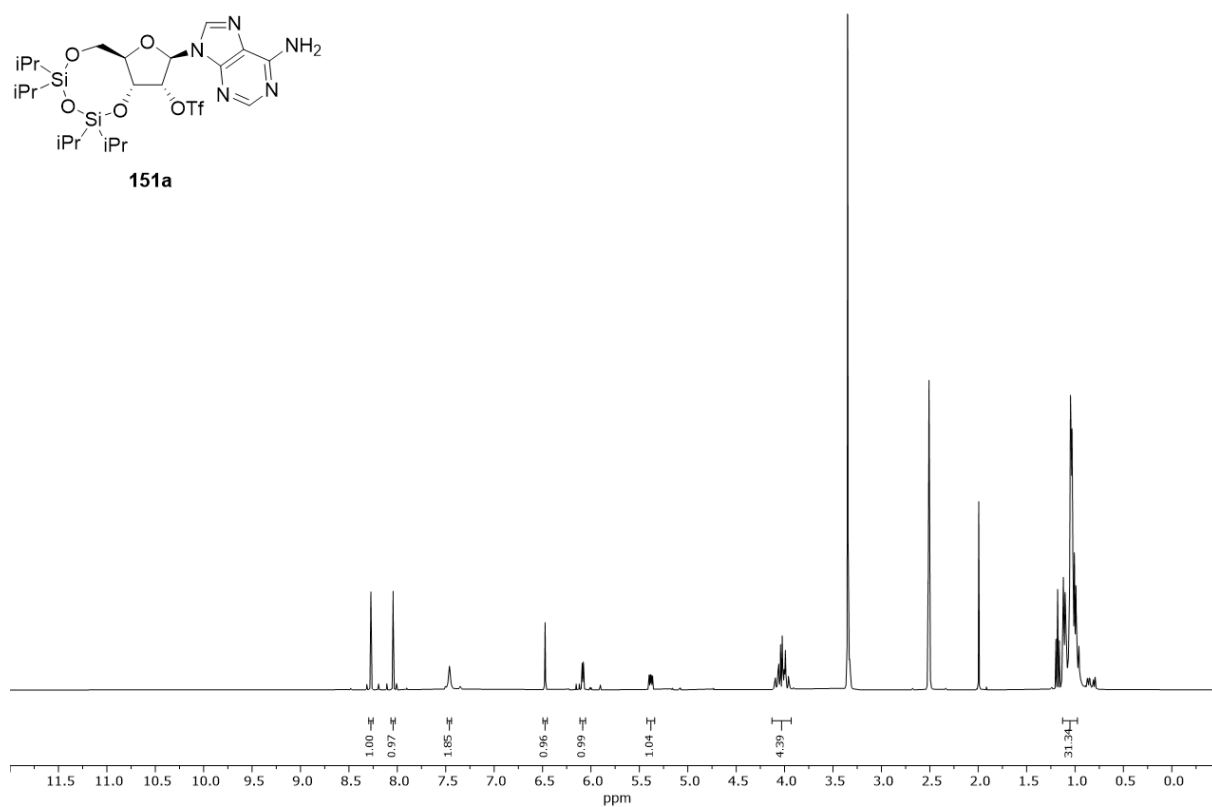
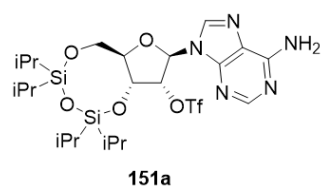
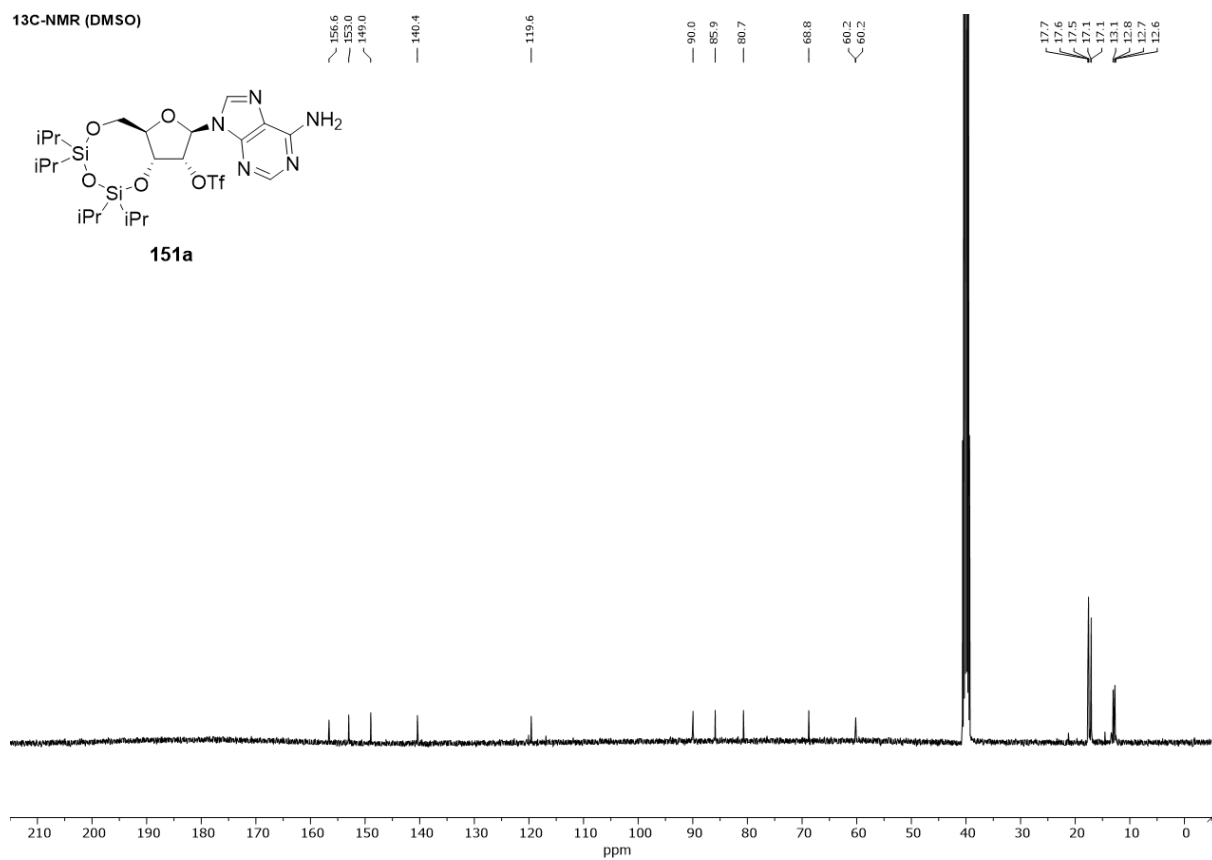
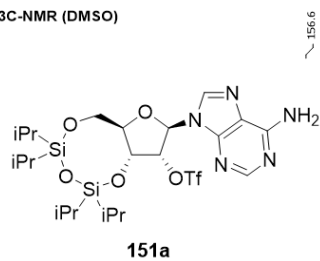


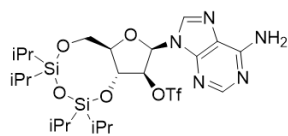
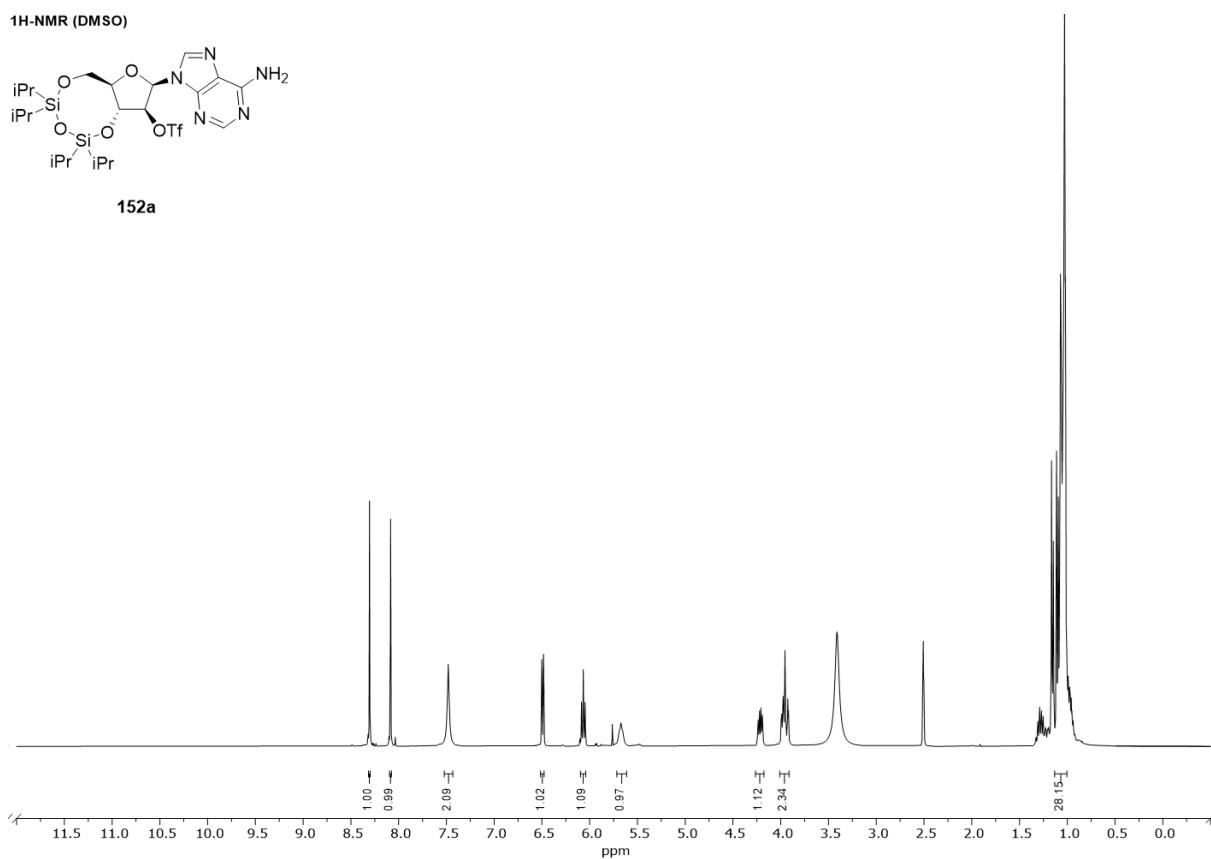
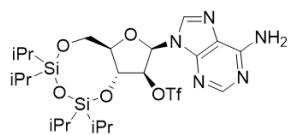
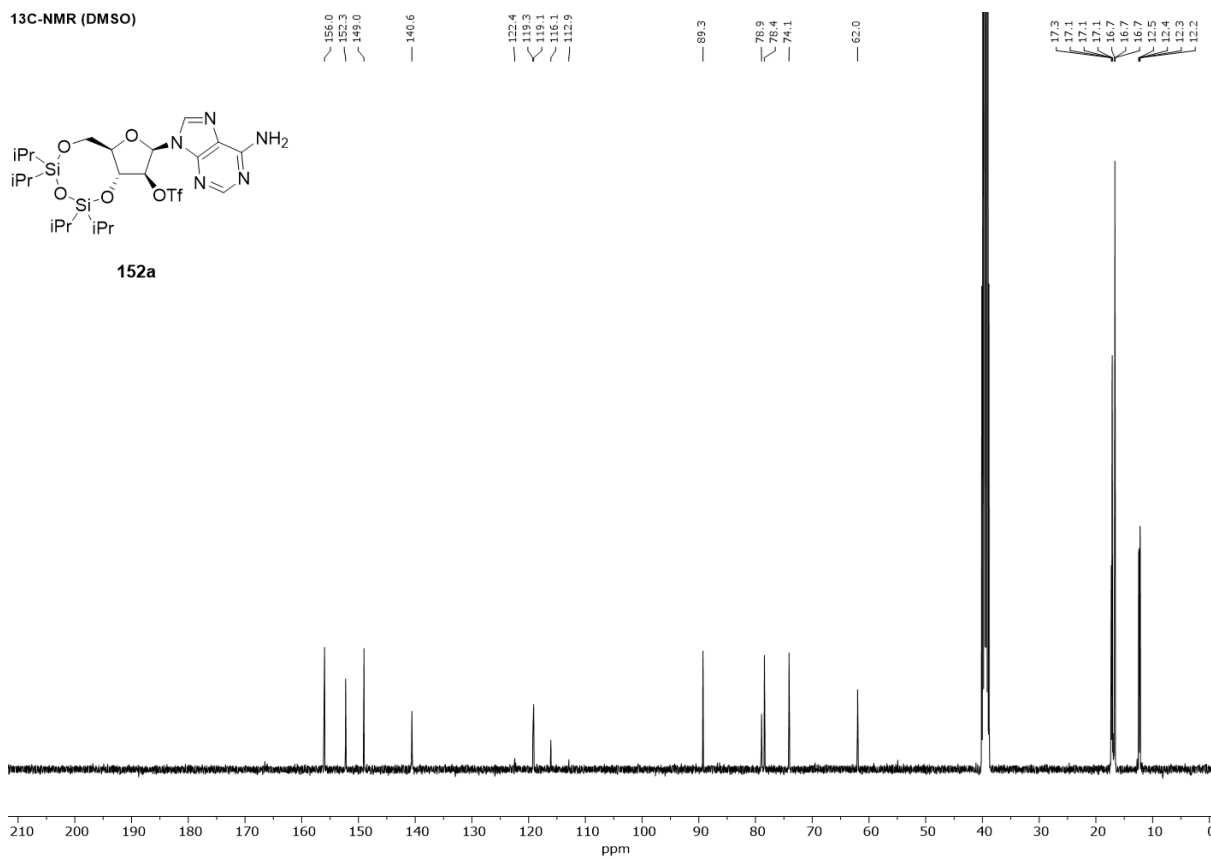
¹H-NMR (CDCl₃)



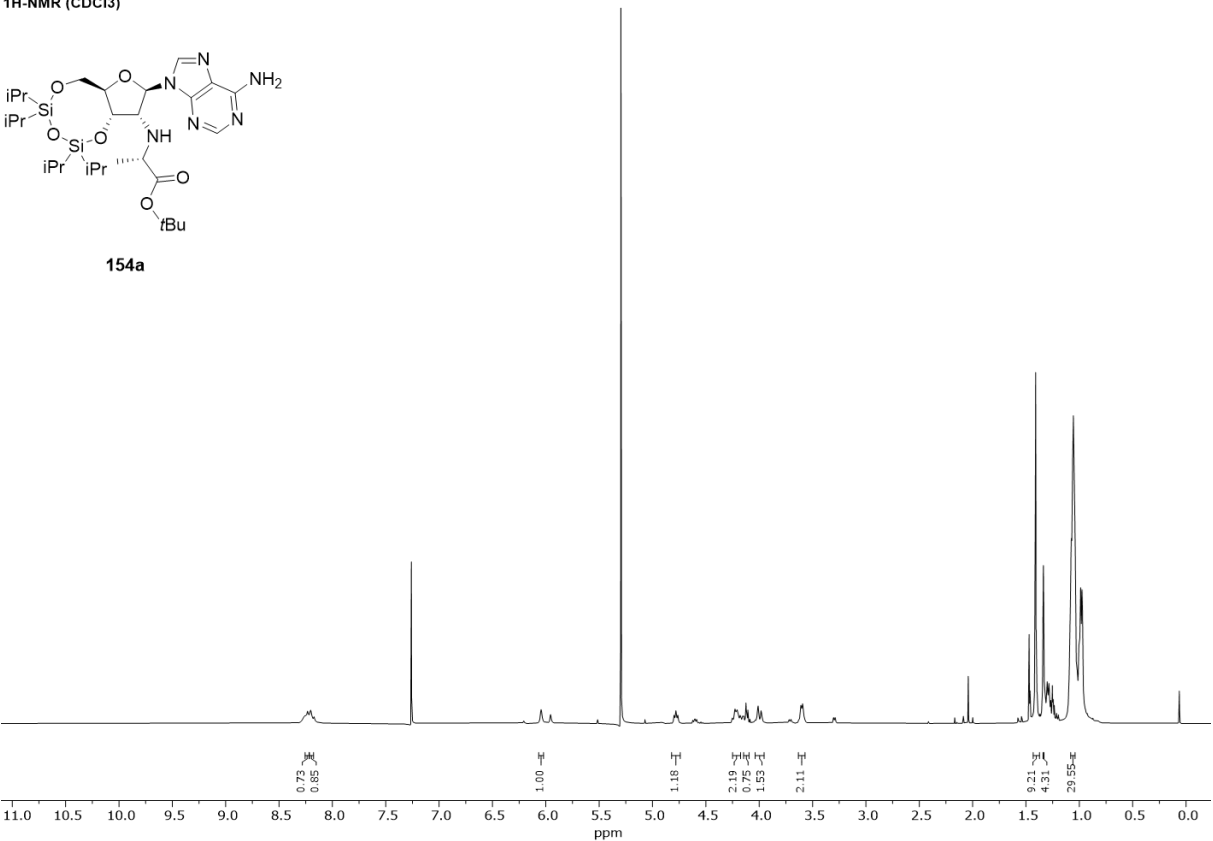
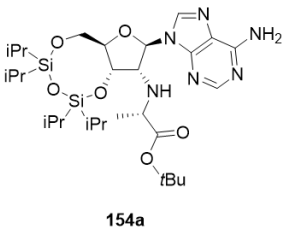
¹³C-NMR (CDCl₃)



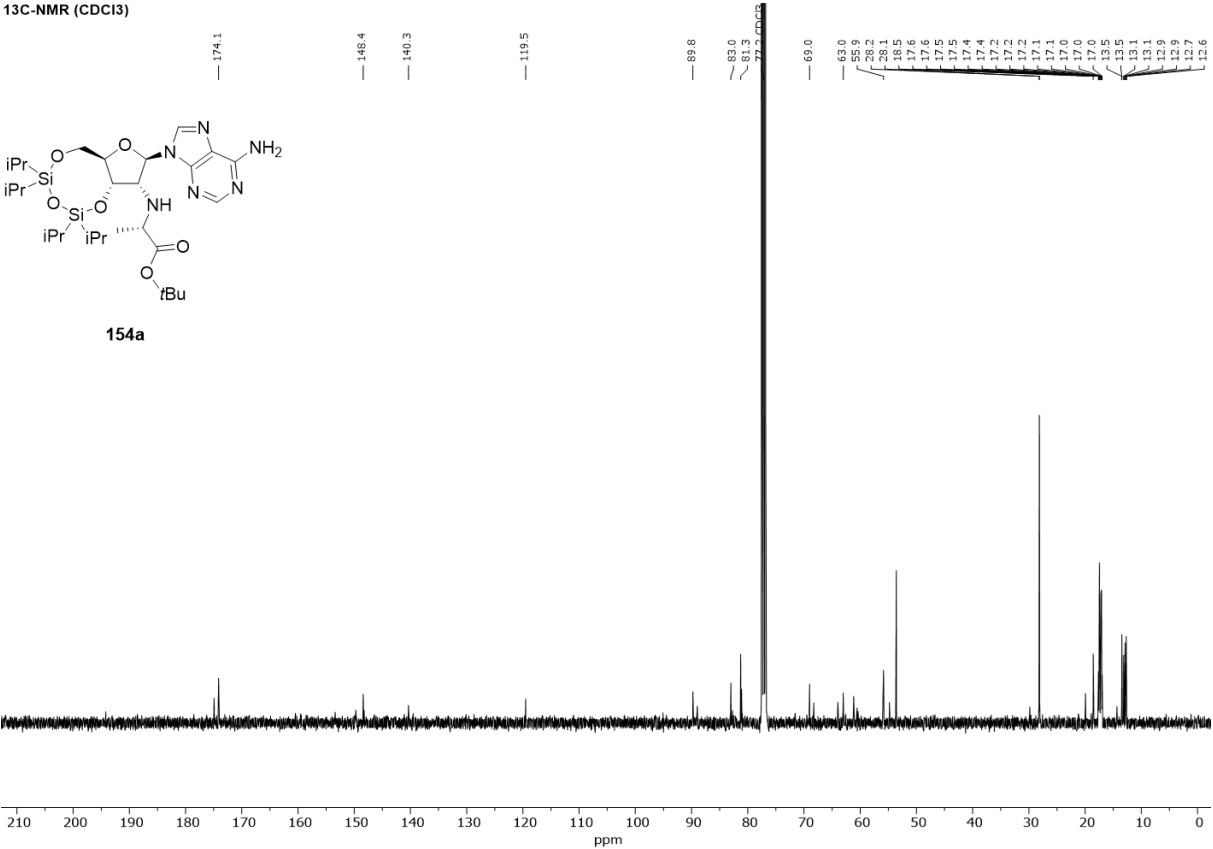
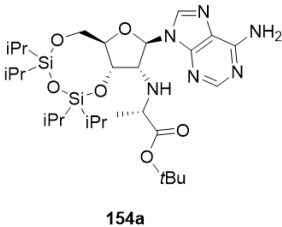
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

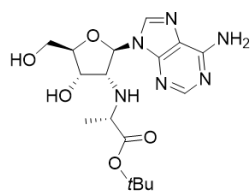
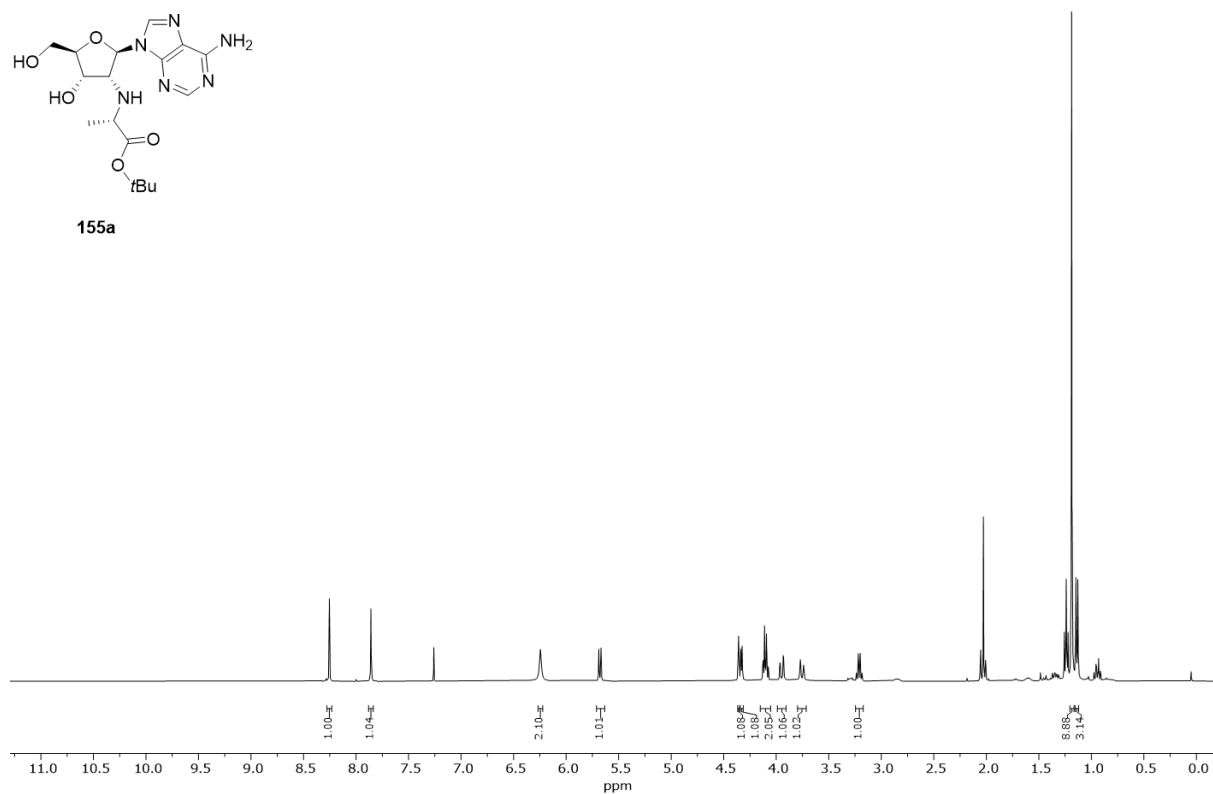
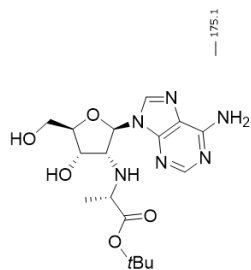
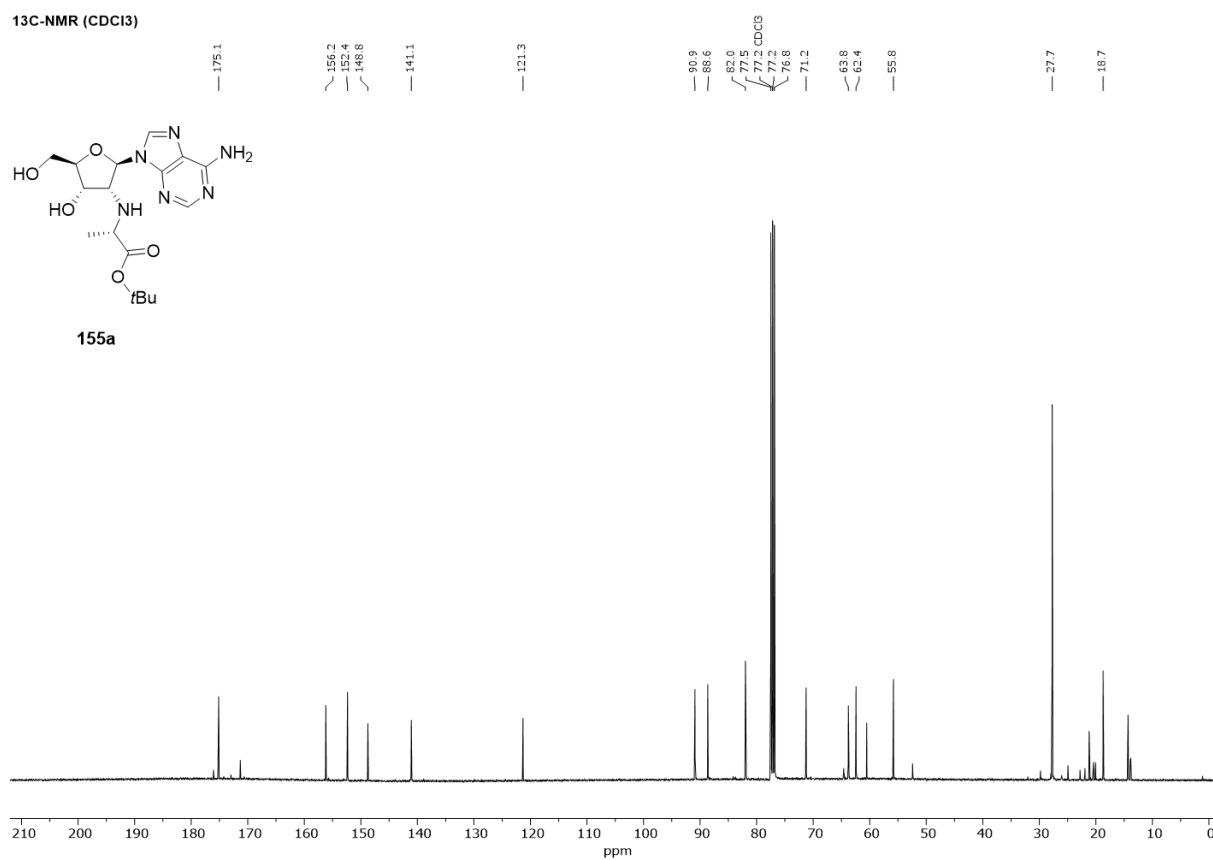
¹H-NMR (DMSO)**152a****¹³C-NMR (DMSO)****152a**

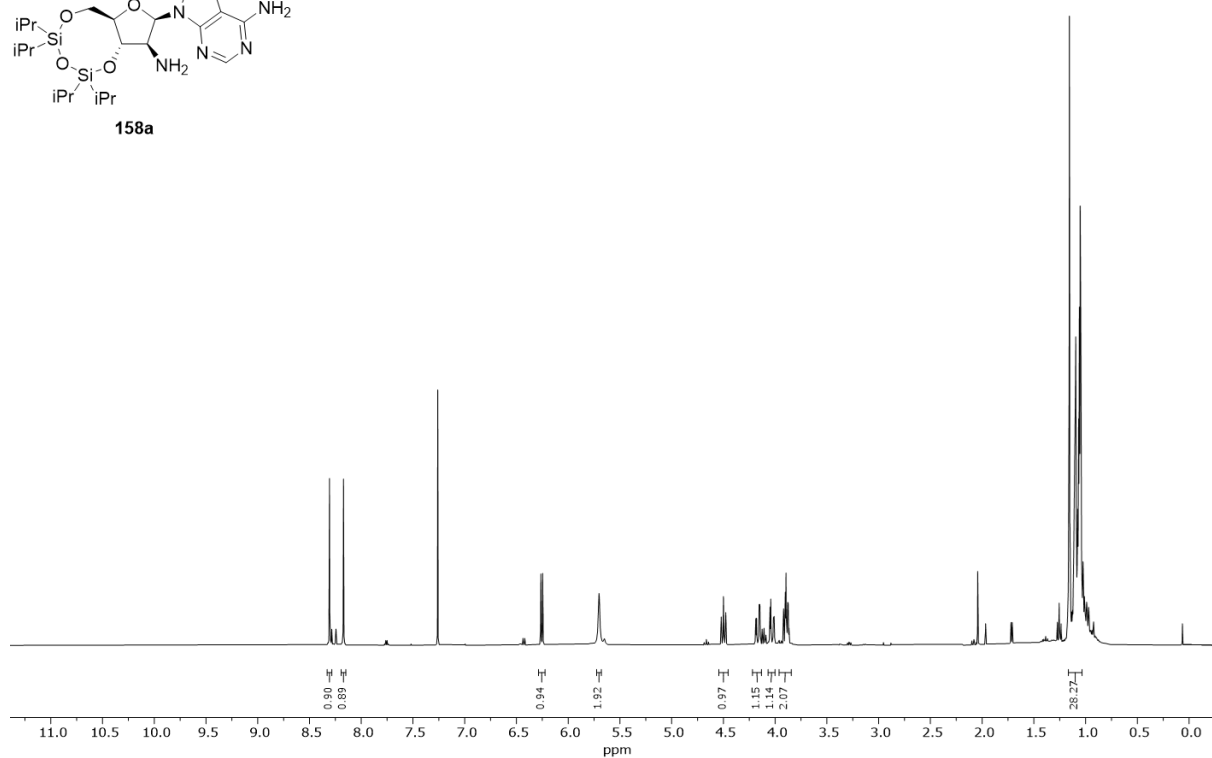
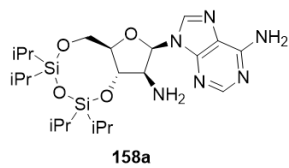
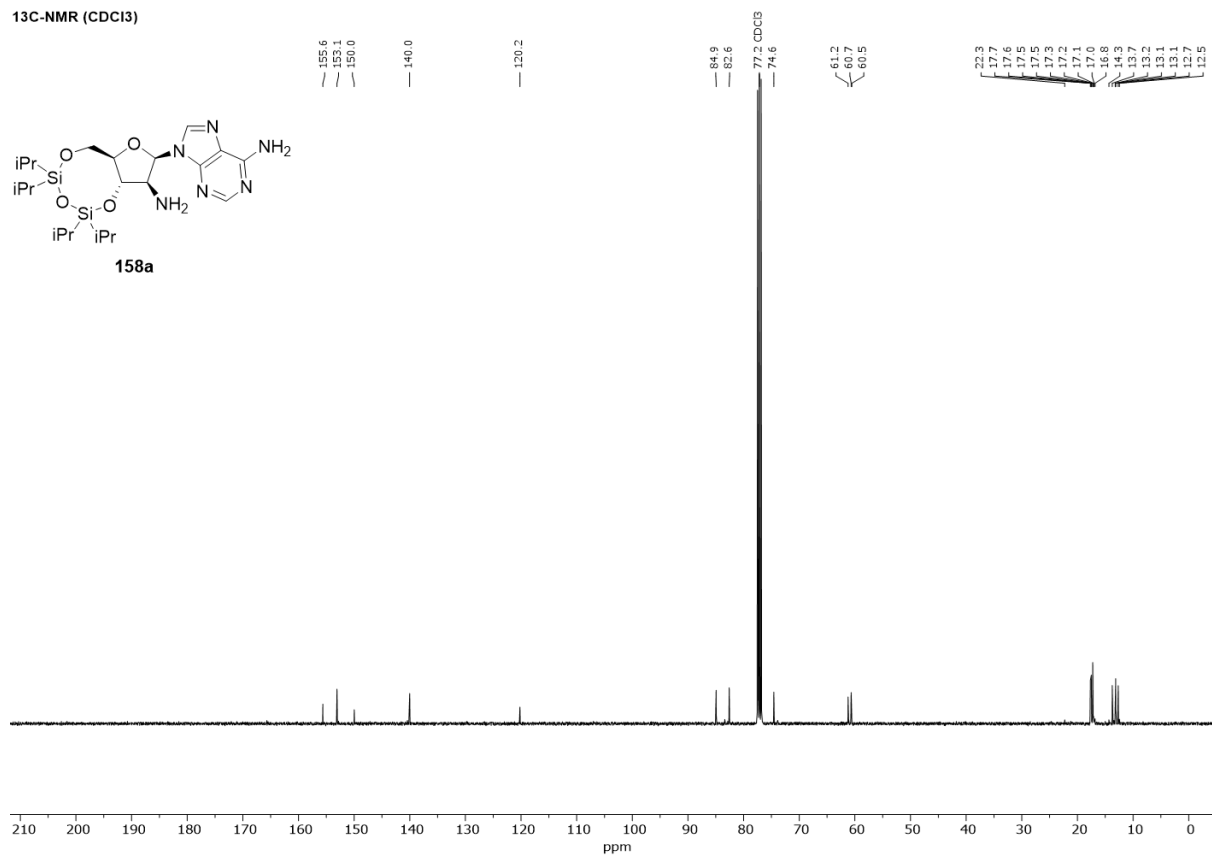
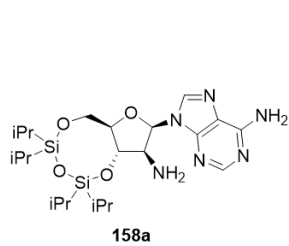
¹H-NMR (CDCl₃)



¹³C-NMR (CDCl₃)

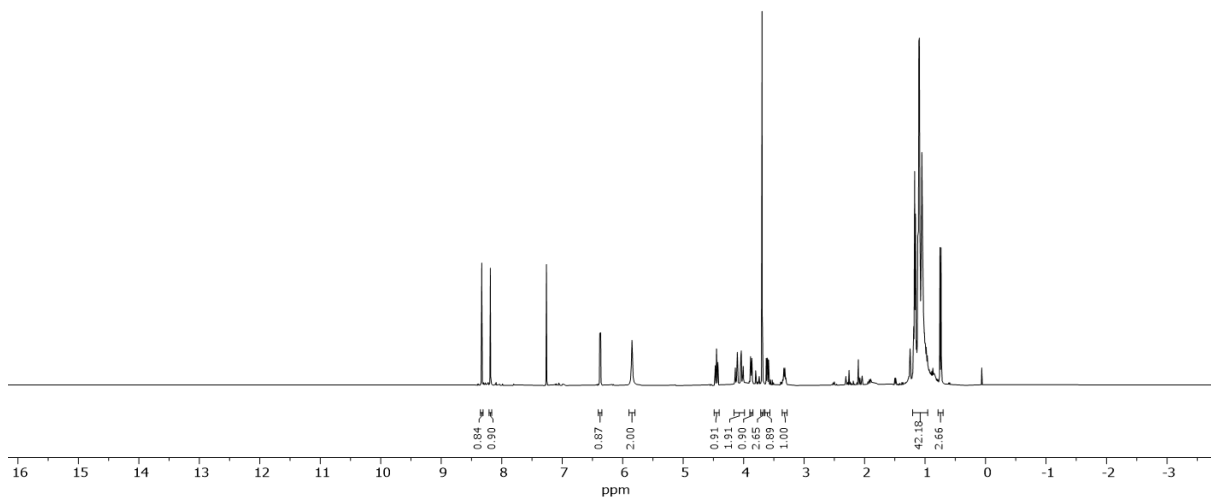
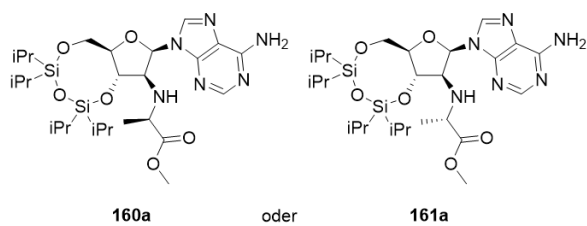


¹H-NMR (CDCl₃)**155a****¹³C-NMR (CDCl₃)****155a**

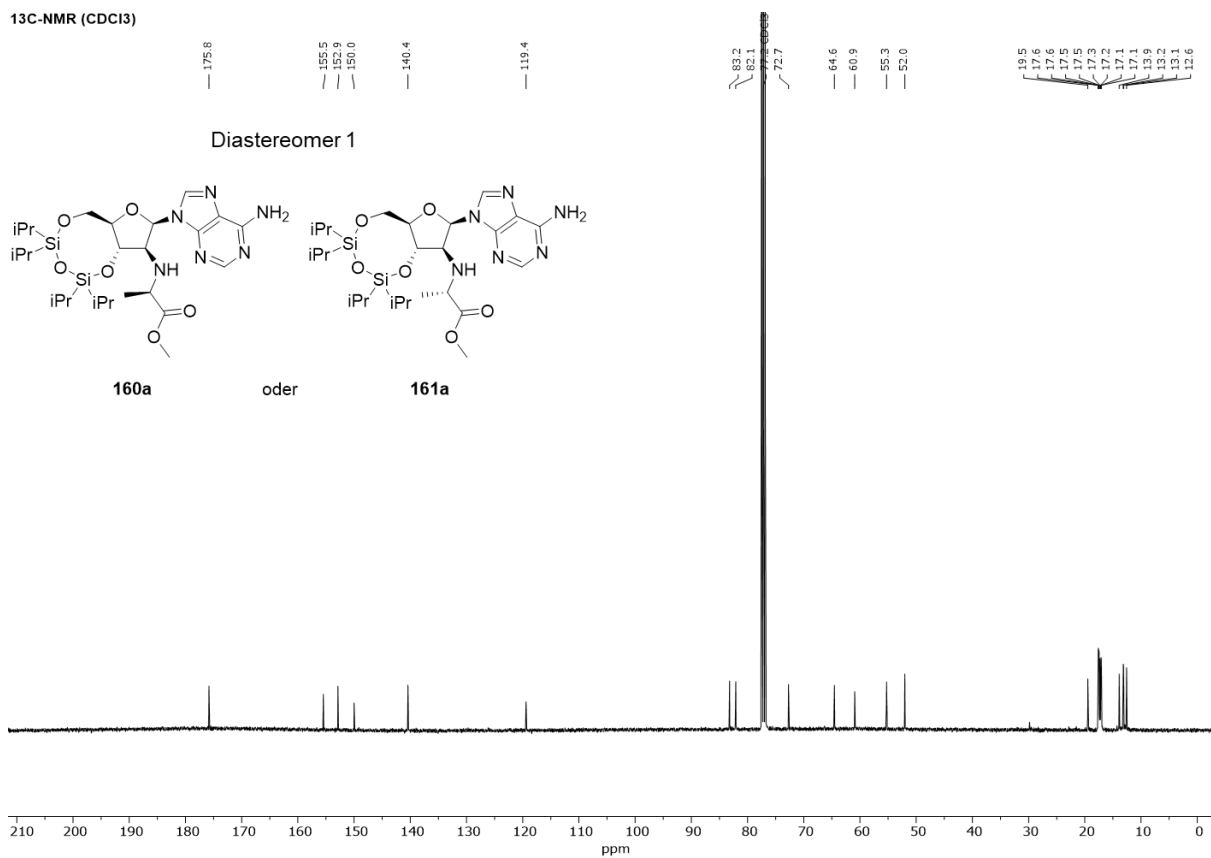
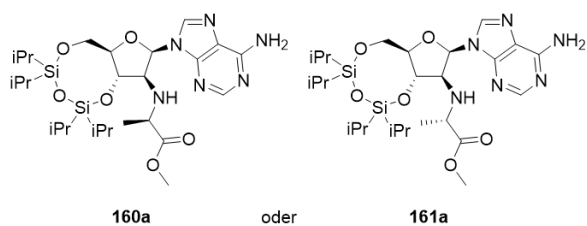
¹H-NMR (CDCl₃)¹³C-NMR (CDCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃)

