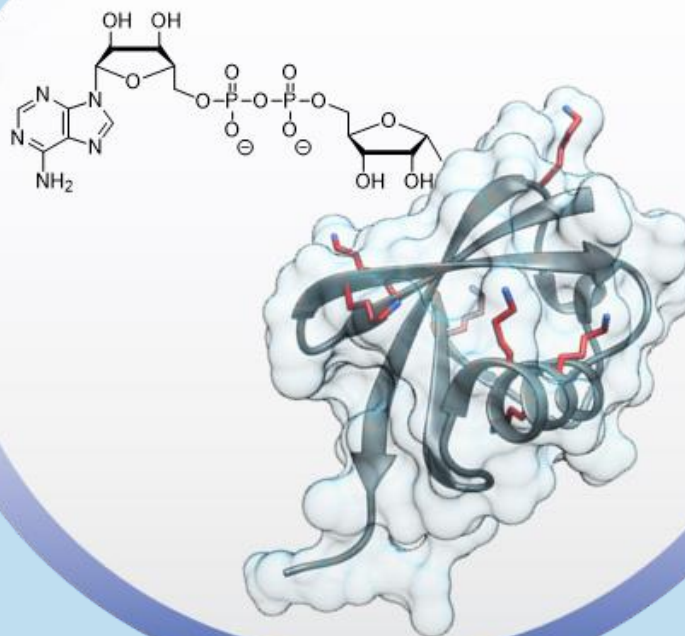


Validatie en optimalisatie van de synthese van α - & β -Ub-ADPr met natieve link op arginine 42.



Marnix Verdegaa
2022

Validatie en optimalisatie van de synthese van α - & β -Ub-ADPr met natieve link op arginine 42.

Afstudeerverslag

Dit Bachelor afstudeerverslag is geschreven door Marnix Verdegaal (s1099018), student aan de Hogeschool Leiden, studie chemie, specialisatie organische chemie onder begeleiding van Dr. Helen Slootweg- Jansen.

De afstudeerstage is uitgevoerd onder leiding van Msc Max Kloet, in de vakgroep van Dr. Gerbrand van der Heden van Noort in het Dept. Cell en Chemische Biologie in het Leids Universitair Medisch Centrum (Eindhoveneweg 20, 2333 ZC te Leiden) gedurende de periode 01-12-2021 t/m 01-09-2022.

Samenvatting

The purpose of this research is to validate and optimize the synthesis of the natively linked α -Ub^{ADPr} & β -Ub^{ADPr} (**19 _{α,β}**) on arginine 42 to further study in the enzymes of *Legionella Pneumophila*. In the synthesis of Ub^{ADPr} the sub goal was to synthesize as much as possible of two molecules (building blocks) which are needed in large quantities. Building block 1 is a α - & β - isothioure donor (**1 _{α,β}**) (1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)diphenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α , β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea). Both anomers were obtained (**1 _{α}** : $m_{\text{tot}} = 3,472 \text{ g}$; $n_{\text{tot}} = 4,26 \text{ mmol}$; $Y_{\text{tot}} = 9,3\%$ over 6 steps – **1 _{β}** : $m_{\text{tot}} = 0,3530 \text{ g}$; $0,433 \text{ mmol}$; $Y_{\text{tot}} = 1,8\%$ over 6 steps. The isothiure donor is reacted with the free amine of ornithine positioned on R42 in the sequence of full-length ubiquitin. The coupling is done on resin to form the guanidinium group and therefore native arginine on position 42 in ubiquitin, this is one of the key steps in the synthesis of Ub^{ADPr}. Building block 2 is a phosphoramidite adenosine compound (**2**) which forms the second part of the pyrophosphate bond to form the Ub^{ADPr} (5'-*O*-(*N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite) ($m_{\text{tot}} = 0,1085 \text{ g}$; $0,136 \text{ mmol}$; $Y = 60,6\%$ over 4 steps). The ubiquitin proteins used were modified with different reporter molecules on resin: biotin (α & β) and rhodamine (α). The α -variant had to be synthesised (**15 _{α}**). The synthesis was followed and confirmed successfully via LC-MS via test cleavages (mass product: 9445 m/z + 9461 m/z TFA adduct). The synthesis of α -Ub^{ADPr} (**19 _{α}**) was stalled. Due to presumably high humidity, the phosphorylation step of the ubiquitin ribosyl compound did not fully convert. Due to lack of reagents and time this reaction was postponed. The β -Ub^{ADPr} protein (**19 _{β}**) was followed and confirmed by LC-MS measurements. However the end reaction didn't result in a full conversion. The compound was used in further biochemical assays and as part of a submitted manuscript to be published in a peer reviewed journal.

Inhoud

Samenvatting	1
Afkortingen	5
Inleiding.....	7
<i>Legionella Pneumophila</i> bacterie.....	7
Ubiquitine eiwit en <i>Legionella</i> besmetting.....	7
Doel.....	8
Synthese.....	9
Analysemethodes.....	12
Resultaten en discussie.....	14
Bouwsteen 1	14
Synthese van 2,3,5-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (4)	14
Synthese van 5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (5)	16
Synthese van 5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)-difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (6)	18
Synthese van 5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)-difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (7 $_{\alpha,\beta}$)	20
Synthese van 1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (1 α)	28
Synthese van 1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (1 β).....	31
Bouwsteen 2	33
Synthese van 2',3',5',-tri- <i>O</i> -butyl-di-methylsilyl adenosine (9)	34
Synthese van <i>N</i> ⁶ - <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2',3',5',tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl adenosine (10)	37
Synthese van <i>N</i> ⁶ - <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2',3',di- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl adenosine (11)	39
Synthese van 5'- <i>O</i> -(<i>N</i> ⁶ - <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2',3',di- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl- <i>N</i> - <i>N</i> -diisopropylfosforamidiet (2).....	41
Resin synthese	43
Synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76 met vrije ornithine op positie 42.....	44
Spacer koppeling:.....	44
Ontscherming Fmoc en koppeling Lysine biotine:.....	45
Ontscherming Fmoc-Lys-Bt en rhodamine koppeling.....	45
Alloc ontscherming	46
Synthese van α -ADPr-Ub-76-Lys(Bt)-rhodamine	47
1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (6 α) op gemodificeerd ubiquitine (20) koppeling:	47
Fosforylering vrije primaire alcohol	48

Synthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)	49
1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiouraea (6 β) op gemodificeerd ubiquitine (12) koppeling:.....	49
Fosforylering vrije primaire alcohol	50
Synthese β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)	51
Conclusie	52
Aanbevelingen	53
Experimenteel	54
Synthese van 2,3,5-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (4)	54
Synthese van 5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (5)	54
Synthese van 5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)-difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (6)	54
Synthese van 5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)-difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (7 α,β)	55
Synthese van 1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiouraea (1 α)	56
Synthese van 1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiouraea (1 β).....	56
Synthese van 2',3',5',-tri- <i>O</i> -butyl-di-methylsilyl adenosine (9)	57
Synthese van <i>N</i> ⁶ - <i>tert</i> -butyloxycarbonyl-2',3',5',tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl adenosine (10)	57
Synthese van <i>N</i> ⁶ - <i>tert</i> -butyloxycarbonyl-2',3',di- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl adenosine (11).....	58
Synthese van 5'- <i>O</i> -(<i>N</i> ⁶ - <i>tert</i> -butyloxycarbonyl-2',3',di- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl- <i>N</i> - <i>N</i> -diisopropylfosforamidiet (2).....	58
Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76 met vrije ornithine op positie 42 (16 α).....	59
Spacer koppeling.....	59
Ontscherming Fmoc en koppeling Lysine biotine	59
Ontscherming Fmoc-Lys-Bt en rhodamine koppeling.....	60
Alloc ontscherming	60
Synthese van β -ADPr(42)-Ub76-PEG-Lys(Bt) (19 β).....	60
1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-3-(5- <i>O</i> -((<i>tert</i> -butyl)difenylsilyl)-2,3-di- <i>O</i> -(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiouraea (1 β) op gemodificeerd ubiquitine (16 β) koppeling	60
Ontscherming TBDPS-groep.....	61
Fosforylering vrije primaire alcohol	61
Fm-groep ontscherming.....	61
Fosforamidiet koppeling	61
Oxidatie fosfor	62
Cyanoethyl ontscherming.....	62

Totale ontscherming β -Ub ^{ADPr}	62
Synthese van α -ADPr-Ub76-Lys(Bt)-rhodamine (19 _a)	62
1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (1 α) op gemodificeerd ubiquitine (16 α) koppeling:	63
Ontscherming TBDPS-groep	63
Fosforylering vrije primaire alcohol	63
Literatuurlijst	64
Bijlagen	66
[A] Mechanismen	66
[1] 2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (2)	66
[2] 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (3)	66
[3] 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (4)	67
[4] 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocynaat (5 α,β)	68
[5] 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (6 α)	69
[6] 2',3',5',-tri-O-butyl-di-methylsilyl adenosine (8)	69
[7] <i>N</i> ⁶ -tert-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-O-tert-butyldimethylsilyl adenosine (9)	70
[8] <i>N</i> ⁶ -tert-butyloxycarbonyl-2',3',di-O-tert-butyldimethylsilyl adenosine (10)	70
[9] 5'-O-(<i>N</i> ⁶ -tert-butyloxycarbonyl-2',3',di-O-tert-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl- <i>N</i> - <i>N</i> -diisopropylfosforamidiet (11)	70
[10] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: PEG-spacer koppeling (17)	71
[11] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: Ontscherming Fmoc en koppeling Lysine biotine (18)	71
[12] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: Ontscherming Fmoc en koppeling di-boc rhodamine (19)	72
[13] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: Ontscherming alloc-bescherm groep	73
[14] Synthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)	74
[15] Synthese van fosforamidiet α -ribosyl(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)-rhodamine	77
[B] Spectra	78
[1] Aanvullende spectra molecuul 1	78
[2] Aanvullende spectra synthese molecuul	79
[3] Aanvullende COSY en HSQC spectra synthese molecuul 6 β	81
[4] LC-MS foutief gesynthetiseerd molecuul 8.	82
[5] Aanvullende COSY en HSQC spectra juiste synthese molecuul 8.	83
[6] NMR-spectra vervuilde synthese MV36	84

Afkortingen

Volgorde van voorkomen

ADPr	: Adenosine difosfaat ribose
mART	: mono-adenosine difosfaat-ribosyl transferase
PDE domein	: Fosfodiesterase domein
DUP domein	: Deubiquitinase domein
Ub-76 ^{ADPr}	: Ubiquitine adenosine difosfaat ribose
SPPS	: Solid Phase Peptide Synthesis
Alloc	: Allyloxycarbonyl
TMS-N ₃	: Trimethylsilyl azide
DCM	: Dichloormethaan
TBDPS-Cl	: <i>Tert</i> -butyldifenylsilyl chloride
TBA-Br	: Tetrabutylammonium bromide
PMB-Cl	: Para-methoxybenzyl chloride
DMF	: Dimethylformamide
THF	: Tetrahydrofuran
DMAP	: 4-dimethylaminopyridine
Boc ₂ O	: Di- <i>tert</i> -butyldicarbonaat
Etl	: Ethyl jodide
MeCN	: Acetonitril
TFA	: Trifluorazijnzuur
TBAF	: Tetrabutylammonium fluoride
tBuOOH	: <i>Tert</i> -butylhydroperoxide
TLC	: Thin layer chromatography (dunne laag chromatografie)
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
COSY	: Correlated Spectroscopy
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Fmoc PEG 2	: Fluorenylmethyloxycarbonyl-8-amino-3,6-dioxaoctaanzuur
HOBt	: 1-hydroxybenzotriazool
HBTU	: (2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfaat
DIPEA	: Diisopropylethylamine
DCI	: 4,5-Dicyanoimidazole
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-een
Pd(PPh ₃) ₄	: Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)
NMP	: <i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone

Volgorde A-Z

ADPr	: Adenosine difosfaat ribose
Alloc	: Allyloxycarbonyl
Boc ₂ O	: Di- <i>tert</i> -butyldicarbonaat
COSY	: Correlated Spectroscopy
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-een
DCI	: 4,5-Dicyanoimidazole
DCM	: Dichloormethaan
DIPEA	: Diisopropylethylamine
DMAP	: 4-dimethylaminopyridine
DMF	: Dimethylformamide
DUP domein	: Deubiquitinase domein
Etl	: Ethyl jodide

Fmoc PEG 2	: Fluorenylmethyloxycarbonyl-8-amino-3,6-dioxaoctaanzuur
HBTU	: (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfaat
HOBt	: 1-hydroxybenzotriazool
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
mART	: mono-ADP-ribosyl transferase
MeCN	: Acetonitril
NMP	: N-methyl-2-pyrrolidone
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PDE domein	: Fosfodiesterase domein
Pd(PPh ₃) ₄	: Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)
PMB-Cl	: Para-methoxybenzyl chloride
SPPS	: Solid Phase Peptide Synthesis
TBA-Br	: Tetrabutylammonium bromide
TBAF	: Tetrabutylammonium fluoride
TBDPS-Cl	: Tert-butyldifenylsilyl chloride
tBuOOH	: Tert-butylhydoperoxide
TFA	: Trifluorazijnzuur
THF	: Tetrahydrofuran
TLC	: Thin layer chromatography (dunne laag chromatografie)
TMS-N3	: Trimethylsilyl azide
Ub-76 ^{ADPr}	: Ubiquitine adenosine difosfaat ribose

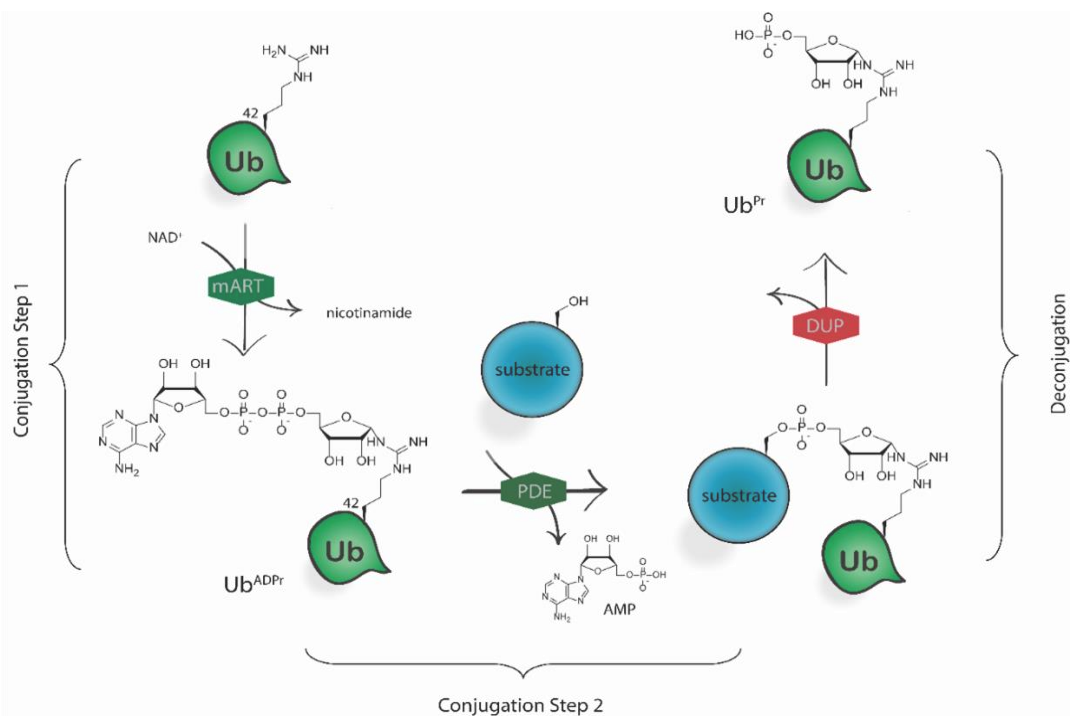
Inleiding

Legionella Pneumophila bacterie

De *Legionella Pneumophila* bacterie is voor 90% de grootste veroorzaker van Legionellose bij de mens in Nederland^[1]. Legionellose, ook wel “Veteranenziekte” genoemd, is een ziekte die bij besmetting kan variëren van een milde koorts tot aan een zware of soms wel dodelijke longontsteking en orgaan uitval. Het is de overkoepelende benaming voor zowel de niet pneumonische (Pontiackoorts) als de pneumonische vorm. De bacterie gedijt goed in zoet water tussen de 20-50°C^[2]. Besmetting vindt plaats doordat de bacterie zich in zoet water aerosolen kan verplaatsen en zo in de longen terecht kan komen. Deze aerosolen kunnen bijvoorbeeld vrij komen vanuit fontein, kranen, douches en koeltorens. Eenmaal in de longen wordt de bacterie opgenomen door de alveolaire macrofagen (fagocyten in de longen die besmetting van ziekteverwekkers zouden moeten voorkomen), waarin het zich actief kan vermenigvuldigen^{[3][4]}.

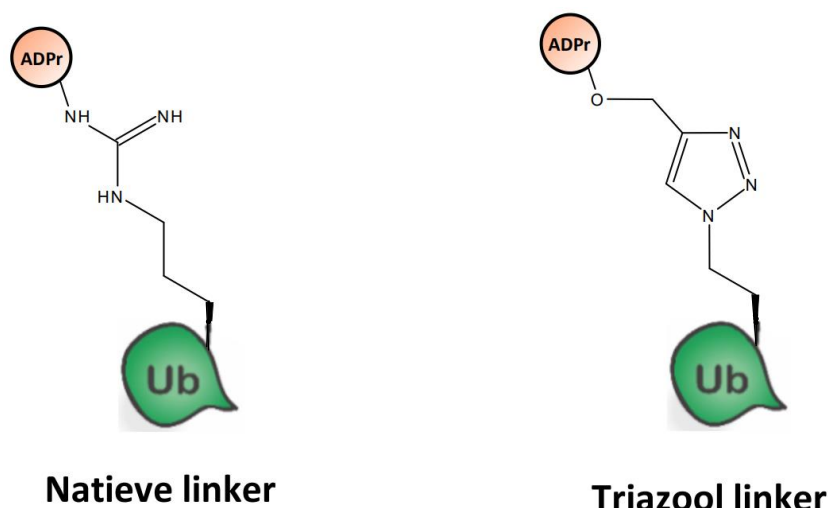
Ubiquitine eiwit en *Legionella* besmetting

Het ubiquitine eiwit is een regel/transport eiwit dat ervoor zorgt dat bepaalde processen in de menselijke cel plaatsvinden. Hierin bindt het ubiquitine eiwit zich een- of meermaals aan andere eiwitten/moleculen. Het complex wordt door andere delen van de cel herkend en dit zorgt ervoor dat er een specifiek proces in gang wordt gezet. Dit betreft bijvoorbeeld de eiwitdegradatie, apoptose en autofagie^[5]. *Legionella* gebruikt het ubiquitine systeem dat zich in menselijke cellen bevindt. De legionellabacterie introduceert enzymen in de gastheer tijdens een infectie. Deze multidomein enzymen bestaan onder andere uit een mART- en PDE-domein. Het onconventionele wat deze enzymen doen is het vormen van een ADP-geribosyleerde ubiquitine intermediair, door toedoen van het MART domein. Vervolgens koppelt het PDE domein een cel eigen substraat (eiwit) en zorgt hierdoor voor het ubiquitineren (koppeling van substraat aan ubiquitine) van gastheer eiwitten. De geubiquitineerde eiwitten van de gastheer zijn voornamelijk endoplasmatisch reticulum eiwitten. Door ubiquitinatie van deze eiwitten wordt de bacterie niet meer herkend en vormt zo een vacuole waarin de bacterie zich ongeremd kan repliceren (*Legionella*-containing vacuoles)^[6]. Het biochemische proces in de cel wordt weergegeven in de biochemische cascade in schema 1^{[7][8]}.



Schema 1 – Biologische cascade van ADPr ubiquitinatie door *Legionella* enzymen op het mART domein, de additie van het gastheer substraat door het PDE domein en het loskoppelen door het knipenzym DUP wat resulteert in fosforibosyl ubiquitine.

Het vormen van Ub^{ADPr} op het mART domein en de koppeling van het substraat met het fosforibosyl op het PDE domein, zijn biochemische enzymatische processen in het lichaam. Deze processen vinden simultaan plaats in de cellen en kunnen dus niet apart bestudeert worden. Wanneer er op synthetische wijze Ub-76^{ADPr} wordt gemaakt, is het mogelijk om Ub-76^{ADPr} te modificeren. Zo kunnen er verschillende “probes” worden gemaakt van het Ub-76^{ADPr} waarmee het gekoppelde enzym in actieve staat gevolgd kan worden. Deze probes kunnen via twee manieren worden gekoppeld aan ubiquitine. Dit is middels een triazool linker (via click chemie in oplossing) of via een natieve linker (synthese op resin)^[9]. De verschillende linkers staan hieronder in figuur 1 weergegeven.

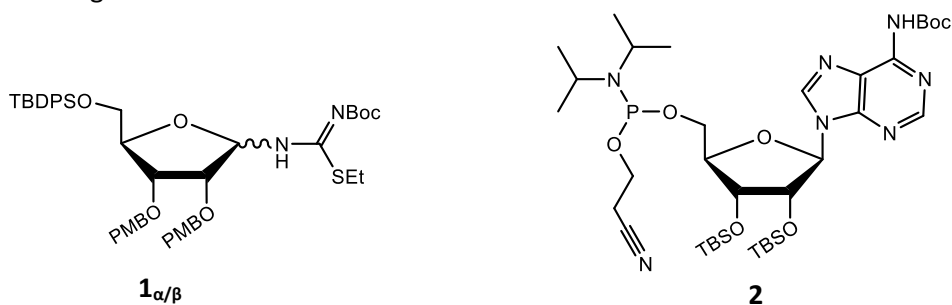


Figuur 1 – Verschillende synthetisch bruikbare linkers tussen ADPr en ubiquitine op positie Arg42.

De natieve vorm wordt in het lichaam enzymatisch gekatalyseerd en de verwachting is dat de natieve binding met het gemodificeerde ADPr beter wordt herkend dan de triazool variant. Wanneer je een probe kan maken die op de natieve manier gebonden is, kan dit veel informatie over de biologische werking van de *Legionella* enzymen geven. Dit kan leiden tot betere inzichten in de werking van *Legionella* in het menselijk lichaam.

Doel

In dit onderzoek wordt de natieve binding gezien als de binding tussen het ribosyl en de arginine op positie 42 van ubiquitine. Dit is de arginine waarop het ADPr door het mART domein wordt gebonden aan ubiquitine^[7]. Deze natieve binding is buiten dit onderzoek om niet eerder gesynthetiseerd. Het biologische vervolgonderzoek is afhankelijk van het gesynthetiseerde Ub-76^{ADPr} en daardoor is het valideren en optimaliseren van de syntheseroute cruciaal. Het doel in deze afstudeeropdracht is dan ook het valideren, optimaliseren van de synthese route van bouwstenen 1 en 2 en het synthetiseren van het alfa en bèta Ub-76^{ADPr} met een natieve link op arginine 42. Deze bouwstenen staan weergegeven in figuur 2.

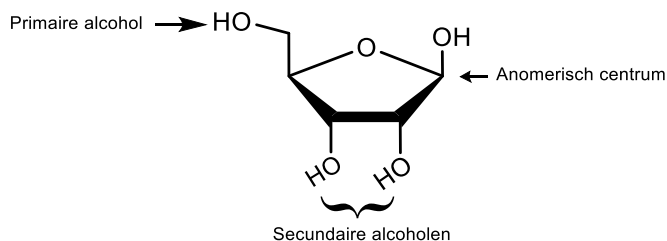


Figuur 2 – Structuren van de bouwstenen nodig voor de synthese van Ub-76^{ADPr} waarin bouwsteen 1 de beschermde alfa of bèta isothioureëverbinding is (1_{α/β}) en bouwsteen twee de primair gebonden fosforamidiet op adenosine (2).

Wanneer deze bouwstenen aan elkaar gekoppeld worden en Ub^{ADPr} wordt gemaakt, wordt het enzymatische proces van het mART domein op synthetische wijze nagemaakt/vervangen. Zo is het mogelijk om vervolgstudies uit te voeren met manipulaties van dit molecuul om zo al eerder genoemde “probes” te creëren of remmers te ontwikkelen die eventuele kunnen resulteren in medicatie voor een *Legionella* infectie. Het belangrijkste is echter het maken van $\text{Arg}^{42}\text{Ub}^{\text{ADPr}}$ (kortweg Ub^{ADPr}) om te onderzoeken in welke mate *Legionella* dit substraat herkent.