Diastereomer 1

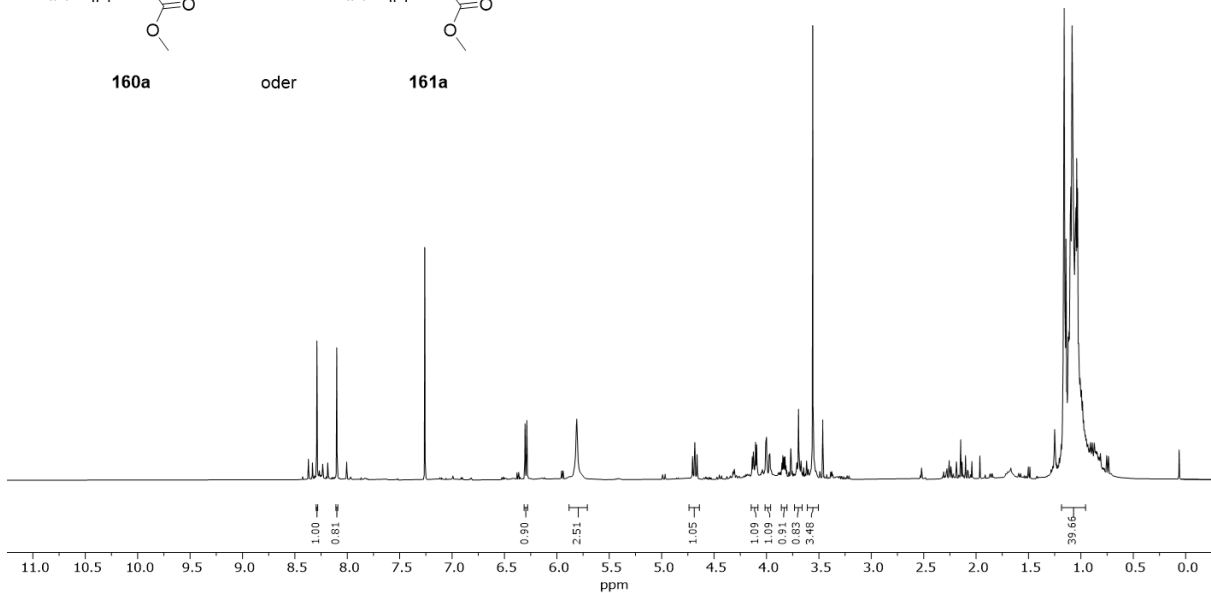
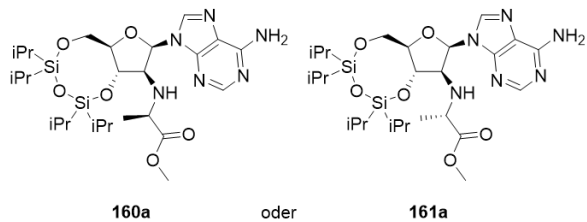
¹³C-NMR (CDCl₃)

Diastereomer 1



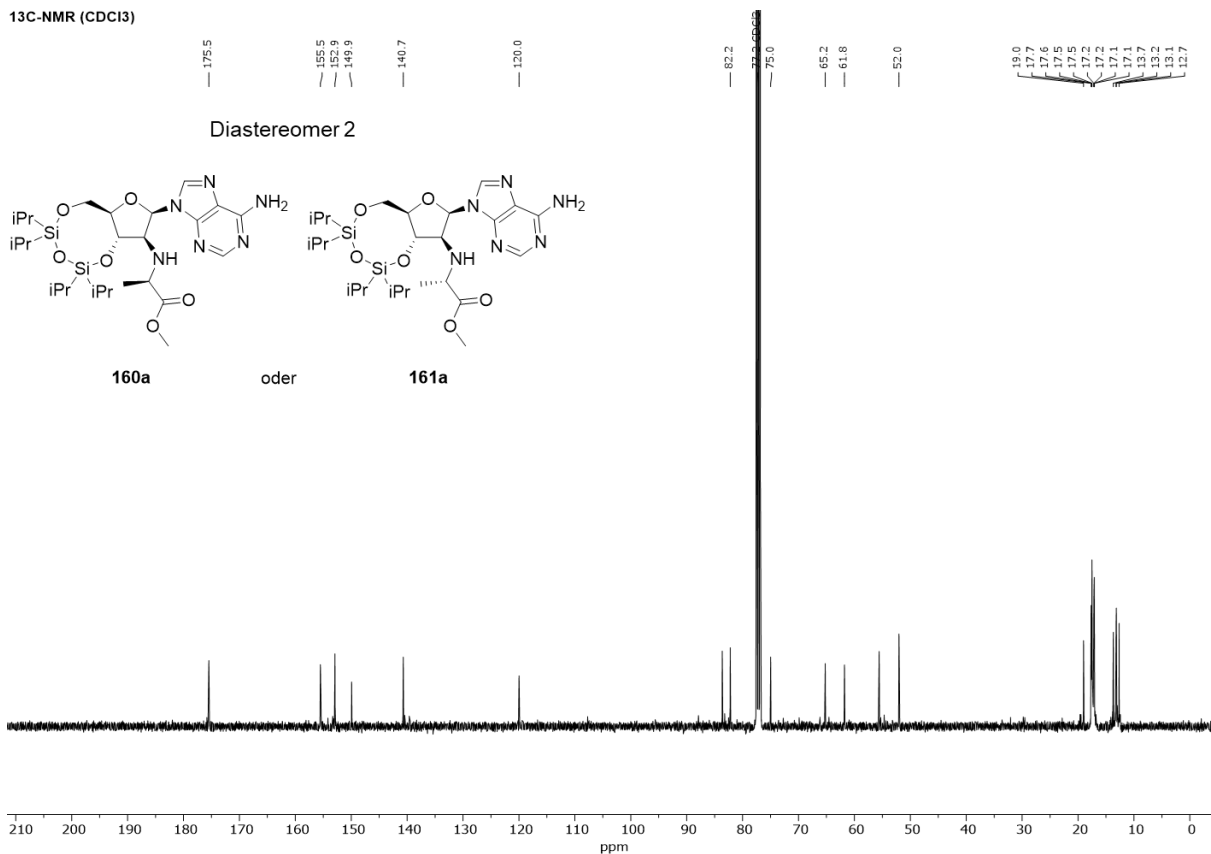
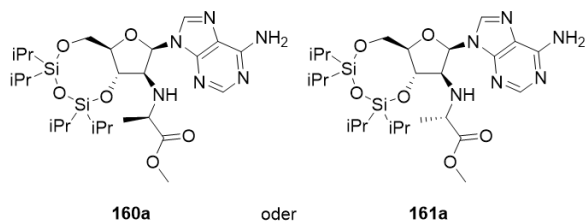
¹H-NMR (CDCl₃)

Diastereomer 2

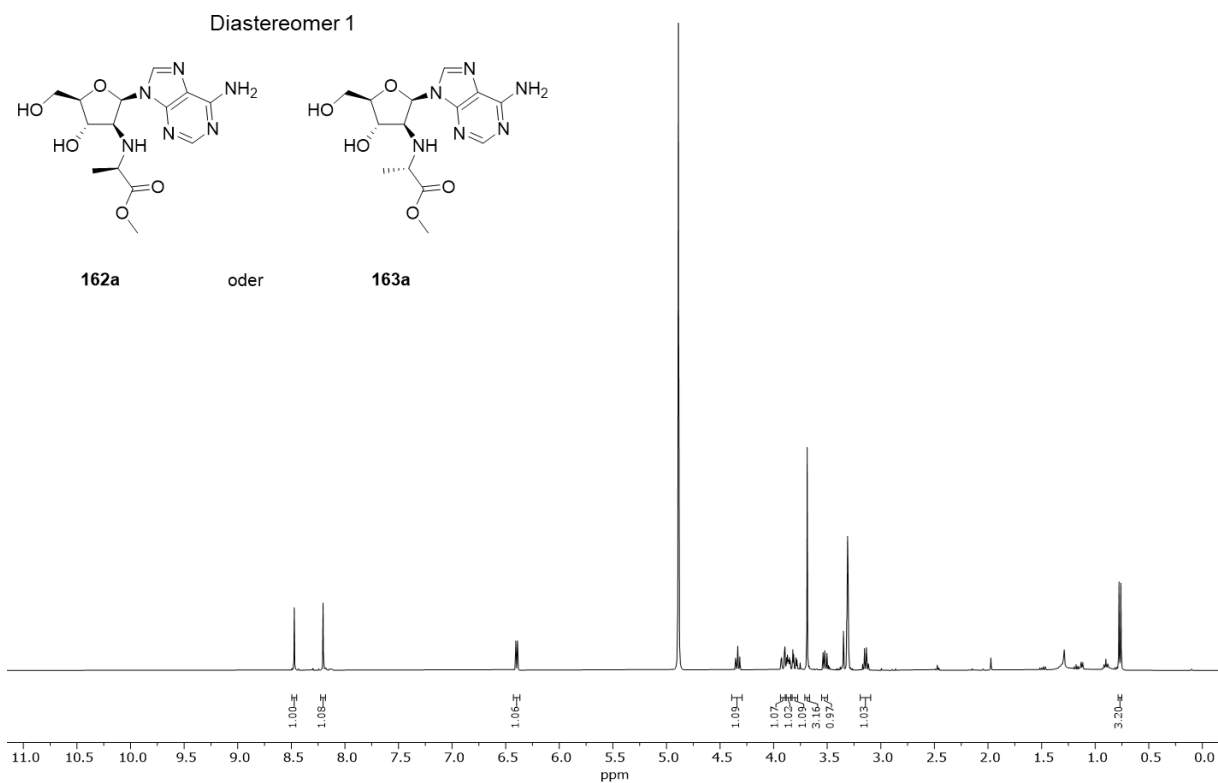


¹³C-NMR (CDCl₃)

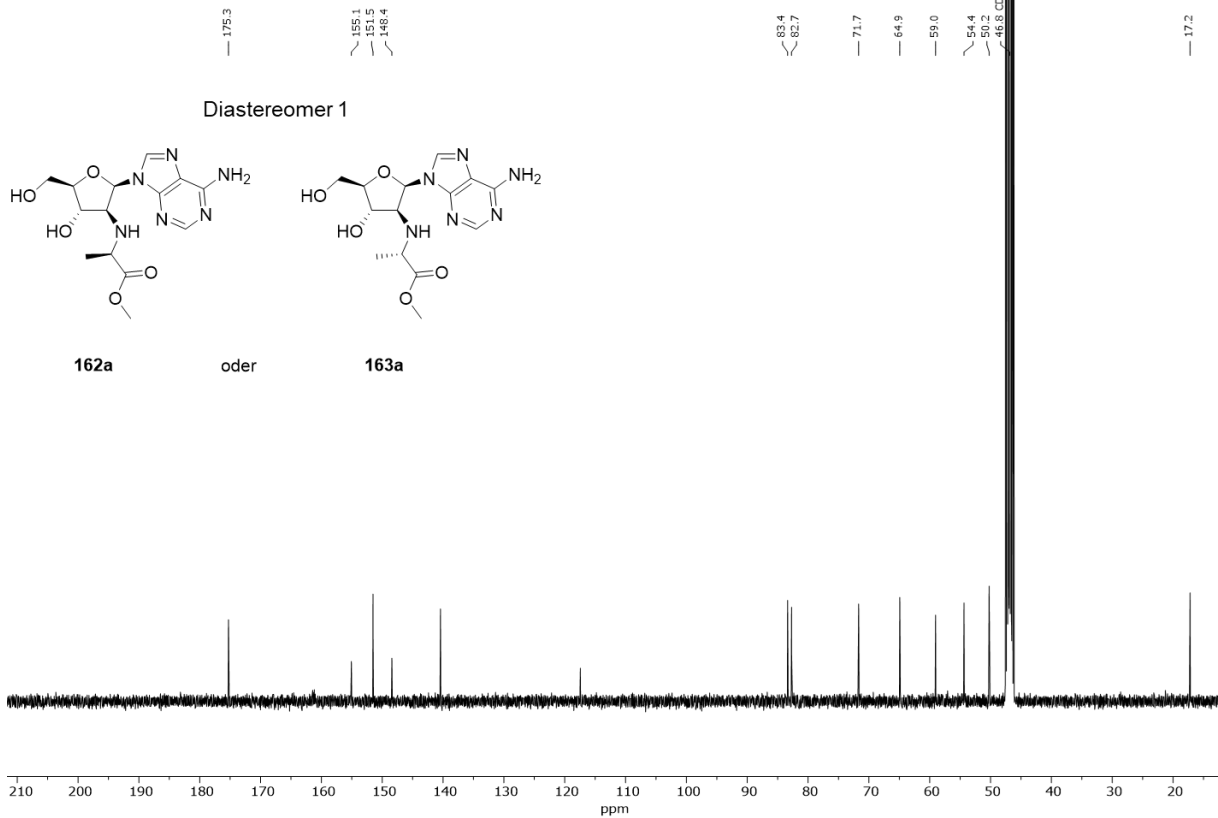
Diastereomer 2



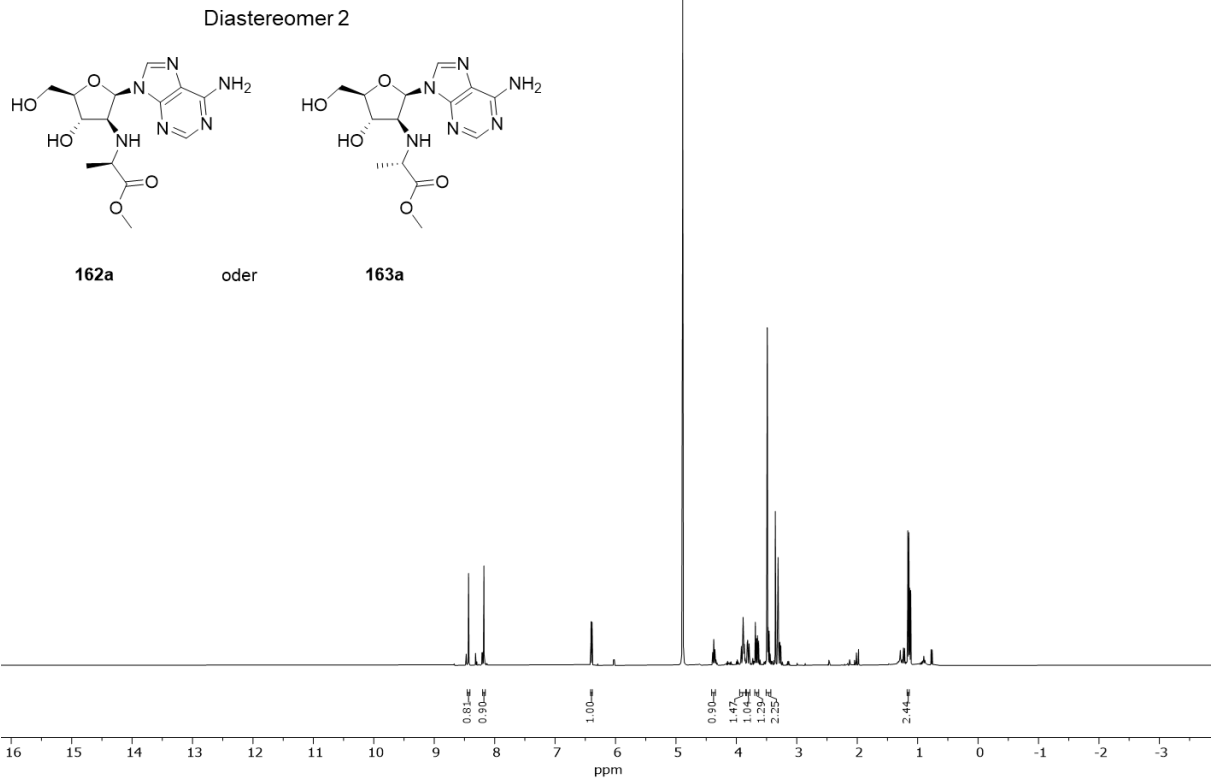
1H-NMR (MeOD)



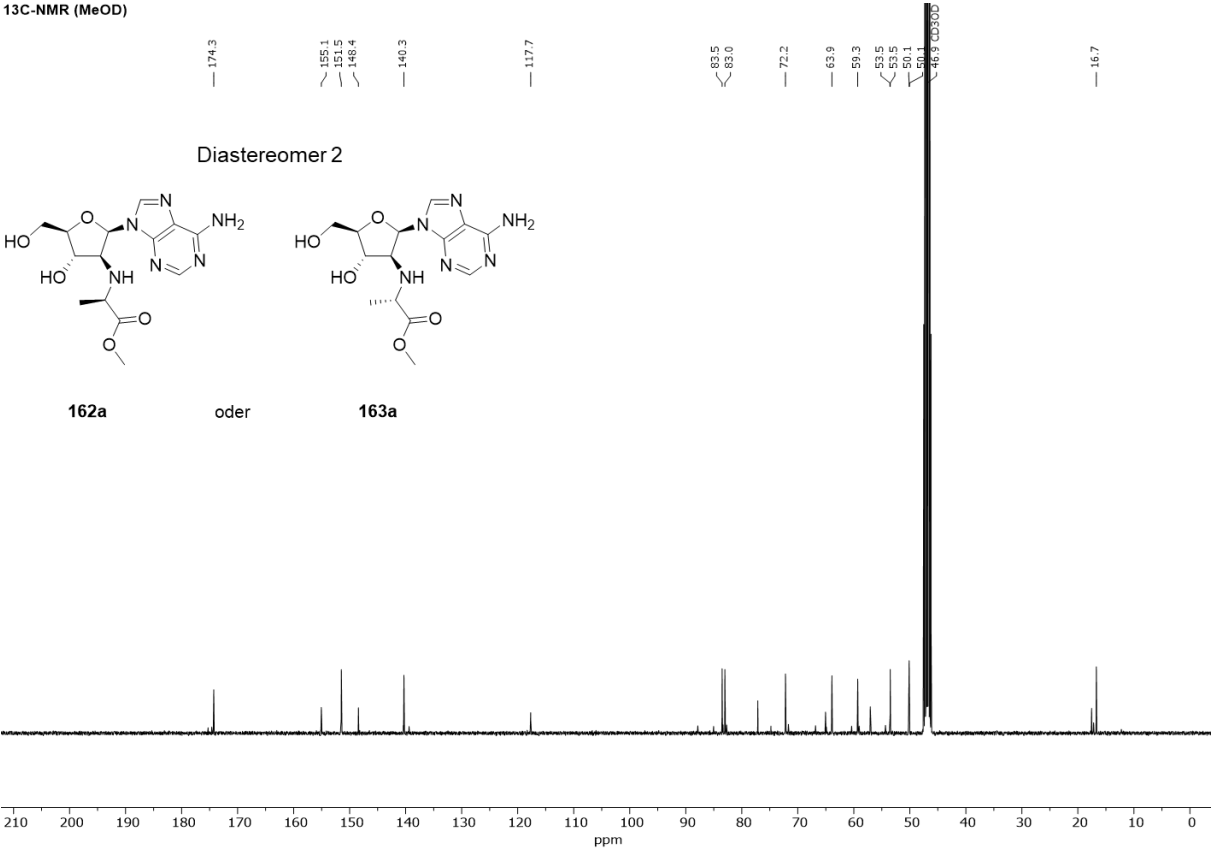
13C-NMR (MeOD)



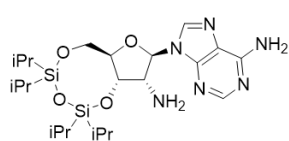
¹H-NMR (MeOD)



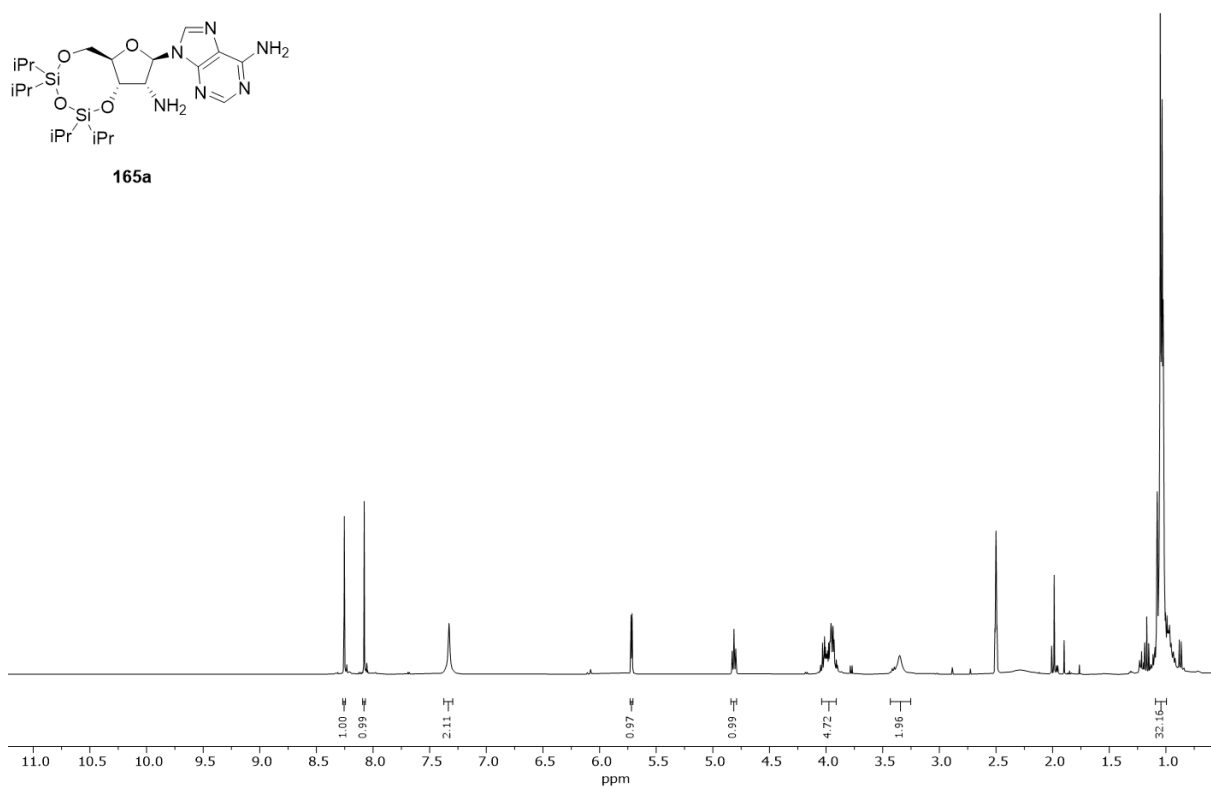
¹³C-NMR (MeOD)



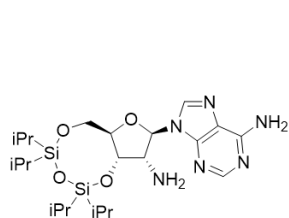
¹H-NMR (DMSO)



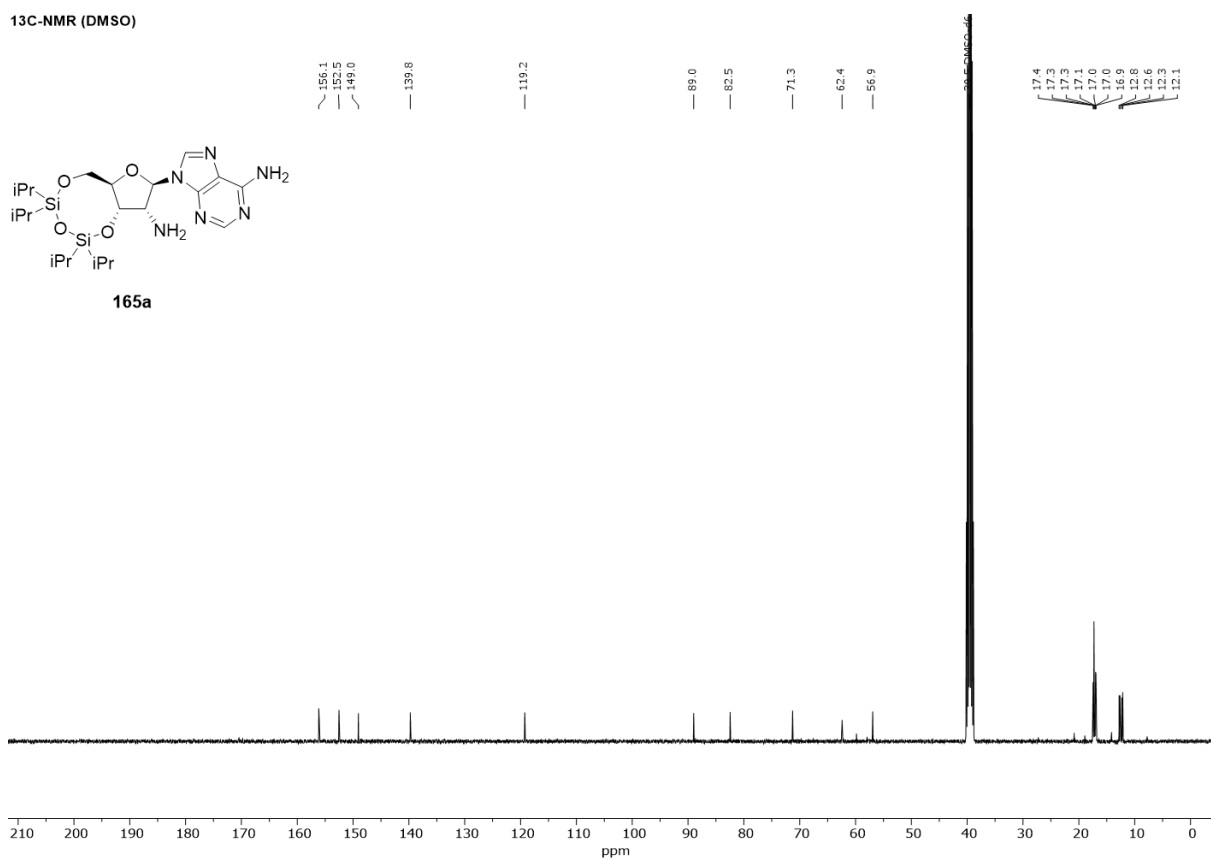
165a



¹³C-NMR (DMSO)

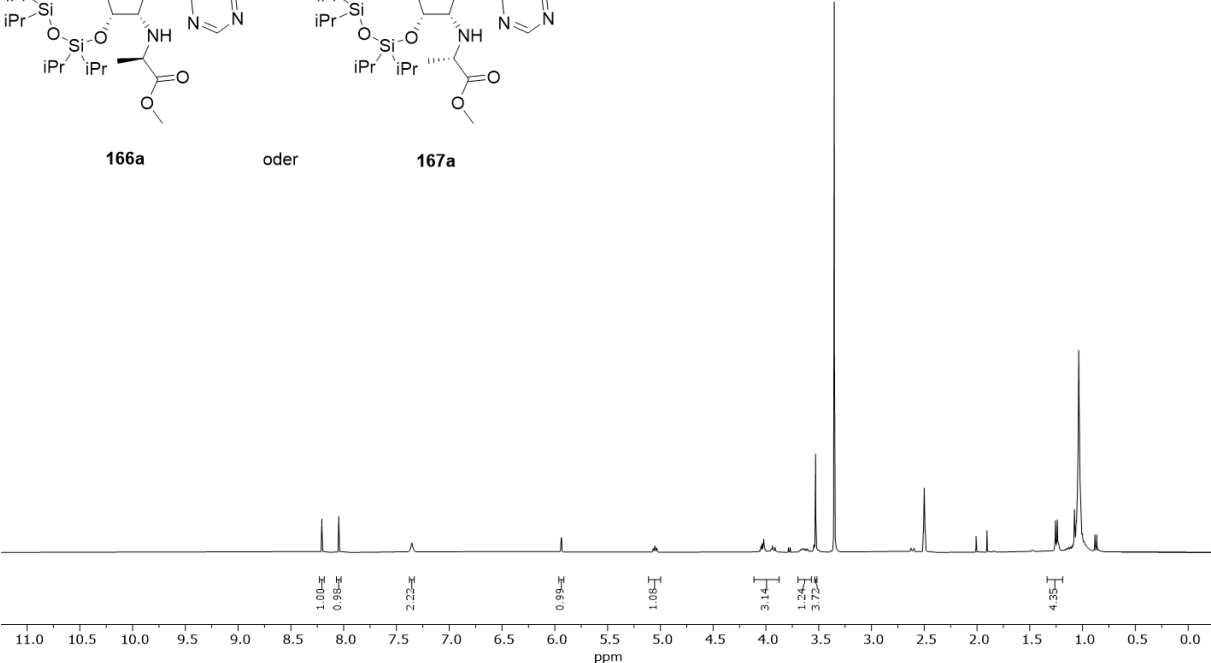
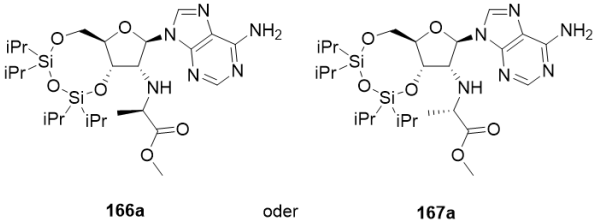


165a



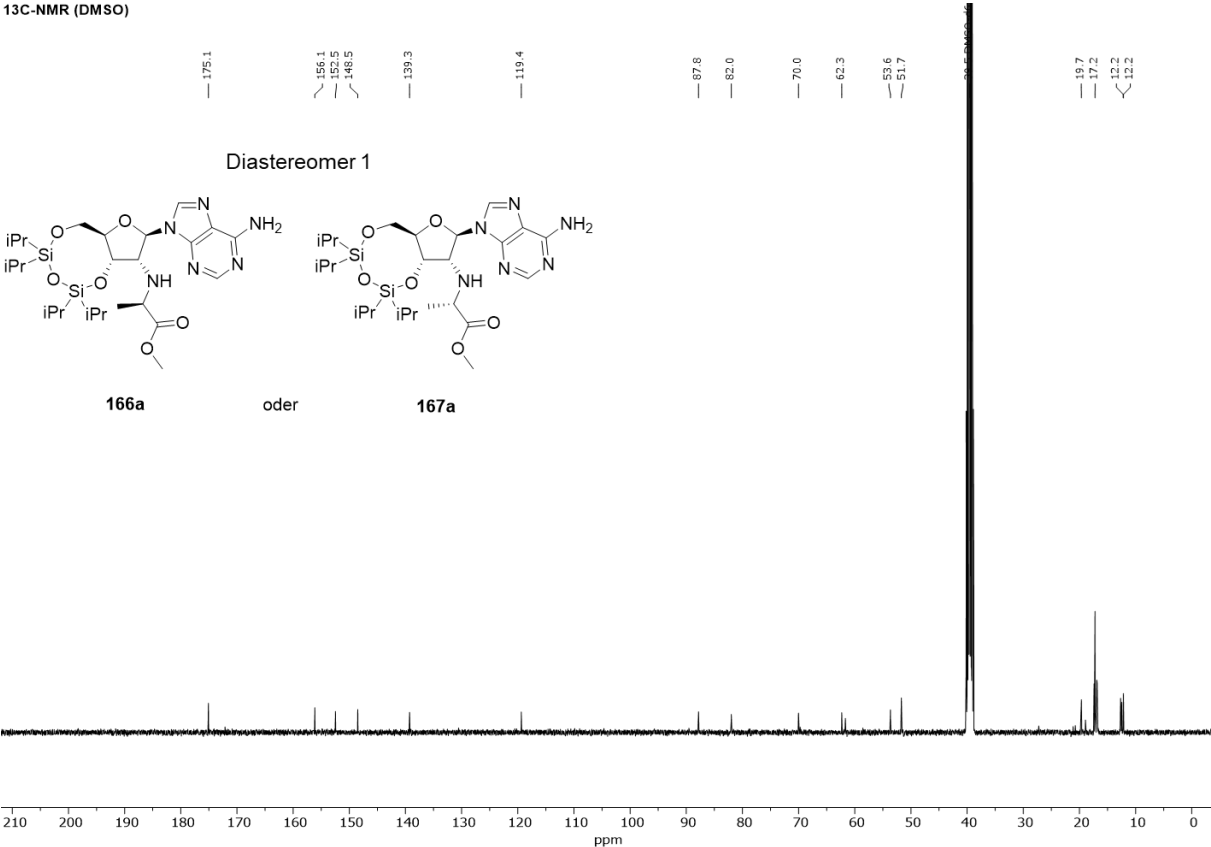
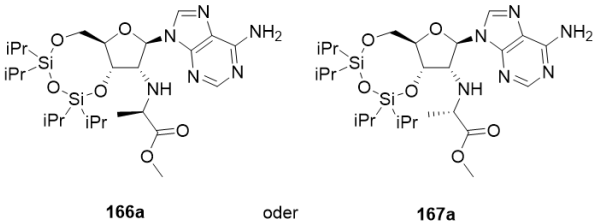
¹H-NMR (DMSO)

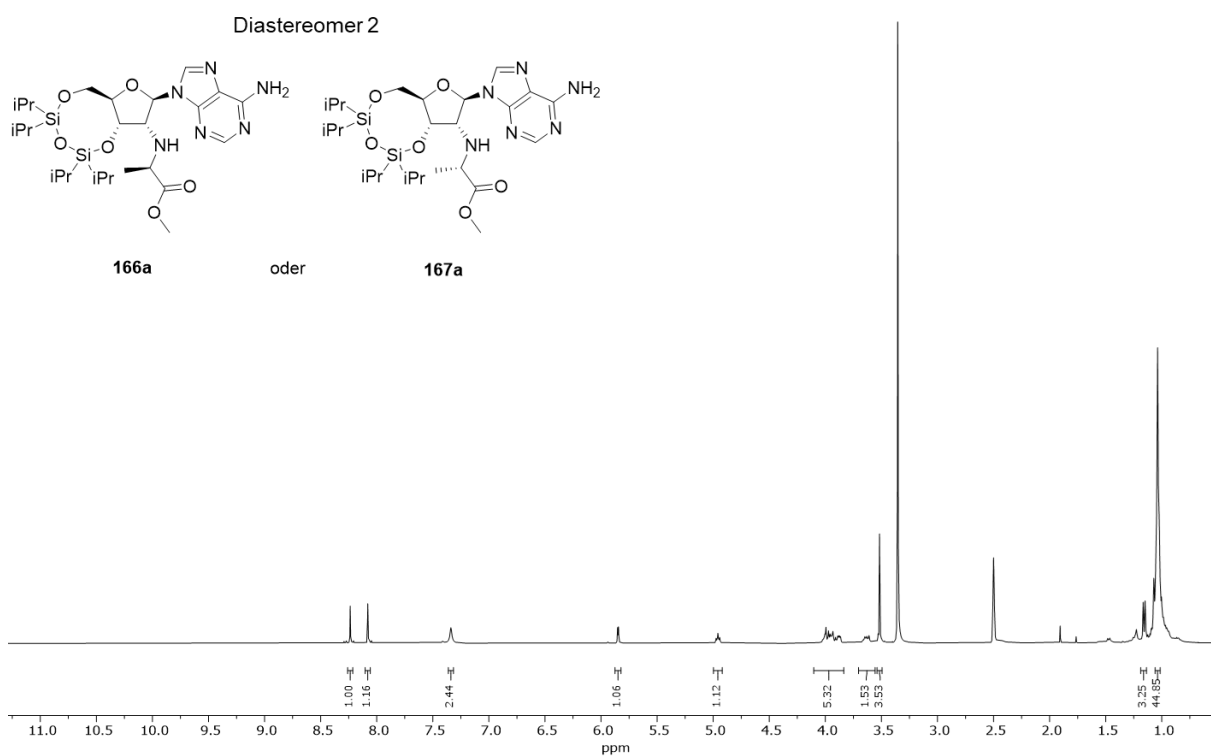
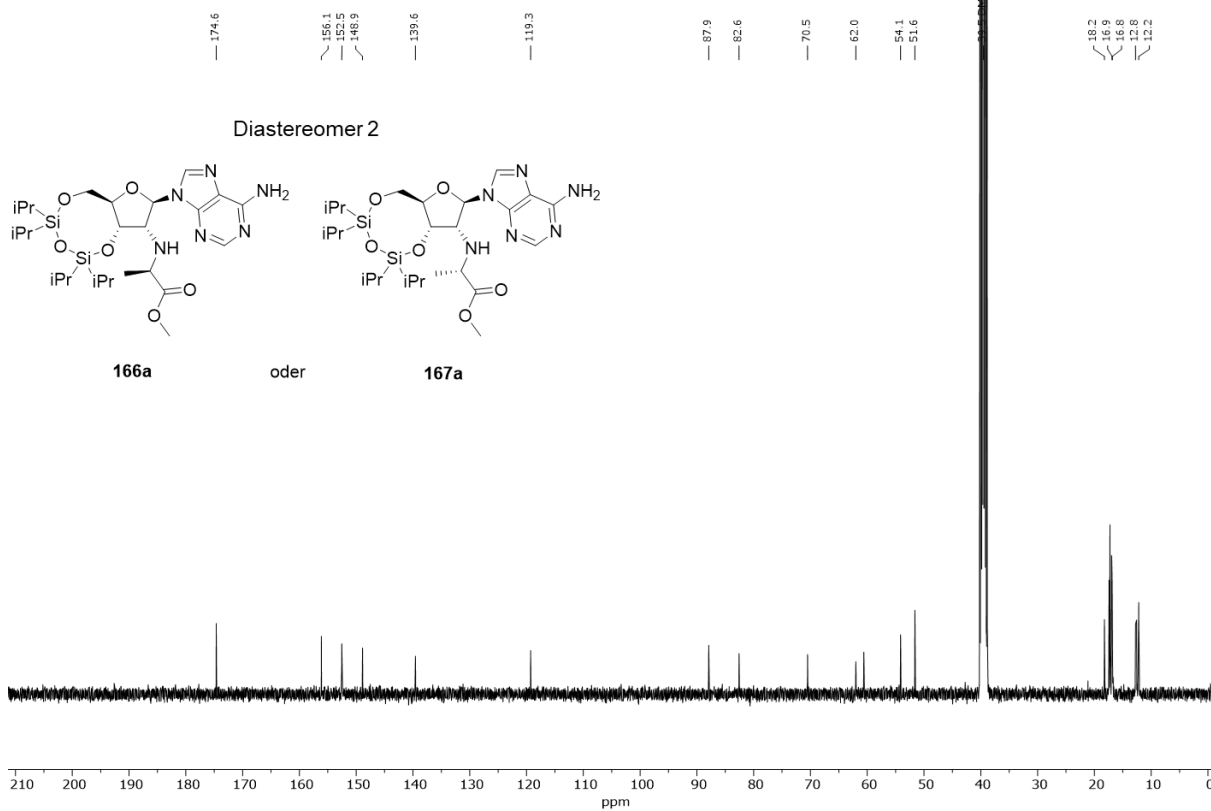
Diastereomer 1