Synthese

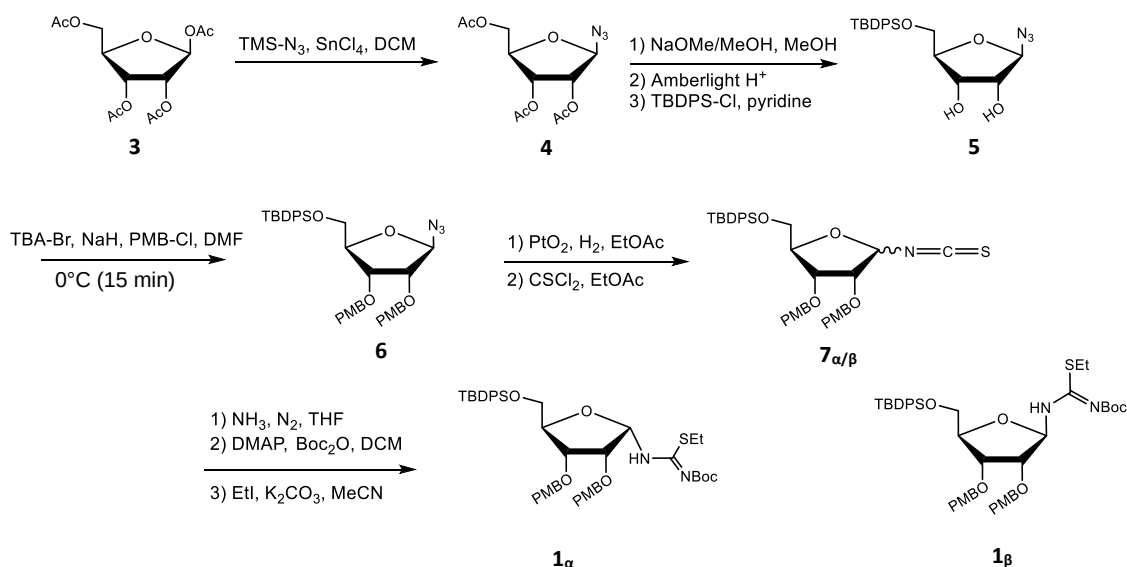
In dit onderzoek staat suikerchemie voorop aan ribose en adenosine moleculen. Dit houdt in dat er gebruik wordt gemaakt van het verschil in reactiviteit van de alcoholgroepen, om hier modificaties op uit te voeren. Hierin wordt er veel gebruik gemaakt van alcohol beschermgroepen, die vervolgens selectief weer verwijderd kunnen worden. Er zijn drie verschillende gradaties in alcohol reactiviteit aan een ribose molecuul. Dit valt te onderverdelen in de secundaire alcoholen, het primaire alcohol en het anomerisch centrum. In figuur 2 worden de reactieve delen van het ribose molecuul weergegeven met de bijbehorende toewijzing.



Figuur 3 – Verschillende reactieve delen van een suiker molecuul met benaming (reactiviteit: anomerisch centrum > primaire alcohol > secundaire alcohol).

In schema twee is het synthese schema van bouwsteen 1 weergegeven. Dit is een meerstaps synthese waarin het gebruik van suikerchemie duidelijk naar voren komt.

Bouwsteen 1



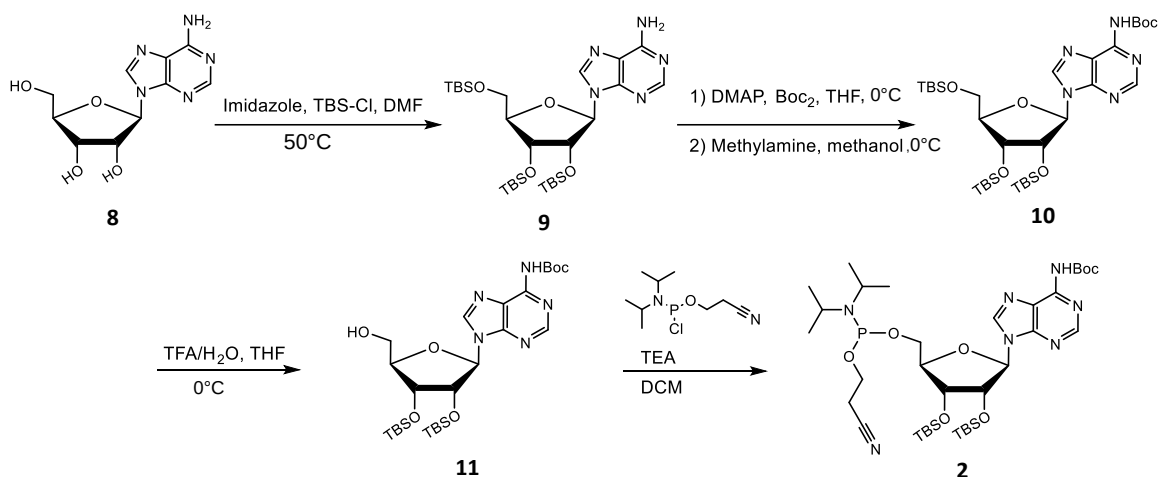
Schema 2 – Syntheseschema bouwsteen 1.

Als eerst wordt de volledig met acetyl beschermde ribose selectief ontschermd op het anomerisch centrum met SnCl_4 . Dit vormt een stabiel intermediair (oxocarbeniumion) waarna selectief op de bèta

positie een azide gemaakt wordt (neighbouring group participation door acetyl van C-2). Vervolgens worden de overige acetyl groepen ontschermd met een NaOMe/MeOH oplossing en worden de gedeprotoneerde oxides, geprotoneerd met H^+ (Amberlight H^+). Vervolgens wordt de primaire positie beschermd met een TBDPS beschermgroep. De secundaire posities worden beschermd met PMB beschermgroepen. Het verschil in beschermgroepen is nodig voor latere selectieve ontscherming reacties voor verdere modificaties aan het molecuul. De anomerische azide wordt hierna gereduceerd tot een amine en dit geeft een anomerisch mengsel. Deze anomeren worden van elkaar gescheiden en met beide varianten wordt een isothioureë verbinding gemaakt met NH_3 -gas. Hierna wordt de amino groep beschermd met een Boc beschermgroep en de zwavel beschermd met een ethyl groep. Dit resulteert in moleculen 1α en 1β (bouwsteen 1).

De synthese van bouwsteen 2 is een meerstaps synthese aan een adenosine molecuul. Hierin worden er niet alleen modificaties uitgevoerd op het ribose molecuul maar ook op het exocyclische gedeelte van het molecuul. Het synthese schema wordt in schema 3 weergegeven.

Bouwsteen 2

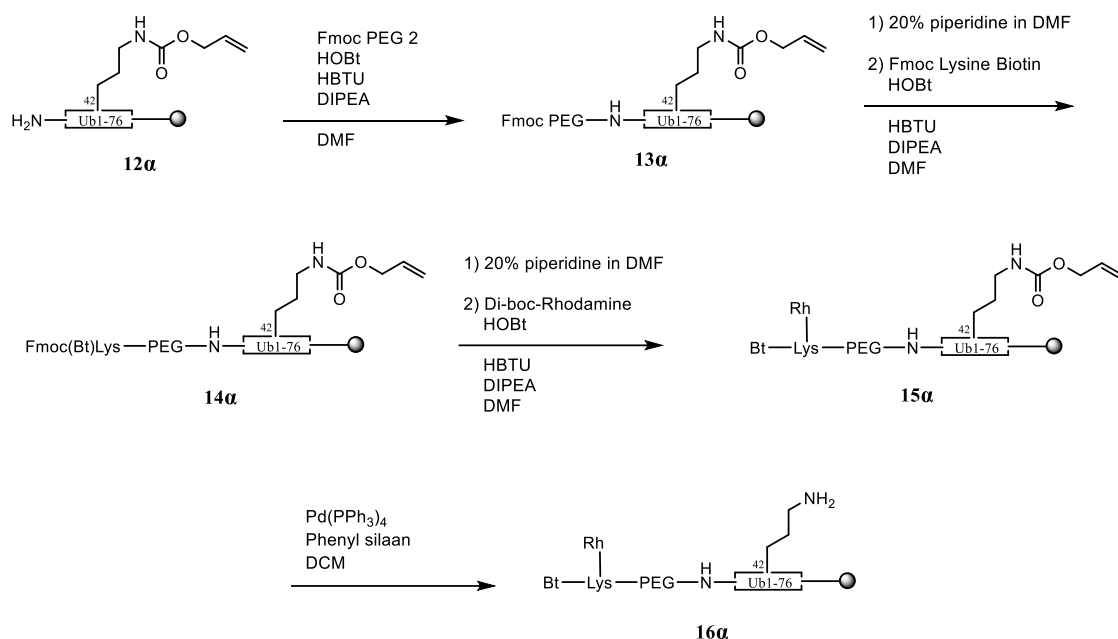


Schema 3 – Synthese schema bouwsteen 2.

De syntheseroute begint met het beschermen van alle alcohol groepen met een TBS beschermgroep (imidazole als katalysator). Vervolgens wordt het exocyclische amine beschermd met een Boc beschermgroep op 0°C (DMAP als katalysator). Het is mogelijk dat er een dubbele Boc groep koppeling plaats vindt. Om te zorgen dat er een enkele Boc groep gekoppeld is, wordt de zwakke base methylamine toegevoegd om zo een eventueel extra gebonden Boc groep te verwijderen. De TBS groep op de primaire positie wordt selectief verwijderd met een TFA/ H_2O oplossing op 0°C. Als laatste wordt een fosforamidiet gekoppeld op de primaire positie middels een SN_2 reactie.

Buiten de suikerchemie om wordt er ook gewerkt met SPPS op resin. Hieronder valt de synthese van α - & β -Ub-76^{ADPr}, maar ook modificaties aan N-terminus kant van de op resin gekoppelde ubiquitine. Het voordeel van SPPS is dat het ubiquitine eiwit hierop synthetisch gemodificeerd kan worden. We kunnen zo bijvoorbeeld reporter moleculen installeren zoals aan lysine gekoppelde biotine of rhodamine (een fluorfoor) aan de N-terminus of op Arginine-42 ADPr vormen. In het geval van de synthetische modificatie van Ub-76 op resin wordt er beide reporter moleculen geïnstalleerd (biotine en rhodamine) (zie schema 4).

Resin modificatie van Ub76

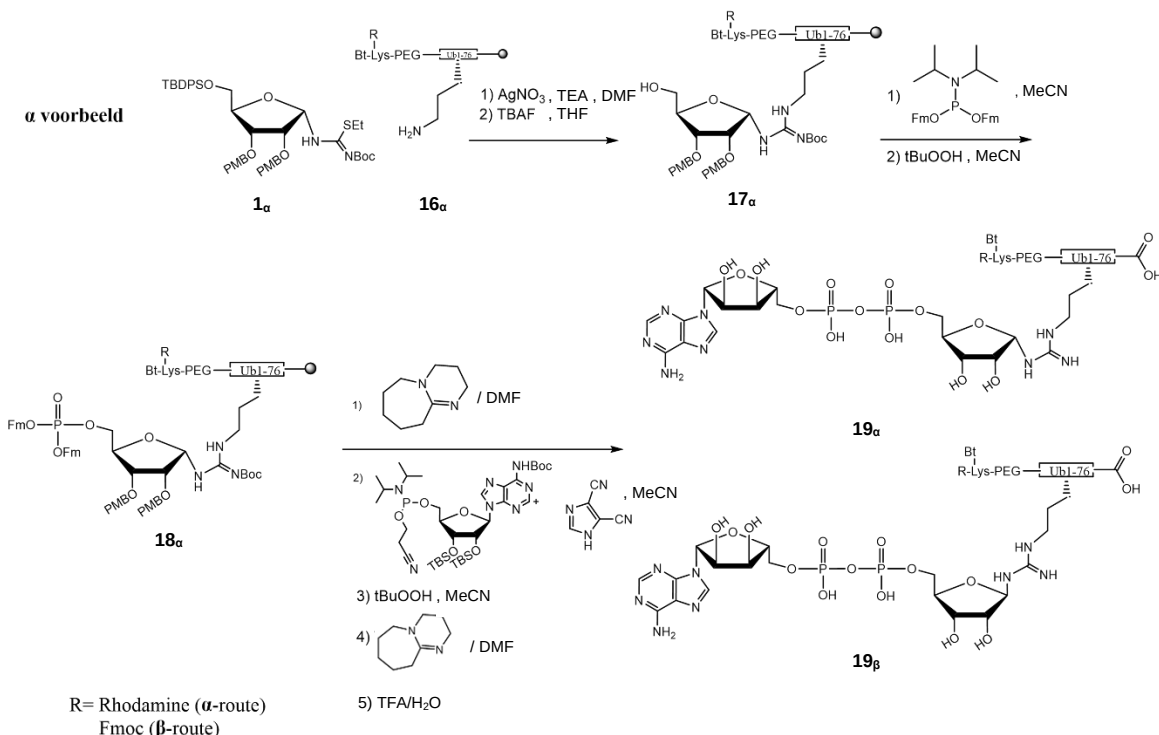


Schema 4 – Synthese schema ubiquitine eiwit modificatie op resin.

Het doel van de koppeling van deze reporter moleculen is om een substraat (Ub-ADPr) te maken voor legionella die via rhodamine in fluorescentie assays gemeten kan worden of via biotine gebruikt kan worden in pulldowns^[10]. Verder wordt er voor het installeren van de aan lysine gekoppelde reporter moleculen een PEG-spacer gekoppeld. Deze spacer wordt gekoppeld om eventuele intermoleculaire interacties tegen te gaan.

Om na succesvolle ribose/suikermolecuul synthese de natieve arginine binding te creëren wordt er gebruik gemaakt van een op positie 42 gemodificeerde vorm van ubiquitine. Ubiquitine is 76 aminozuren lang en wordt op aanvraag gesynthetiseerd op resin. Hierin is de arginine vervangen door een met Alloc beschermde ornithine, die met behulp van AgNO₃ met de isothioureia donor bouwsteen 1 (**1_{α/β}**) tot een arginine/guanidinium link reageert. Hierin fungeert de zwavel ethyl groep als een goede vertrekkende groep die vervangen wordt door de amide binding met het ornithine. Dit vormt in zijn geheel de arginine link die natief is. Hierna wordt gelijk de primaire TBDPS-groep verwijderd door toevoeging van TBAF (stap 1 synthese schema 5).

α - & β -Ub-ADPr synthese op resin



Schema 5 – Synthese schema vorming van α - en β -Ub^{ADPr} (**19 α** /**19 β**) op resin.

Zoals in schema 5 te zien is zijn er twee verschillende modificaties van Ub-76 op resin gebruikt in de synthese van Ub^{ADPr}. Zo wordt molecuul **1 α** gekoppeld aan een ubiquitine eiwit dat gemodificeerd is met een rhodamine als extra reporter molecuul. In de synthese route waar **1 β** aan ubiquitine wordt gekoppeld is op deze plek een Fmoc beschermgroep in plaats van de rhodamine. Dit verschil wordt gemaakt omdat de eindverbindingen **19 α** en **19 β** voor verschillende doeleindes gebruikt gaan worden in vervolgonderzoek.

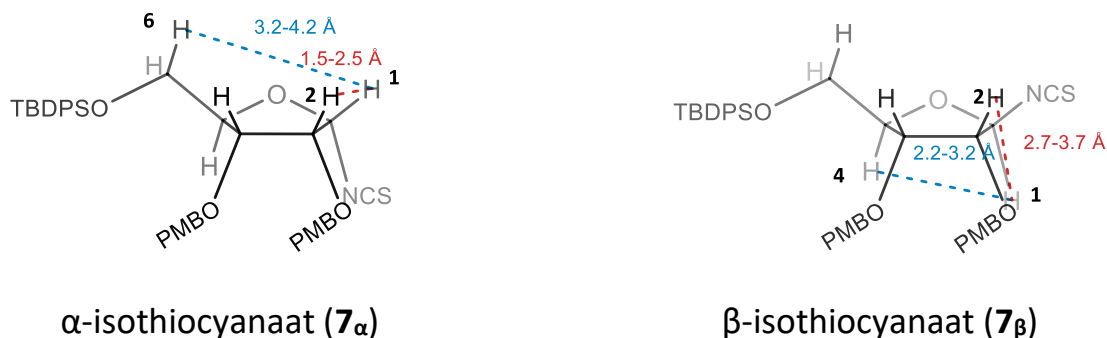
Na de koppelingen van de fosforibosyl groepen aan ubiquitine, wordt per verbinding de fosforbrug (pyrofosfaat binding) gesynthetiseerd om bouwstenen 1 en 2 aan elkaar te koppelen. Dit wordt bereikt door op resin eerst de primaire positie van molecuul **17 α/β** te fosforyleren met een Fm beschermd fosforamidiet en deze te oxideren met tBuOOH. Het beschermde fosforamidiet van molecuul **18 α/β** wordt vervolgens ontschermd met DBU en hieraan wordt bouwsteen 2 (**2**) gekoppeld om zo de pyrofosfaat binding te vormen met behulp van DCI en de verbinding wordt geoxideerd met tBuOOH. De cyanoethyl beschermgroep wordt verwijderd met behulp van DBU en de het Ub^{ADPr} wordt van de resin afgesplitst met een TFA/H₂O mengsel (verwijderd ook alle beschermgroepen). Dit vormt het α - en β -Ub^{ADPr} in oplossing, wat vervolgens gezuiverd kan worden.

Analysemethodes

Ter indicatie en identificatie van moleculen wordt er gebruikt gemaakt van verschillende analysemethoden. Elke reactie wordt gevolgd met TLC, om te zien of de reactie op gang is gekomen en of deze is beëindigd. Nadat er wordt geconstateerd dat de reactie uit is gereageerd, of dat de maximale hoeveelheid product is behaald, wordt de reactie (indien nodig) opgewerkt en gezuiverd. Dit zal handmatig gebeuren of automatisch met de Buchi Control Unit C-620. Hierna zal elk product in de synthese route van bouwsteen 1 & 2 worden geanalyseerd op NMR (Bruker-300 Ultrashield NMR). Dit zal per synthese minimaal een ¹H-NMR en ¹³CNMR of waar nodig een ³¹P-NMR meting zijn.

In het geval van molecuul **7 α,β** worden er ook 2D NMR metingen gedaan zoals COSY, HSQC en NOESY. Voor molecuul **7 α,β** zijn de COSY en de NOESY vooral belangrijk om te kunnen achterhalen wat het α - of β -anomeer is.

In een COSY spectrum worden twee ^1H -NMR spectra tegen elkaar uitgezet, om zo de naastgelegen interacties tussen protonen weer te geven. Een NOESY meting meet de koppeling tussen naast elkaar gelegen protonen, maar ook de interactie over een ruimte heen (tot een afstand 5 Å tussen de te meten protonen).^[11] Zo zal bij een α -isothiocyanaat verbinden H'1 koppelen met de twee H'6 protonen. Bij de β -isothiocyanaat zal H'1 koppelen met H'4. Dit is schematisch weergegeven in figuur 3.



Figuur 4 - Koppelende protonen die interactie hebben bij de α - of β -isothiocyanaat verbinding bij een NOESY meting (blauw) en de bindingsafstand tussen H-1 en H-2 in deze configuraties (rood).

Een andere manier om de α - en β -anomeer te bepalen is om te kijken naar de waarde van de J-koppeling. De waarde van de J-koppeling van de β -anomeer zal kleiner zijn dan de α -anomeer, aangezien de afstand hier groter is tussen de H-1 en H-2 en dus de interactie tussen de twee protonen lager is.

Bij de synthese van molecuul **2** zal er echter een ^{31}P -NMR genomen worden. Hiermee wordt geconstateerd of de koppeling tot vorming van het fosforamidiet heeft plaats gevonden. ^{31}P -NMR werkt conceptueel gezien volgens dezelfde principes als ^1H -NMR. Hierin heeft fosfor ook een spin van $\frac{1}{2}$ en natuurlijke isotopen. Het verschil zit hem voornamelijk in het gebruik van andere externe standaarden die gebruikt worden om de spectra te eiken. Hierin is de ^{31}P -NMR $\delta = 0$ ppm gebaseerd op 85% fosforzuur. Het spectrum is gebaseerd op het aantal unieke fosfor kernen. In het geval van molecuul **2** zullen er twee verschillende signalen verwacht worden^[12]. Het fosfor centrum is in dit geval namelijk chiraal.

Het onderzoek en de syntheseroutes die gebruikt worden komen voornamelijk uit een manuscript dat gepubliceerd gaat worden. In dit manuscript zal ook data/moleculen verwerkt worden dat uit dit onderzoek komt. Dit betekent dat de resultaten van dit onderzoek tot een co-auteurschap op dit manuscript heeft geleidt.

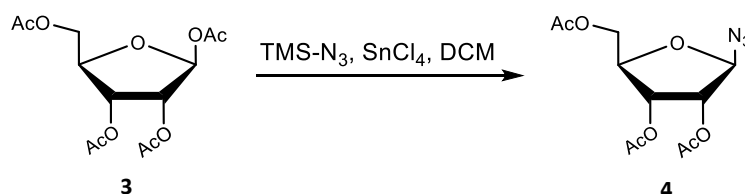
Resultaten en discussie

Het doel van dit onderzoek was het valideren en optimaliseren van de twee hoofdbouwstenen om hiermee uiteindelijk α - & β -Ub-76^{ADPr} op resin te maken en te zuiveren. Hierin is elke reactie stap in deze route meerdere malen uitgevoerd. De resultaten zullen per molecuul besproken worden. De gebruikte NMR-spectra die per molecuul zijn weergegeven zijn representatief voor elke syntheses stap tenzij anders vermeld wordt. Bijbehorende reactiemechanismen per synthese zijn terug te vinden in bijlage A1 t/m A15.

Na het valideren van de synthese route van bouwsteen 1 is ter optimalisatie getracht om een gedeelte van de syntheses ruw na elkaar door te zetten. Hierin wordt bedoeld dat er alleen tussen de verschillende syntheses door wordt gewassen om reagentia uit het reactiemengsel te halen, maar wordt niet na elke syntheses stap het product gezuiverd. Deze optimalisatie methode werd toegepast op de syntheses stappen van molecuul **3** naar molecuul **6**. Dit komt overeen met syntheses MV24, MV25 en MV26. Tussen deze syntheses wordt er dus geen procentuele opbrengst bepaald. Enkel na synthese van MV26.

Bouwsteen 1

Synthese van 2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (**4**)



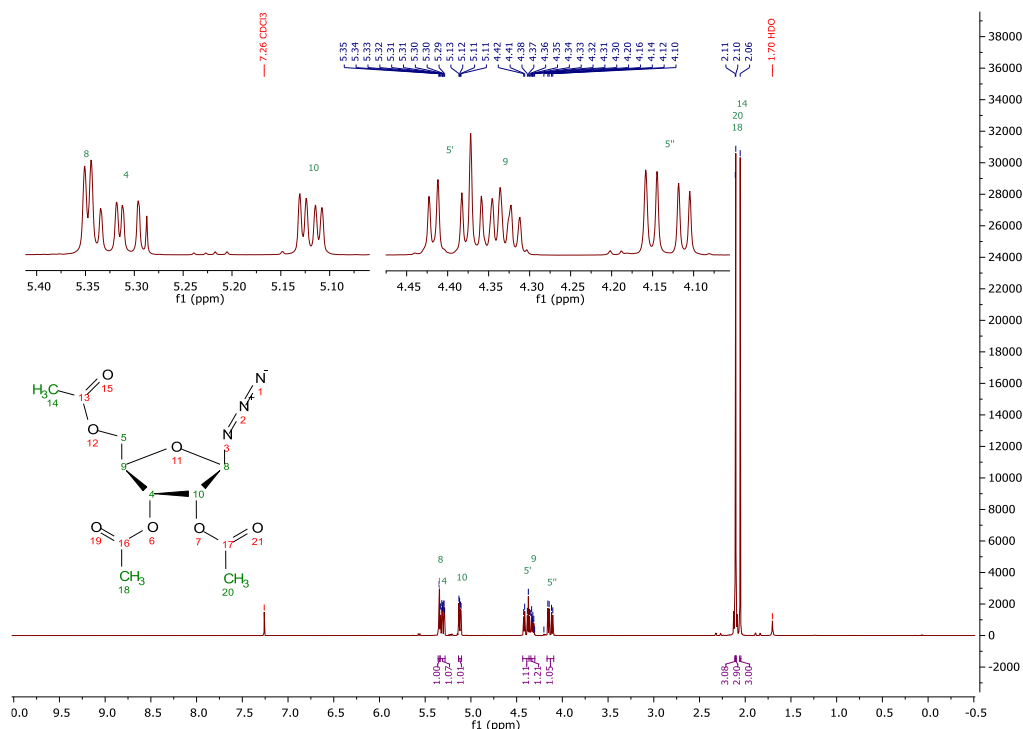
De synthese van 2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (**4**) is drie keer uitgevoerd. Dit waren de syntheses MV01, MV11 en MV24. De synthese van MV24 zal later besproken worden omdat dit de eerste synthese is in een optimalisatie poging (ruw doorzetten met enkel was stappen als “zuivering”). Van de syntheses MV01 en MV11 staan de belangrijkste data in tabel 1 weergegeven.

Tabel 1- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (**4**).