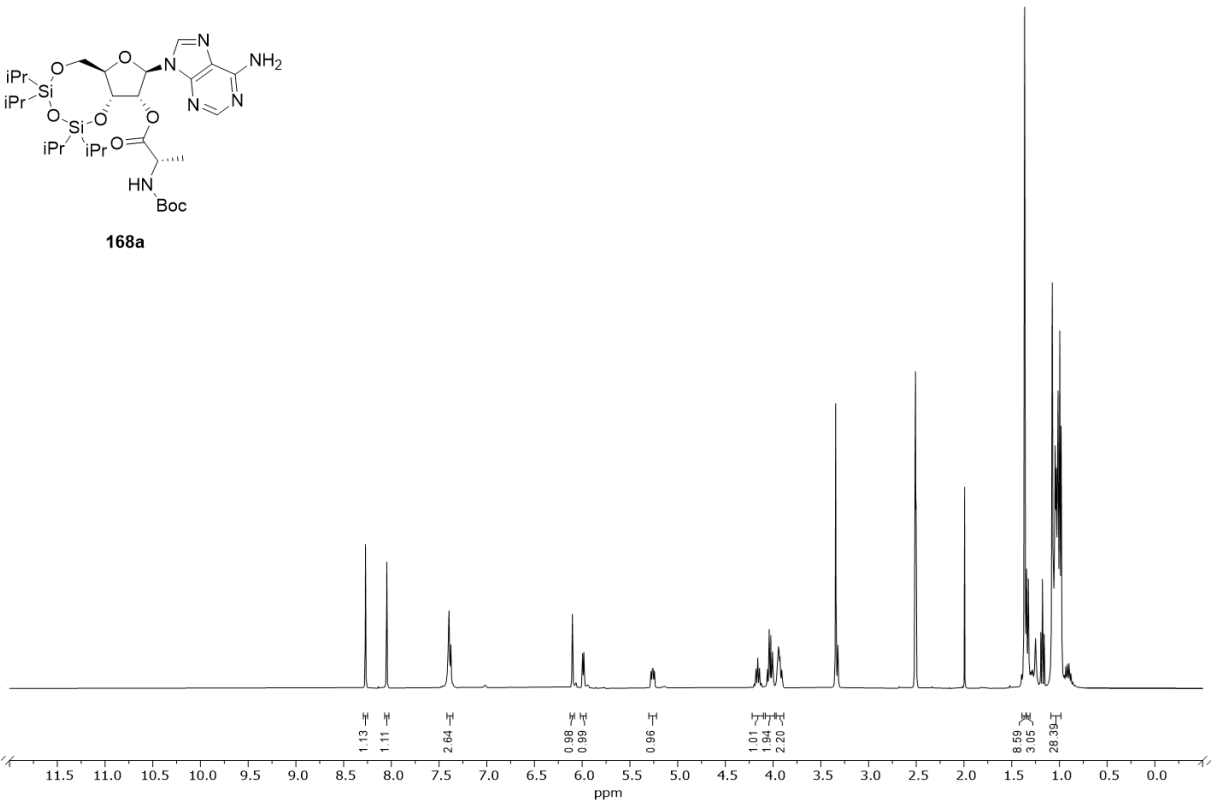
¹³C-NMR (DMSO)

Diastereomer 1

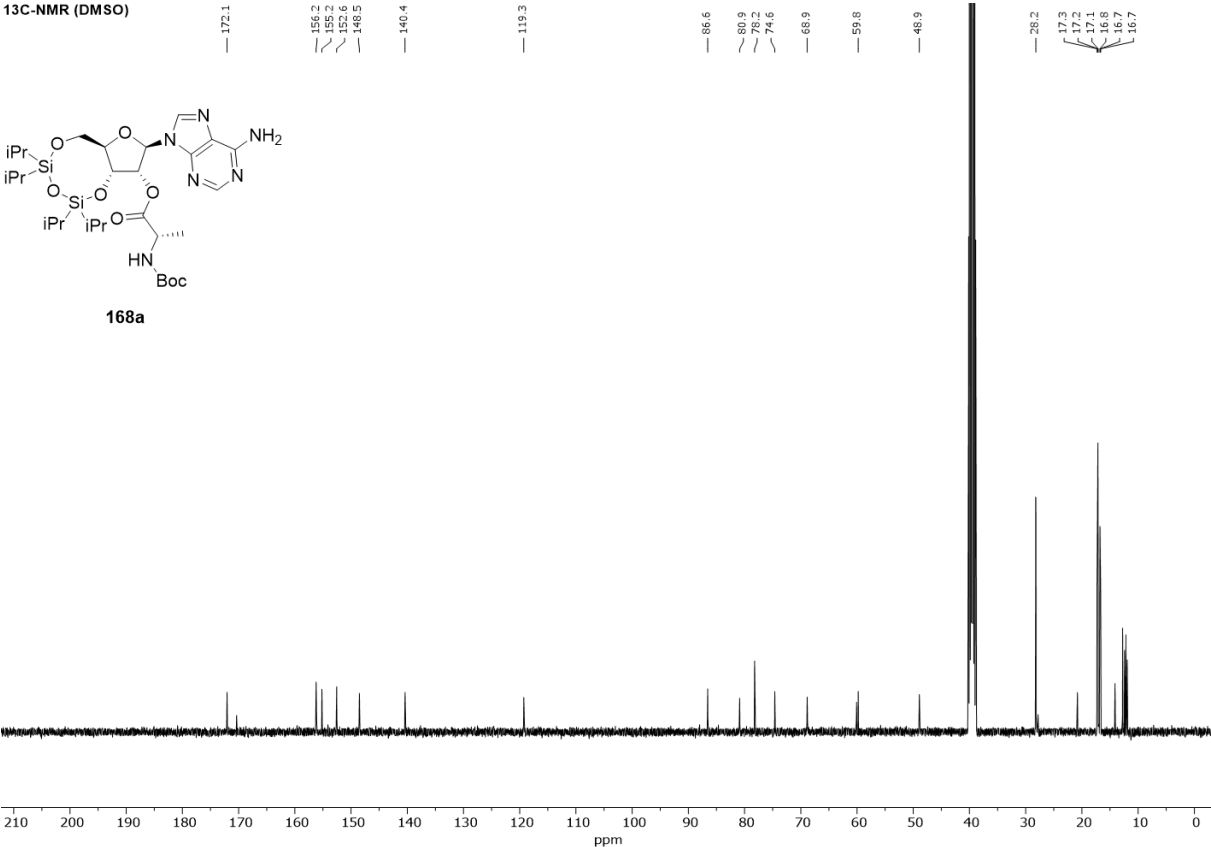


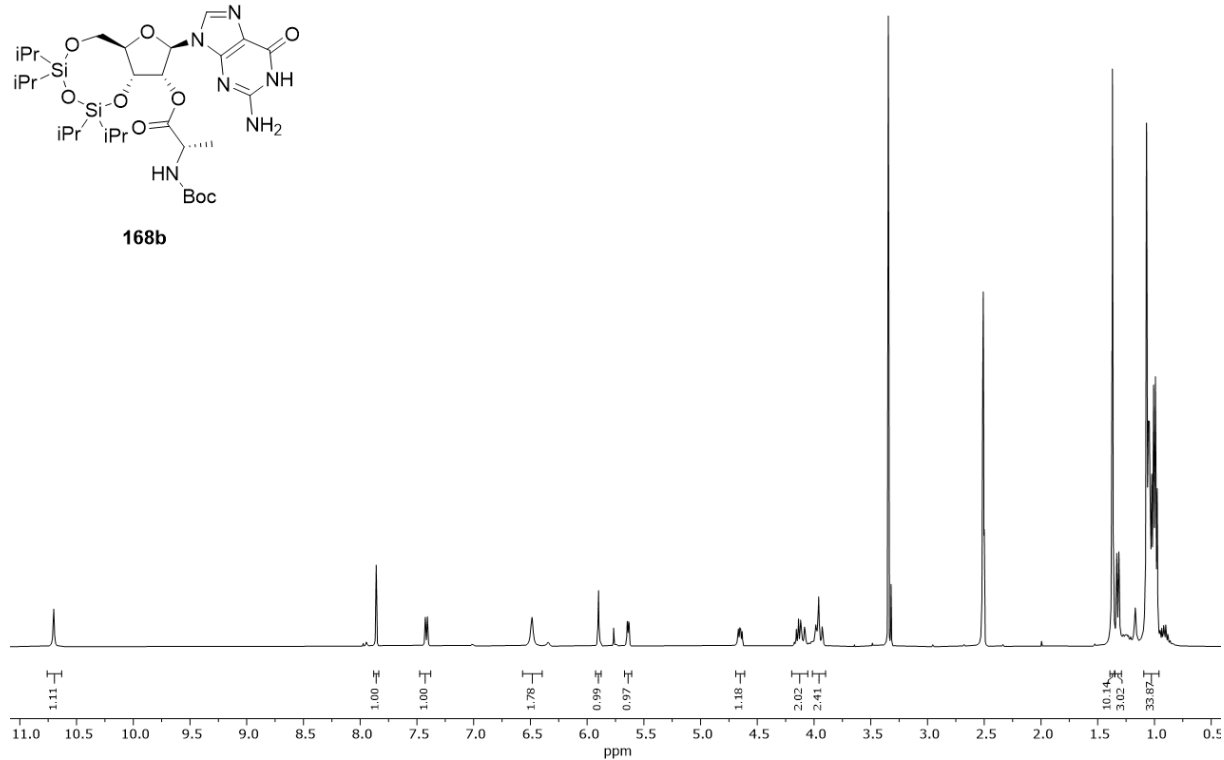
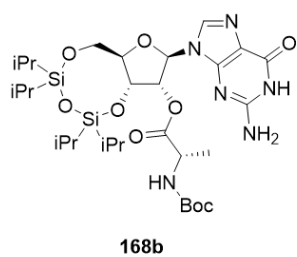
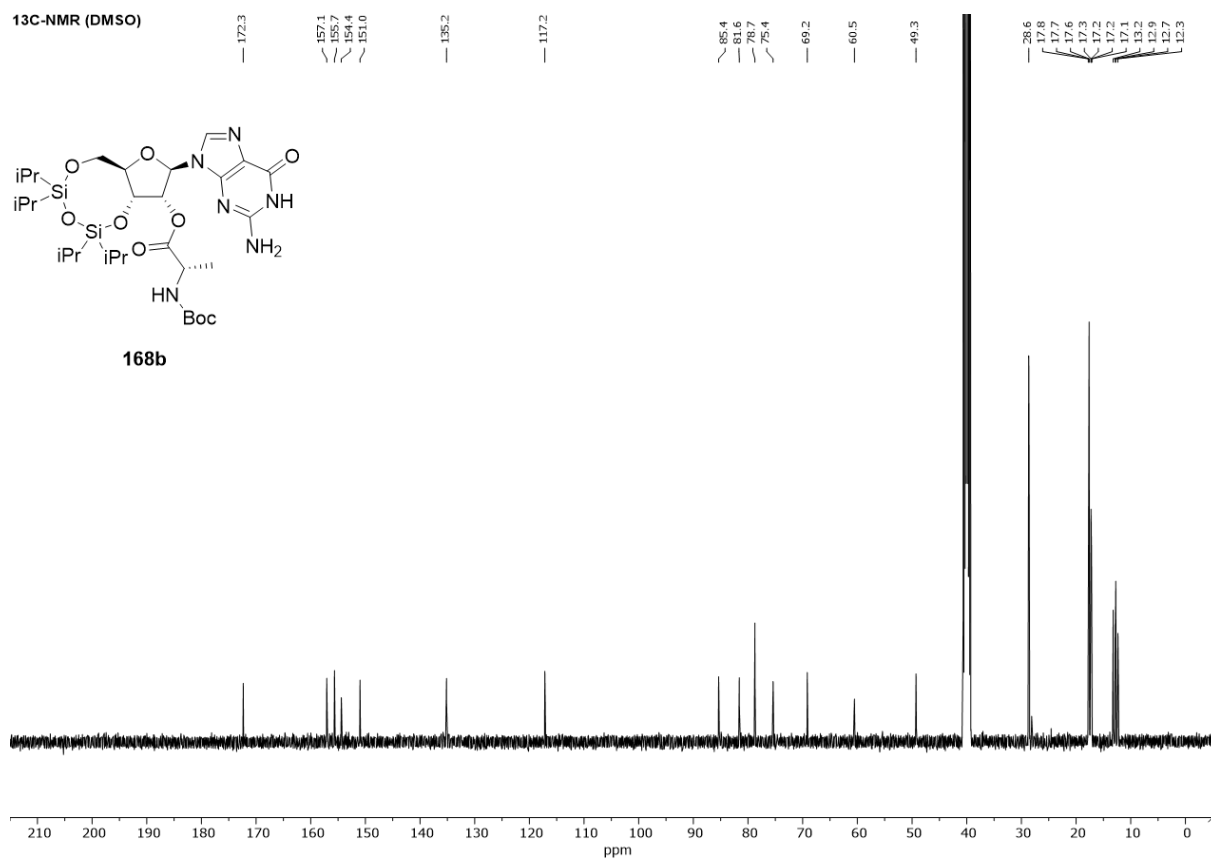
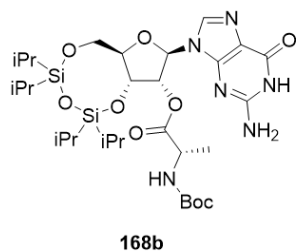
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

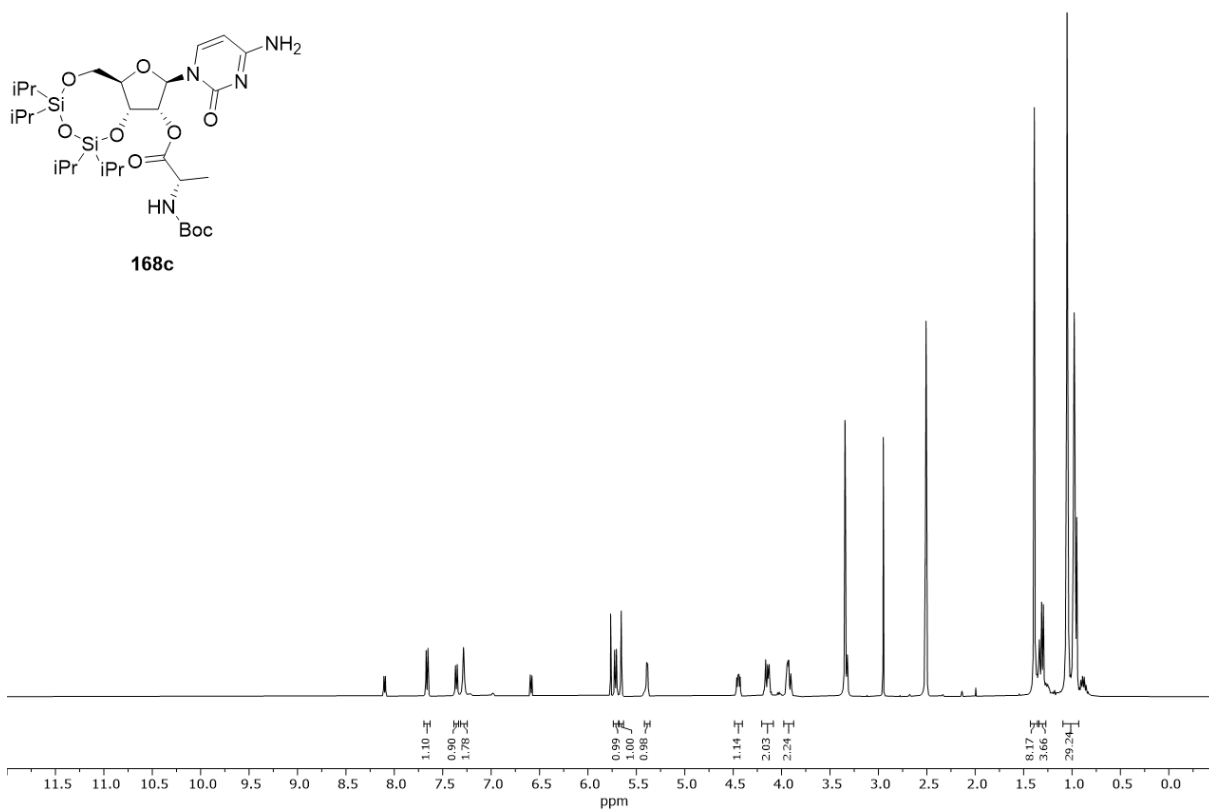
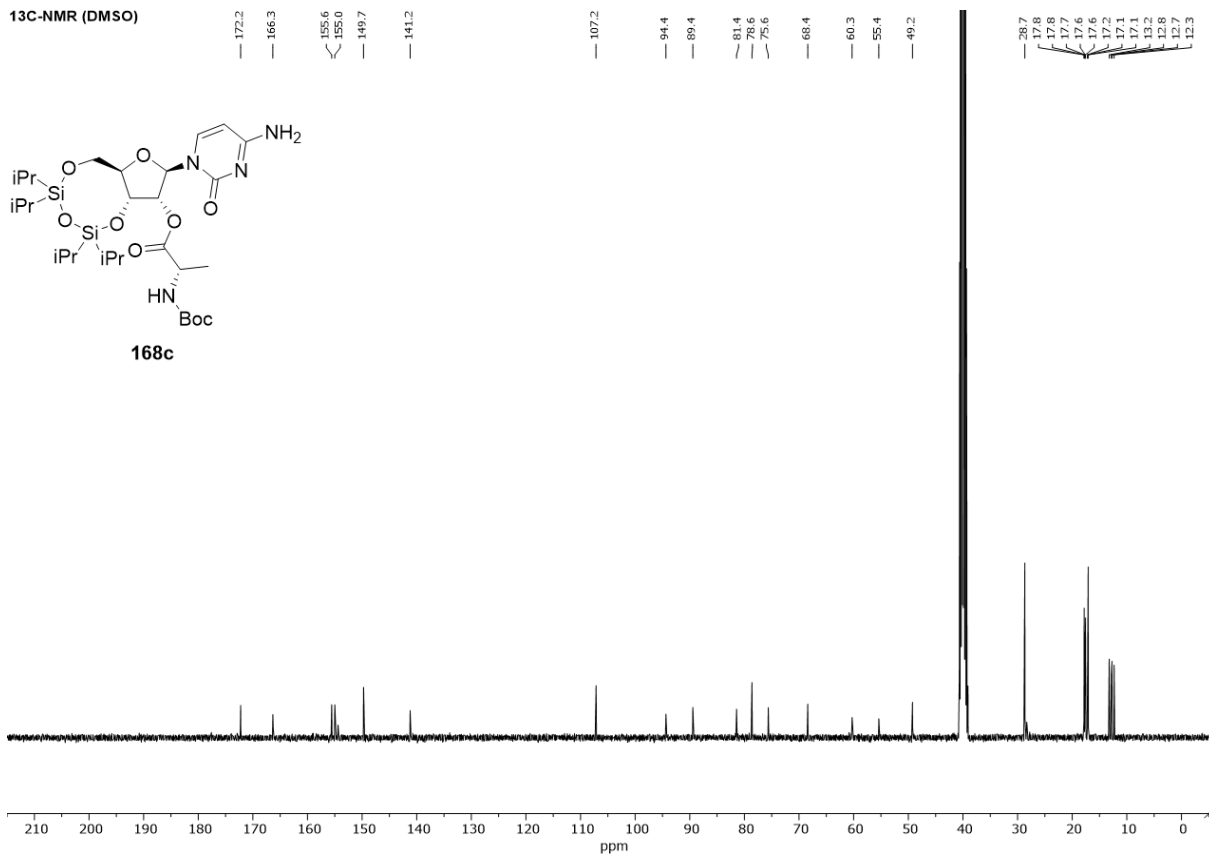
¹H-NMR (DMSO)

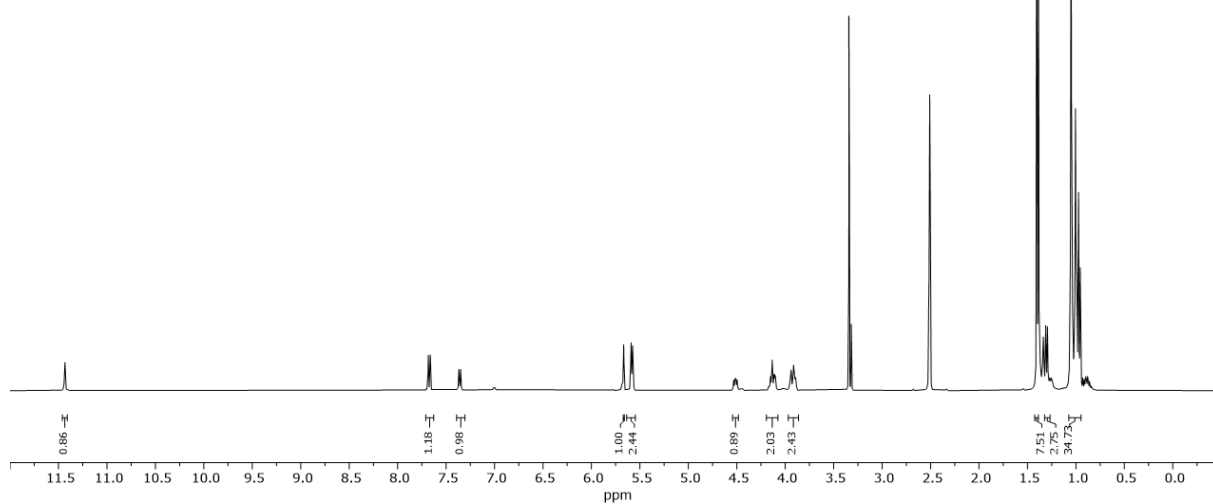
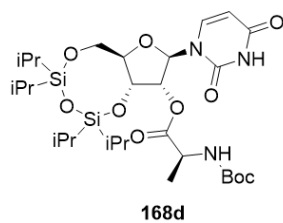
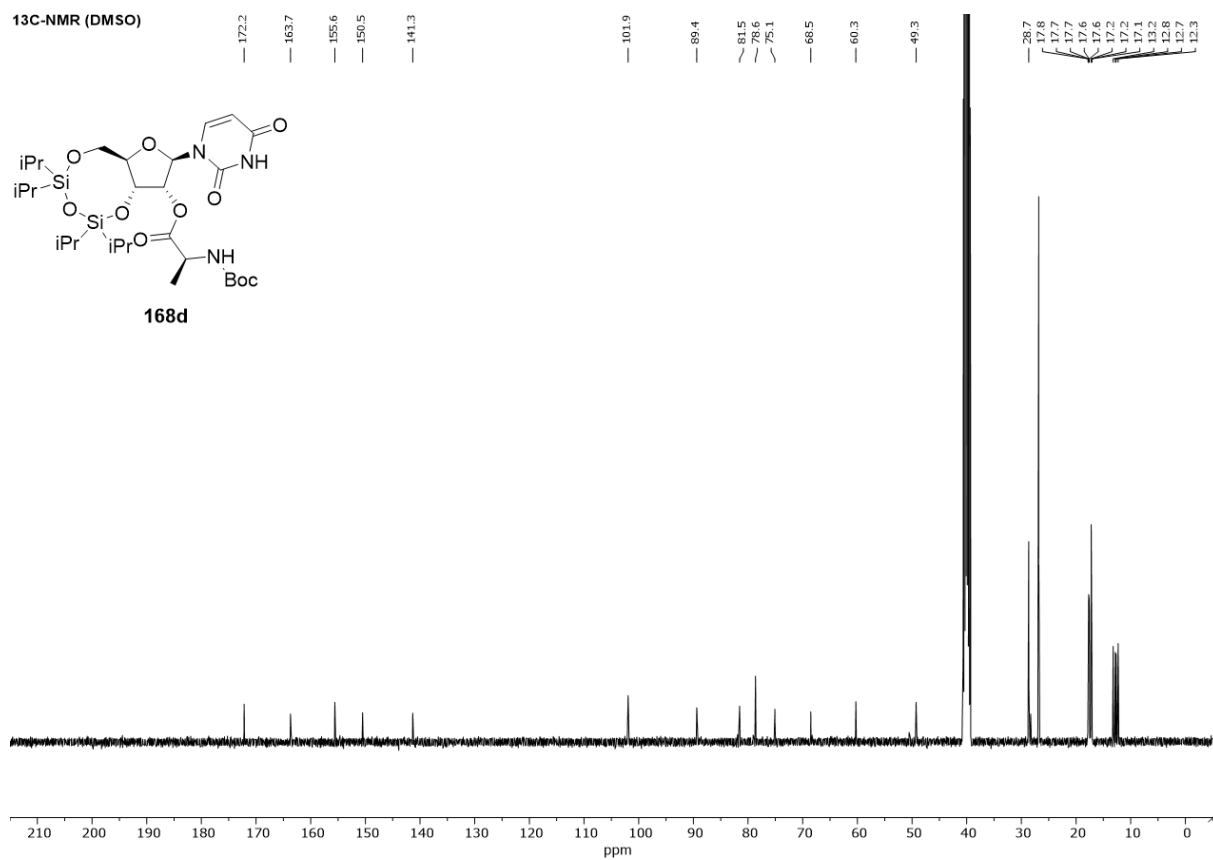
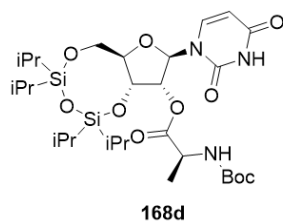


¹³C-NMR (DMSO)

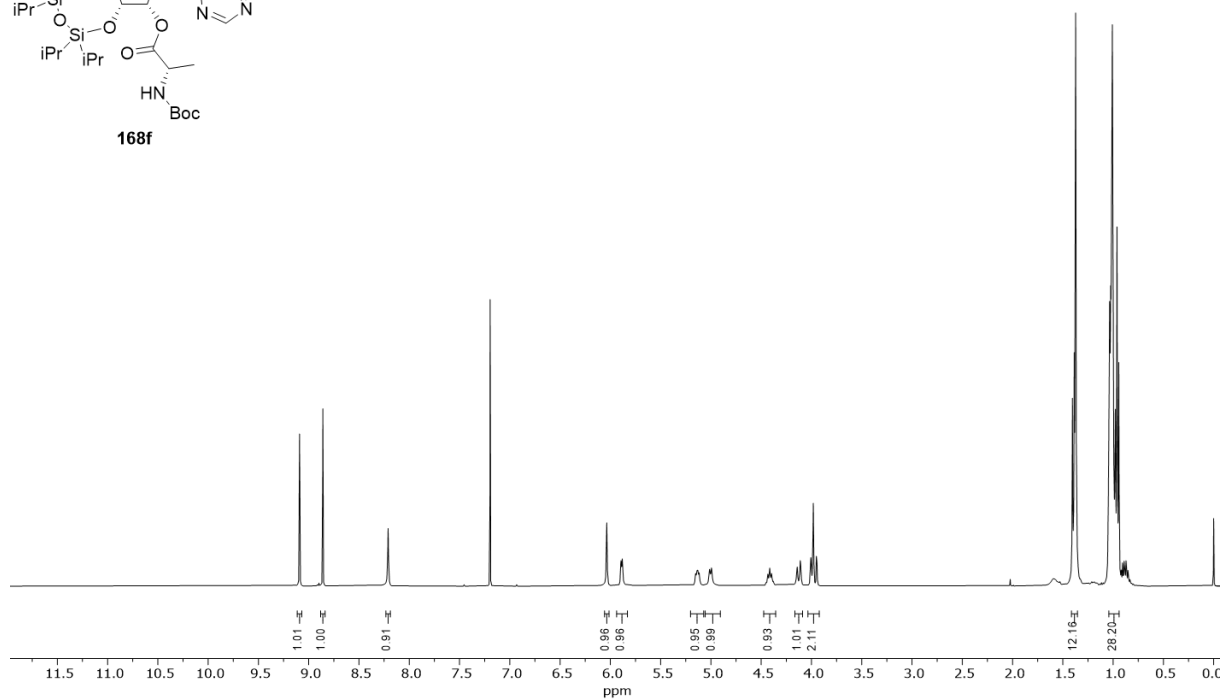
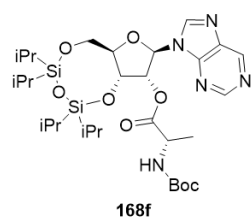


¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

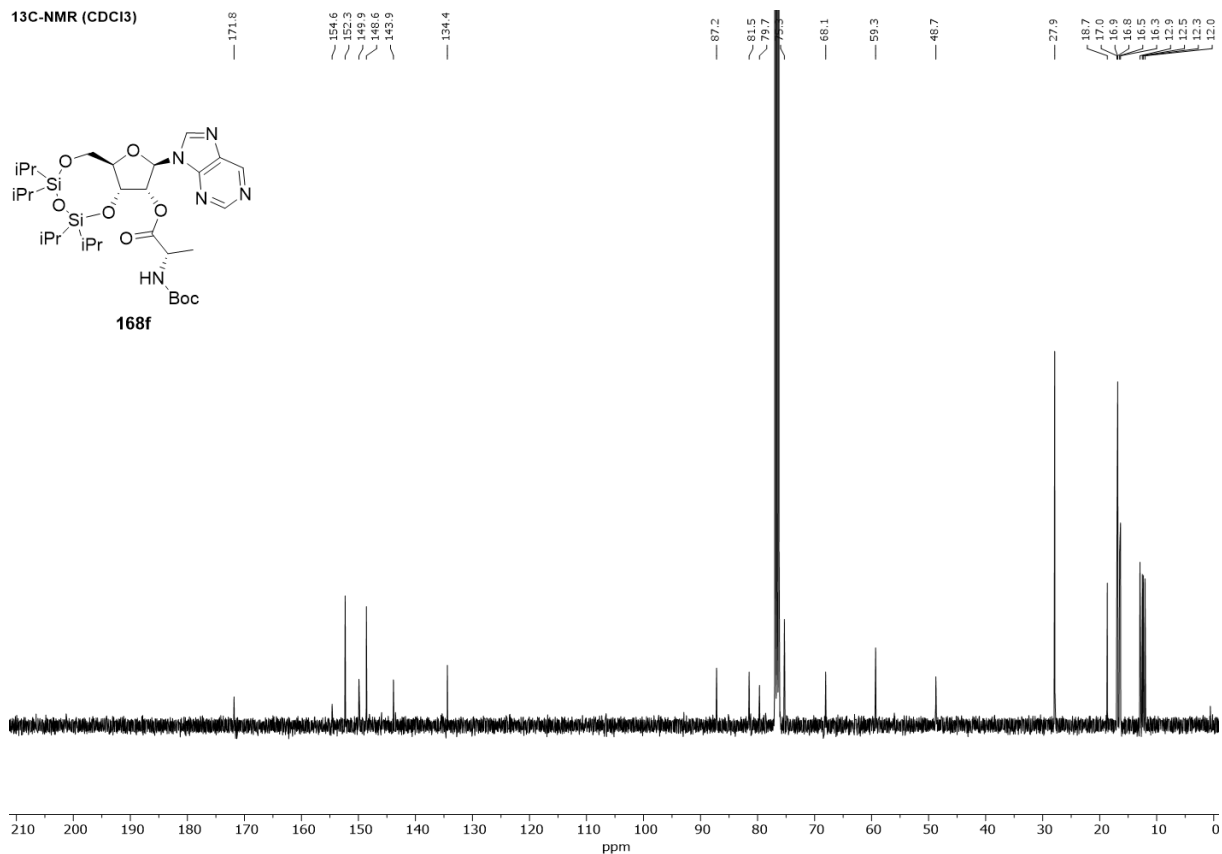
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

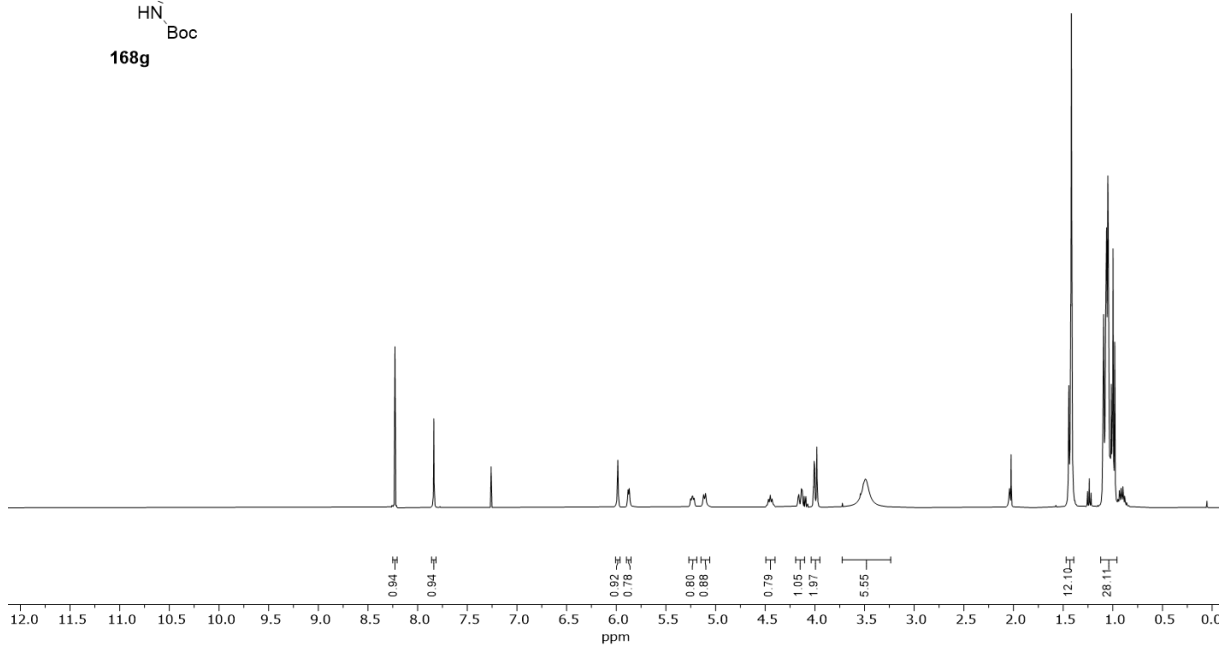
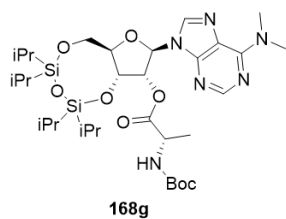
¹H-NMR (CDCl₃)



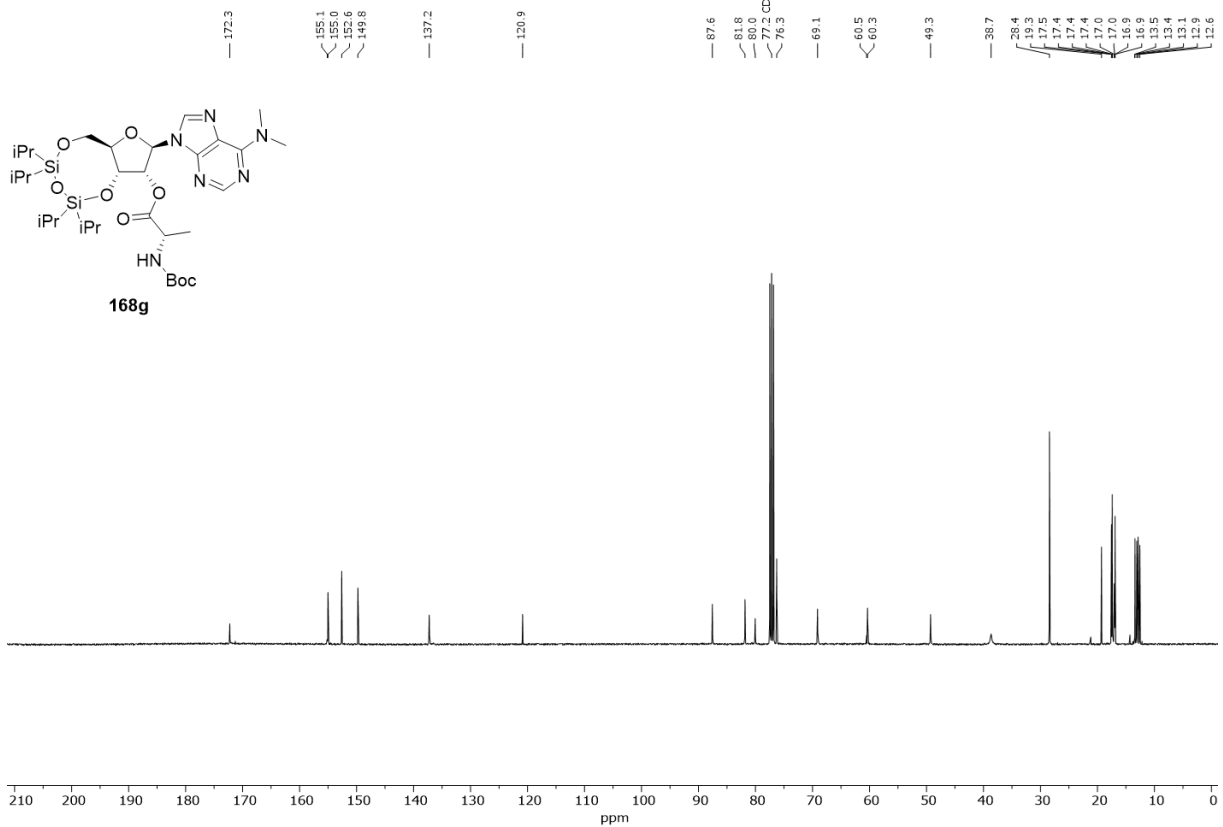
¹³C-NMR (CDCl₃)



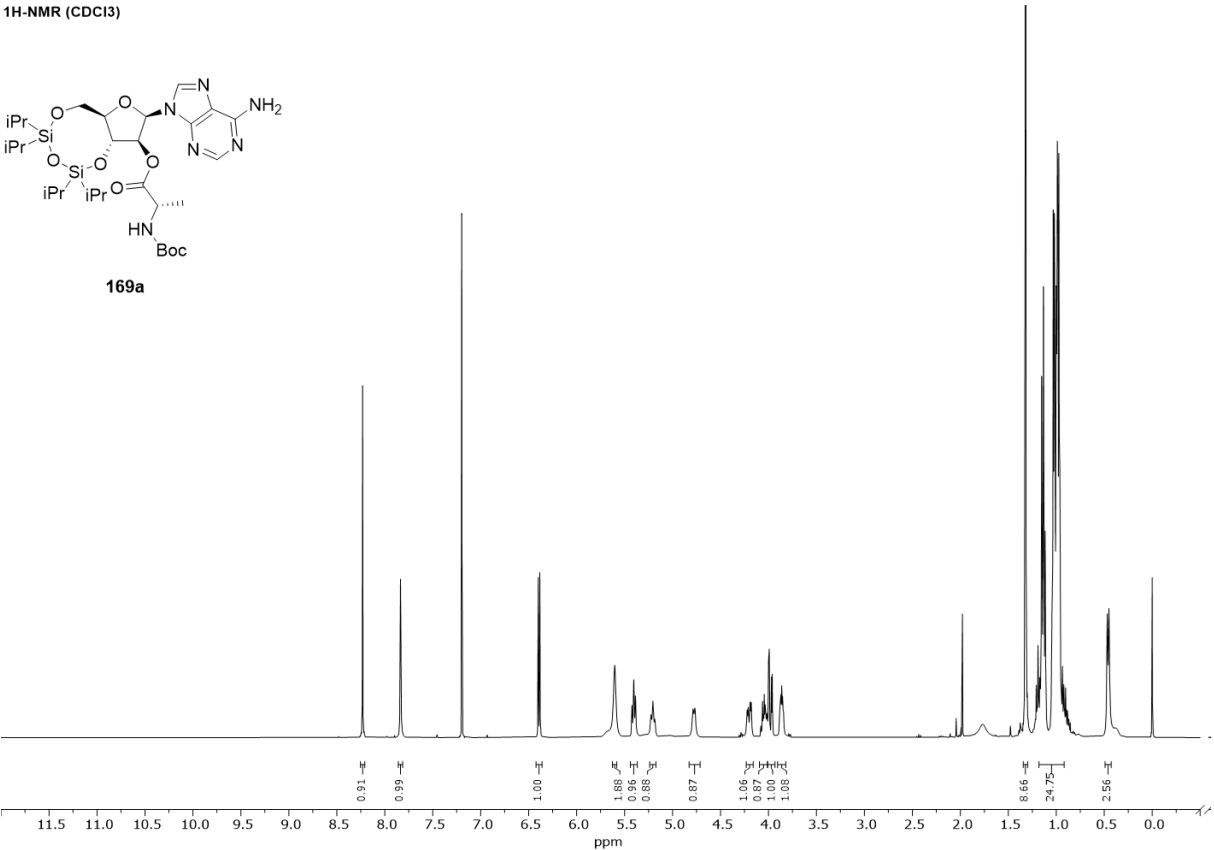
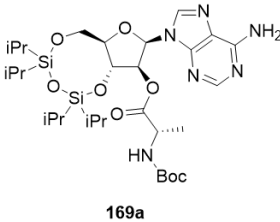
¹H-NMR (CDCl₃)



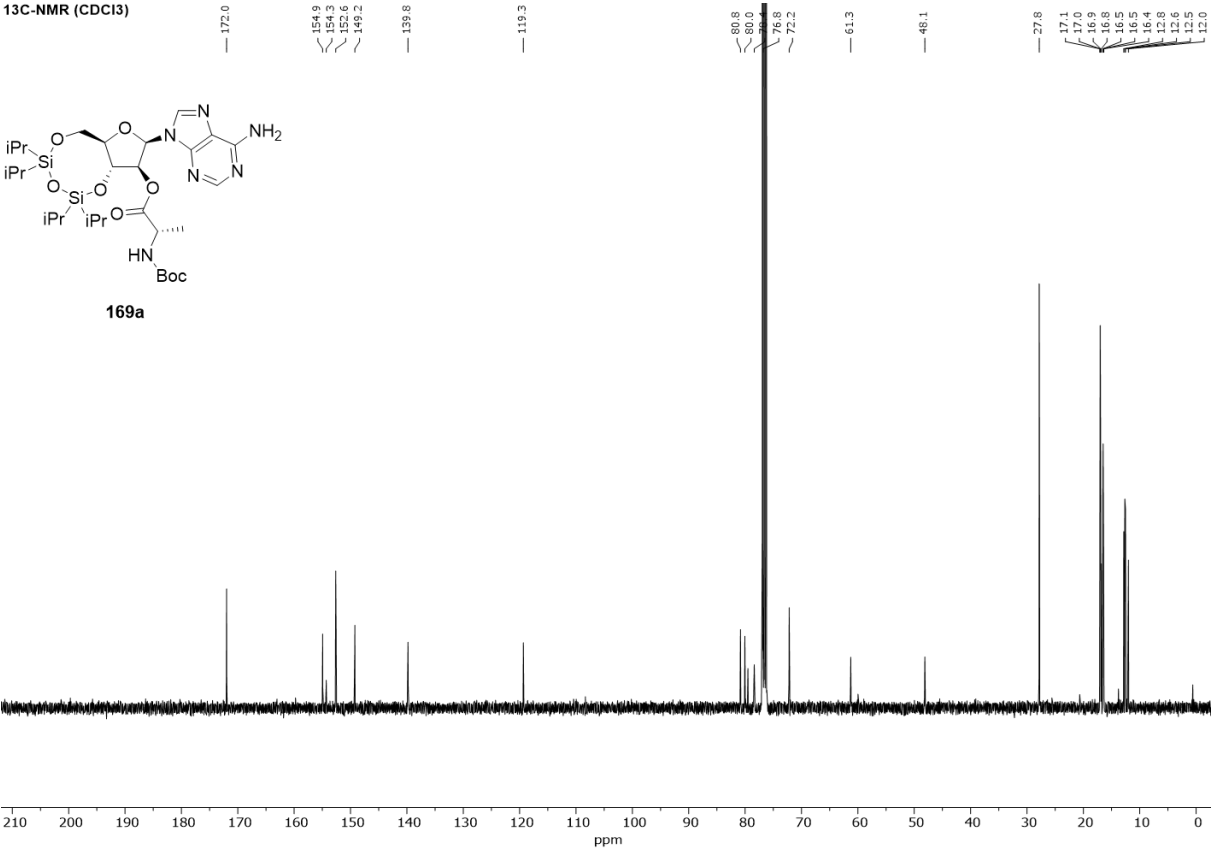
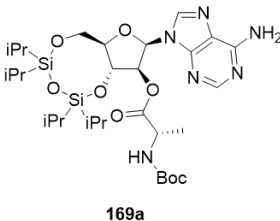
¹³C-NMR (CDCl₃)



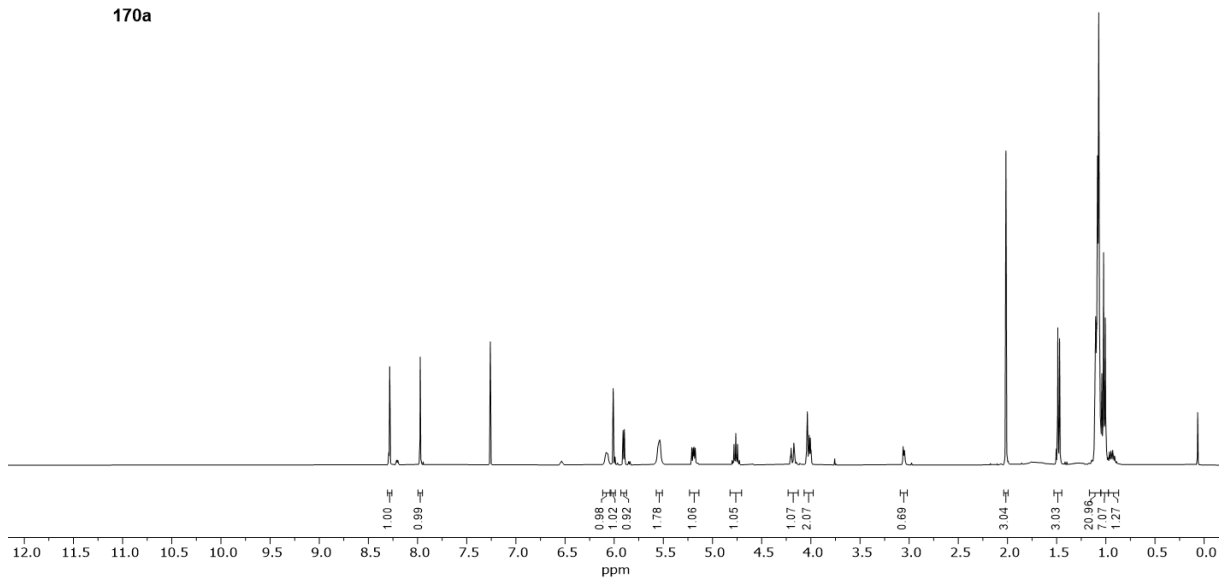
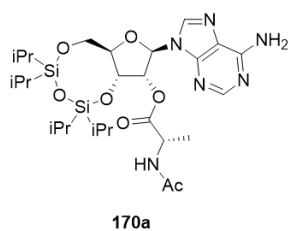
¹H-NMR (CDCl₃)



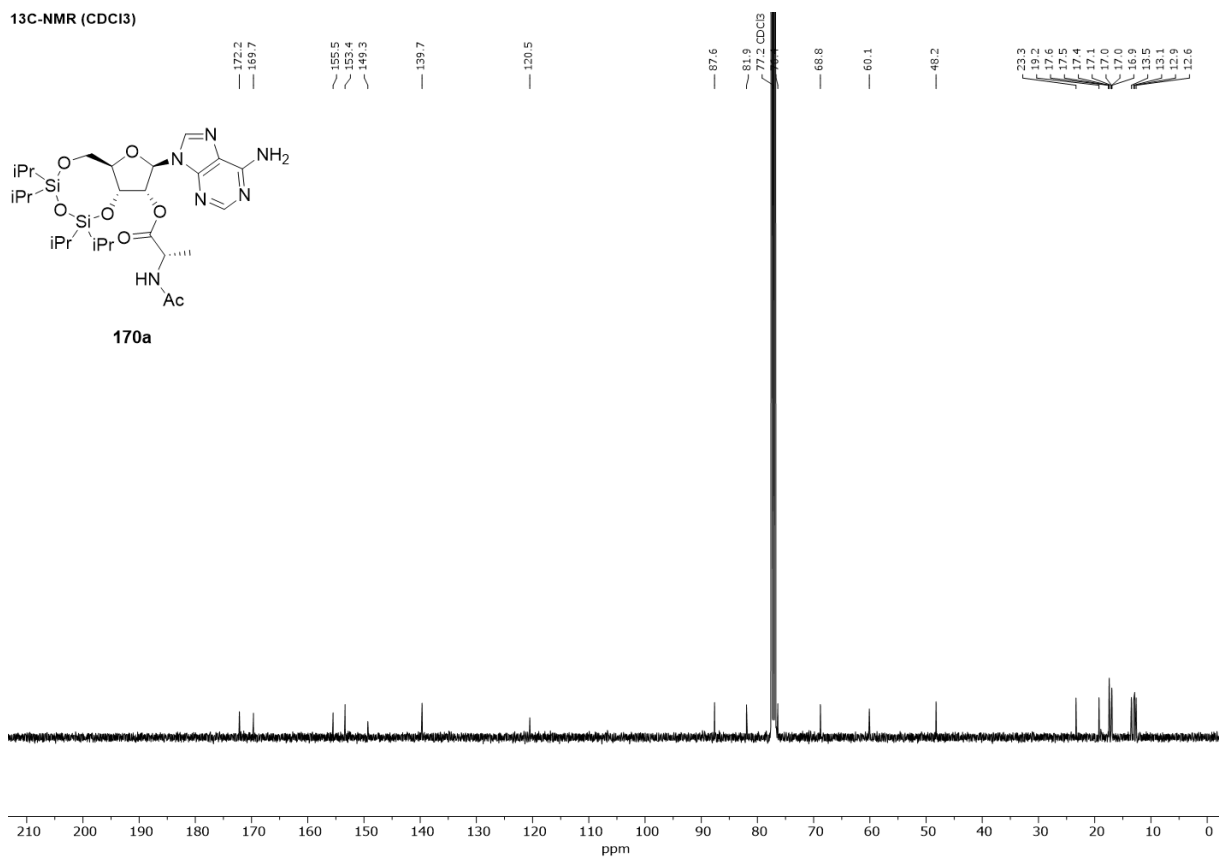
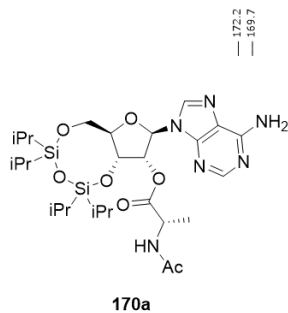
¹³C-NMR (CDCl₃)



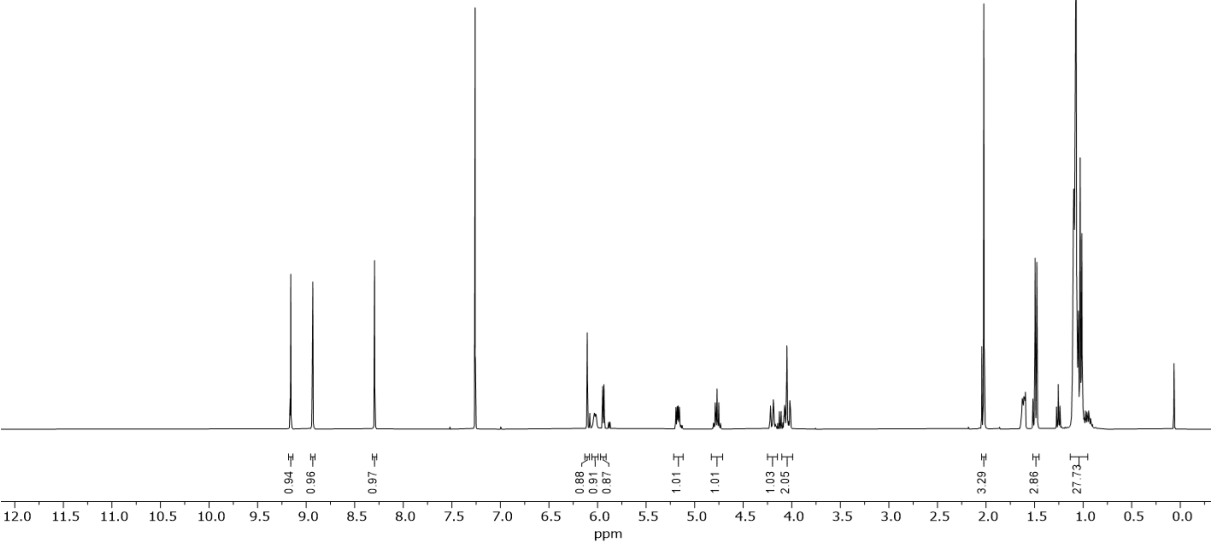
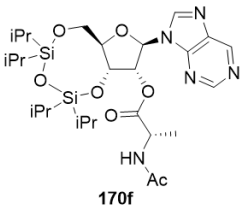
¹H-NMR (CDCl₃)



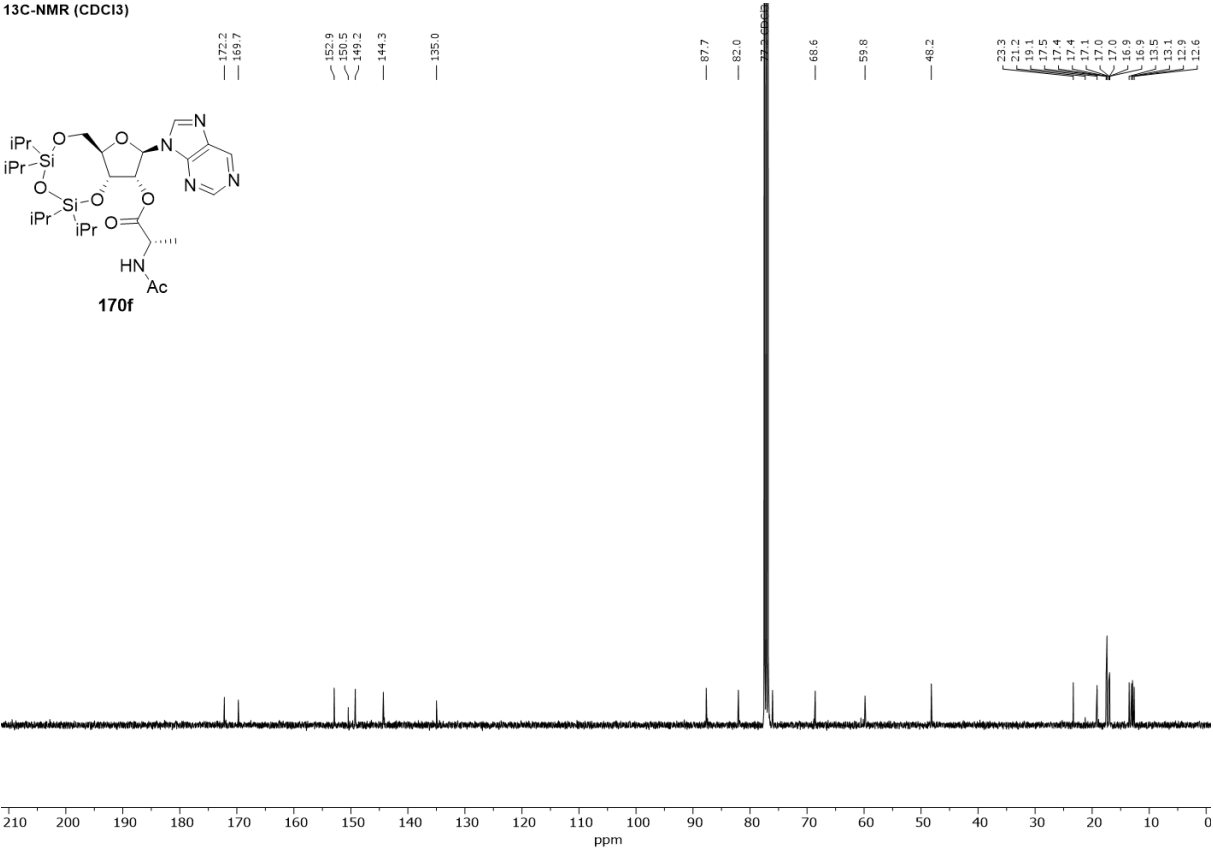
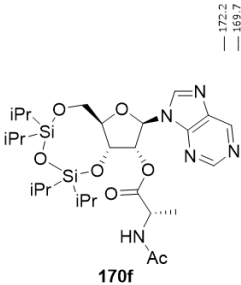
¹³C-NMR (CDCl₃)



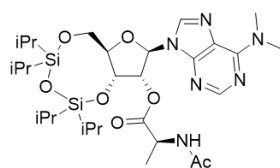
¹H-NMR (CDCl₃)



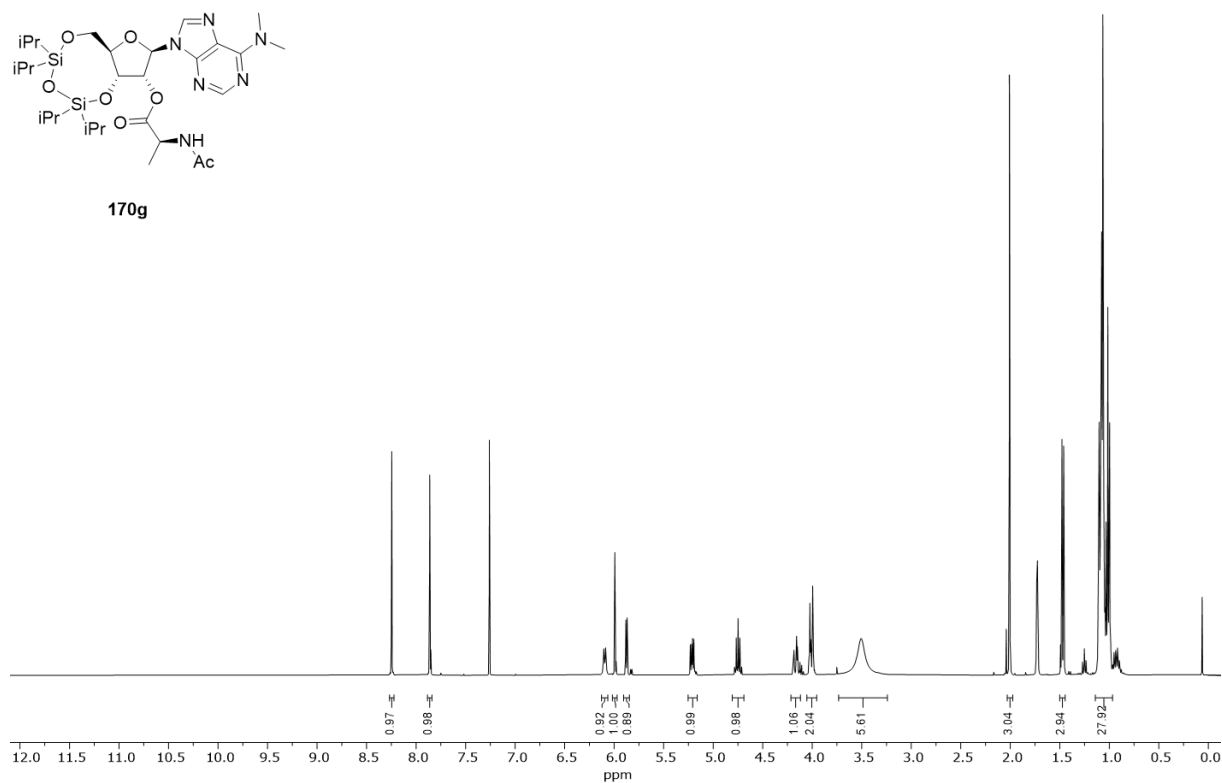
¹³C-NMR (CDCl₃)



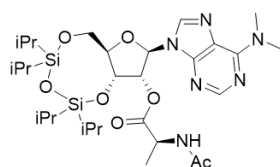
¹H-NMR (CDCl₃)



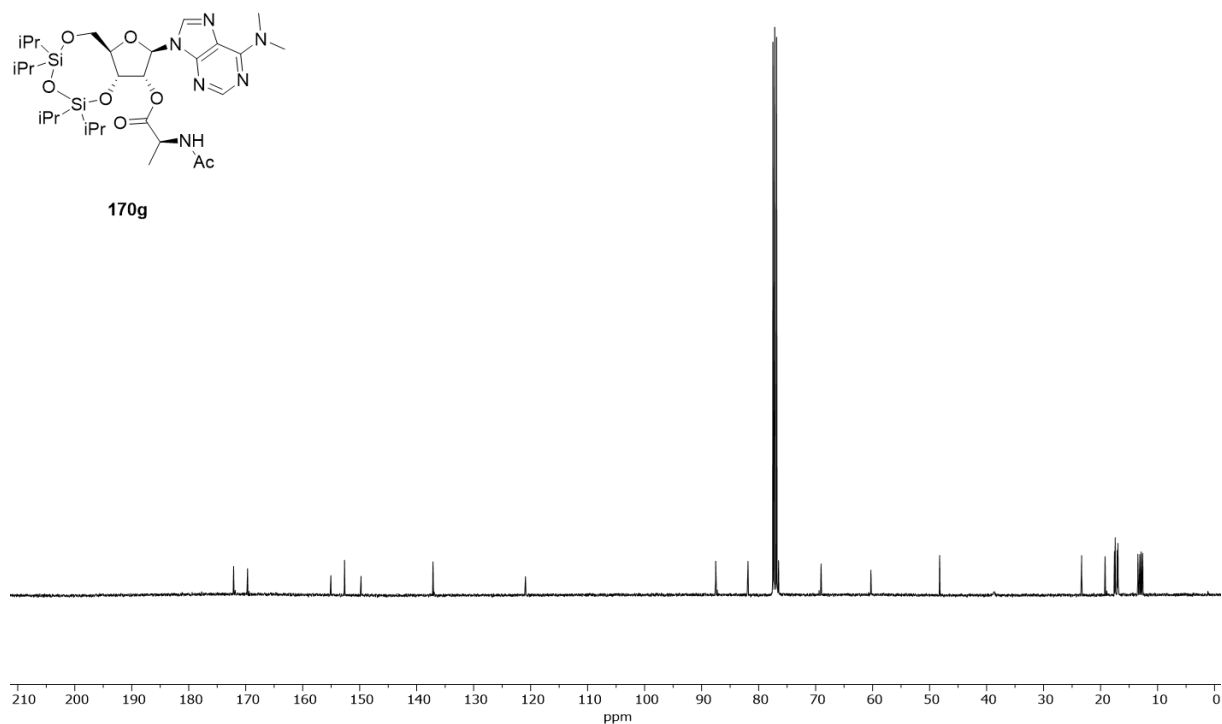
170g



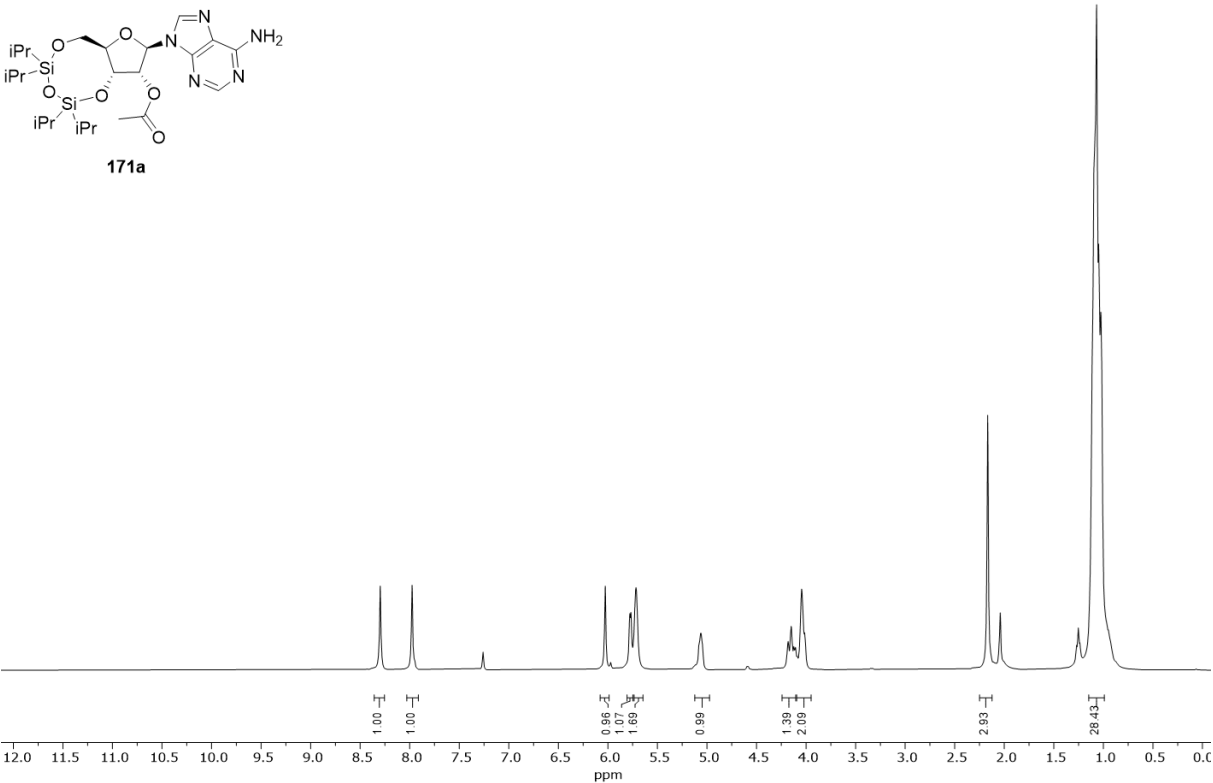
¹³C-NMR (CDCl₃)



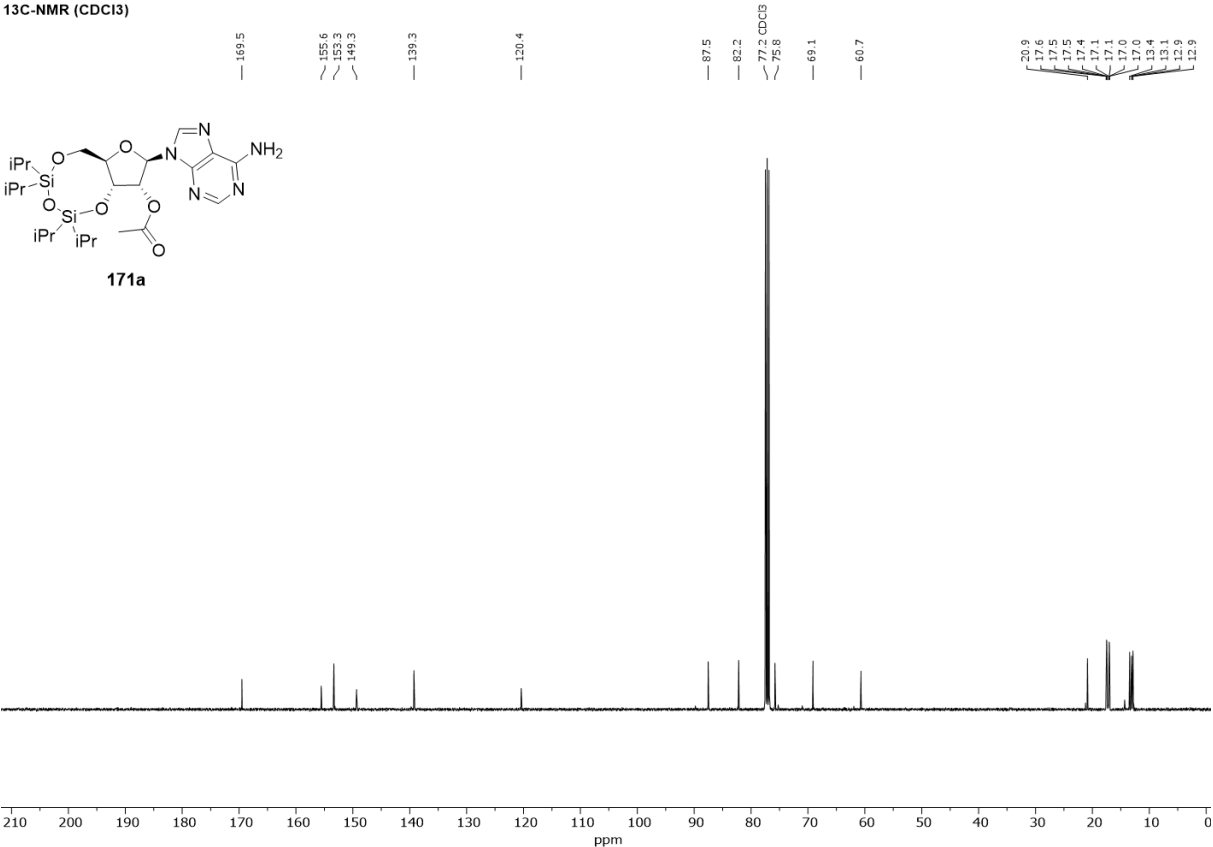
170g

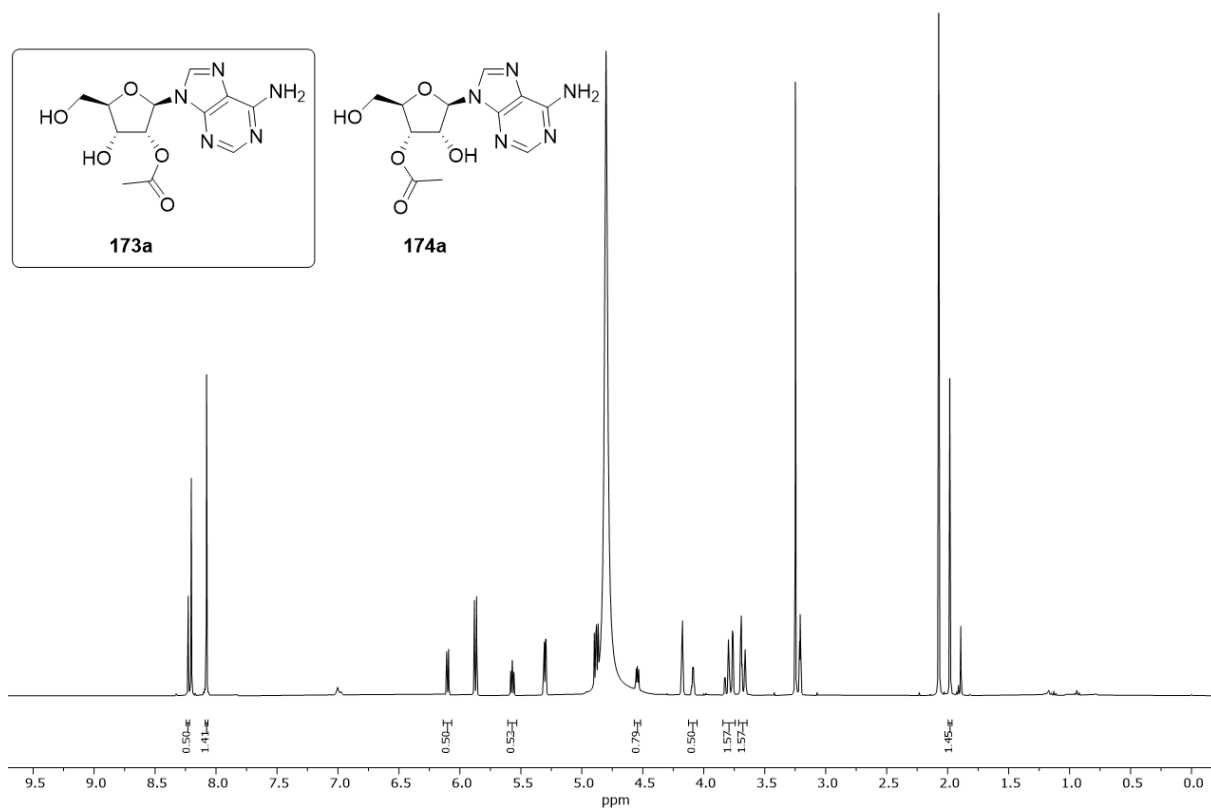
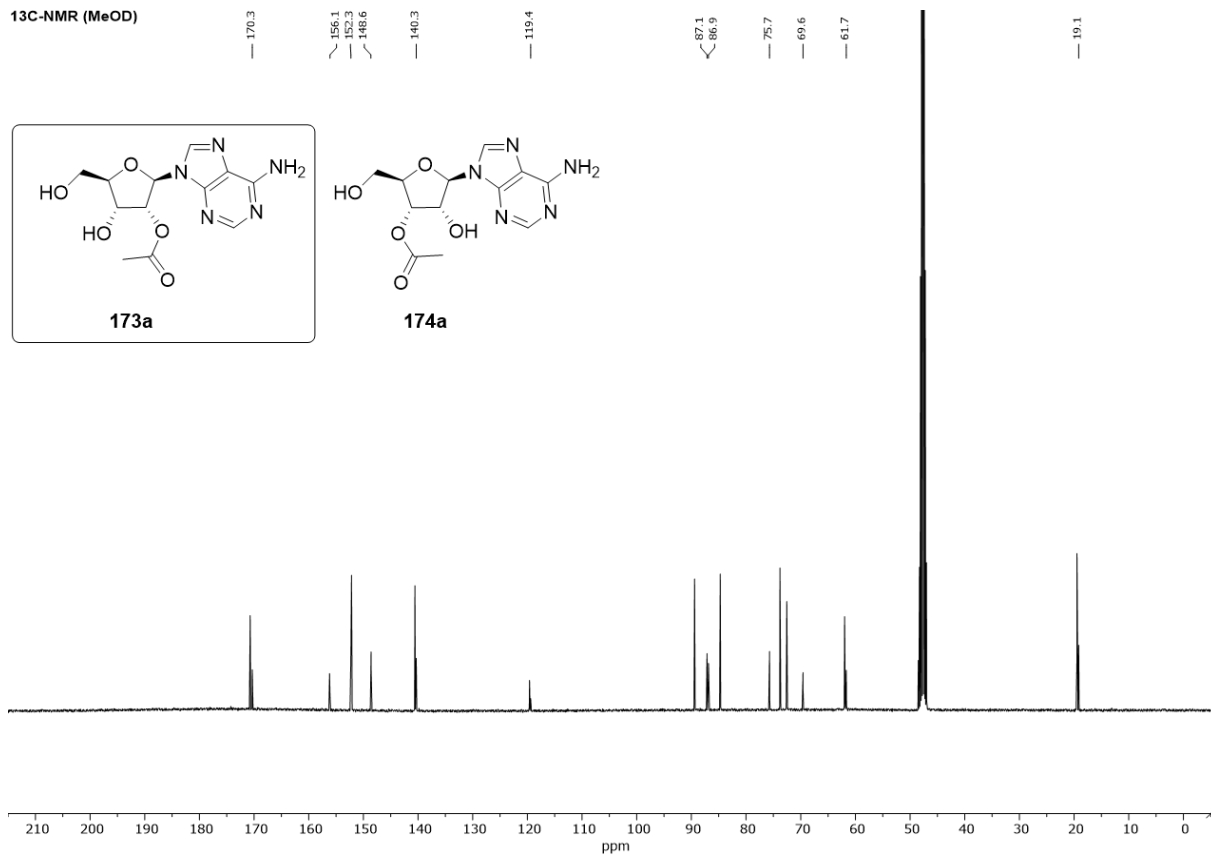


¹H-NMR (CDCl₃)

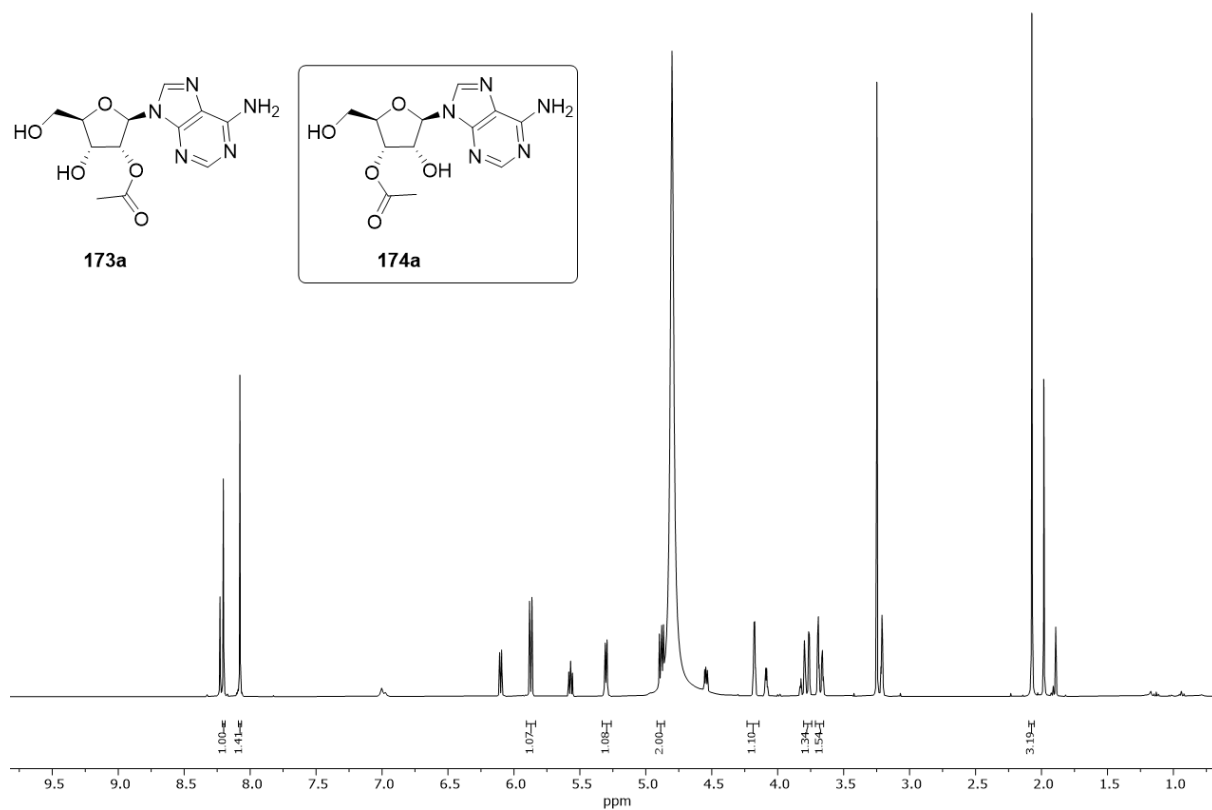


¹³C-NMR (CDCl₃)