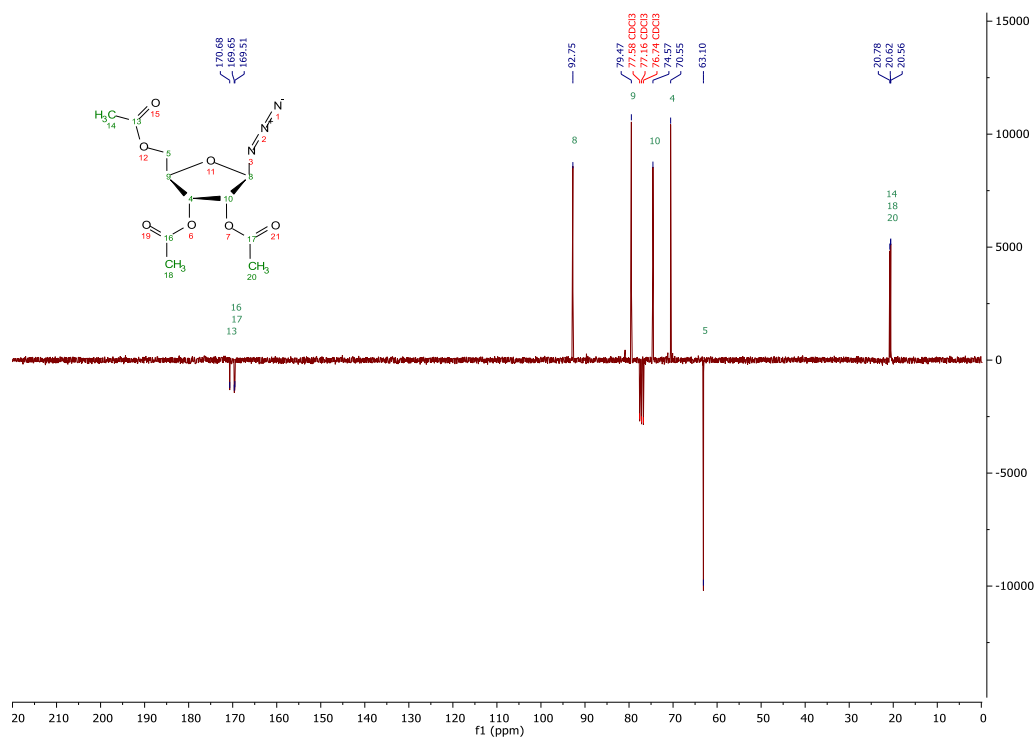
Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV01	4,99	4,13	15,7	13,7	87,3
MV11	9,98	8,33	31,4	27,7	88,2
MV24	9,7020	-	33,48	-	-

Zoals te zien is aan de hoge procentuele opbrengst is de reactie efficiënt verlopen. De reagentia zijn erg reactief zoals het gebruikte SnCl₄. SnCl₄ zorgt voor de ontscherming van de acetyl-groep op het anomerische centrum. Dit is alleen op deze positie mogelijk doordat er hier een oxocarbenium intermediair gevormd kan worden (zie bijlage A1). Mede door dit oxocarbenium intermediair zal het eindproduct de gewilde β -azide zijn. Buiten de vorming van het oxocarbenium intermediair vindt er namelijk ook het “Neighbouring Group Effect”^[13] plaats. Dit effect zorgt ervoor dat de carbonyl zuurstof (gekoppeld aan C-2) het gevormde carbokation op C-1 stabiliseert (coördineert aan C-1). Hierdoor wordt de α -positie afgeschermd, waardoor de azide alleen op de β -positie zou kunnen aanvallen. In het ¹H-NMR en ¹³C-NMR is te zien dat er drie CH₃ signalen zijn, die overeenkomen met de CH₃ signalen van de acetyl groepen. Dit is te zien in figuur 5 en 6. In de uitgangsstof waren er vier signalen te zien voor zowel de CH₃ signalen bij de ¹H-NMR en ¹³C-NMR en bij het ¹³C-NMR ook deze signalen voor de carbonyl koolstoffen (zie bijlage B1).

Na deze bevindingen is er doorgegaan met het modificeren van molecuul **4**.

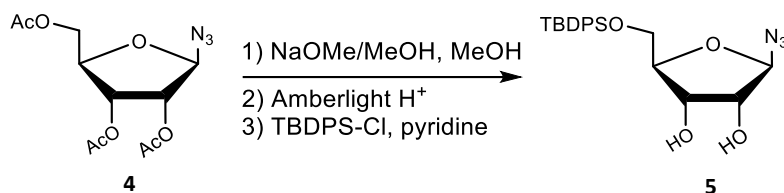


Figuur 5 - Het gemeten ¹H-NMR spectrum van 2,3,5-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl azide (**4**)



Figuur 6 - Het gemeten ¹³C-NMR spectrum van 2,3,5-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl azide (**4**)

Synthese van 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (**5**)



De synthese van 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (**5**) is vier keer uitgevoerd. Dit waren syntheses MV02, MV06, MV12 en MV25. In de synthese van MV02 is de opbrengst niet gerapporteerd. MV25 is ook niet gerapporteerd, omdat deze synthese deel uitmaakt van het eerder genoemde ruwe doorzetten van synthese MV24. Hieronder in tabel 2 zijn de resultaten weergegeven van de uitgevoerde syntheses.

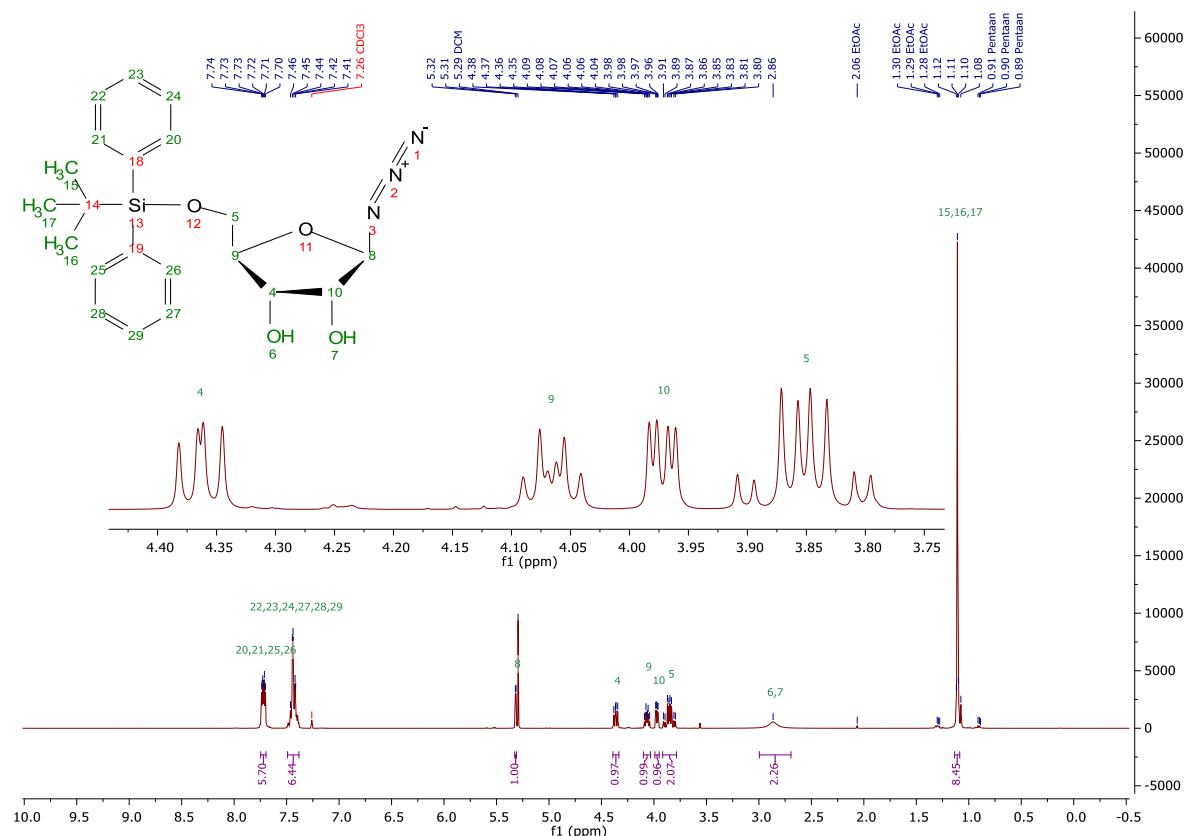
Tabel 2- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (**5**).

Synthese	$m_{\text{(start)}}$ (g)	$m_{\text{(opbrengst)}}$ (g)	$\text{mmol}_{\text{(start)}}$	$\text{mmol}_{\text{(opbrengst)}}$	Opbrengst (%)
MV02	2,002	-	6,67	-	-
MV06	2,126	2,599	7,06	6,29	89,1
MV12	8,234	9,598	27,35	23,2	84,9

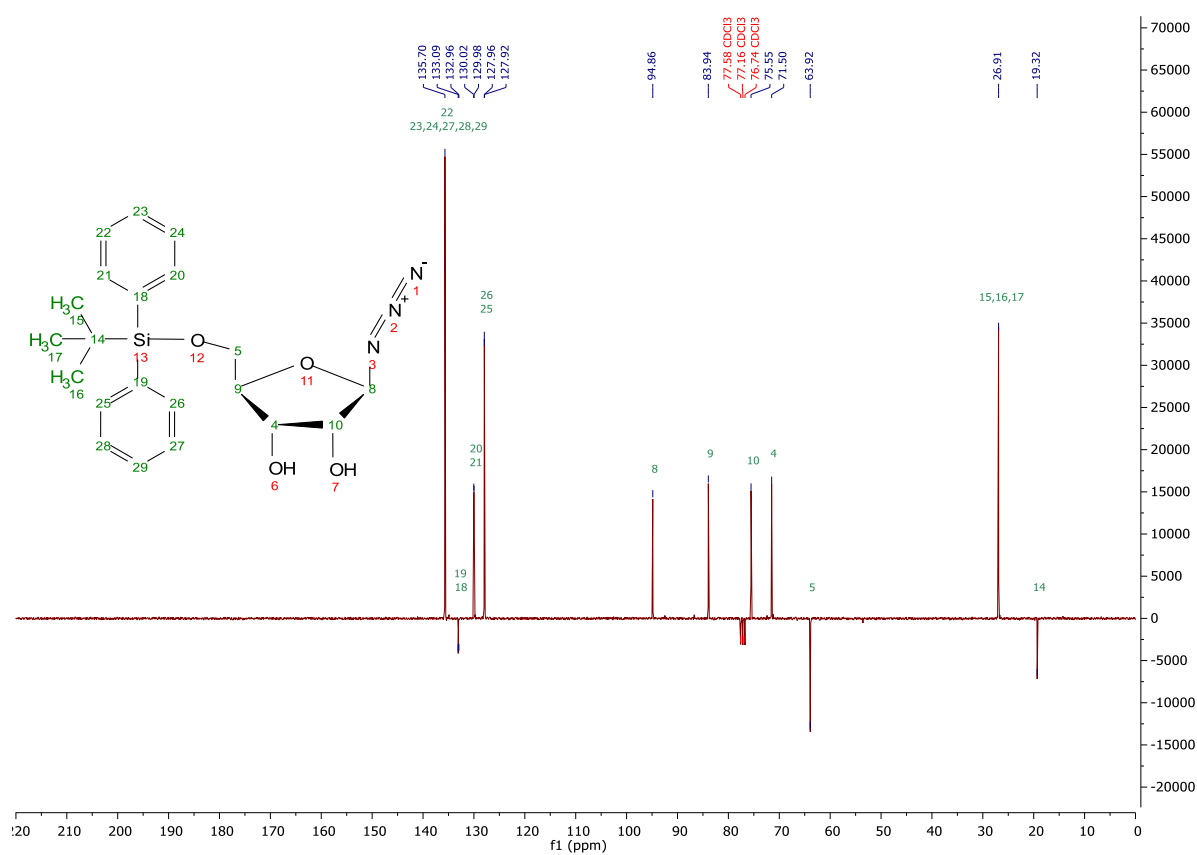
Zoals te zien is aan de procentuele opbrengsten zijn de syntheses wederom efficiënt verlopen. Ook is er duidelijk te zien in de NMR-spectra dat er een TBDPS-bescherm groep is gekoppeld/geïnstalleerd. Omdat er een lage hoeveelheid equivalenten van TBDPS-Cl wordt gebruikt, de primaire alcohol reactiever is dan de secundaire alcoholen en de TBDPS-groep erg “bulky” is (sterische hindering), zal de TBDPS-groep voornamelijk op de C-6 positie binden.

Verder is er in het ^1H -NMR ook te zien dat er twee alcohol protonen aanwezig zijn (2,86 ppm), 9 protonen die overeen komen met de *tert*-butyl-groep van de TBDPS (1,10 - 1,12 ppm) en 10 protonen die overeen komen met de benzeen groepen (7,41 – 7,74 ppm: aromatische gebied). Het ^1H -NMR - spectrum is te zien in figuur 7. Ook is elk koolstof signaal terug te vinden in het ^{13}C -NMR weergegeven in figuur 8.

De spectroscopische data gaf genoeg reden om door te gaan met de bescherming van molecuul **5** met PMB-groepen.

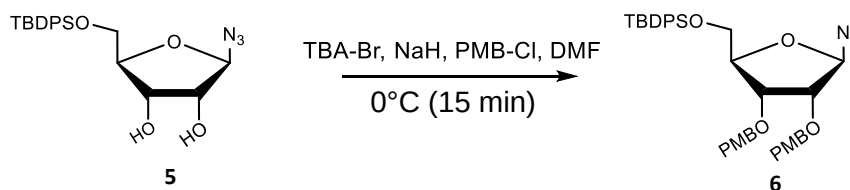


Figuur 7 - Het gemeten ¹H-NMR spectrum van 5-O-((tert-butyl)-diphenylsilyl)-β-D-ribofuranosyl azide (5)



Figuur 8 - Het gemeten ¹³C-NMR spectrum van 5-O-((tert-butyl)-diphenylsilyl)-β-D-ribofuranosyl azide (5)

Synthese van 5-O-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (6)



De synthese van 5-O-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (6) is vaak uitgevoerd. Door de stevige reactie condities waren er behoorlijk wat bijproducten die gevormd werden en was optimalisatie van de reactietijd cruciaal, dit is terug te zien in de procentuele opbrengst die gerapporteerd staat in tabel 3.

Tabel 3- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 5-O-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (6) met de reactietijd (R.T.) per synthese.

Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)	R.T. (min)
MV03	0,994	0,1097	2,40	0,168	7,0	Overnacht
MV04	0,3765	-	0,859	-	-	150
MV05	1,005	0,557	2,43	0,85	35,1	72
MV07	1,029	0,5081	2,49	0,777	31,2	50
MV15	3,930	2,2921	9,50	3,506	36,9	60
MV26	13,978	8,156	33,80	12,47	36,9	60
MV28	7,3063 g	5,968	17,67	9,127	51,7	60

Aan de waardes van synthese MV03 is duidelijk te zien dat het een uitdagende reactie is. De reactie werd overnacht laten staan en zo ontstonden er veel bijproducten. In een van deze bijproducten werd de TBDPS groep afgesplitst. Een TBDPS-groep word normaal ontschermd met gebruik van TBAF. In de synthese zijn er veel broom en chloor atomen aanwezig die HBr en HCl kunnen vormen. In deze ontstane condities ontstaan er zowel zure condities als een halogeenrijke omgeving. Deze condities zouden samen mogelijk ervoor kunnen zorgen dat de TBDPS-groep wordt ontschermd, maar dit is niet met zekerheid te stellen.

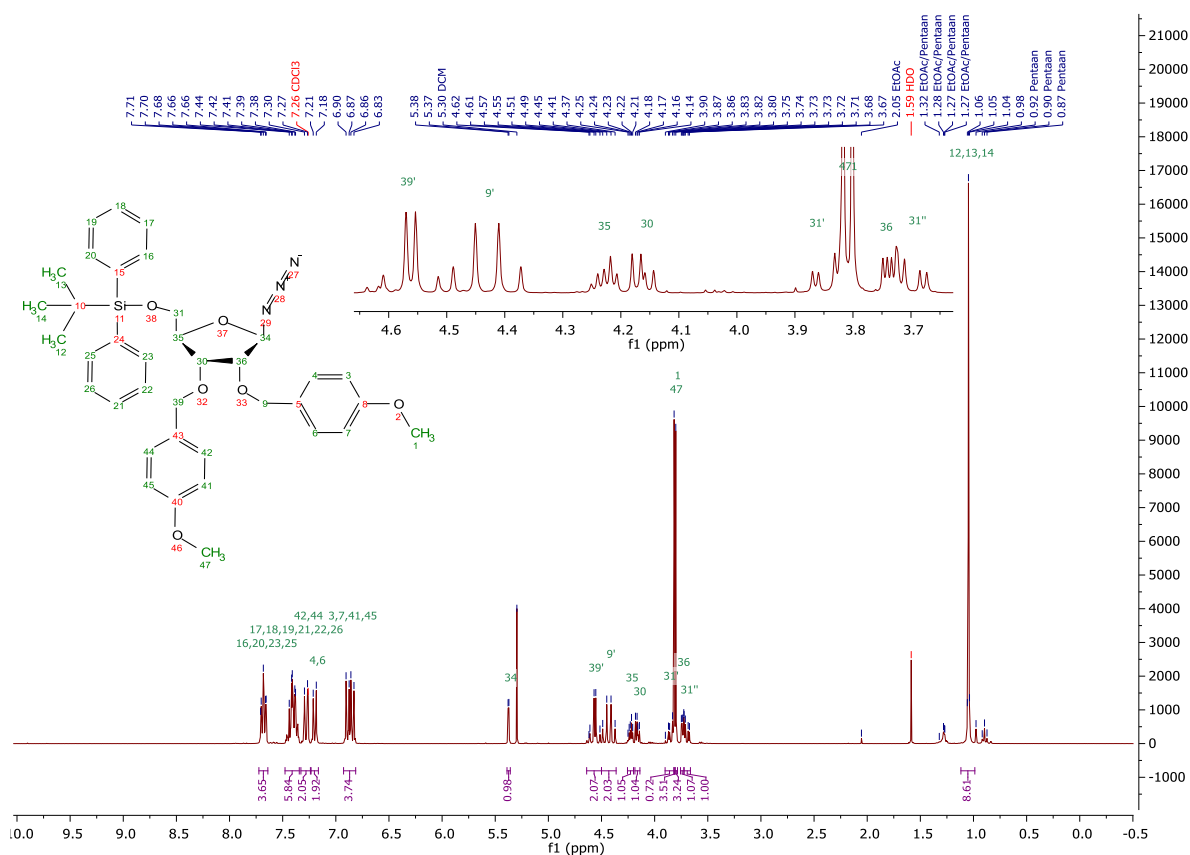
Er werd dus ook een product gevonden dat twee keer met een PMB-groep beschermd was. Van het product waarin de modificatie met 2 PMB-groepen werd geconstateerd, is een her synthese uitgevoerd met TBDPS-Cl (MV04). Dit was echter niet succesvol omdat naar verwachting een PMB-groep op de meer reactieve primaire alcohol was gebonden. De TBDPS-groep op de primaire alcohol is essentieel voor een latere selectieve ontscherming en er kan dus niet doorgedaan worden met een PMB-groep op de primaire alcohol positie. Na deze bevinding is er gefocust op het optimaliseren van de reactietijd (MV05 + MV07). Deze bevindingen werden meegenomen in de rest van de reacties.

Ook is de reactie gevoelig voor water en is het dus van belang om extreem droog te werken. Zo werd er bij elke reactie gecoëvaporeerd met toluen, met droge oplosmiddelen en onder inerte omgevingen gewerkt. Deze maatregelen bleken ontoereikend en er werden bij MV15, MV26 en MV28 geactiveerde mole sieves toegevoegd. Zoals te zien is in de procentuele opbrengst heeft dit een zeer bevorderende werking gehad. Ook zal dit te wijten zijn aan de schaalverhoging. Zo zal bij eenzelfde hoeveelheid water in het reactie mengsel minder effect hebben op grotere schaal, dan bij een lagere schaal zoals MV07.

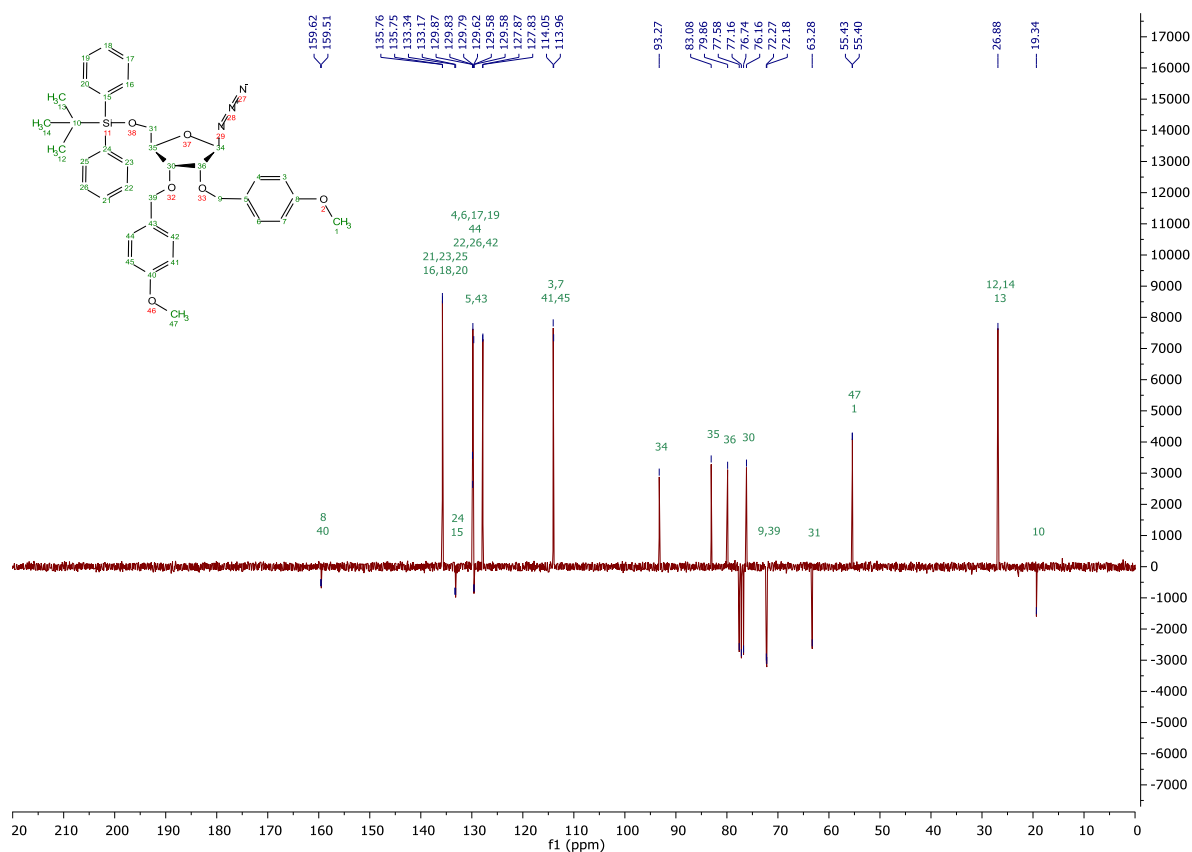
Synthese MV26 is de laatste stap geweest van de ruw doorgezette synthese route (molecuul 3 naar molecuul 6: zie schema 2). Hierin werd gekeken of het mogelijk was om met alleen was stappen voor

de reagentia, eenzelfde of betere procentuele opbrengst te verkrijgen. Dit zou namelijk veel tijd en chemicaliën schelen. De procentuele opbrengst is gebaseerd op de eerste ingewogen hoeveelheid van molecuul **3** (MV24). Er werd initieel een verkeerd oplosmiddel gebruikt (DCM). Dit zorgde ervoor dat de NaH niet kon oplossen en de reactie niet op gang kwam. Er werd rustig aan koude DMF toegevoegd en de reactie kwam op gang. Deze fout heeft naar verwachting gezorgd voor een lagere procentuele opbrengst. Echter is de gerapporteerde procentuele opbrengst, de opbrengst na 3 synthese stappen. Wanneer deze waarde wordt vergeleken met de meest gunstige totaal opbrengst van 29,0% van de voorgaande syntheses (gerekend met opbrengsten van MV11, MV06 en MV15) is dit een verbetering (36,9%). Naar verwachting is dit deels te wijden aan het gebruik van geactiveerd mole sieves om de reactiecondities nog droger te maken. Het is dus mogelijk om zonder tussentijds zuiveren via kolomchromatografie molecuul **6** te synthetiseren.

De identificatie van de stof is uitgevoerd met een ^1H -NMR en ^{13}C -NMR meting. Deze spectra zijn te zien in figuur 9 en 10. Hierin zijn duidelijk de methoxy-groepen (3,80 en 3,82 ppm) te zien van de PMB groepen en de methyl groepen van de TBDPS-tert-butyl (1,05 ppm). Ook is er te zien dat er in dit spectrum (synthese MV28) nog een beetje vervuiling is met oplosmiddelen (EtOAc en pentaan) en naar verwachting water^[14]. Dit is te zien in het ^1H -NMR spectrum.

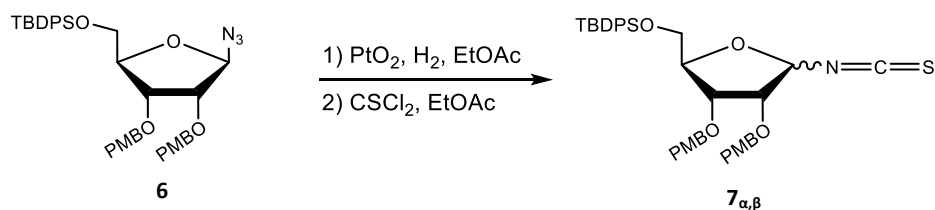


Figuur 9 - Het gemeten ^1H -NMR spectrum van 5-O-((tert-butyl)-diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (**6**).



Figuur 10 - Het gemeten ^1H -NMR spectrum van 5-O-((*tert*-butyl)-diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (**6**).

Synthese van 5-O-((*tert*-butyl)-diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7 $_{\alpha,\beta}$**)



In de synthese van 5-O-((*tert*-butyl)-diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat wordt voornamelijk gebruik gemaakt van de stof CSCI_2 in de vorming van het α,β isothioyanaat. In deze reactie werd in eerste instantie een reductie met platinedioxyde en H_2 -gas uitgevoerd. Hierdoor werd er een amine gevormd die vervolgens om werd gezet in een isothiocyanaat (met CSCI_2). Echter waren er problemen met de levering van CSCI_2 . In synthese MV10 is er daarom gebruik gemaakt van het minder gevaarlijke en reeds op het lab aanwezige koolstof disulfide (CS_2). Dit is een minder reactief molecuul dan CSCI_2 .

Tabel 4- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7 α,β**).