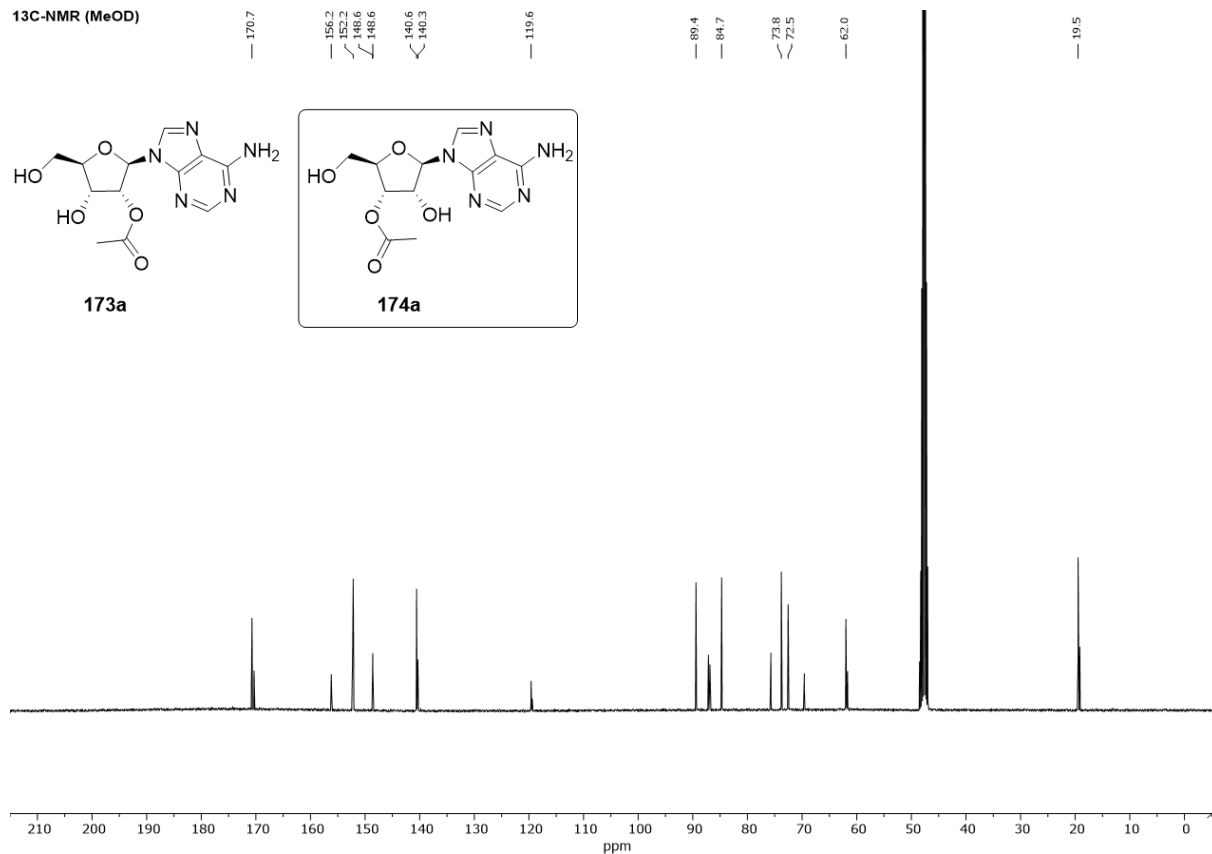


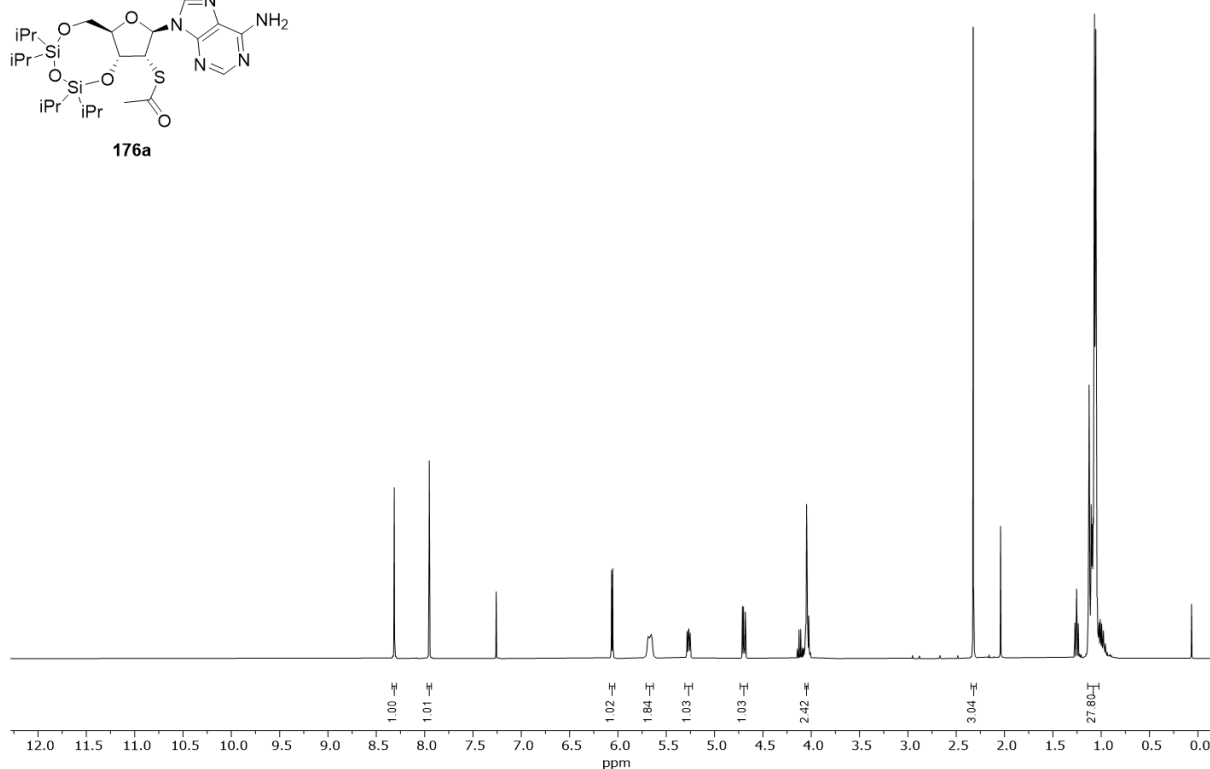
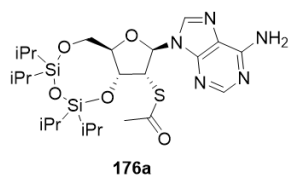
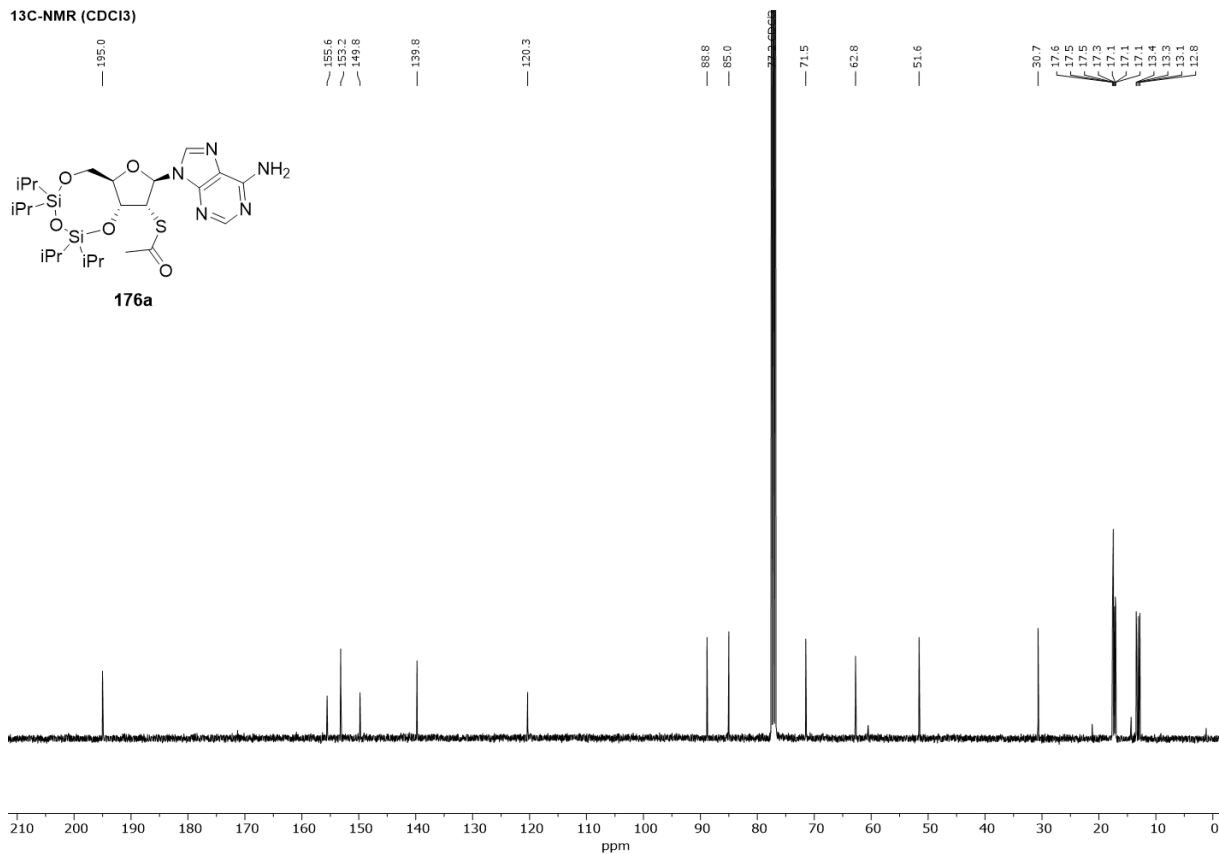
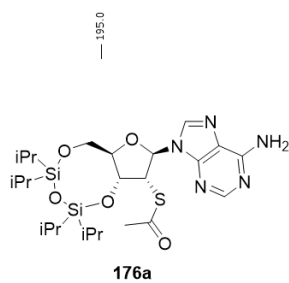
¹H-NMR (MeOD)**¹³C-NMR (MeOD)**

¹H-NMR (MeOD)

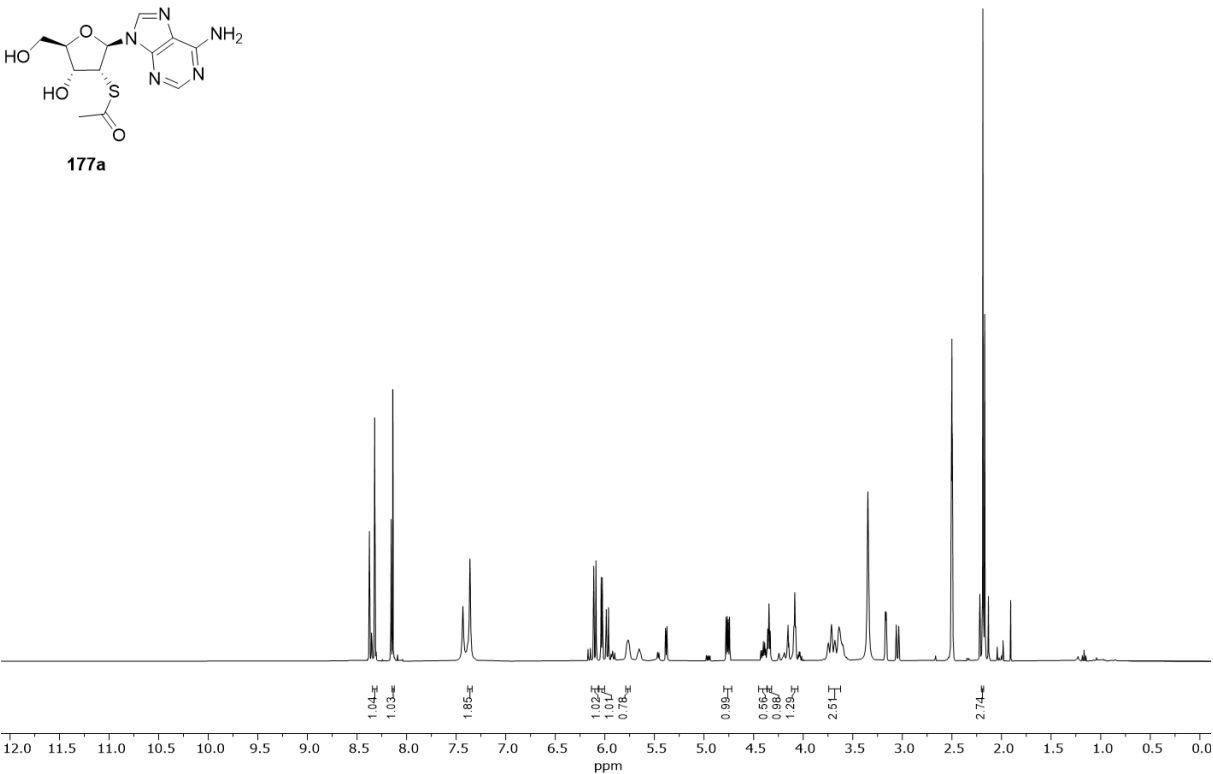


¹³C-NMR (MeOD)

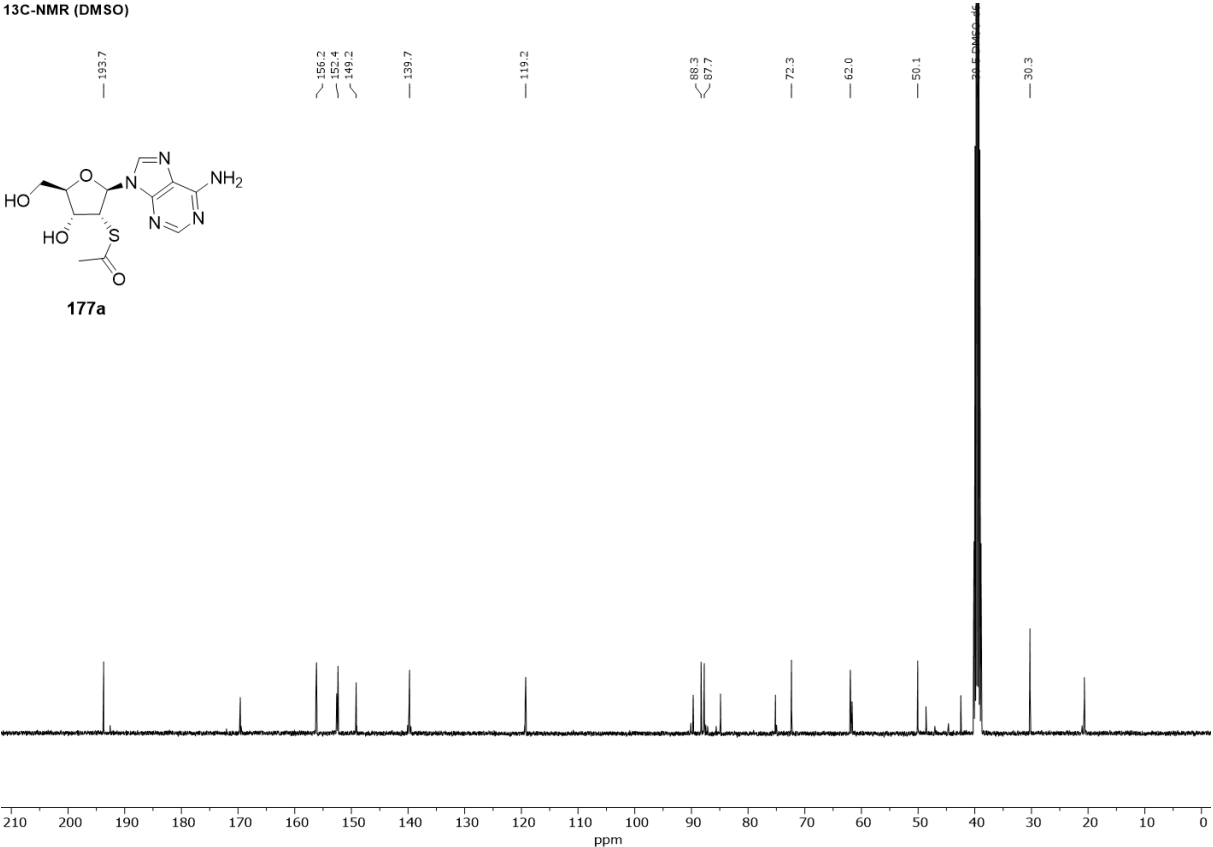


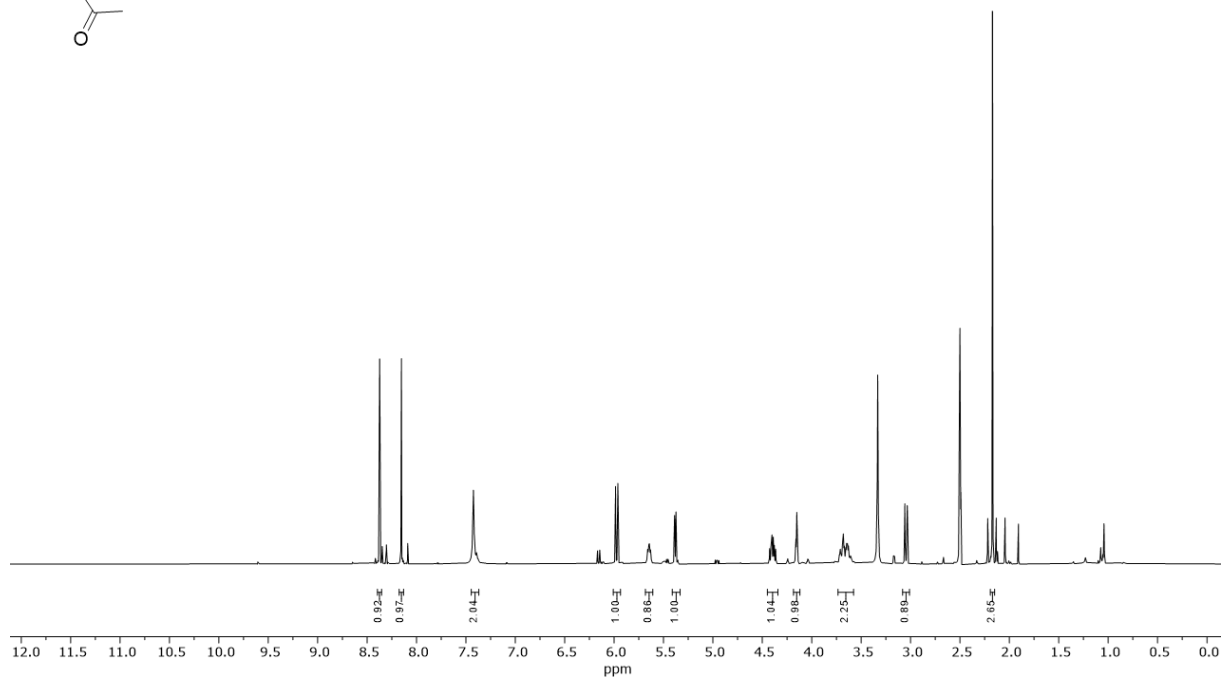
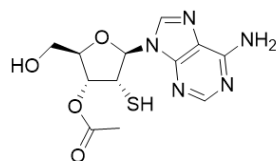
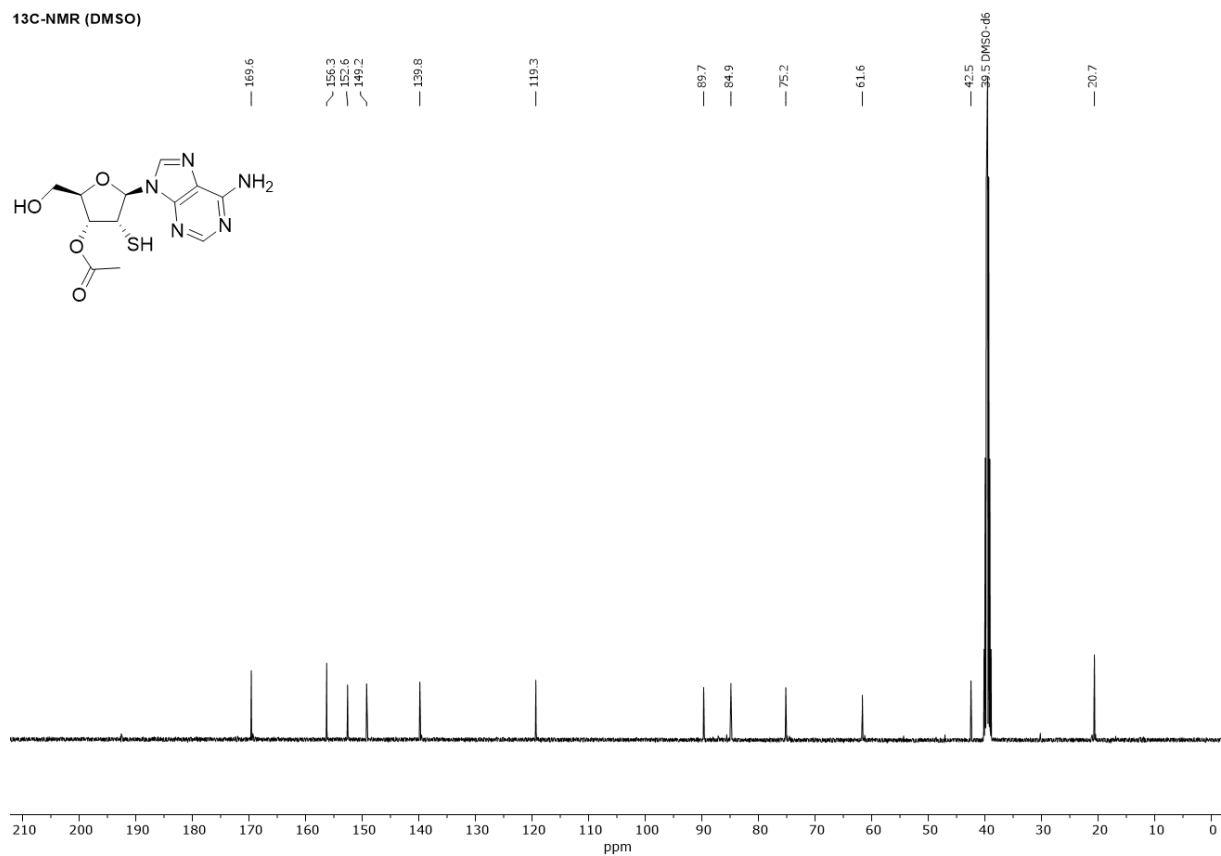
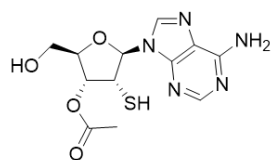
¹H-NMR (CDCl₃)**¹³C-NMR (CDCl₃)**

¹H-NMR (DMSO)

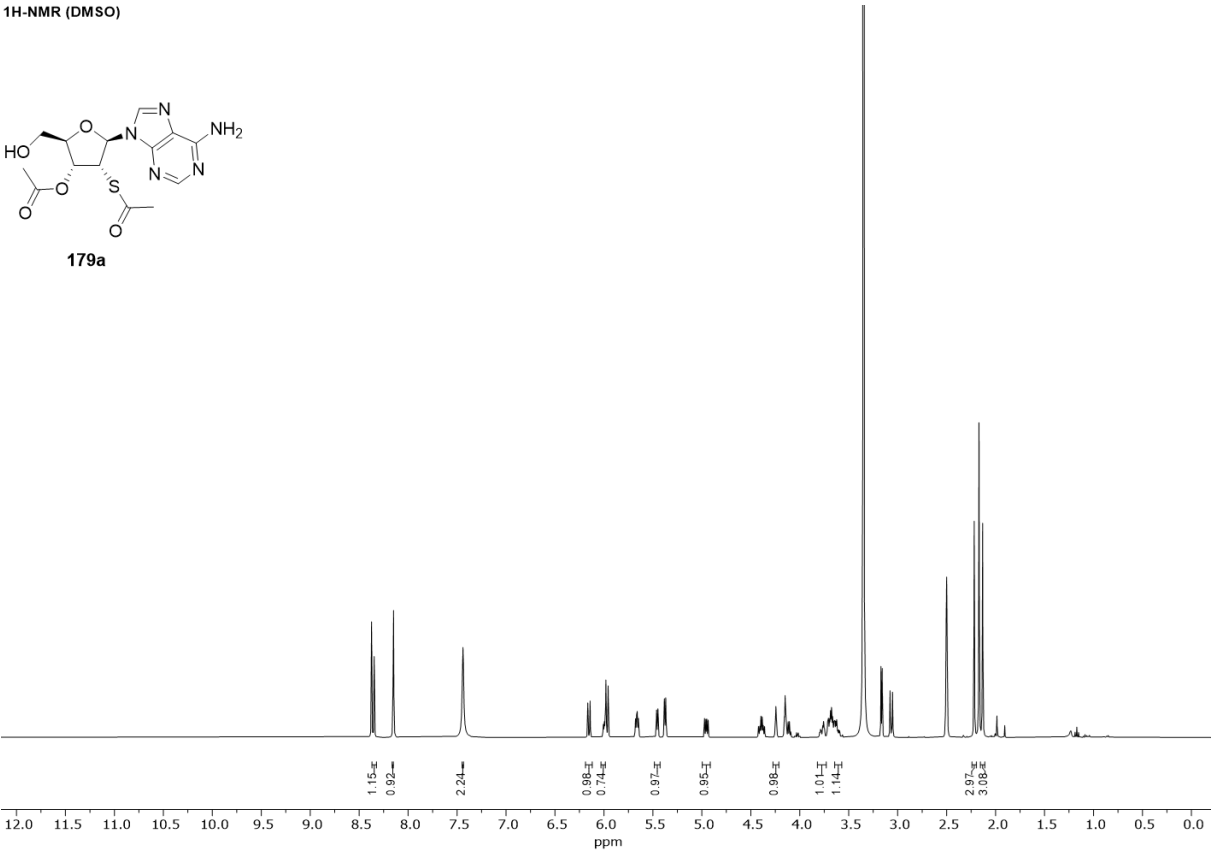
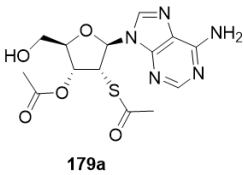


¹³C-NMR (DMSO)

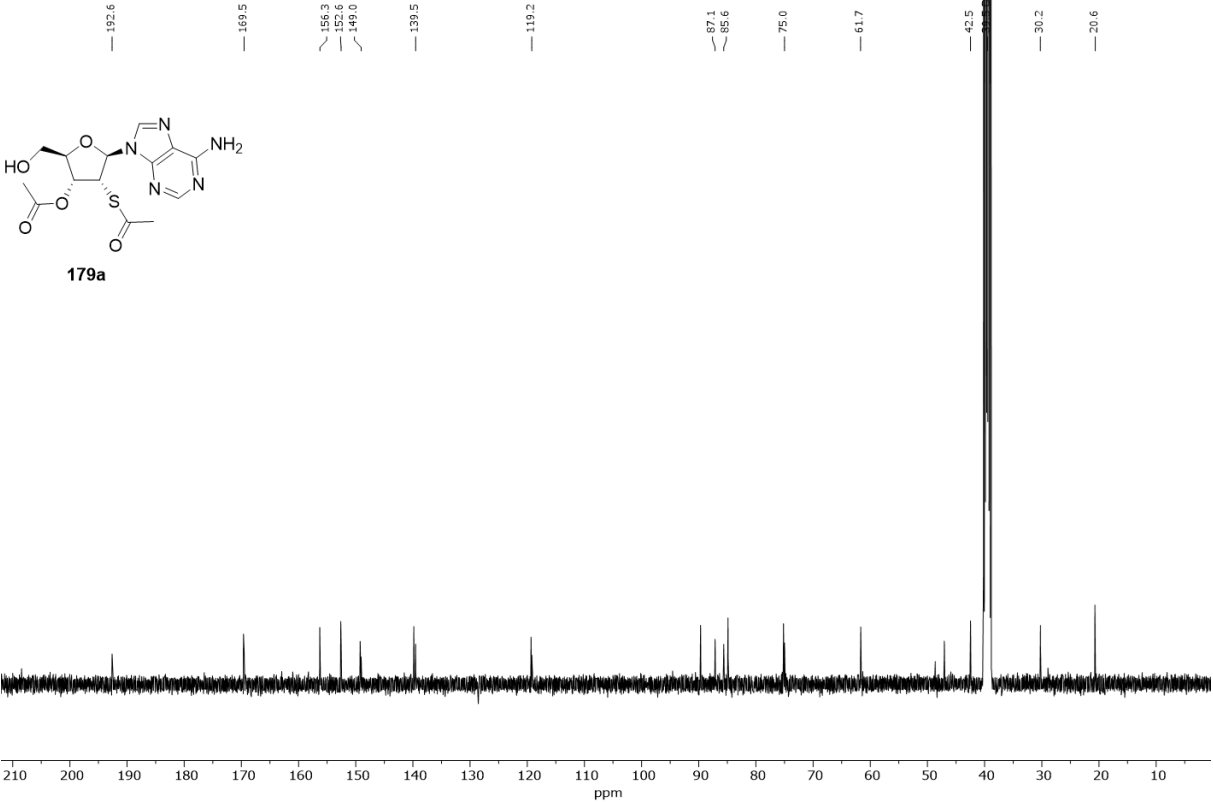


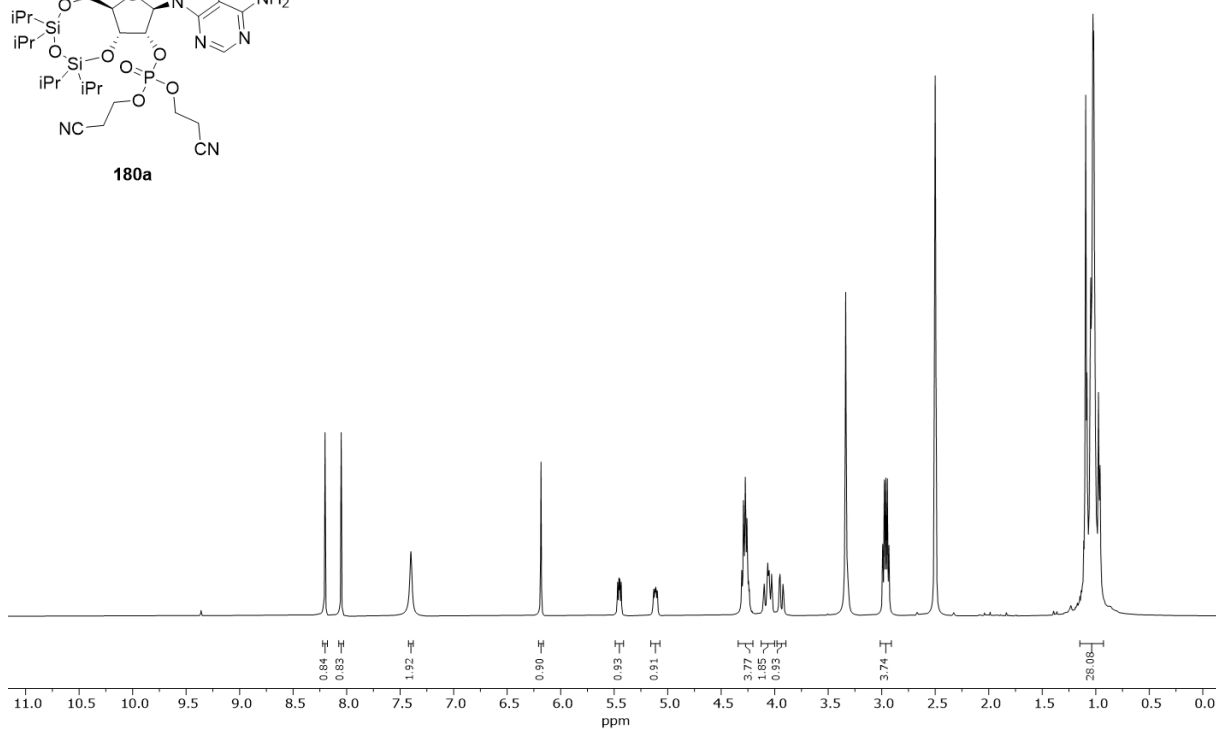
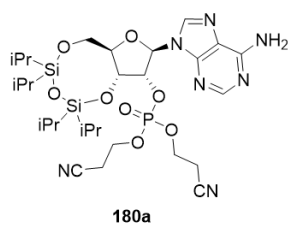
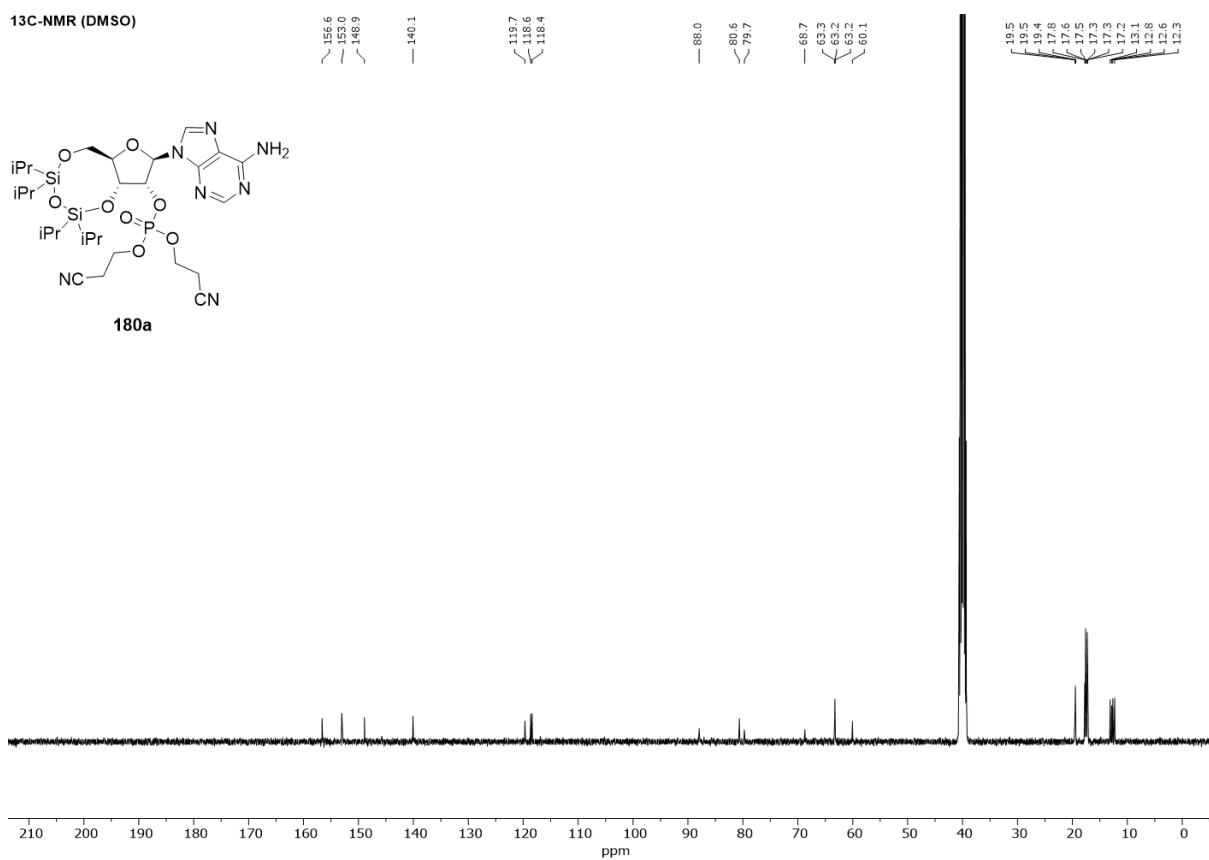
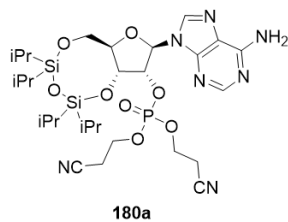
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

¹H-NMR (DMSO)



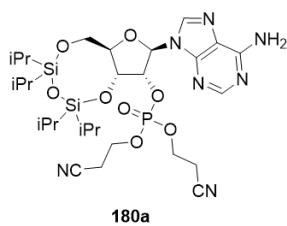
¹³C-NMR (DMSO)



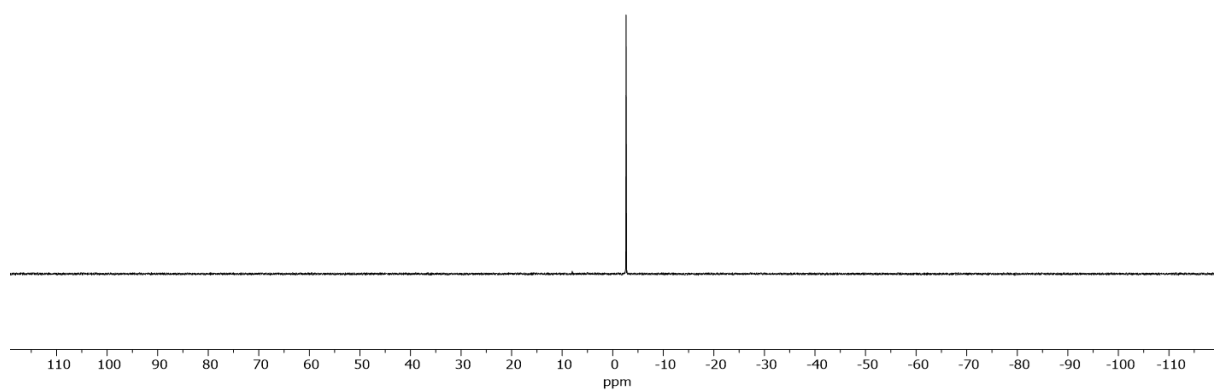
¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

³¹P-NMR (DMSO)

0.6

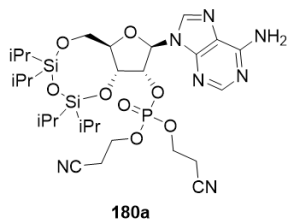


180a

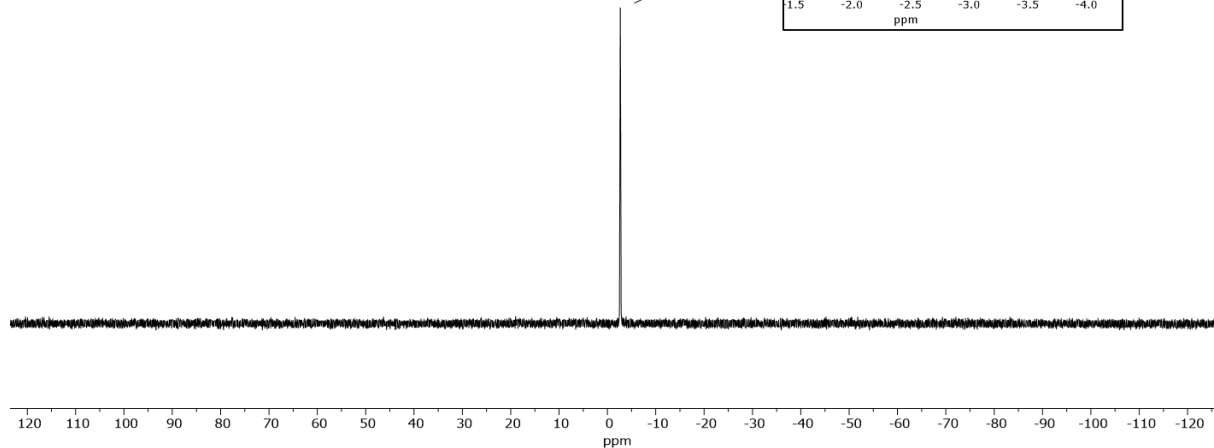
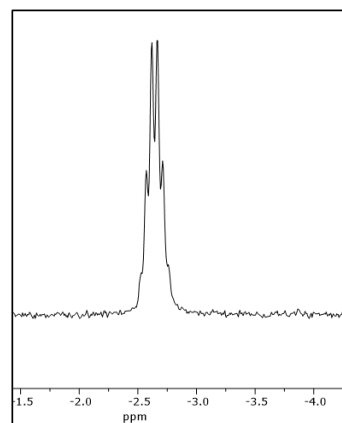


³¹P-NMR (DMSO)

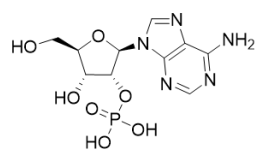
0.6



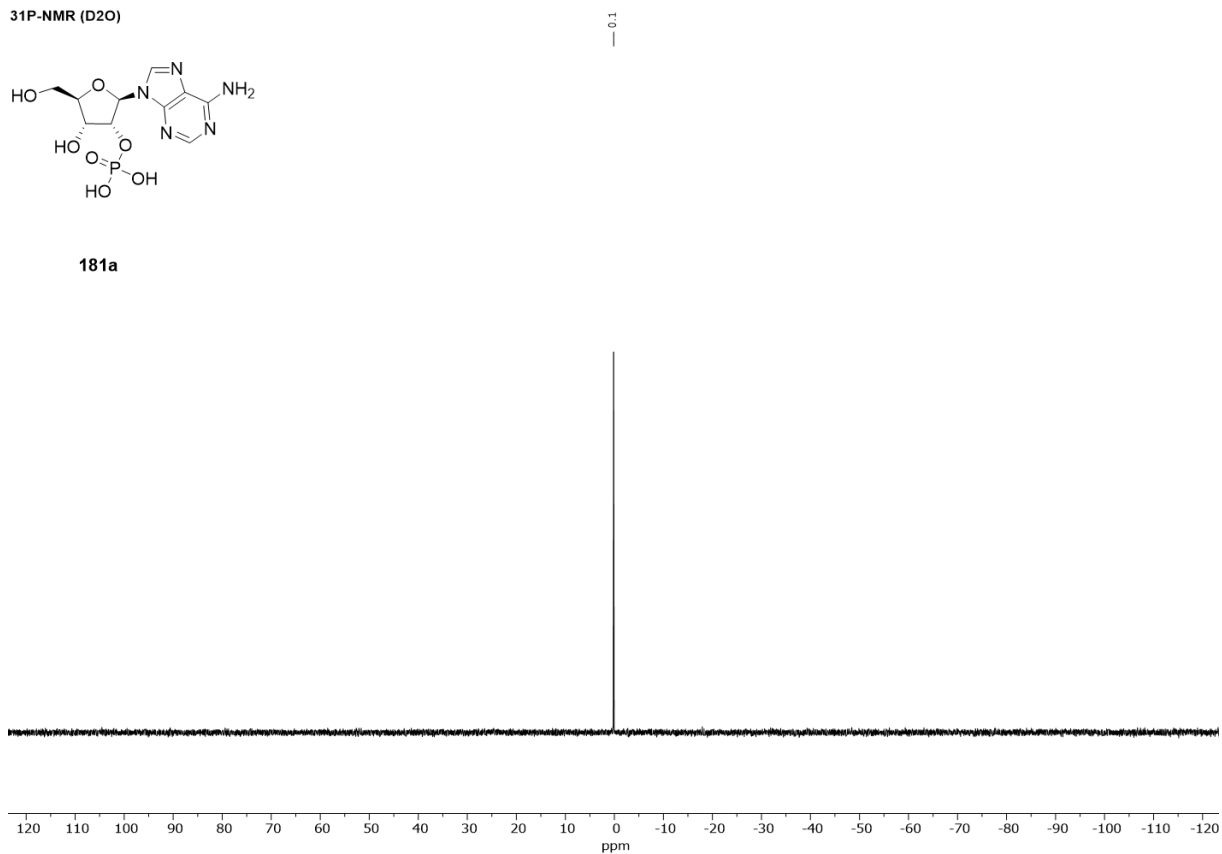
180a



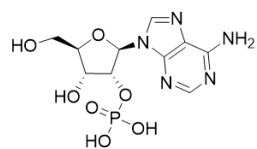
31P-NMR (D2O)



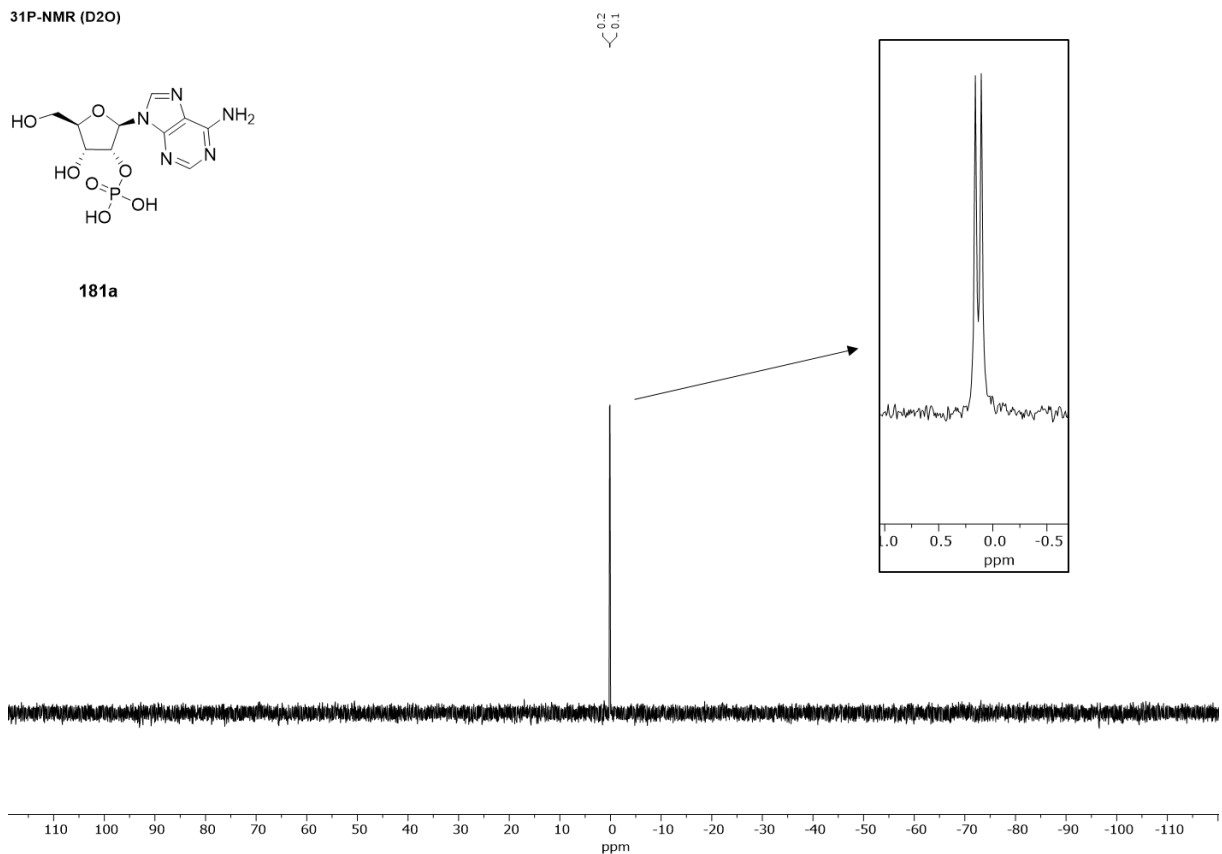
181a



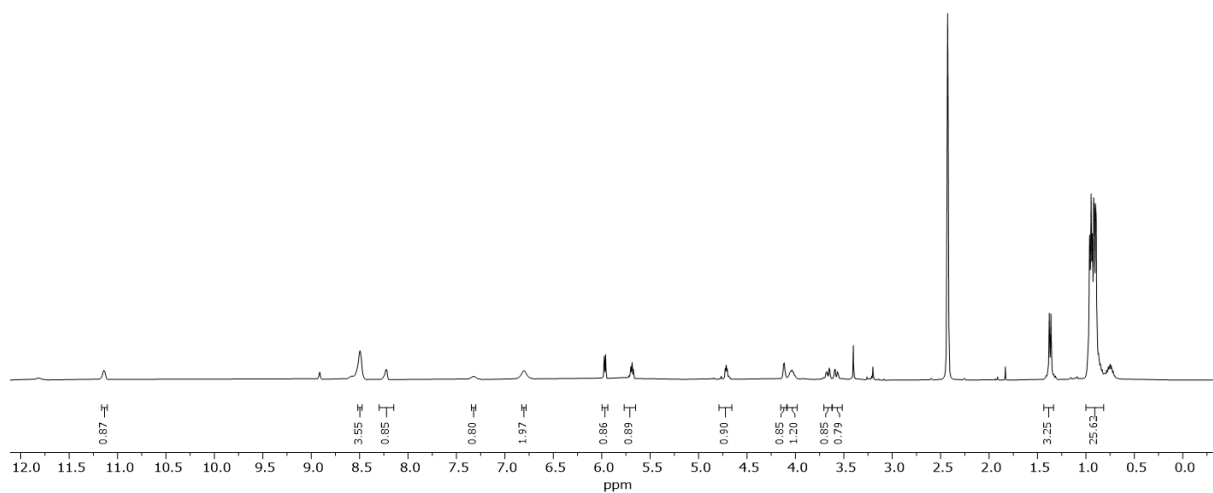
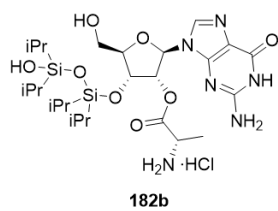
31P-NMR (D2O)



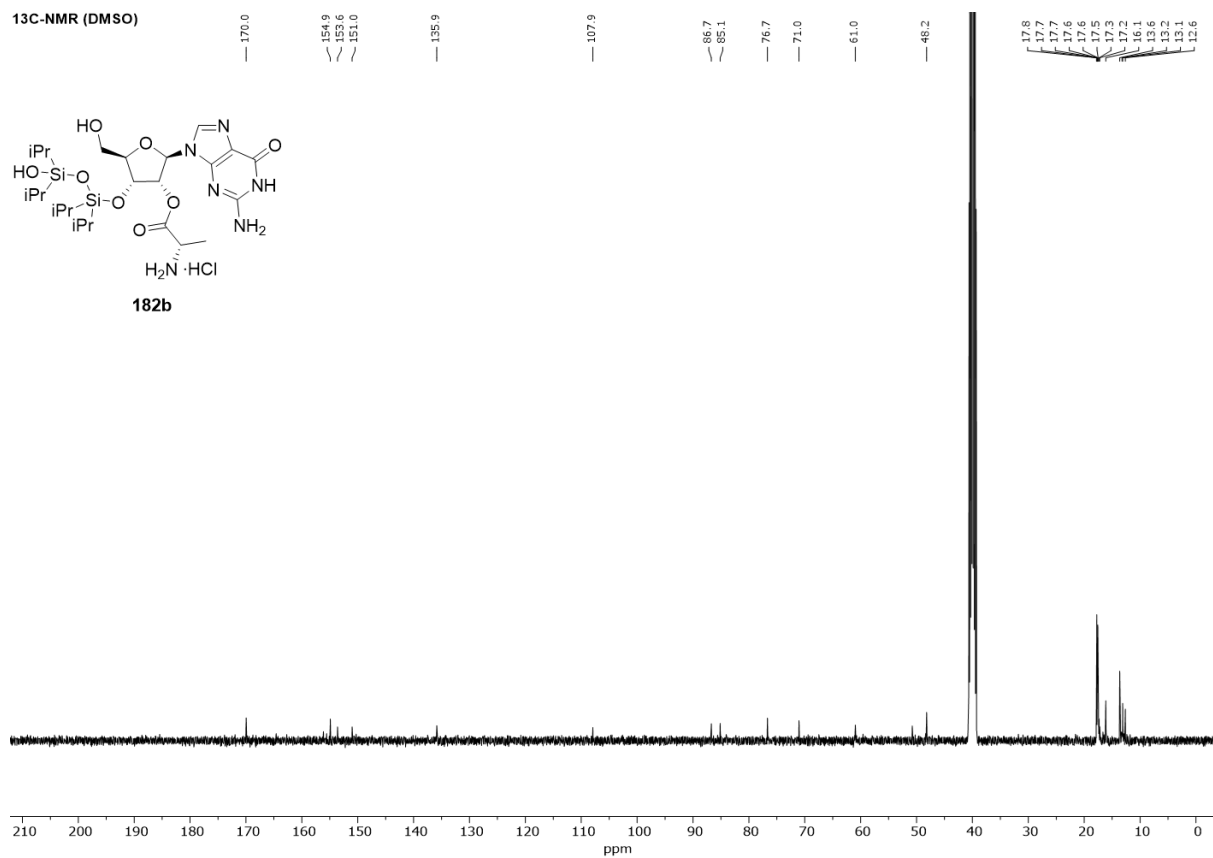
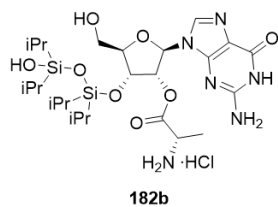
181a

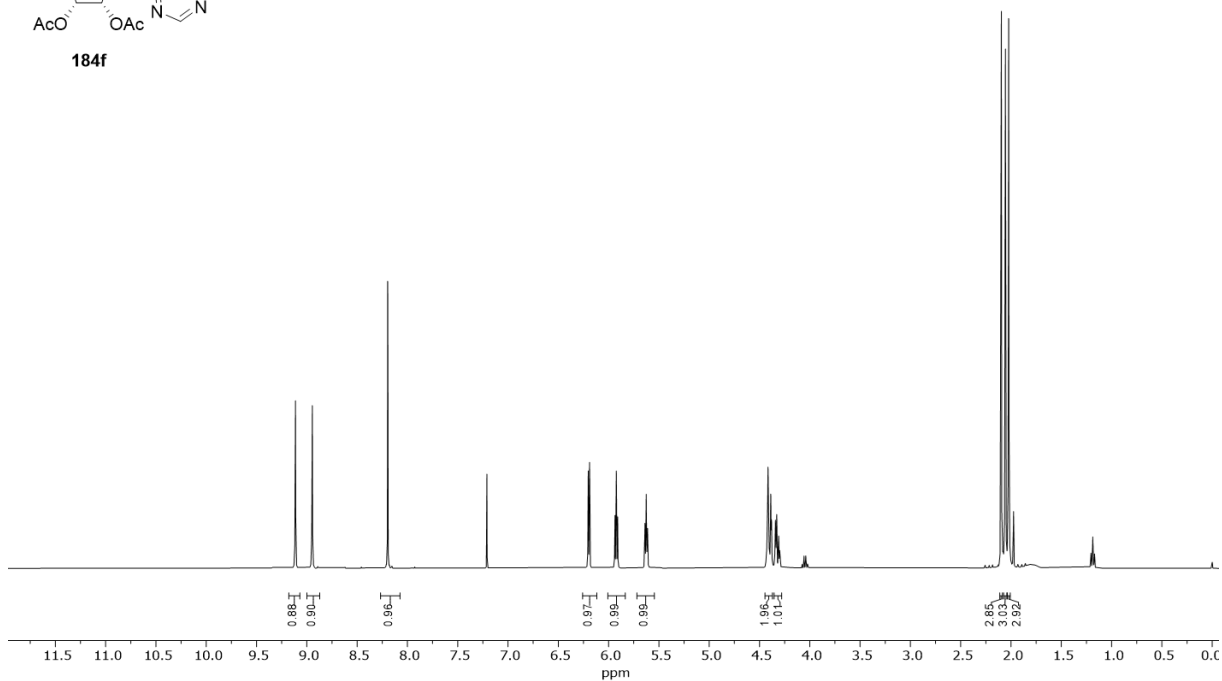
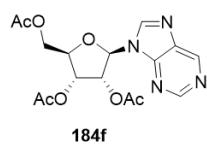
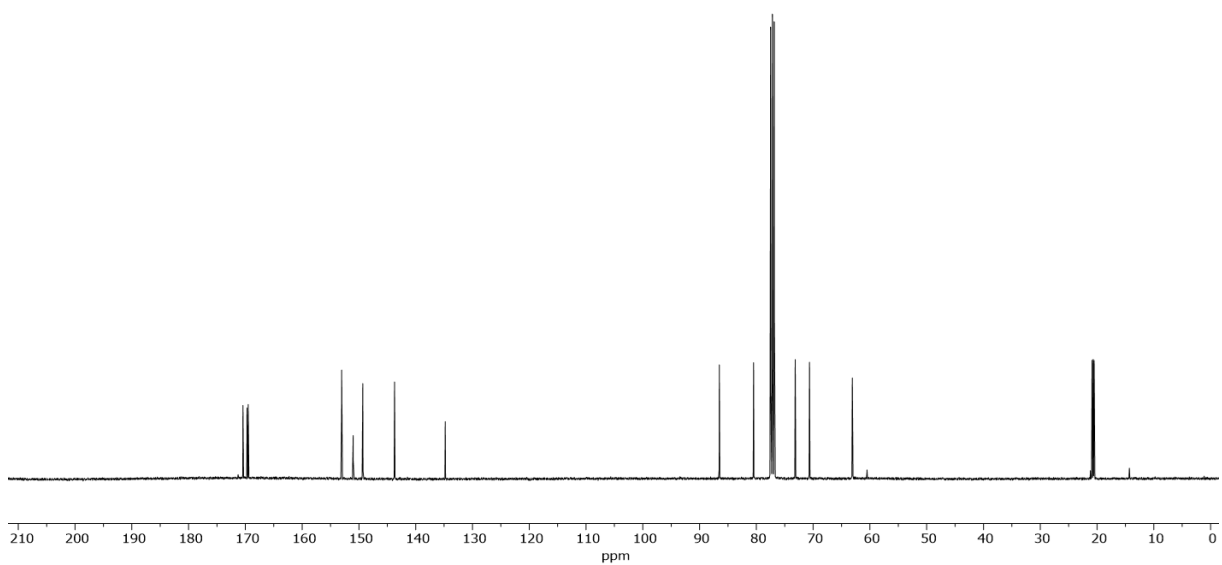
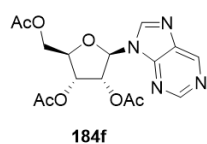


¹H-NMR (DMSO)

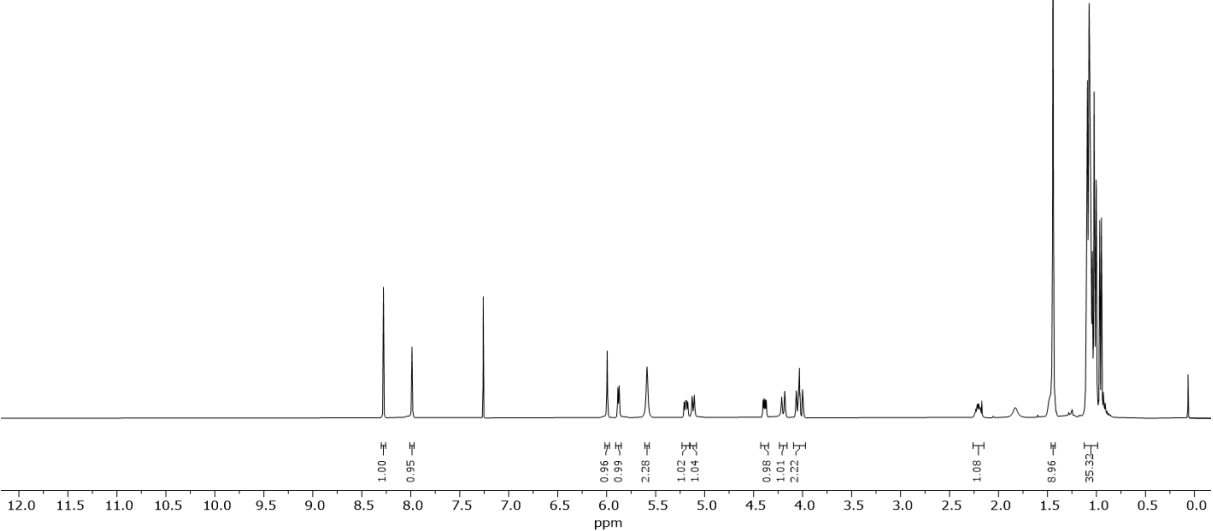
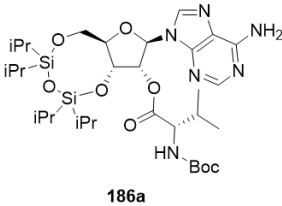


¹³C-NMR (DMSO)

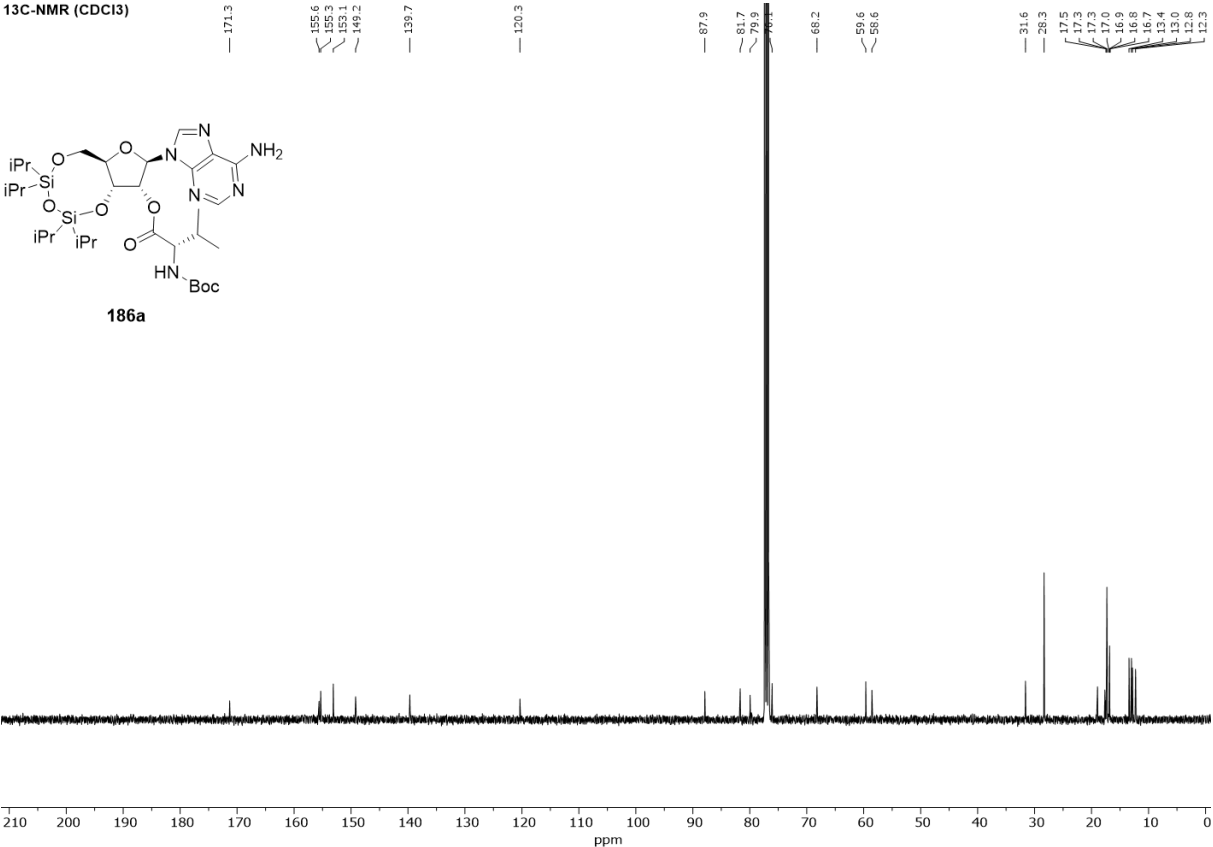


¹H-NMR (CDCl₃)¹³C-NMR (CDCl₃)

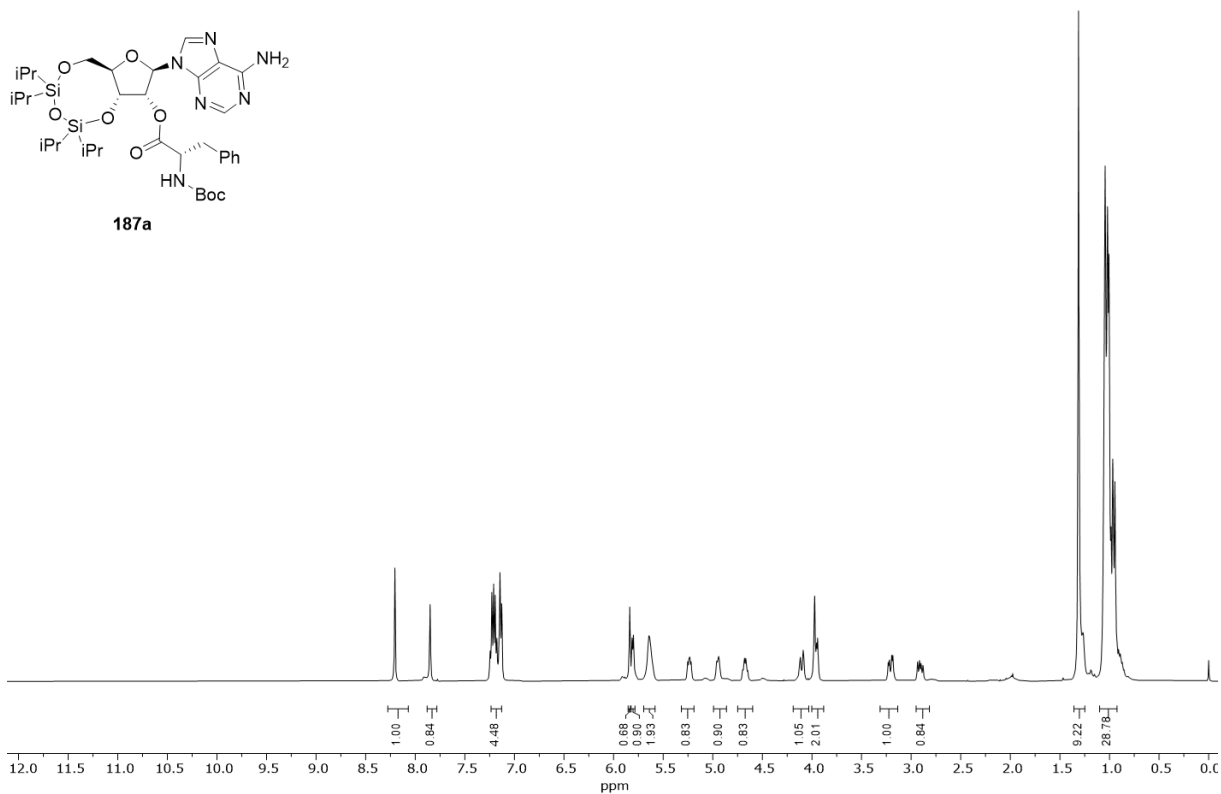
¹H-NMR (CDCl₃)



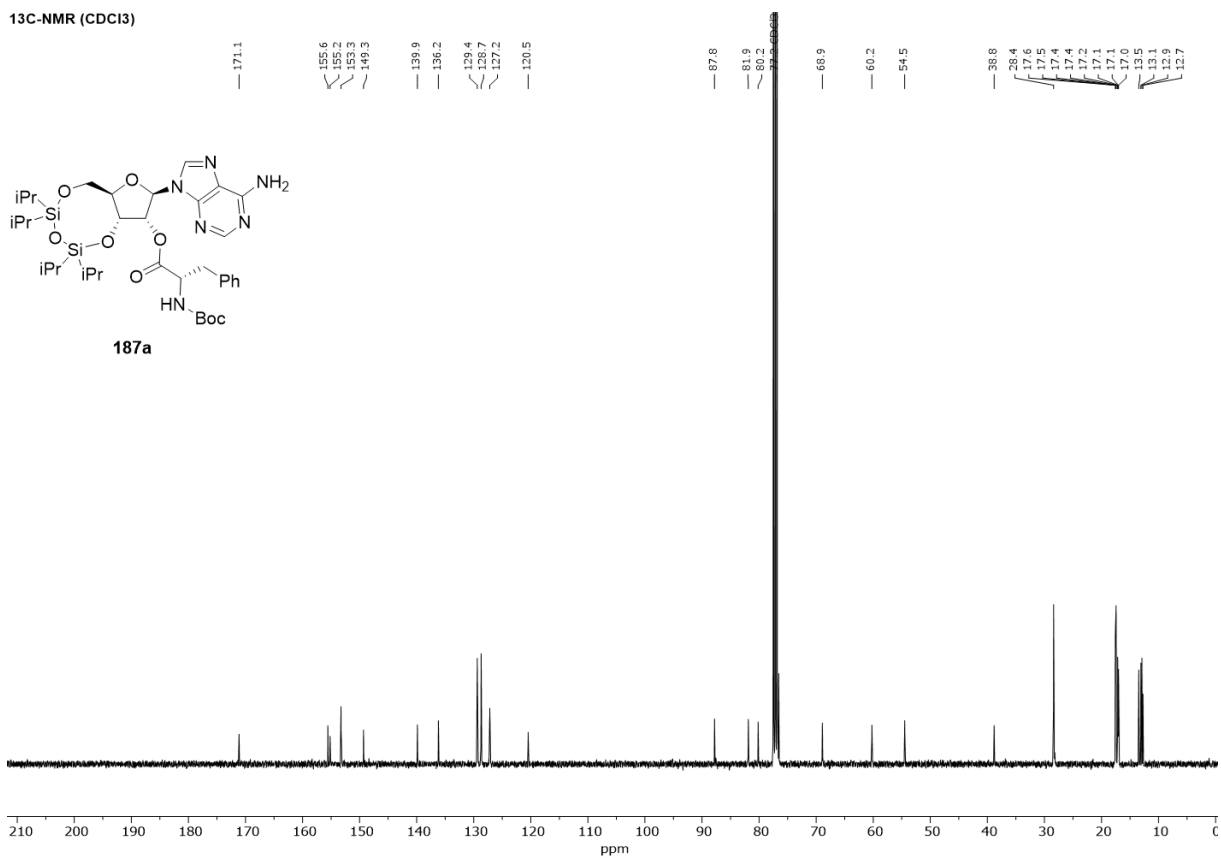
¹³C-NMR (CDCl₃)



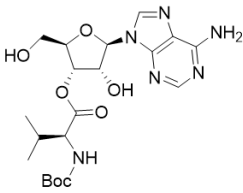
¹H-NMR (CDCl₃)



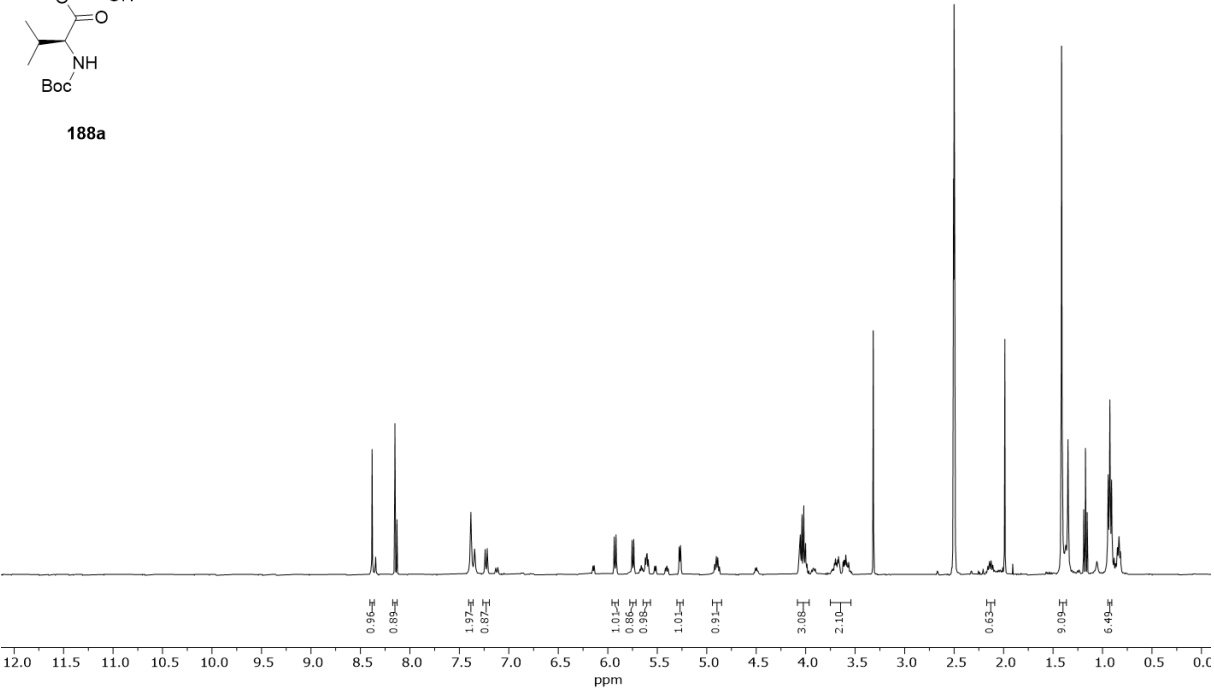
¹³C-NMR (CDCl₃)



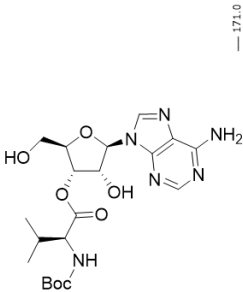
¹H-NMR (dmso)



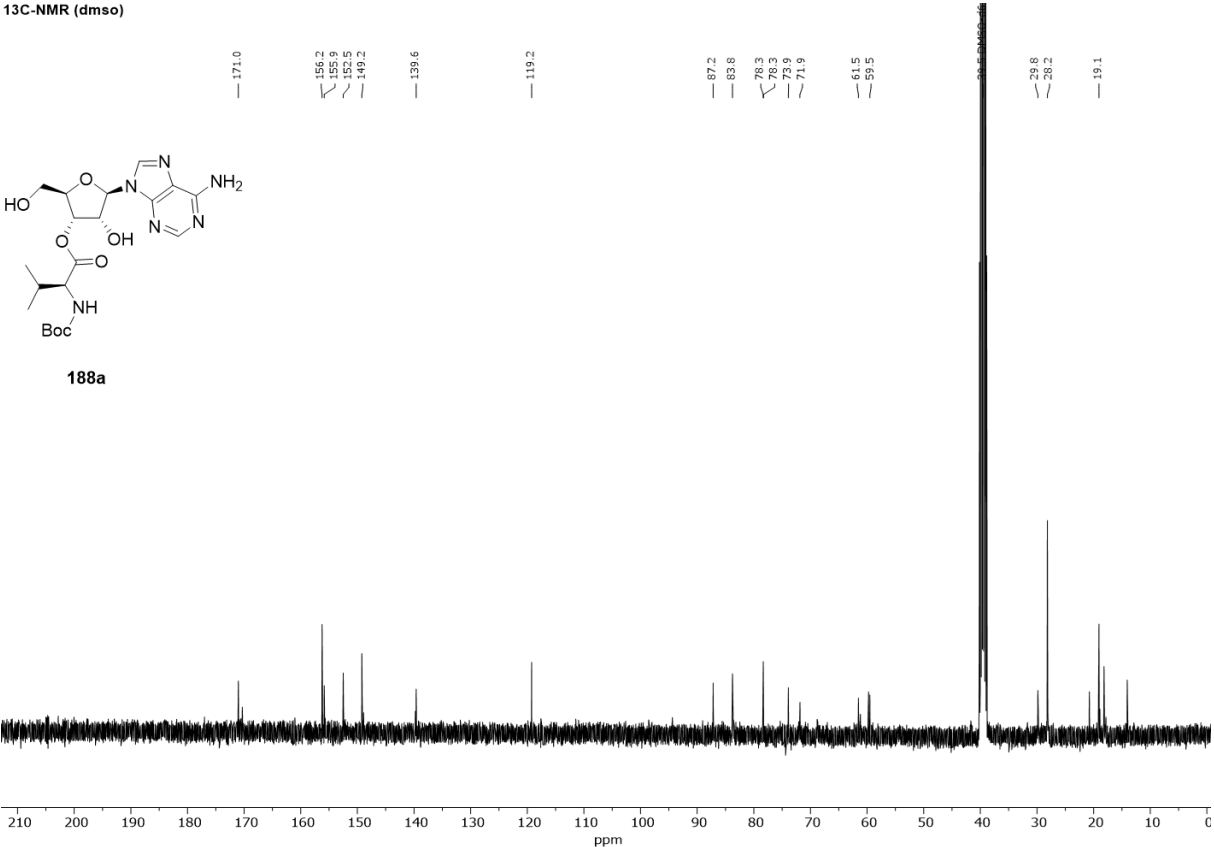
188a

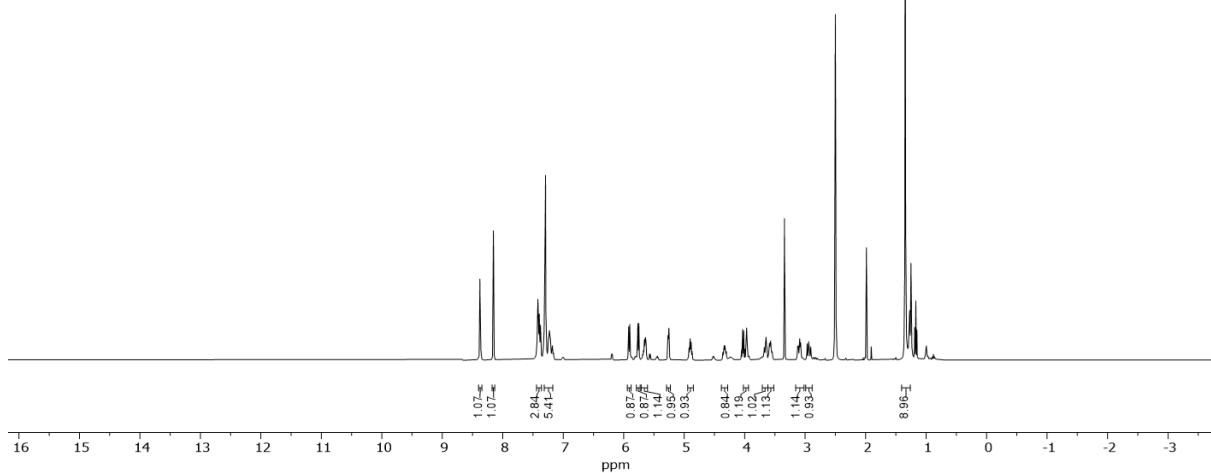
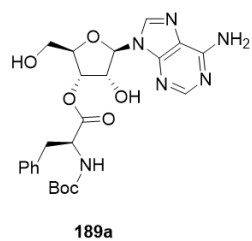
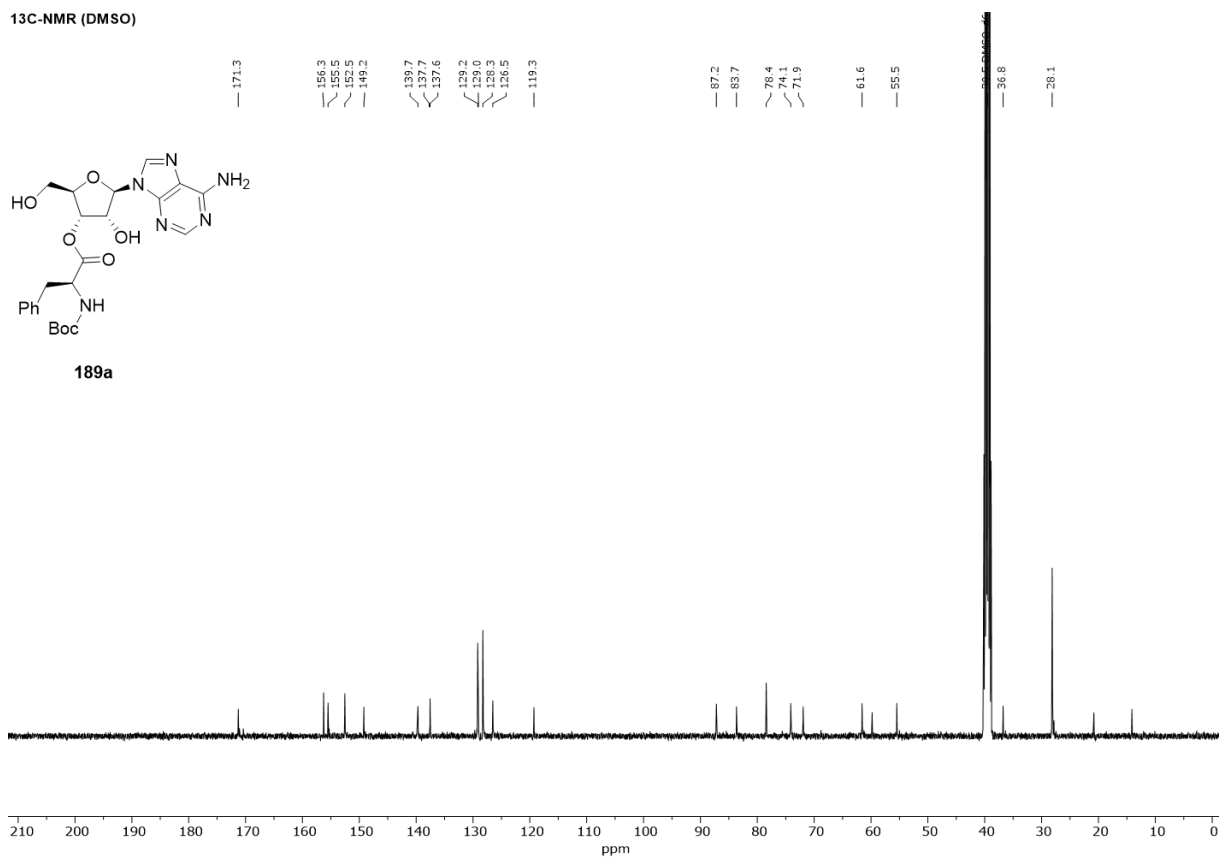
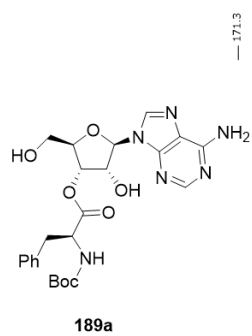


¹³C-NMR (dmso)