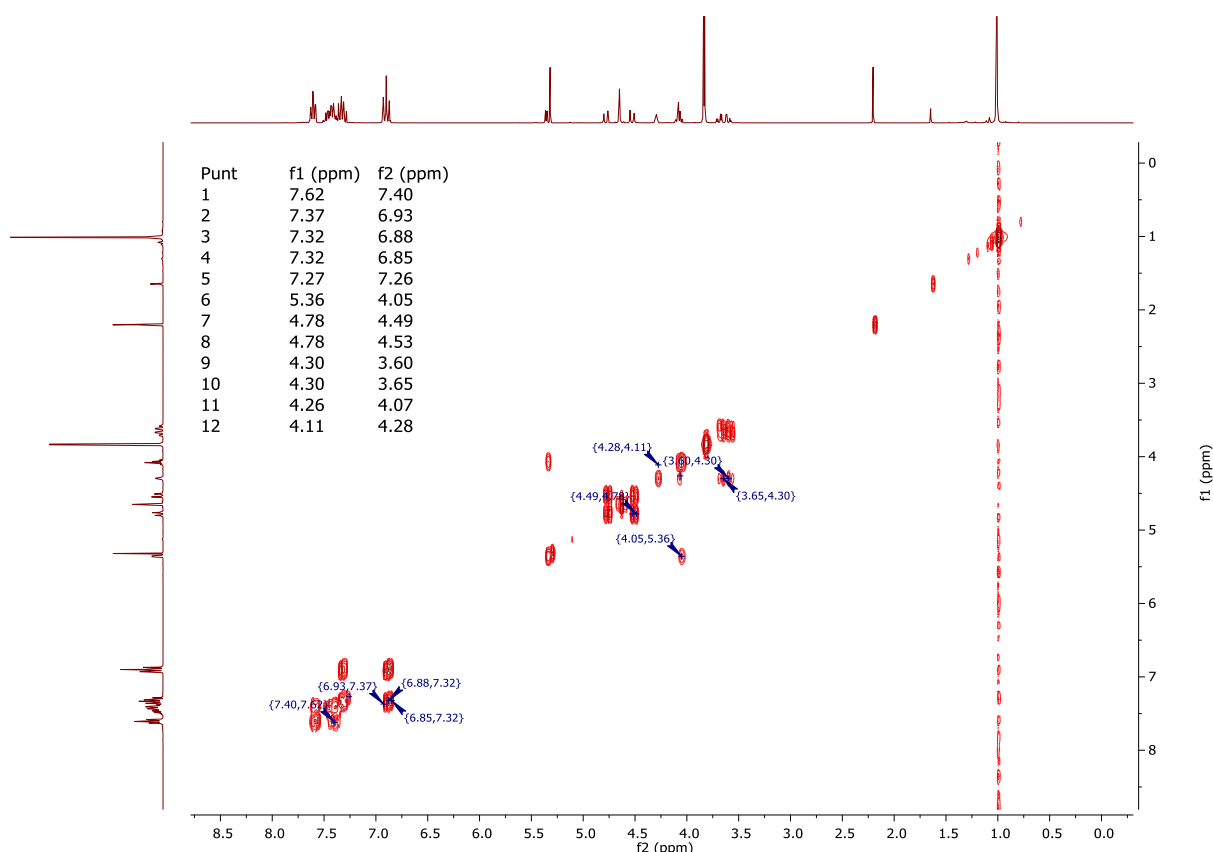
Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)		mmol _(start)	mmol _(opbrengst)		Opbrengst (%)		
		α	β		α	β	α	β	Totaal
MV10	0,2089	-	-	0,3198	-	-	-	-	-
MV16	0,2074	0,0603	0,0389	0,3172	0,0900	0,0581	28,4	18,3	46,7
MV17	1,0069	0,4055	0,2144	1,540	0,605	0,320	39,3	20,8	60,1
MV22	1,0088	0,3909	0,2495	1,543	0,5835	0,3724	35,1	22,4	57,5
MV27	5,0023	0,9138	2,5025*	7,651	1,364	-	17,8	-	-
MV31	9,2107	3,1952	1,953	14,09	4,7696	2,9153	33,9	20,7	54,6
MV32	2,5025	-	-	-	-	-	-	-	-

* β -variant onschiedbaar vervuild met uitgangsstof **6**.

Allereerst is er een testreactie uitgevoerd met het CS₂ om de isothiocyanaat verbinding te maken. Er werd geconstateerd dat dit niet mogelijk is. In deze reductie van de azide tot een primair amine, is het reductieproduct een instabiele verbinding. Zo zal er een sterker electroofiel nodig zijn om zo snel mogelijk het instabiele amine om te zetten in de isothiocyanaat verbinding. CS₂ is een minder sterk electroofiel dan CCl₂ en reageert dus naar verwachting minder snel tot de isothiocyanaat. Wanneer deze reactie niet snel genoeg verloopt kan het molecuul uit elkaar vallen of ontstaat er een ring opening waarbij het amine een amide binding zal vormen met het naastgelegen zuurstof. In de synthese van MV10 zijn verschillende fracties geïsoleerd en gekarakteriseerd met behulp van ¹H-NMR en ¹³C-NMR. Hieruit was geen enkele fractie het beoogde product. De synthese route met CCl₂ werd dus aangehouden.

De eerder genoemde instabiliteit van het molecuul wordt ook bevestigd in de synthese route met CCl₂. De reductie met PtO₂ en H₂ werd namelijk gevolgd op TLC en hierin werd elke keer vrijwel volledige conversie (minimaal 90%) geconstateerd. Na deze omzetting is er uiteindelijk een maximaal gehaalde totale procentuele opbrengst van 60,1% verkregen. Aangezien het CCl₂ zo'n sterk electroofiel is, zal de verminderde opbrengst verklaard kunnen worden door de verwachte instabiliteit van de gereduceerde azide.

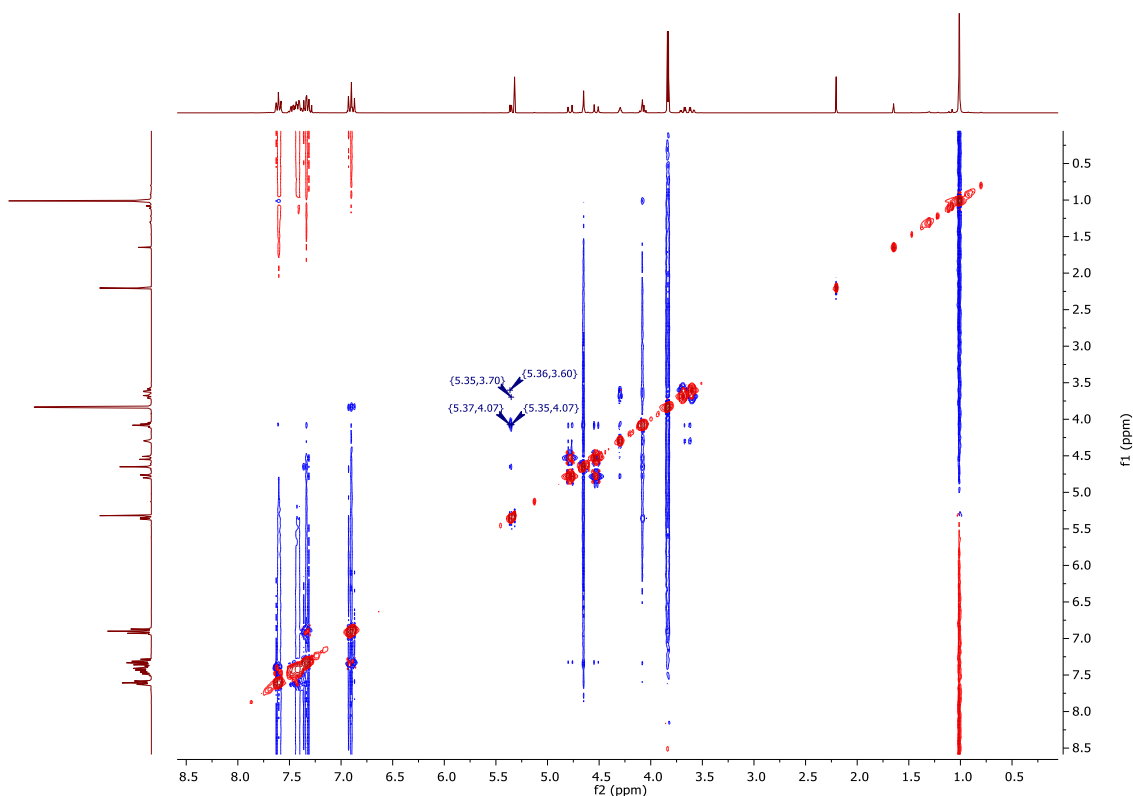
In de synthese is het α -anomeer het major product en de β -anomeer het minor product. Tijdens elke synthese van de isothiocyanaat verbinding zijn de α -anomeer of β -anomeer apart van elkaar geïsoleerd. Om te bepalen welke fractie de α -anomeer of β -anomeer is, is er naast ¹H-NMR ook een COSY gemeten. Met behulp van dit spectrum worden de H-4 en de H-1 protonen bepaald (zie figuur 3). Dit is later van belang voor de bepalingen in het NOESY spectrum. Om de H-4 te achterhalen werden eerst de twee H-5 protonen gelokaliseerd. Er is te zien dat er tussen 3,5 en 5,5 ppm twee signalen zijn die opsplitsen als een dubbele doublet en beide integreren voor 2 protonen. Dit zijn de signalen bij 3,56-3,69 ppm en bij 4,49-4,78 ppm. In de COSY meting in figuur 11 is te zien dat de enige koppeling die de dubbele doublet bij 4,49-4,78 ppm heeft, met protonen van "zichzelf" (punt 7). De dubbele doublet bij 3,56-3,69 ppm heeft een koppeling met een ander signaal, namelijk punt 10 ({3,65;4,30} in het spectrum). Dit zal dus betekenen dat dit proton H-4 zal zijn (4,30 ppm).



Figuur 11 - Het gemeten COSY spectrum van 5-O-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7a**) .

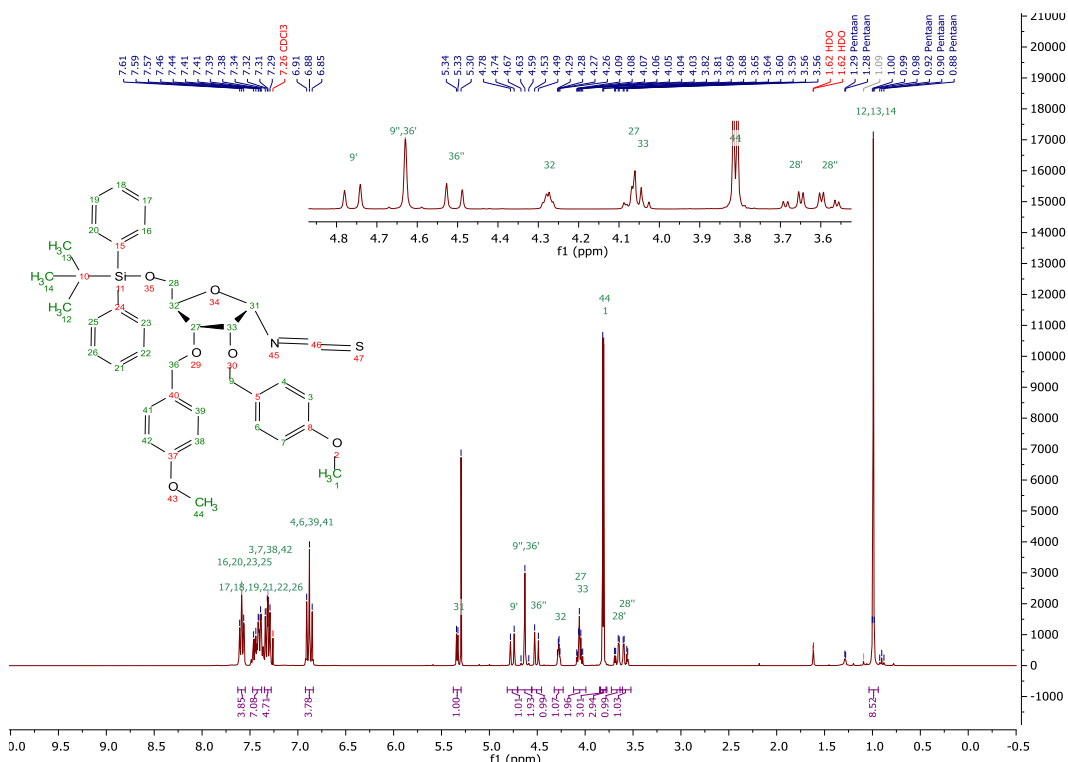
Als er verder in de tabel van het COSY spectrum wordt gekeken is er ook een signaal bij punt 11 {4,07;4,24}. Ook is er een signaal bij punt 6 ({4,05;5,36}). Het signaal wat rond 4,06 ligt integreert in het ^1H -NMR als 2. Het signaal bij 4,06 ppm zal dus overeenkomen met zowel H-3 als H-2, aangezien dit signaal in de COSY meting zowel koppelt met H-4, als in een ander proton bij 5,36 ppm. Aangezien het H-1 proton het anomerische proton is, zal deze geen koppeling meer hebben met een ander proton en dit wordt ook in de COSY meting bevestigd (geen andere koppeling te zien met het signaal op 5,36 ppm). Het signaal op 5,36 ppm is dus van H-1.