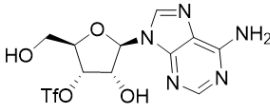


188a

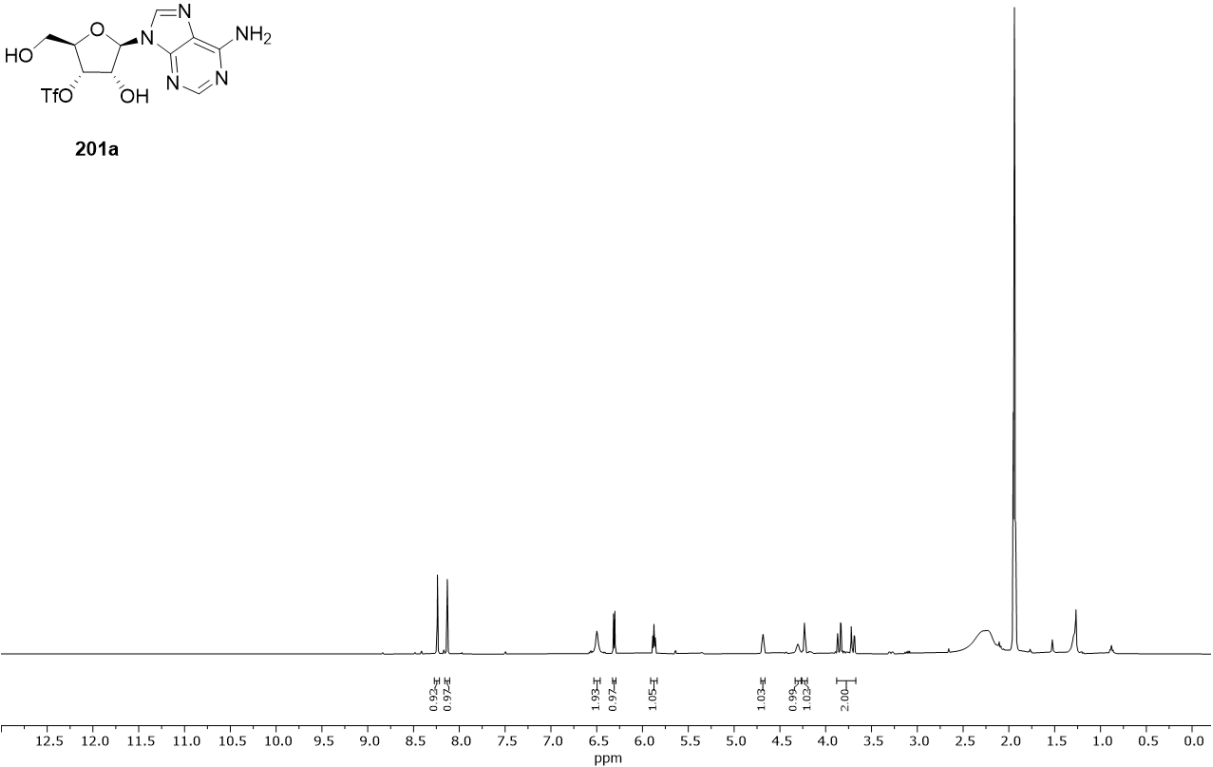


¹H-NMR (DMSO)**¹³C-NMR (DMSO)**

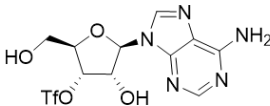
¹H-NMR (CD₃CN)



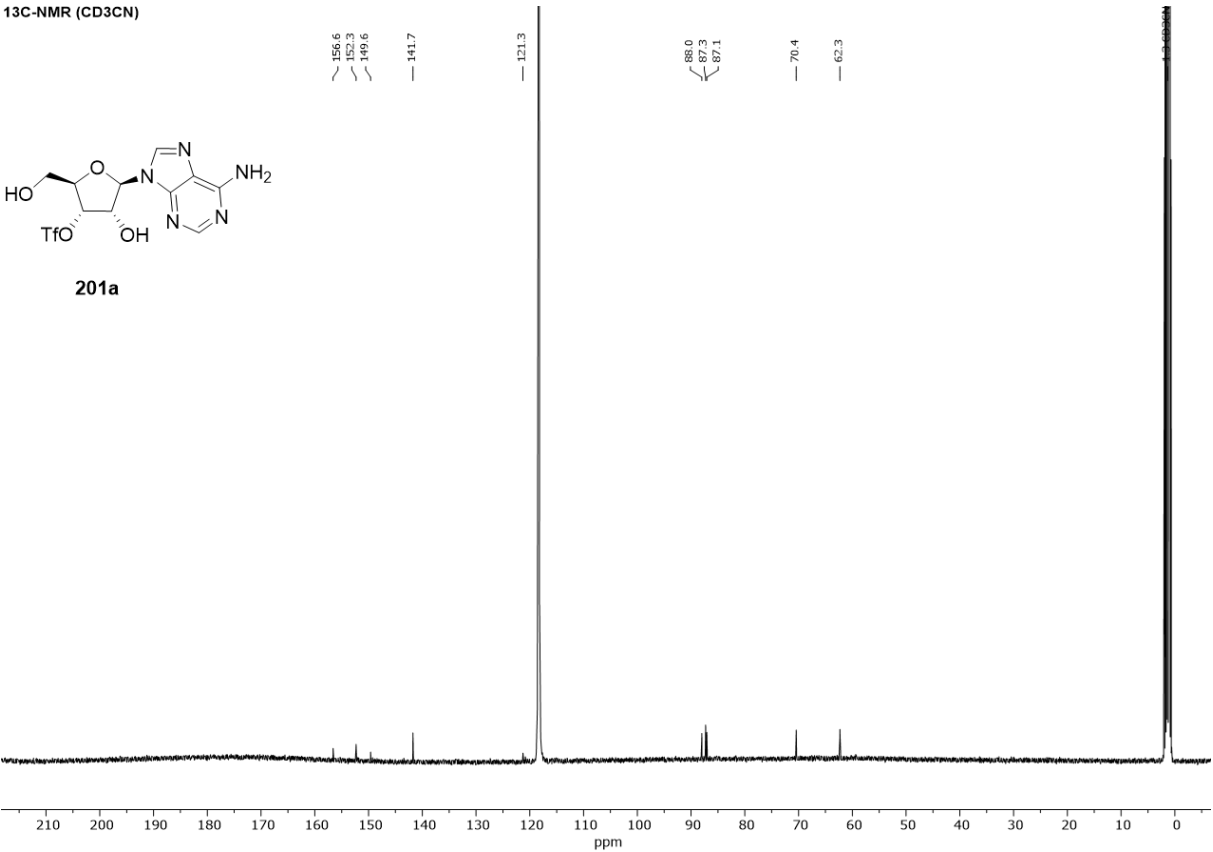
201a

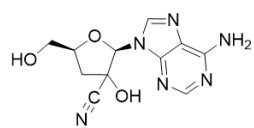
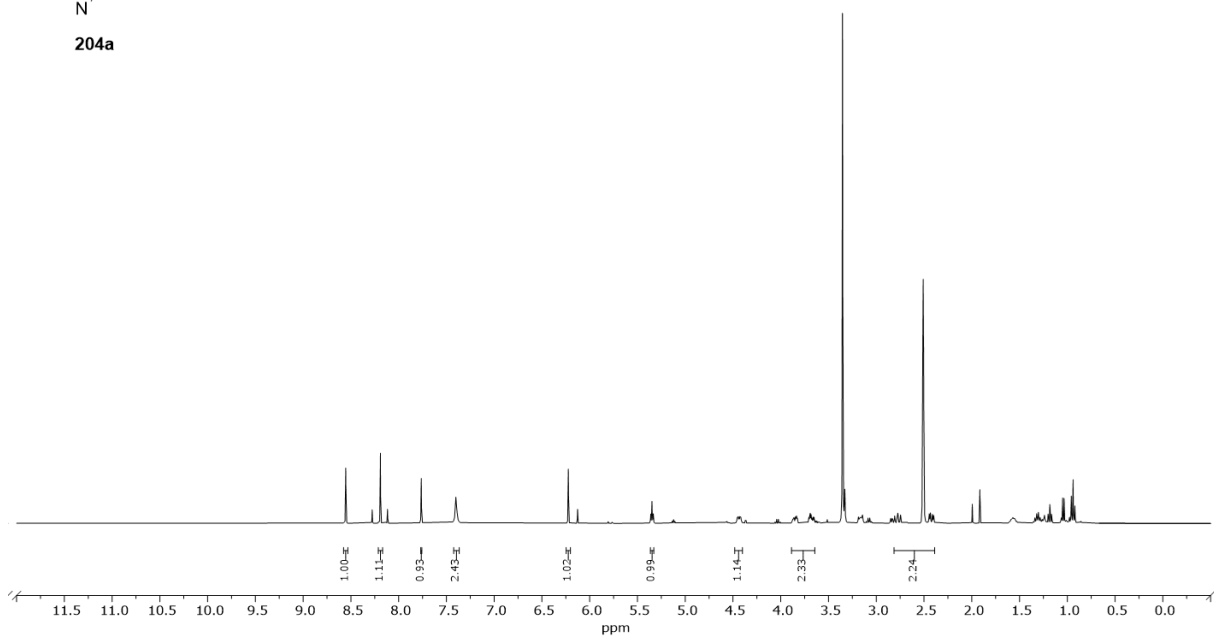
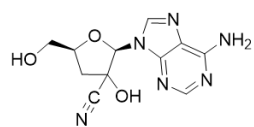
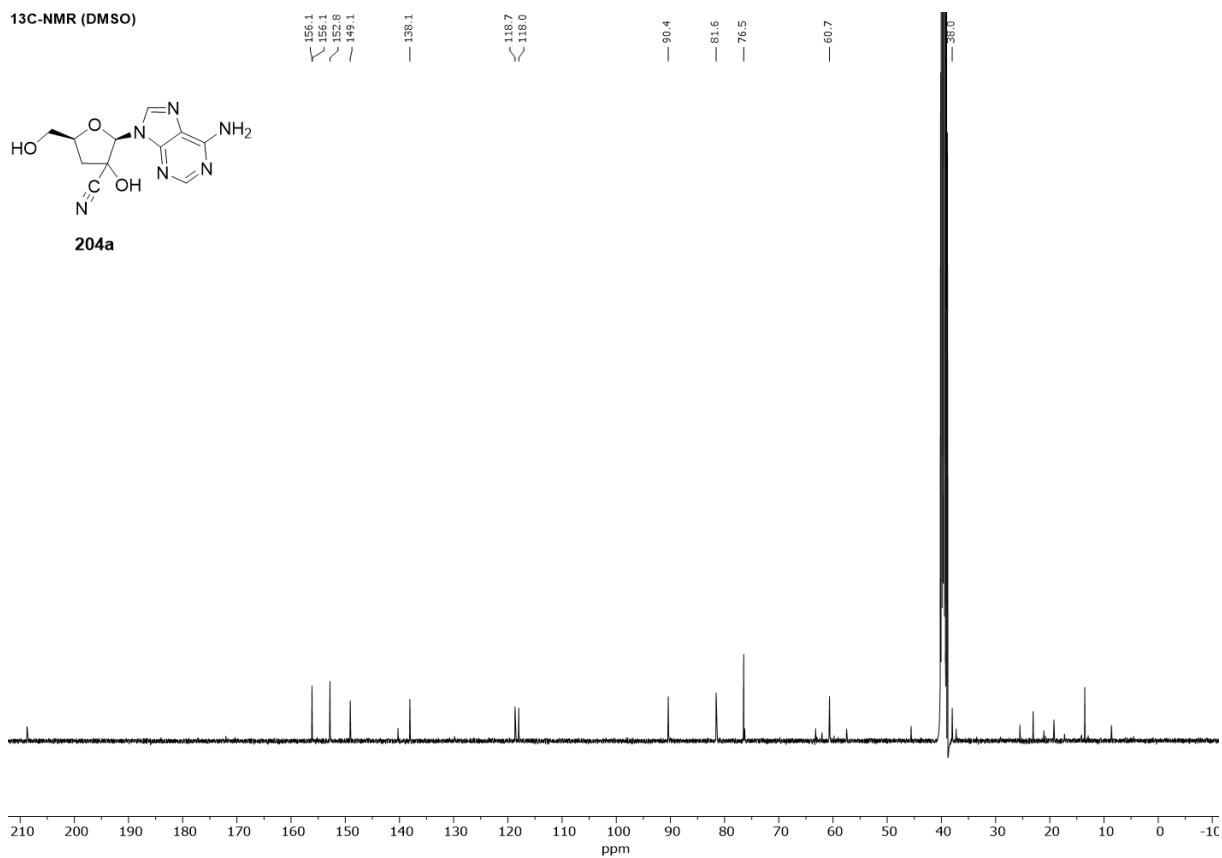


¹³C-NMR (CD₃CN)



201a



¹H-NMR (DMSO)**204a****¹³C-NMR (DMSO)****204a**

7.1.2 Wöhler-Nukleosid Eichgeraden

Biuret-Nukleoside

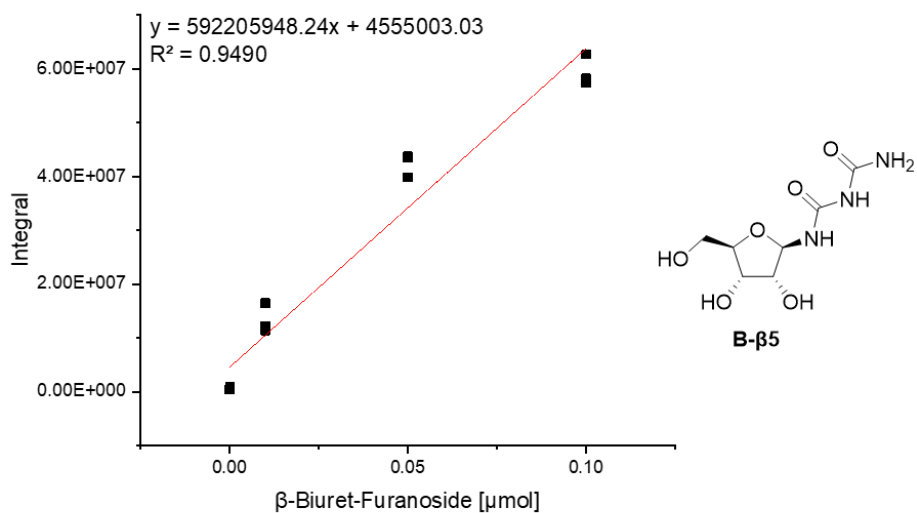


Figure 1. Calibration curve of **B-β5**.

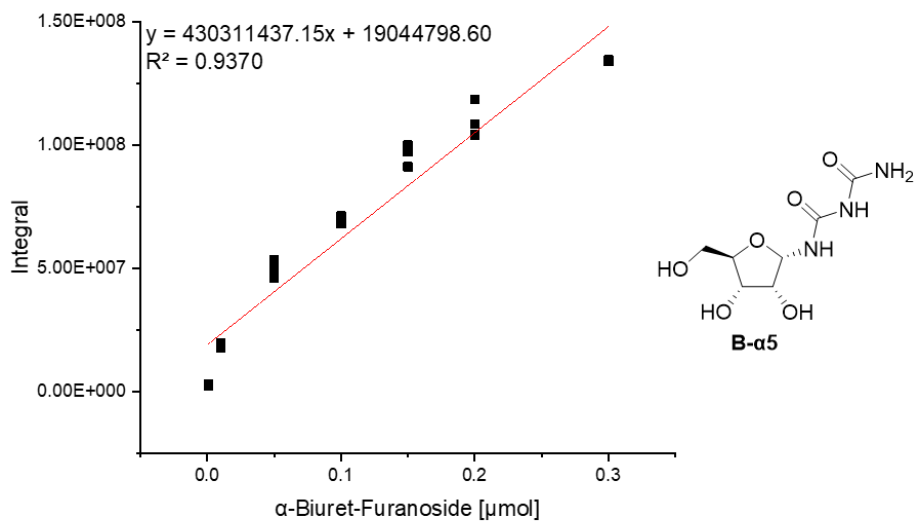
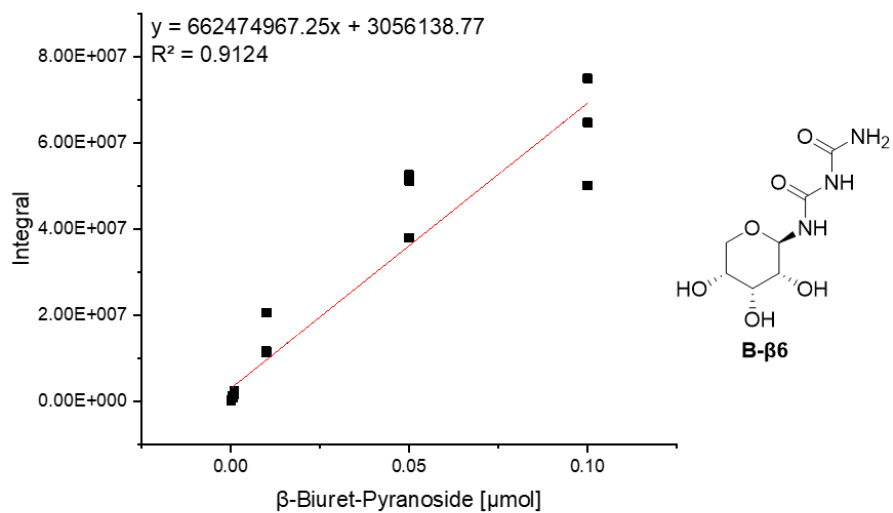
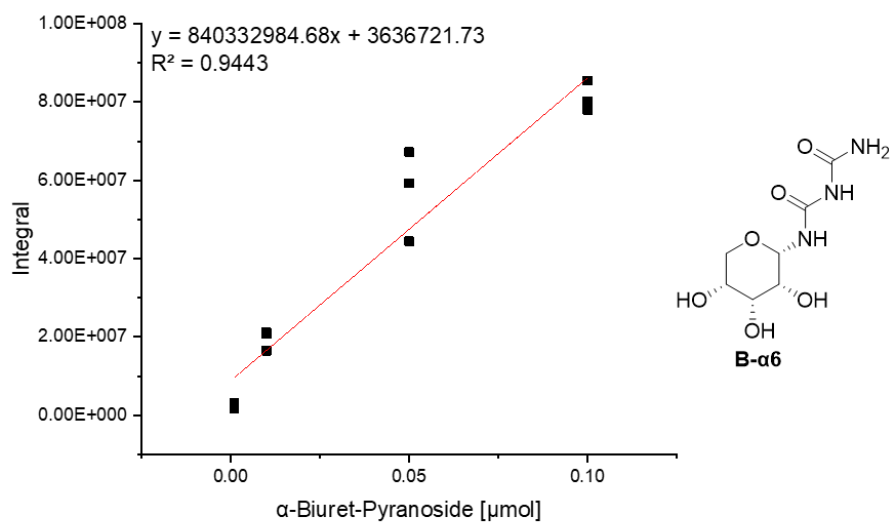


Figure 2. Calibration curve of **B-α5**.

Figure 3. Calibration curve of **B-β6**.Figure 4. Calibration curve of **B-α6**.

Triuret-Nukleoside

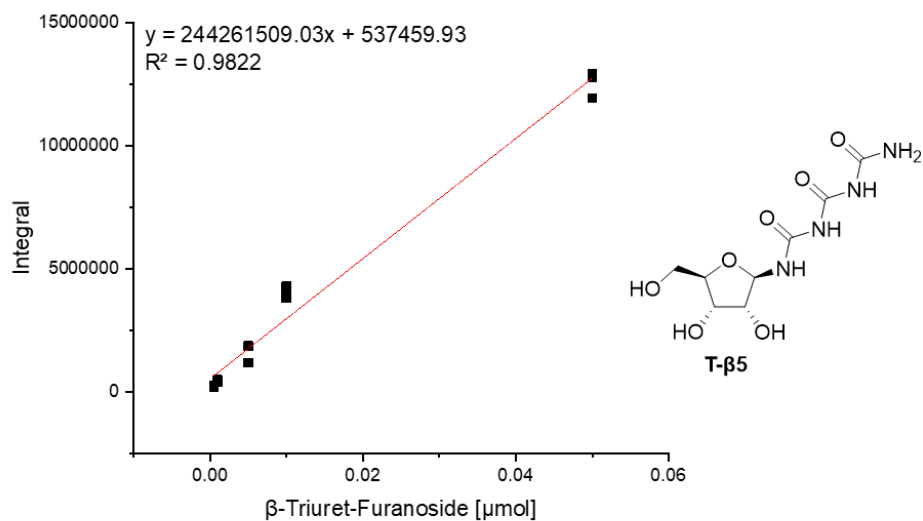


Figure 5. Calibration curve of T-β5.

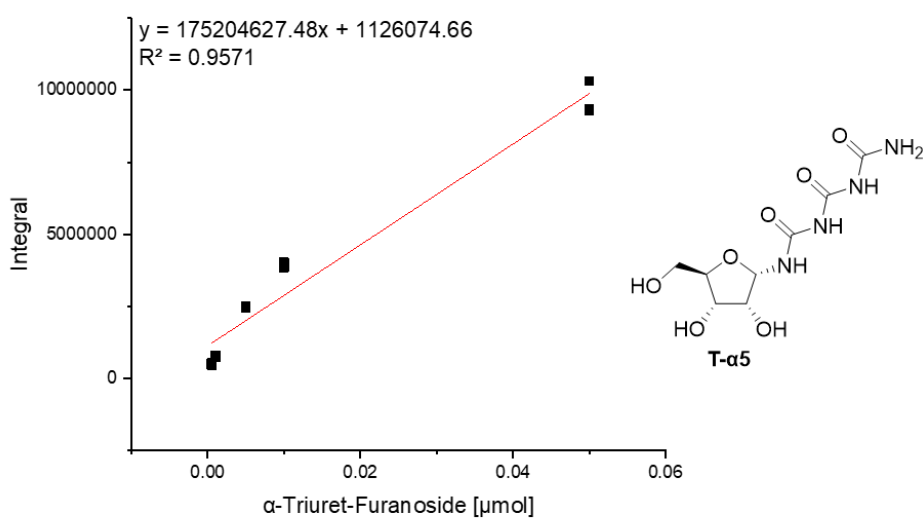


Figure 6. Calibration curve of T-α5.

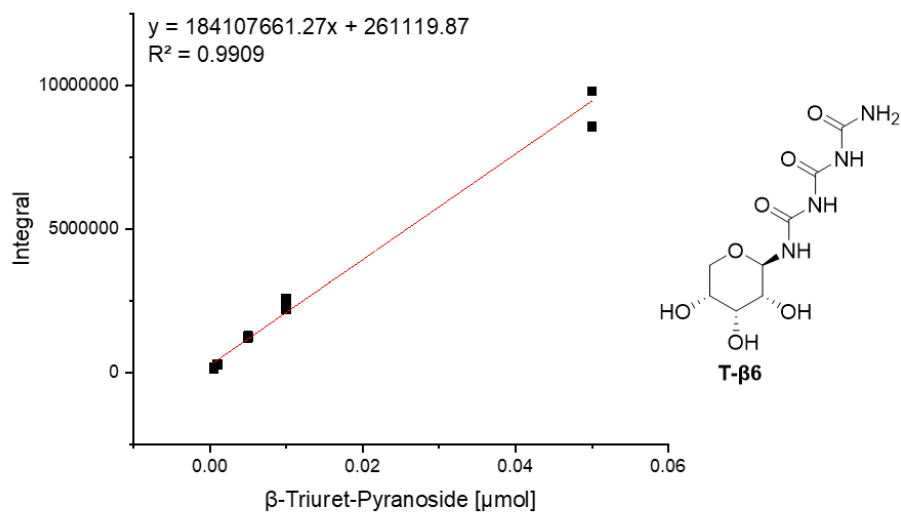


Figure 7. Calibration curve of T-β6.

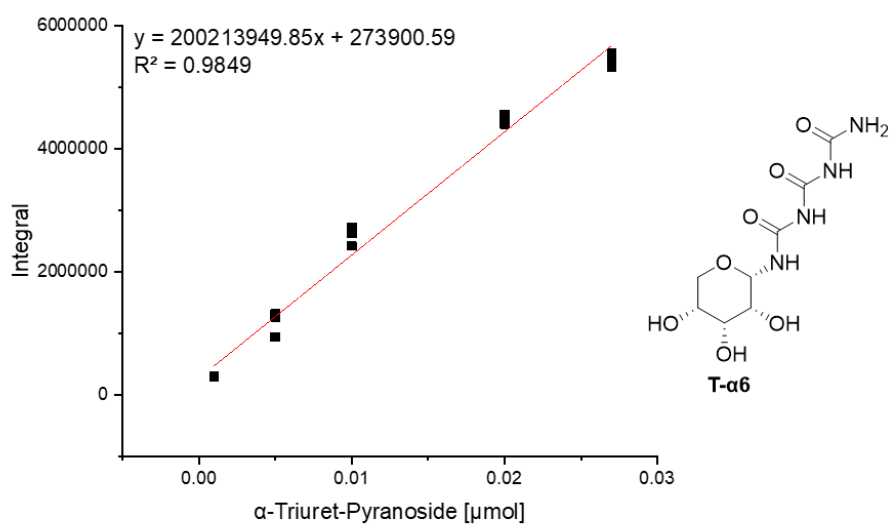


Figure 8. Calibration curve of T-α6.

7.1.3 Biomimetische Estermigration DFT Rechnungen

DFT calculations regarding the stability of 2'- and 3'-acylated adenosines in the 2'-3' acyl migration were performed to receive the optimized single point energies for both regioisomers utilizing ORCA 6.0.0.^[250-258]

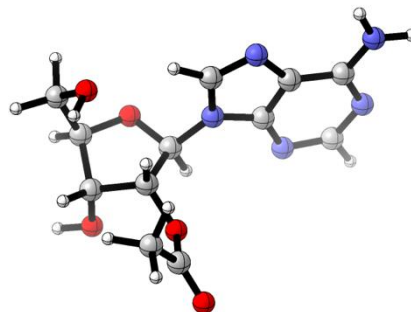
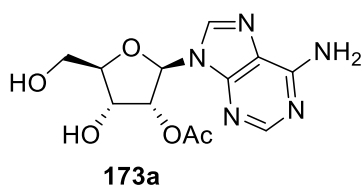
All structures were optimized applying the following command line:

```
! B3LYP[259] def2-SVP[260] def2/J D3BJ TIGHTSCF CPCM(THF) Opt Freq
```

For all calculations regarding the optimized structures the input as well as the corresponding output files are attached as additional files to the supplementary information. For all calculation no imaginary frequencies were obtained.

All visualizations of calculated structures were obtained utilizing CYLview20.

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetate (**173a**)



Cartesian coordinates (Angstroem)

N	-1.006706	11.413716	7.581210
C	-0.124761	10.533358	8.073557
N	0.950464	10.017939	7.472555
C	1.102025	10.487190	6.228973
C	0.266869	11.408246	5.579085
C	-0.843361	11.879439	6.325700
N	2.087780	10.187640	5.309622
C	1.808812	10.935649	4.176093
N	0.730054	11.672928	4.301951
N	-1.727656	12.763508	5.829381
C	4.718114	7.769272	4.481414
C	3.224068	8.091314	4.568833
C	3.207727	9.298578	5.518394
O	4.417363	9.981567	5.283033
C	5.317080	9.188621	4.486471

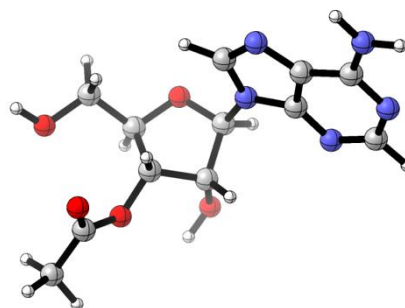
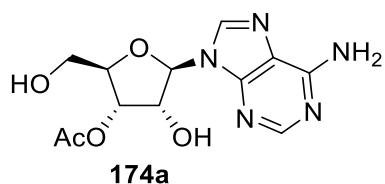
Anhang

O	2.414986	7.066460	5.112998
O	5.061321	7.033875	5.633236
C	5.508290	9.831823	3.115847
O	4.324509	9.872585	2.332167
C	1.823757	6.113381	4.349635
C	1.960935	6.215693	2.850625
O	1.205399	5.245091	4.913134
H	2.463014	10.880162	3.304538
H	-1.613170	13.135240	4.895548
H	-2.497803	13.081623	6.404985
H	4.977450	7.223481	3.556142
H	2.867884	8.409847	3.583166
H	3.131183	8.947754	6.560372
H	6.297222	9.168417	4.992884
H	6.015662	6.873100	5.617834
H	6.324580	9.310538	2.585300
H	5.826824	10.873842	3.279363
H	4.279381	9.078382	1.781744
H	1.498534	7.145310	2.482604
H	3.017451	6.223048	2.543256
H	1.453476	5.355802	2.398369
H	-0.313558	10.195228	9.100142

E [Hartree]

-1114.873344955552

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl acetate (**174a**)



Cartesian coordinates (Angstroem)

N	-1.855781	9.241311	4.593083
C	-0.819684	8.942683	3.797603
N	-0.827620	8.247789	2.657120
C	-2.060293	7.834798	2.334111
C	-3.237372	8.066819	3.062311
C	-3.091760	8.817835	4.257595
N	-2.454041	7.095671	1.238957
C	-3.821196	6.924617	1.355231
N	-4.322717	7.490035	2.430551
N	-4.131436	9.117819	5.056312
C	-1.563362	4.257091	0.266285
C	-0.682536	5.448032	0.651124
C	-1.565731	6.614468	0.181287
O	-2.346158	6.133822	-0.887141
C	-2.162463	4.723905	-1.064260

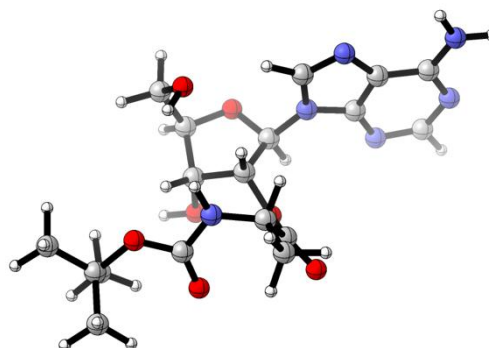
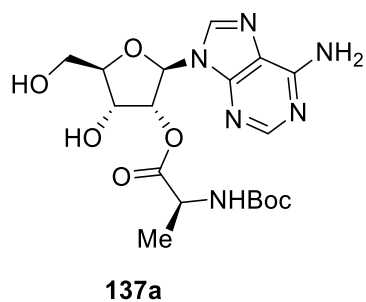
Anhang

O	0.498841	5.479681	-0.114216
O	-0.780497	3.081481	0.116274
C	-3.478002	4.076921	-1.455876
O	-3.181627	2.741569	-1.817172
C	-1.301682	1.901417	0.540938
C	-0.438612	0.754359	0.102308
O	-2.328995	1.818680	1.167787
H	-4.381615	6.378837	0.598678
H	-5.065252	8.805810	4.823772
H	-3.977296	9.653213	5.902112
H	-2.349310	4.089670	1.015268
H	-0.478044	5.502422	1.733693
H	-0.933583	7.456284	-0.140866
H	-1.423342	4.541839	-1.864481
H	0.888592	4.591728	-0.087514
H	-3.920609	4.646331	-2.296029
H	-4.182372	4.128589	-0.604777
H	-4.000929	2.229098	-1.800992
H	0.624638	0.983377	0.262687
H	-0.727084	-0.158887	0.636721
H	-0.590520	0.608842	-0.980110
H	0.157109	9.317554	4.128906

E [Hartree]

-1114.879362883667

(2R,3R,4R,5R)-2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl
(*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**137a**)



Cartesian coordinates (Angstroem)

N	-1.108537	11.286411	7.034597
C	-0.250919	10.434200	7.611484
N	0.899629	9.964726	7.126714
C	1.163009	10.452987	5.910193
C	0.369989	11.348922	5.181588
C	-0.829959	11.770342	5.807781
N	2.248257	10.197266	5.100139
C	2.059882	10.943290	3.950397
N	0.950571	11.642383	3.963302
N	-1.688558	12.626021	5.224849
C	4.978314	7.838652	4.456592
C	3.480665	8.144870	4.424158
C	3.358834	9.323642	5.402427
O	4.573324	10.027411	5.298915
C	5.560678	9.259780	4.584480

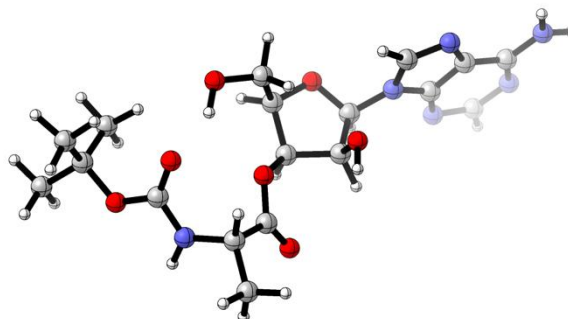
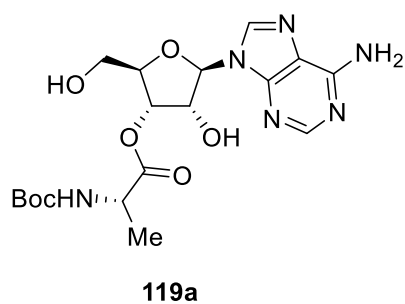
O	2.645267	7.089800	4.861040
O	5.239013	7.035362	5.584424
C	5.894223	9.942598	3.262510
O	4.808745	9.967191	2.345944
C	1.767409	6.415568	4.086307
C	1.800915	6.617064	2.561241
O	0.951215	5.716658	4.628798
C	0.798125	5.691907	1.873925
N	3.146864	6.492014	2.028367
H	2.801966	10.917984	3.150891
H	-1.494800	13.003188	4.306471
H	-2.531835	12.902294	5.712818
H	5.320175	7.356606	3.527222
H	3.218991	8.493118	3.421911
H	3.186471	8.946987	6.423764
H	6.478383	9.226284	5.195878
H	6.189824	6.857632	5.616813
H	6.780427	9.454153	2.820416
H	6.161182	10.988584	3.482695
H	4.856677	9.182910	1.781741
H	1.496464	7.663819	2.388743
H	1.061756	4.641054	2.060532
H	0.812098	5.880379	0.790354

H	-0.217845	5.868696	2.253024
C	3.958088	5.453976	2.373866
H	3.417882	7.073987	1.243411
O	3.667517	4.635795	3.232116
O	5.106319	5.503819	1.680312
C	6.202535	4.550310	1.922866
C	6.743042	4.743293	3.340929
H	7.155997	5.757243	3.459928
H	7.554599	4.022481	3.522626
H	5.958318	4.588273	4.092184
C	7.244527	4.961407	0.885510
H	7.536963	6.012790	1.028993
H	6.845100	4.842591	-0.133221
H	8.140894	4.331642	0.986856
C	5.723552	3.120418	1.669005
H	5.000016	2.800376	2.428202
H	6.588212	2.439658	1.690753
H	5.254047	3.049027	0.675495
H	-0.535399	10.078829	8.609746

E [Hartree]

-1554.846035159974

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alaninate (**119a**)



Cartesian coordinates (Angstroem)

C	-0.861787	-1.428967	1.143935
N	2.122331	0.227622	2.450432
C	-2.062668	0.132898	2.854085
O	-1.829890	-2.358913	1.625426
O	0.475263	-1.857542	3.149339
C	1.079918	-0.172651	1.542147
C	-1.271635	0.001525	1.542930
C	0.535598	-1.591341	1.769883
O	-0.026290	0.701800	1.675383
O	-3.447524	-0.045081	2.698860
C	3.446065	0.424389	2.117327
C	4.070843	0.794927	3.313934
N	3.160546	0.834346	4.352167
C	2.021191	0.490050	3.803776
N	4.029019	0.294060	0.920915

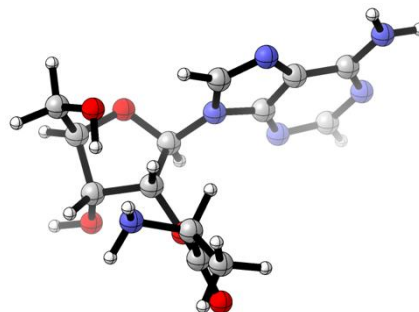
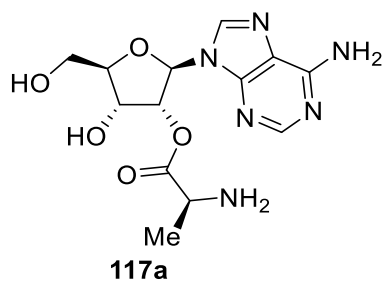
C	5.334137	0.567434	0.972585
N	6.063739	0.929496	2.035498
C	5.461636	1.055290	3.235393
N	6.190825	1.418047	4.305851
C	-1.736995	-3.636327	1.216220
O	-0.827026	-4.055530	0.541802
C	-2.955475	-4.443329	1.674066
N	-4.092742	-4.055088	0.854666
O	-5.783750	-2.781881	0.200598
C	-6.656894	-1.594551	0.183709
C	-7.561759	-1.573166	1.416021
C	-5.790605	-0.340056	0.067777
C	-7.481191	-1.804599	-1.084561
C	-4.897435	-3.006515	1.175620
O	-4.815442	-2.385757	2.229153
C	-2.701862	-5.941053	1.597658
H	-0.778854	-1.525901	0.051213
H	-1.897099	1.166622	3.199592
H	-1.632508	-0.544071	3.612092
H	0.304704	-2.800380	3.281175
H	1.519210	-0.108090	0.532206
H	-1.859320	0.478776	0.741396
H	1.145247	-2.335780	1.237182

H	-3.670250	-0.988145	2.577512
H	1.064021	0.415534	4.315215
H	5.882949	0.485417	0.026099
H	7.182224	1.596715	4.202451
H	5.754694	1.520578	5.212800
H	-3.183854	-4.131983	2.703124
H	-4.164985	-4.436762	-0.083862
H	-8.313222	-0.777521	1.297201
H	-6.987617	-1.387018	2.330998
H	-8.091612	-2.533492	1.515624
H	-6.440363	0.543648	-0.025916
H	-5.158765	-0.398064	-0.832576
H	-5.142994	-0.204383	0.943219
H	-8.167148	-0.956788	-1.229400
H	-8.075527	-2.728211	-1.011123
H	-6.823717	-1.878247	-1.964117
H	-2.466492	-6.244012	0.565883
H	-3.593840	-6.487085	1.936584
H	-1.850534	-6.218903	2.235945

E [Hartree]

-1554.855441294987

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**117a**)



Cartesian coordinates (Angstroem)

N	-1.006164	11.303418	7.552441
C	-0.056855	10.530117	8.096003
N	1.049158	10.052790	7.523011
C	1.155393	10.439819	6.247308
C	0.251143	11.245153	5.542668
C	-0.886055	11.685370	6.265334
N	2.151756	10.146485	5.341963
C	1.805493	10.782199	4.162842
N	0.678286	11.447052	4.245154
N	-1.837415	12.459942	5.713969
C	4.855151	7.772328	4.659181
C	3.368304	8.088004	4.680116
C	3.316567	9.324751	5.578054
O	4.486818	10.037141	5.223966
C	5.399069	9.196709	4.479720

O	2.545143	7.024976	5.108227
O	5.199873	7.201901	5.901993
C	5.518975	9.643965	3.020493
O	4.342654	9.513088	2.244344
C	1.812066	6.304329	4.228244
C	1.678252	6.788568	2.769005
O	1.239975	5.326357	4.639911
C	0.624807	5.952182	2.045936
N	2.980111	6.822999	2.073270
H	-0.213194	10.256266	9.146877
H	2.450335	10.705725	3.285691
H	-1.756604	12.767023	4.753520
H	-2.626576	12.761796	6.272246
H	5.122600	7.113938	3.815415
H	3.081613	8.418017	3.685389
H	3.301466	9.054347	6.645873
H	6.395221	9.284713	4.944489
H	6.154601	7.043242	5.908152
H	6.364304	9.087123	2.571872
H	5.786669	10.712308	3.014320
H	4.117987	8.566402	2.114023
H	1.315048	7.830874	2.828312
H	0.932598	4.896513	2.000192

H 0.499518 6.330719 1.019644

H -0.347210 6.004212 2.557863

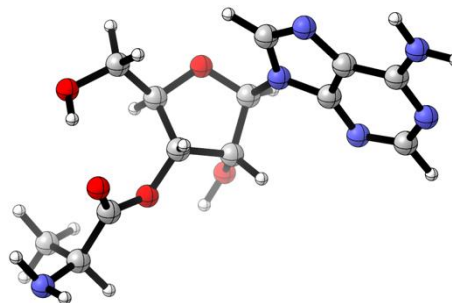
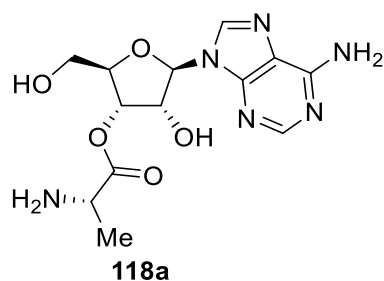
H 3.414887 5.897730 2.102846

H 2.799292 7.001846 1.082994

E [Hartree]

−1209.422497607656

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl L-alaninate (**118a**)



Cartesian coordinates (Angstroem)

N	-1.006164	11.303418	7.552441
C	-0.056855	10.530117	8.096003
N	1.049158	10.052790	7.523011
C	1.155393	10.439819	6.247308
C	0.251143	11.245153	5.542668
C	-0.886055	11.685370	6.265334
N	2.151756	10.146485	5.341963
C	1.805493	10.782199	4.162842
N	0.678286	11.447052	4.245154
N	-1.837415	12.459942	5.713969
C	4.855151	7.772328	4.659181
C	3.368304	8.088004	4.680116
C	3.316567	9.324751	5.578054
O	4.486818	10.037141	5.223966
C	5.399069	9.196709	4.479720

O	2.545143	7.024976	5.108227
O	5.199873	7.201901	5.901993
C	5.518975	9.643965	3.020493
O	4.342654	9.513088	2.244344
C	1.812066	6.304329	4.228244
C	1.678252	6.788568	2.769005
O	1.239975	5.326357	4.639911
C	0.624807	5.952182	2.045936
N	2.980111	6.822999	2.073270
H	-0.213194	10.256266	9.146877
H	2.450335	10.705725	3.285691
H	-1.756604	12.767023	4.753520
H	-2.626576	12.761796	6.272246
H	5.122600	7.113938	3.815415
H	3.081613	8.418017	3.685389
H	3.301466	9.054347	6.645873
H	6.395221	9.284713	4.944489
H	6.154601	7.043242	5.908152
H	6.364304	9.087123	2.571872
H	5.786669	10.712308	3.014320
H	4.117987	8.566402	2.114023
H	1.315048	7.830874	2.828312
H	0.932598	4.896513	2.000192

Anhang

H 0.499518 6.330719 1.019644

H -0.347210 6.004212 2.557863

H 3.414887 5.897730 2.102846

H 2.799292 7.001846 1.082994

E [Hartree]

−1209.422493691136

Kapitel 8

Danksagung

Zuallererst gilt mein großer Dank PROF. DR. OLIVER TRAPP für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Dank der Möglichkeit meine Masterarbeit in deinem Arbeitskreis anfertigen zu können, wurde mein Interesse für das Thema Origin of Life geweckt. Ich schätze deine positive und inspirierende Art an Dinge heranzugehen sehr. Außerdem danke ich dir für den regen Austausch und die Freiheit auch eigene Ideen zu verfolgen.

PROF. RENTMEISTER danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie PROF. SCHÜTZ, PROF. KARAGHIOSOFF, PROF. MARKIC und PROF. BRAUN für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Departments Chemie – insbesondere der NMR-Abteilung, der Ver- und Entsorgung, den Glasbläsern, sowie der Feinmechanik.

Besonderer Dank gebührt den Angestellten des Arbeitskreis Trapp. Danke CLAUDIA für deinen unermüdlichen Einsatz für uns. Danke HEIKE für das Erledigen des für uns Unsichtbaren. Danke Brigitte für das Handling sämtlicher Material- und Chemikalienwünsche. Danke CARRIE für deinen unermüdlichen Einsatz am NMR-Gerät, sowie deiner großartigen Unterstützung bei der Kalibrierung und Instandhaltung der Orbitrap. Mein großer Dank geht an NATHALIE für die Unterstützung bei der Synthesearbeit in den letzten Zügen meiner Doktorarbeit, vor allem, da die von dir bearbeiteten Reaktionen des Öfteren ihren eigenen Willen gezeigt haben. Danke an ALEX für deine Einweisungen an diversen Analytikgeräten, der Unterstützung bei Problemen/Reparaturen/Wartungen und deinem stets offenen Ohr.

Ich möchte mich auch bei meinen Praktikanten – DINA, TOFFI, TRINH, LUKAS und MILKHA – für ihr Interesse an meinen Forschungsthemen und ihrem Engagement im Labor bedanken.

Ein großes Dankeschön geht raus an die Mitglieder des AK Trapps. Danke für die freundliche Aufnahme während meiner Masterarbeit und der angenehmen Atmosphäre von da an, die verschiedenen Abendveranstaltungen, sei es Neuer Wein mit Zwiebelkuchen, gemeinsames Grillen oder einfach nur das gemeinsame Verspeisen von bestelltem Essen in der Kaffeeküche. Danke für die Unterstützung bei Fragen jeglicher Art und Problemen bei diversen Geräten oder einer nicht funktionierenden Reaktion. Danke sowohl an die Mensa-Esser als auch die in der Kaffeeküchen-Esser, ihr habt die Mittagspause immer sehr vergnüglich gestaltet. Das F3.017 – angefangen bei FLO, JENNY, ANNA, FABI und MAX, gefolgt von TOFFI, FUMITO, DINO, NATHALIE, LUKAS und SADU – hat immer für eine sehr angenehme, unterhaltsame, musikalisch gut begleitete Arbeitsatmosphäre gesorgt. Danke an CHRISTOPH für die sehr enge und gute Zusammenarbeit an

Danksagung

unserem gemeinsamen Projekt, das schlussendlich doch noch gut wurde! Ohne dich wären so manche SFB-Angelegenheiten nicht so angenehm gewesen. Vielen Dank an *Luca* für deinen Input, wenn mal wieder etwas nicht ganz so lief wie es das eigentlich auf dem Papier sollte. Vielen Dank an *T'OFFI* – du warst nicht nur ein großartiger, äußerst frecher Praktikant, sondern hast danach seit dem Beginn deiner Masterarbeit meinen Laboralltag enorm bereichert. Nicht nur dank deiner teils sehr unterhaltsamen Diskussionen, unter anderem mit *Dino* und der immerwährenden Frage nach der besten Nudelsorte, sondern auch, weil ich bei dir immer kurz Luft ablassen konnte. Dies lässt uns zu einer letzten Person in diesem Abschnitt kommen – *MAX*. Vielen Dank für dein immer offenes Ohr, nicht nur in chemischer Hinsicht. Du warst der beste Laborpartner, den man sich wünschen konnte. Wir haben so manches Projekt gemeinsam bearbeitet und so manchen Praktikanten geformt. Du hast nicht nur dafür gesorgt, dass ich einen Halbmarathon laufe, sondern auch dafür, dass ich nicht komplett wahnsinnig wurde, wenn die Chemie mal wieder machte, was sie wollte. Ohne dich hätte der Laboralltag nur halb so viel Spaß gemacht. Danke!

Herzlicher Dank geht an die fleißigen Korrekturleser für den jeweiligen Input, um diese Arbeit zu verbessern. Danke an *BRITTA*, *JULIA & DOMINIK*, *LUCA*, *MAX*, *RACHEL*, *TIFF* und *T'OFFI*.

Ein sehr wichtiger Teil während einer Doktorarbeit ist der Ausgleich in der Freizeit. Vielen Dank an meine Mädlsrunde – *BRITTA*, *SONJA*, *RACHEL* und *TIFF*, die mich seit dem Studium begleiten und zum einen das Studium zu einer unvergesslichen Zeit haben werden lassen, aber auch während der Doktorarbeit stets für mich da waren und für einige unvergessliche Momente gesorgt haben. Ich bin sehr dankbar, dass wir obwohl wir immer wieder eine räumliche Trennung hatten und haben, nach wie vor füreinander da sind. Ein weiterer Dank geht an *JULIA* und *KATRIN* – u.a. für die halbjährlichen *Tollwood* Besuche, sowie so einige Konzerte oder gemeinsame Treffen.

Danke an *ALEX* für das Aushalten von so mancher schlechten Stimmung, wenn es mal wieder einen Rückschlag im Labor gab. Dank deiner Herangehensweise ans Leben habe ich immer wieder neue Aspekte kennen gelernt und mich weiterentwickelt. Durch die gemeinsamen Urlaube konnte ich auch in stressigen Phasen immer wieder eine Verschnaufspause finden.

Der größte Dank geht an *MEINE FAMILIE*. Danke für die dauerhafte Unterstützung nicht nur während des Studiums und für das an mich Glauben. Danke für so manchen entspannten Abend, an dem ich abschalten konnte. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke für alles.

Kapitel 9

Literaturverzeichnis

-
- [1] S. Pfalzner, M. B. Davies, M. Gounelle, A. Johansen, C. Münker, P. Lacerda, S. P. Zwart, L. Testi, M. Tieloff, D. Veras, *Phys Scr* **2015**, *90*, 068001.
- [2] R. Güsten, H. Wiesemeyer, D. Neufeld, K. M. Menten, U. U. Graf, K. Jacobs, B. Klein, O. Ricken, C. Risacher, J. Stutzki, *Nature* **2019**, *568*, 357-359.
- [3] R. A. Alpher, R. Herman, *Nature* **1948**, *162*, 774-775.
- [4] G. Gamow, *Phys Rev* **1946**, *70*, 572-573.
- [5] G. Gamow, *Phys Rev* **1948**, *74*, 505-506.
- [6] K. Mezger, A. Maltese, H. Vollstaedt, *Icarus* **2021**, *365*, 114497.
- [7] J. Korenaga, *Precambrian Res* **2021**, *359*, 106178.
- [8] J. D. Kramers, *J Geol Soc* **2007**, *164*, 3-17.
- [9] W. F. Bottke, D. Vokrouhlický, S. Marchi, T. Swindle, E. R. D. Scott, J. R. Weirich, H. Levison, *Science* **2015**, *348*, 321-323.
- [10] J. W. Valley, W. H. Peck, E. M. King, S. A. Wilde, *Geology* **2002**, *30*, 351-354.
- [11] A. J. Cavosie, J. W. Valley, S. A. Wilde, E.I.M.F., *Earth Planet Sci Lett* **2005**, *235*, 663-681.
- [12] E. G. Nisbet, N. H. Sleep, *Nature* **2001**, *409*, 1083-1091.
- [13] M. R. Walter, R. Buick, J. S. R. Dunlop, *Nature* **1980**, *284*, 443-445.
- [14] G.-F. Xing, X.-L. Wang, Y. Wan, Z.-H. Chen, Y. Jiang, K. Kitajima, T. Ushikubo, P. Gopon, *Sci Rep* **2014**, *4*, 5143.
- [15] S. L. Miller, H. C. Urey, *Science* **1959**, *130*, 245-251.
- [16] G. Schlesinger, S. L. Miller, *J Mol Evol* **1983**, *19*, 376-382.
- [17] H. S. Jones, *Sci Prog* **1950**, *38*, 417-429.
- [18] P. H. Abelson, *Proc Natl Acad Sci USA* **1966**, *55*, 1365-1372.
- [19] M. G. Trainer, *Curr Org Chem* **2013**, *17*, 1710-1723.
- [20] D. Trail, E. B. Watson, N. D. Tailby, *Nature* **2011**, *480*, 79-82.
- [21] J. Kasting, *Science* **1993**, *259*, 920-926.
- [22] Z. R. Todd, A. C. Fahrenbach, C. J. Magnani, S. Ranjan, A. Björkbom, J. W. Szostak, D. D. Sasselov, *Chem Commun* **2018**, *54*, 1121-1124.
- [23] R. Wordsworth, R. Pierrehumbert, *Science* **2013**, *339*, 64-67.
- [24] D. E. Canfield, *Annu Rev Earth Planet Sci* **2005**, *33*, 1-36.
- [25] K. J. Zahnle, *Elements* **2006**, *2*, 217-222.
- [26] N. H. Sleep, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a002527.
- [27] T. A. Kral, K. M. Brink, S. L. Miller, C. P. McKay, *Orig Life Evol Biosph* **1998**, *28*, 311-319.
- [28] B. E. Schirmer, M. Gugger, P. C. Donoghue, *Palaeontology* **2015**, *58*, 769-785.
- [29] A. L. Sessions, D. M. Doughty, P. V. Welander, R. E. Summons, D. K. Newman, *Curr Biol* **2009**, *19*, R567-574.
- [30] P. Cloud, *Am J Sci* **1972**, *272*, 537-548.
- [31] J. I. Lunine, *Philos Trans R Soc B* **2006**, *361*, 1721-1731.
- [32] A. R. Sarafian, S. G. Nielsen, H. R. Marschall, F. M. McCubbin, B. D. Monteleone, *Science* **2014**, *346*, 623-626.
- [33] S. J. Mojzsis, T. M. Harrison, R. T. Pidgeon, *Nature* **2001**, *409*, 178-181.
- [34] C. Sagan, G. Mullen, *Science* **1972**, *177*, 52-56.
- [35] I. Cnossen, J. Sanz-Forcada, F. Favata, O. Witasse, T. Zegers, N. F. Arnold, *J Geophys Res Planets* **2007**, *112*.
- [36] W. R. Kuhn, J. F. Kasting, *Nature* **1983**, *301*, 53-55.
- [37] J. F. Kasting, M. T. Howard, *Philos Trans R Soc B* **2006**, *361*, 1733-1742.
- [38] G. Feulner, *Rev Geophys* **2012**, *50*.
- [39] J. Spencer, *GSA Today* **2019**, *29*.
- [40] R. Gomes, H. F. Levison, K. Tsiganis, A. Morbidelli, *Nature* **2005**, *435*, 466-469.
-

- [41] C. Meinert, I. Myrgorodska, P. de Marcellus, T. Buhse, L. Nahon, S. V. Hoffmann, L. L. S. d'Hendecourt, U. J. Meierhenrich, *Science* **2016**, *352*, 208-212.
- [42] N. Kitadai, S. Maruyama, *Geosci Front* **2018**, *9*, 1117-1153.
- [43] Y. Furukawa, Y. Chikaraishi, N. Ohkouchi, N. O. Ogawa, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, C. Abe, T. Nakamura, *Proc Natl Acad Sci USA* **2019**, *116*, 24440-24445.
- [44] U. J. Meierhenrich, G. M. Muñoz Caro, J. H. Bredehöft, E. K. Jessberger, W. H. Thiemann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 9182-9186.
- [45] Z. Martins, O. Botta, M. L. Fogel, M. A. Sephton, D. P. Glavin, J. S. Watson, J. P. Dworkin, A. W. Schwartz, P. Ehrenfreund, *Earth Planet Sci Lett* **2008**, *270*, 130-136.
- [46] S. Pizzarello, *Acc Chem Res* **2006**, *39*, 231-237.
- [47] M. H. Engel, S. A. Macko, *Nature* **1997**, *389*, 265-268.
- [48] U. J. Meierhenrich, L. Nahon, C. Alcaraz, J. H. Bredehöft, S. V. Hoffmann, B. Barbier, A. Brack, *Angew Chem Int Ed* **2005**, *44*, 5630-5634.
- [49] C. Meinert, S. V. Hoffmann, P. Cassam-Chenai, A. C. Evans, C. Giri, L. Nahon, U. J. Meierhenrich, *Angew Chem Int Ed* **2014**, *53*, 210-214.
- [50] G. E. Tranter, *Nature* **1985**, *318*, 172-173.
- [51] M. Quack, *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 4618-4630.
- [52] A. Collet, M. J. Brienne, J. Jacques, *Chem Rev* **1980**, *80*, 215-230.
- [53] P. Parsons, *Nature* **1996**, *383*, 221-222.
- [54] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- [55] A. Butlerow, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1861**, *120*, 295-298.
- [56] J. L. Bada, A. Lazcano, *Science* **2003**, *300*, 745-746.
- [57] K. Marshall-Bowman, S. Ohara, D. A. Sverjensky, R. M. Hazen, H. J. Cleaves, *Geochim Cosmochim Acta* **2010**, *74*, 5852-5861.
- [58] B. Damer, D. Deamer, *Astrobiology* **2019**, *20*, 429-452.
- [59] D. Ross, D. Deamer, *Astrobiology* **2019**, *19*, 517-521.
- [60] D. M. Fialho, T. P. Roche, N. V. Hud, *Chem Rev* **2020**, *120*, 4806-4830.
- [61] S. L. Miller, J. L. Bada, *Nature* **1988**, *334*, 609-611.
- [62] M. A. Pasek, *Chem Rev* **2020**, *120*, 4690-4706.
- [63] S. A. Benner, H.-J. Kim, E. Biondi:in *Prebiotic Chemistry and Chemical Evolution of Nucleic Acids* (Ed.: C. Menor-Salván), Springer International Publishing, Cham, **2018**, pp. 31-83.
- [64] J. L. Bada, *Nat Commun* **2023**, *14*, 2011.
- [65] S. Chang:in *The Chemistry of Life's Origins* (Eds.: J. M. Greenberg, C. X. Mendoza-Gómez, V. Pirronello), Springer Netherlands, Dordrecht, **1993**, pp. 259-299.
- [66] K. Kobayashi, H. Yanagawa:in *Biological Systems Under Extreme Conditions: Structure and Function* (Eds.: Y. Taniguchi, H. E. Stanley, H. Ludwig), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2002**, pp. 221-238.
- [67] K. Matsuno, E. Imai:in *Encyclopedia of Astrobiology* (Eds.: M. Gargaud, R. Amils, J. C. Quintanilla, H. J. Cleaves, W. M. Irvine, D. L. Pinti, M. Viso), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**, pp. 790-793.
- [68] D. S. Kelley, J. A. Karson, D. K. Blackman, G. L. Früh-Green, D. A. Butterfield, M. D. Lilley, E. J. Olson, M. O. Schrenk, K. K. Roe, G. T. Lebon, P. Rivizzigno, t. A.-J. o. M. E. S. Party, *Nature* **2001**, *412*, 145-149.
- [69] R. Lohrmann, *J Mol Evol* **1972**, *1*, 263-269.
- [70] D. Ritson, J. D. Sutherland, *Nat Chem* **2012**, *4*, 895-899.
- [71] A. I. Oparin, *Proiskhozhdenie zhizni*, Izd. Moskovskii Rabochii, Moskau, **1924**.
- [72] S. Tirard, *J Genet* **2017**, *96*, 735-739.

-
- [73] C. Darwin, Letter to J. D. Hooker, **1871**, Letter no. 7471, Darwin Correspondence Project, <https://www.darwinproject.ac.uk/letter/DCP-LETT-7471>, (Stand: 14.04.2025).
- [74] H. C. Urey, *Proc Natl Acad Sci USA* **1952**, *38*, 351-363.
- [75] A. I. Oparin, *The Origin of Life*, Macmillan, New York, **1938**.
- [76] S. Tirard:in *Encyclopedia of Astrobiology* (Eds.: M. Gargaud, R. Amils, J. C. Quintanilla, H. J. Cleaves, W. M. Irvine, D. L. Pinti, M. Viso), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**, pp. 724-724.
- [77] J. Zimmermann, E. Werner, S. Sodei, J. Moran, *Acc Chem Res* **2024**, *57*, 3032-3043.
- [78] A. Cornish-Bowden, M. L. Cárdenas, *J Theor Biol* **2008**, *252*, 411-418.
- [79] K. Ruiz-Mirazo, *Phys Life Rev* **2020**, *34-35*, 96-98.
- [80] F. A. L. Anet, *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8*, 654-659.
- [81] B. Herschy, A. Whicher, E. Camprubi, C. Watson, L. Dartnell, J. Ward, J. R. G. Evans, N. Lane, *J Mol Evol* **2014**, *79*, 213-227.
- [82] W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nat Rev Microbiol* **2008**, *6*, 805-814.
- [83] I. A. Berg, D. Kockelkorn, W. H. Ramos-Vera, R. F. Say, J. Zarzycki, M. Hügler, B. E. Alber, G. Fuchs, *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8*, 447-460.
- [84] N. Virgo, T. Ikegami, *Artificial Life Conference Proceedings* **2013**, 240-247.
- [85] G. Wächtershäuser, *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, *87*, 200-204.
- [86] M. C. Weiss, F. L. Sousa, N. Mrnjavac, S. Neukirchen, M. Roettger, S. Nelson-Sathi, W. F. Martin, *Nat Microbiol* **2016**, *1*, 16116.
- [87] K. B. Muchowska, S. J. Varma, E. Chevallot-Beroux, L. Lethuillier-Karl, G. Li, J. Moran, *Nat Ecol Evol* **2017**, *1*, 1716-1721.
- [88] K. B. Muchowska, S. J. Varma, J. Moran, *Chem Rev* **2020**, *120*, 7708-7744.
- [89] W. F. Martin, F. L. Sousa, N. Lane, *Science* **2014**, *344*, 1092-1093.
- [90] H. J. Morowitz, *Complexity* **1999**, *4*, 39-53.
- [91] W. Martin, M. J. Russell, *Philos Trans R Soc B* **2007**, *362*, 1887-1926.
- [92] C. T. Mierke:in *Cellular Mechanics and Biophysics: Structure and Function of Basic Cellular Components Regulating Cell Mechanics* (Ed.: C. T. Mierke), Springer International Publishing, Cham, **2020**, pp. 477-508.
- [93] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618-618.
- [94] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
- [95] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [96] T. A. Steitz, P. B. Moore, *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 411-418.
- [97] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman, *Proc Natl Acad Sci USA* **1967**, *58*, 217-224.
- [98] H. B. White, *J Mol Evol* **1976**, *7*, 101-104.
- [99] K. A. Denessiouk, V.-V. Rantanen, M. S. Johnson, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2001**, *44*, 282-291.
- [100] A. Lazcano, R. Guerrero, L. Margulis, J. Oró, *J Mol Evol* **1988**, *27*, 283-290.
- [101] J. Jonsson, M. Sandberg, S. Wold, *J Chemom* **1996**, *10*, 163-170.
- [102] J. Oró, *Biochem Biophys Res Commun* **1960**, *2*, 407-412.
- [103] J. Oró, *Nature* **1961**, *191*, 1193-1194.
- [104] J. Oró, A. P. Kimball, *Arch Biochem Biophys* **1962**, *96*, 293-313.
- [105] M. Levy, S. L. Miller, J. Oró, *J Mol Evol* **1999**, *49*, 165-168.
- [106] S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, *Science* **2016**, *352*, 833-836.
- [107] W. Traube, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1900**, *33*, 3035-3056.
- [108] R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *Science* **1966**, *154*, 784-785.
- [109] M. P. Robertson, M. Levy, S. L. Miller, *J Mol Evol* **1996**, *43*, 543-550.
-

- [110] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, 375, 772-774.
- [111] E. Stephen-Sherwood, J. Oró, A. P. Kimball, *Science* **1971**, 173, 446-447.
- [112] L. Petera, K. Mrazikova, L. Nejd, K. Zemankova, M. Vaculovicova, A. Pastorek, S. Civis, P. Kubelik, A. Heays, G. Cassone, J. Sponer, M. Ferus, J. Sponer, *Molecules* **2021**, 26, 2248.
- [113] R. Breslow, *Tetrahedron Lett* **1959**, 1, 22-26.
- [114] W. Löb, *Z Elektrochem Angew Phys Chem* **1906**, 12, 282-312.
- [115] H. Tambawala, A. H. Weiss, *J Catal* **1972**, 26, 388-400.
- [116] J. C. Speck:in *Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. 13* (Ed.: M. L. Wolfrom), Academic Press, **1958**, pp. 63-103.
- [117] S. J. Angyal, *Carbohydr Res* **1997**, 300, 279-281.
- [118] R. Shapiro, *Orig Life Evol Biosph* **1988**, 18, 71-85.
- [119] R. D. Partridge, A. H. Weiss, D. Todd, *Carbohydr Res* **1972**, 24, 29-44.
- [120] R. Larralde, M. P. Robertson, S. L. Miller, *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, 92, 8158-8160.
- [121] G. Springsteen, G. F. Joyce, *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 9578-9583.
- [122] I. V. Delidovich, A. N. Simonov, O. P. Taran, V. N. Parmon, *ChemSusChem* **2014**, 7, 1833-1846.
- [123] H.-J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, *J Am Chem Soc* **2011**, 133, 9457-9468.
- [124] A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, *Science* **2004**, 303, 196-196.
- [125] D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, C. E. Wintner, A. Eschenmoser, *Helv Chim Acta* **1990**, 73, 1410-1468.
- [126] J. B. Lambert, S. A. Gurusamy-Thangavelu, K. Ma, *Science* **2010**, 327, 984-986.
- [127] S. Pallmann, Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J Phys* **2018**, 20, 055003.
- [128] C. Reid, L. E. Orgel, *Nature* **1967**, 216, 455-455.
- [129] N. W. Gabel, C. Ponnampereuma, *Nature* **1967**, 216, 453-455.
- [130] K. Usami, A. Okamoto, *Org Biomol Chem* **2017**, 15, 8888-8893.
- [131] D. J. Ritson, J. D. Sutherland, *Angew Chem Int Ed* **2013**, 52, 5845-5847.
- [132] C. Ponnampereuma, C. Sagan, R. Mariner, *Nature* **1963**, 199, 222-226.
- [133] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J Mol Biol* **1972**, 67, 25-33.
- [134] I. Nam, J. K. Lee, H. G. Nam, R. N. Zare, *Proc Natl Acad Sci USA* **2017**, 114, 12396-12400.
- [135] I. Nam, H. G. Nam, R. N. Zare, *Proc Natl Acad Sci USA* **2018**, 115, 36-40.
- [136] R. Krishnamurthy, S. Guntha, A. Eschenmoser, *Angew Chem Int Ed* **2000**, 39, 2281-2285.
- [137] H.-J. Kim, S. A. Benner, *Proc Natl Acad Sci USA* **2017**, 114, 11315-11320.
- [138] H.-J. Kim, Y. Furukawa, T. Kakegawa, A. Bitá, R. Scorei, S. A. Benner, *Angew Chem Int Ed* **2016**, 55, 15816-15820.
- [139] S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell, *Nat Commun* **2018**, 9, 163.
- [140] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J Mol Evol* **1972**, 1, 249-257.
- [141] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, 459, 239-242.
- [142] J. Xu, M. Tsanakopoulou, C. J. Magnani, R. Szabla, J. E. Šponer, J. Šponer, R. W. Góra, J. D. Sutherland, *Nat Chem* **2017**, 9, 303-309.
- [143] L. Frick, J. P. Mac Neela, R. Wolfenden, *Bioorg Chem* **1987**, 15, 100-108.
- [144] H. Okamura, S. Becker, N. Tiede, S. Wiedemann, J. Feldmann, T. Carell, *Chem Commun* **2019**, 55, 1939-1942.
- [145] S. Becker, J. Feldmann, S. Wiedemann, H. Okamura, C. Schneider, K. Iwan, A. Crisp, M. Rossa, T. Amatov, T. Carell, *Science* **2019**, 366, 76-82.
- [146] J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, *Angew Chem Int Ed* **2019**, 58, 9944-9947.
- [147] F. H. C. Crick, *J Mol Biol* **1968**, 38, 367-379.

-
- [148] L. E. Orgel, *J Mol Biol* **1968**, *38*, 381-393.
- [149] C. R. Woese, *The genetic code : the molecular basis for genetic expression*, Harper & Row, New York, **1967**.
- [150] J. Xu, V. Chmela, N. J. Green, D. A. Russell, M. J. Janicki, R. W. Góra, R. Szabla, A. D. Bond, J. D. Sutherland, *Nature* **2020**, *582*, 60-66.
- [151] J. P. Ferris, *Orig Life Evol Biosph* **1993**, *23*, 307-315.
- [152] R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J Mol Biol* **1970**, *47*, 531-543.
- [153] P. Nie, Y. Bai, H. Mei, in *Molecules*, Vol. 25, **2020**.
- [154] K. Duffy, S. Arangundy-Franklin, P. Holliger, *BMC Biology* **2020**, *18*, 112.
- [155] V. B. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, S.-Y. Peak-Chew, S. H. McLaughlin, P. Herdewijn, P. Holliger, *Science* **2012**, *336*, 341-344.
- [156] S. J. Roberts, R. Szabla, Z. R. Todd, S. Stairs, D.-K. Bučar, J. Šponer, D. D. Sasselov, M. W. Powner, *Nat Commun* **2018**, *9*.
- [157] N. Martín-Pintado, M. Yahyaee-Anzahaee, R. Campos-Olivas, A. M. Noronha, C. J. Wilds, M. J. Damha, C. González, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 9329-9339.
- [158] A. M. Noronha, C. J. Wilds, C.-N. Lok, K. Viazovkina, D. Arion, M. A. Parniak, M. J. Damha, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7050-7062.
- [159] S. S. Cohen, *Cancer* **1977**, *40*, 509-518.
- [160] P. J. Ortiz, M. J. Manduka, S. S. Cohen, *Cancer Res* **1972**, *32*, 1512-1517.
- [161] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *284*, 2118-2124.
- [162] M. Bolli, R. Micura, A. Eschenmoser, *Chemistry & Biology* **1997**, *4*, 309-320.
- [163] L. Orgel, *Science* **2000**, *290*, 1306-1307.
- [164] B. W. F. Colville, M. W. Powner, *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60*, 10526-10530.
- [165] D. Whitaker, M. W. Powner, *Nat Chem* **2022**, *14*, 766-774.
- [166] K.-U. Schöning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **2000**, *290*, 1347-1351.
- [167] A. Eschenmoser, *Orig Life Evol Biosph* **2004**, *34*, 277-306.
- [168] G. F. Joyce, A. W. Schwartz, S. L. Miller, L. E. Orgel, *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**, *84*, 4398-4402.
- [169] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 4174-4175.
- [170] E. Meggers, L. Zhang, *Acc Chem Res* **2010**, *43*, 1092-1102.
- [171] A. E. Engelhart, N. V. Hud, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a002196.
- [172] J. S. Rice, X. Gao, *Biochemistry* **1997**, *36*, 399-411.
- [173] R. J. Jones, K. Y. Lin, J. F. Milligan, S. Wadwani, M. D. Matteucci, *J Org Chem* **1993**, *58*, 2983-2991.
- [174] A. L. Weber, *Orig Life Evol Biosph* **2001**, *31*, 71-86.
- [175] H. D. Bean, F. A. Anet, I. R. Gould, N. V. Hud, *Orig Life Evol Biosph* **2006**, *36*, 39-63.
- [176] G. K. Mittapalli, Y. M. Osornio, M. A. Guerrero, K. R. Reddy, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46*, 2478-2484.
- [177] G. K. Mittapalli, K. R. Reddy, H. Xiong, O. Munoz, B. Han, F. De Riccardis, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46*, 2470-2477.
- [178] P. E. Nielsen, *Chem Biodiversity* **2007**, *4*, 1996-2002.
- [179] K. Groebke, J. Hunziker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmermann, A. Holzner, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv Chim Acta* **1998**, *81*, 375-474.
- [180] B. D. Heuberger, C. Switzer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2779-2783.
- [181] S. C. Kim, D. K. O'Flaherty, L. Zhou, V. S. Lelyveld, J. W. Szostak, *Proc Natl Acad Sci USA* **2018**, *115*, 13318-13323.
- [182] F. B. Howard, H. T. Miles, *Biochemistry* **1977**, *16*, 4647-4650.
-

- [183] R. Krishnamurthy, S. Pitsch, M. Minton, C. Miculka, N. Windhab, A. Eschenmoser, *Angew Chem, Int Ed Engl* **1996**, *35*, 1537-1541.
- [184] V. M. Kolb, J. P. Dworkin, S. L. Miller, *J Mol Evol* **1994**, *38*, 549-557.
- [185] B. J. Cafferty, D. M. Fialho, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, *Nat Commun* **2016**, *7*, 11328.
- [186] M. C. Chen, B. J. Cafferty, I. Mamajanov, I. Gállego, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 5640-5646.
- [187] D. M. Fialho, K. C. Clarke, M. K. Moore, G. B. Schuster, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 1263-1271.
- [188] C. V. Mungi, S. K. Singh, J. Chugh, S. Rajamani, *Phys Chem Chem Phys* **2016**, *18*, 20144-20152.
- [189] F. Chemat, M. Poux, *Tetrahedron Lett* **2001**, *42*, 3693-3695.
- [190] H. Okamura, A. Crisp, S. Hübner, S. Becker, P. Rovó, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2019**, *58*, 18691-18696.
- [191] F. Xu, S. Wiedemann, J. Feldmann, S. Becker, T. Carell, *ChemistryEurope* **2023**, *1*, e202300057.
- [192] F. Xu, A. Crisp, T. Schinkel, R. C. A. Dubini, S. Hübner, S. Becker, F. Schelter, P. Rovó, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2022**, *61*, e202211945.
- [193] M. D. Berg, C. J. and Brandl, *RNA Biology* **2021**, *18*, 316-339.
- [194] F. H. Crick, *Symp Soc Exp Biol* **1958**, *12*, 138-163.
- [195] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, *192*, 1227-1232.
- [196] M. Nirenberg, P. Leder, M. Bernfield, R. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman, C. O'Neal, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1965**, *53*, 1161-1168.
- [197] S. J. Sharp, J. Schaack, L. Cooley, D. J. Burke, D. Söll, *CRC Crit Rev Biochem* **1985**, *19*, 107-144.
- [198] M. Sprinzl, K. S. Vassilenko, *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, D139-D140.
- [199] E. M. Phizicky, J. D. Alfonzo, *FEBS Lett* **2010**, *584*, 265-271.
- [200] J. E. Jackman, J. D. Alfonzo, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2013**, *4*, 35-48.
- [201] G. R. Björk, T. G. Hagervall, *EcoSal Plus* **2014**, *6*, 10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2013.
- [202] J. A. Kowalak, J. J. Dalluge, J. A. McCloskey, K. O. Stetter, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7869-7876.
- [203] C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 4576-4579.
- [204] Y. Motorin, H. Grosjean:in *Modification and Editing of RNA* (Ed.: R. B. Henri Grosjean), **1998**, pp. 543-549.
- [205] G. R. Björk, *Molecular Evolution of Life* **1986**, 91.
- [206] N. Cermakian, R. Cedergren:in *Modification and Editing of RNA* (Ed.: R. B. Henri Grosjean), **1998**, pp. 535-541.
- [207] P. Auffinger, E. Westhof:in *Modification and Editing of RNA* (Ed.: R. B. Henri Grosjean), **1998**, pp. 569-576.
- [208] P. C. Thiaville, B. El Yacoubi, C. Köhrer, J. J. Thiaville, C. Deutsch, D. Iwata-Reuyl, J. M. Bacusmo, J. Armengaud, Y. Bessho, C. Wetzel, X. Cao, P. A. Limbach, U. L. RajBhandary, V. de Crécy-Lagard, *Mol Microbiol* **2015**, *98*, 1199-1221.
- [209] E. M. Phizicky, A. K. Hopper, *Rna* **2023**, *29*, 898-957.
- [210] E. J. Maglott, J. T. Goodwin, G. D. Glick, *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 7461-7462.
- [211] K. Hamashima, M. Tomita, A. Kanai, *Mol Biol Evol* **2015**, *33*, 530-540.
- [212] R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, A. Zamir, *Science* **1965**, *147*, 1462-1465.
- [213] P. Nissen, M. Kjeldgaard, S. Thirup, B. F. Clark, J. Nyborg, *Biochimie* **1996**, *78*, 921-933.

-
- [214] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science* **1974**, *185*, 435-440.
- [215] H. Shi, P. B. Moore, *Rna* **2000**, *6*, 1091-1105.
- [216] M. Ibba, D. Söll, *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 617-650.
- [217] M. Safro, L. Klipcan, *Biol Direct* **2013**, *8*, 17.
- [218] M. Sprinzl, *J Biosci* **2006**, *31*, 489-496.
- [219] B. Griffin, M. Jarman, C. Reese, J. Sulston, D. Trentham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 3638-3649.
- [220] J. S. Weinger, S. A. Strobel, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5939-5948.
- [221] T. M. Schmeing, R. M. Voorhees, A. C. Kelley, Y. G. Gao, F. V. t. Murphy, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 688-694.
- [222] B. R. So, S. An, S. Kumar, M. Das, D. A. Turner, C. M. Hadad, K. Musier-Forsyth, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 31810-31820.
- [223] J. Ling, H. Roy, M. Ibba, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 72-77.
- [224] B. E. Nordin, P. Schimmel, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 20510-20517.
- [225] F. von der Haar, F. Cramer, *FEBS Lett* **1975**, *56*, 215-217.
- [226] M. Bechtel, N. J. Kurrle, O. Trapp, *Chem Eur J* **2024**, *30*, e202402055.
- [227] M. W. Powner, J. D. Sutherland, *ChemBiochem* **2008**, *9*, 2386-2387.
- [228] D. Kopetzki, M. Antonietti, *New J Chem* **2011**, *35*, 1787.
- [229] A. V. Dass, T. Georgelin, F. Westall, F. Foucher, P. De Los Rios, D. M. Busiello, S. Liang, F. Piazza, *Nat Commun* **2021**, *12*, 2749.
- [230] K. N. Drew, J. Zajicek, G. Bondo, B. Bose, A. S. Serianni, *Carbohydr Res* **1998**, *307*, 199-209.
- [231] N. J. Kurrle, M. Bechtel, N. Hampel, O. Trapp, *ChemSystemsChem*, *n/a*, e00046.
- [232] J. M. de Bruijn, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, *Recl Trav Chim Pays-Bas* **1987**, *106*, 35-43.
- [233] J. M. De Bruijn, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, *Starch - Stärke* **1987**, *39*, 23-28.
- [234] C. J. Knill, J. F. Kennedy, *Carbohydr Polym* **2003**, *51*, 281-300.
- [235] B. Y. Yang, R. Montgomery, *Carbohydr Res* **1996**, *280*, 27-45.
- [236] T. Sowa, S. Ouchi, *Bull Chem Soc Jpn* **2006**, *48*, 2084-2090.
- [237] J. Caron, E. Lepeltier, L. H. Reddy, S. Lepître-Mouelhi, S. Wack, C. Bourgaux, P. Couvreur, D. Desmaële, *Eur J Org Chem* **2011**, *2011*, 2615-2628.
- [238] C. P. Burke, M. R. Swingle, R. E. Honkanen, D. L. Boger, *J Org Chem* **2010**, *75*, 7505-7513.
- [239] N. J. Kurrle, C. J. B. Seifert, N. Hampel, T. Rauch, M. Thoma, L. V. Parziale, M. S. R. Ebeling, D. Berthold, O. Trapp, *ChemBioChem*, *n/a*, e202500395.
- [240] S. Zhou, W. Zhu, X. Qin, S. Li, W. Chu, *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*.
- [241] J. H. Marks, J. Wang, N. F. Kleimeier, A. M. Turner, A. K. Eckhardt, R. I. Kaiser, *Angew Chem Int Ed* **2023**, *62*, e202218645.
- [242] K. Sanada, A. Washio, H. Ishikawa, Y. Yoshida, T. Mino, M. Sakamoto, *Angew Chem Int Ed* **2022**, *61*, e202201268.
- [243] B. Majumdar, S. Daisy, L. E. M., S. N. A., J. C. and Chaput, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2025**, *44*, 474-485.
- [244] R. Zou, M. J. Robins, *Can J Chem* **1987**, *65*, 1436-1437.
- [245] S. Sase, M. Jaric, A. Metzger, V. Malakhov, P. Knochel, *J Org Chem* **2008**, *73*, 7380-7382.
- [246] M. S. Hofmayer, F. H. Lutter, L. Grokenberger, J. M. Hammann, P. Knochel, *Org Lett* **2019**, *21*, 36-39.
- [247] Z.-D. Shi, B.-H. Yang, Y.-L. Wu, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3287-3296.
- [248] S. G. Patching, S. A. Baldwin, A. D. Baldwin, J. D. Young, M. P. Gallagher, P. J. F. Henderson, R. B. Herbert, *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 462-470.
-

- [249] S. Hentschel, J. Alzeer, T. Angelov, O. D. Schärer, N. W. Luedtke, *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51*, 3466-3469.
- [250] D. Bykov, T. Petrenko, R. Izsák, S. Kossmann, U. Becker, E. Valeev, F. Neese, *Mol Phys* **2015**, *113*, 1961-1977.
- [251] M. Garcia-Ratés, F. Neese, *J Comput Chem* **2019**, *40*, 1816-1828.
- [252] M. Garcia-Ratés, F. Neese, *J Comput Chem* **2020**, *41*, 922-939.
- [253] B. Helmich-Paris, B. de Souza, F. Neese, R. Izsák, *J Chem Phys* **2021**, *155*, 104109.
- [254] F. Neese, *J Comput Chem* **2003**, *24*, 1740-1747.
- [255] F. Neese, *J Comput Chem* **2023**, *44*, 381-396.
- [256] F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker, *Chem Phys* **2009**, *356*, 98-109.
- [257] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J Chem Phys* **2010**, *132*, 154104.
- [258] S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J Comput Chem* **2011**, *32*, 1456-1465.
- [259] A. D. Becke, *J Chem Phys* **1993**, *98*, 1372-1377.
- [260] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys Chem Chem Phys* **2005**, *7*, 3297-3305.