Om vast te stellen of de gemaakte component de α - of de β -variant is, wordt gekeken naar het NOESY spectrum in figuur 12. Hierin is te zien dat H-1 koppelt met H-5 en H-2.



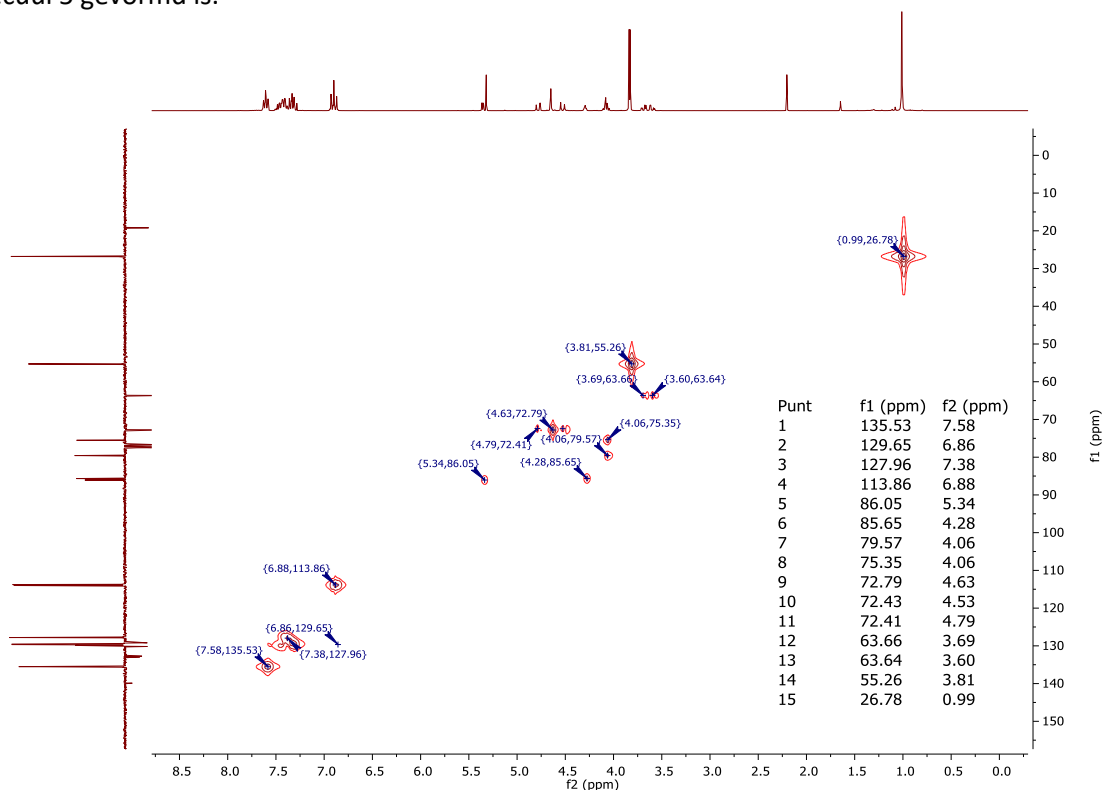
Figuur 12 - Het gemeten NOESY spectrum 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7a**).

Er wordt geen koppeling gezien met de H-4 en dit duidt erop dat het gemaakte molecuul de α -anomeer zal zijn. Uit het ^1H -NMR spectrum (figuur 13) is de J-koppeling gehaald ($J = 4,4 \text{ Hz}$) van het H-1 proton.

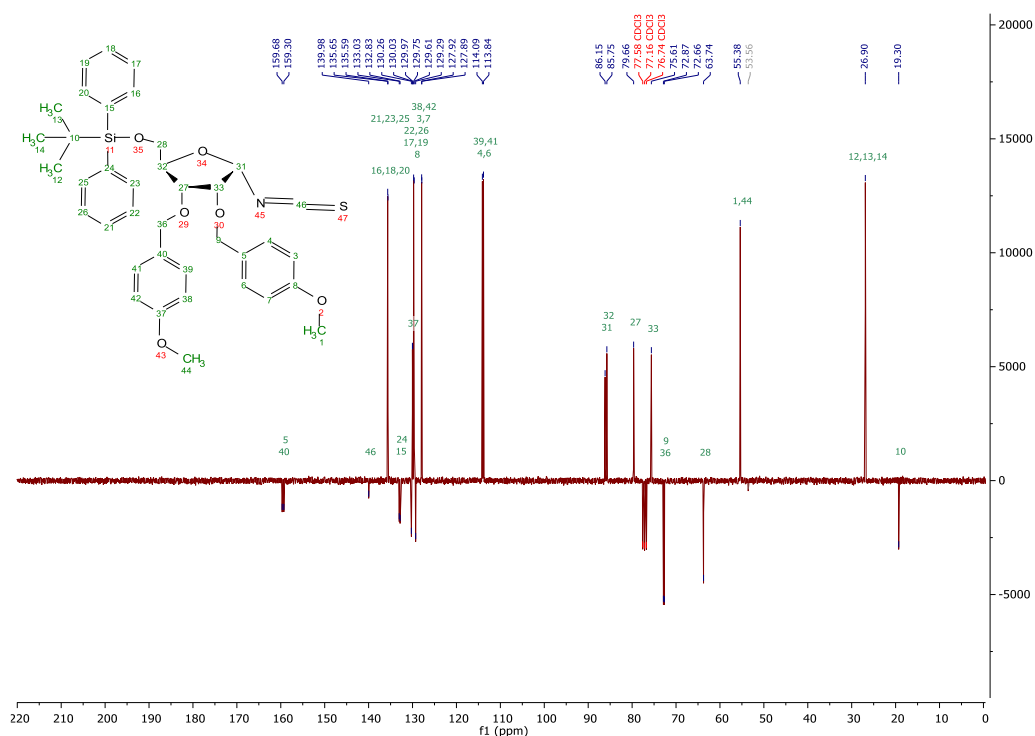


Figuur 13 - Het gemeten ^1H -NMR spectrum van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7a**).

Ter extra validatie is er een HSQC meting uitgevoerd, waarvan het spectrum in figuur 14 te zien is. Hieruit zijn de coördinerende signalen te zien tussen het ^1H -NMR en ^{13}C -NMR signalen. Met behulp van het HSQC spectrum is het definitieve ^{13}C -NMR spectrum uitgewerkt (figuur 15). Hieruit blijkt dat molecuul 5 gevormd is.

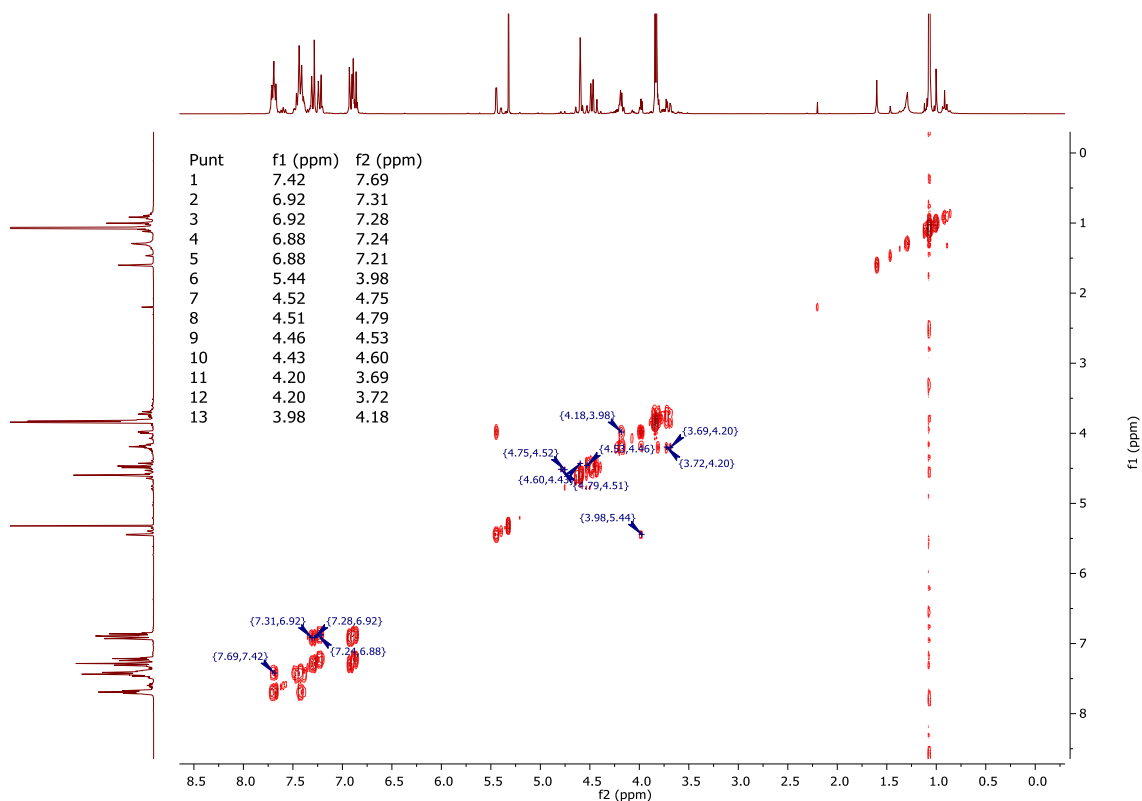


Figuur 14 – Het gemeten HSQC spectrum van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranosyl isothiocanaat (**7a**).



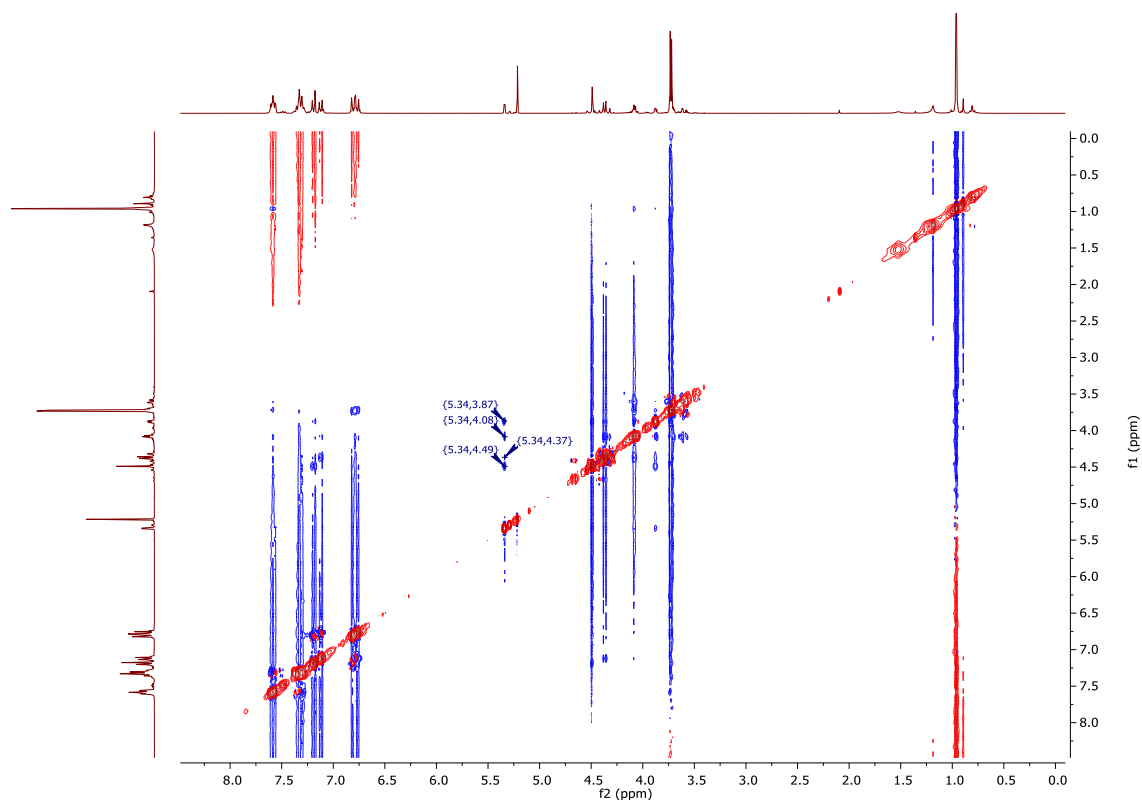
Figuur 15 – Het gemeten ^{13}C -NMR-spectrum van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranosyl isothiocanaat (**7a**).

Voor de tweede fractie is hetzelfde traject doorlopen en is er gekeken naar het COSY spectrum. Hieruit blijkt dat het H-4 signaal overlappt met die van het H-3 proton (f2 signaal rond 4,2 ppm). Ook is te zien dat H-1 overeenkomt met het f2 signaal bij 5,44 ppm (figuur 16).



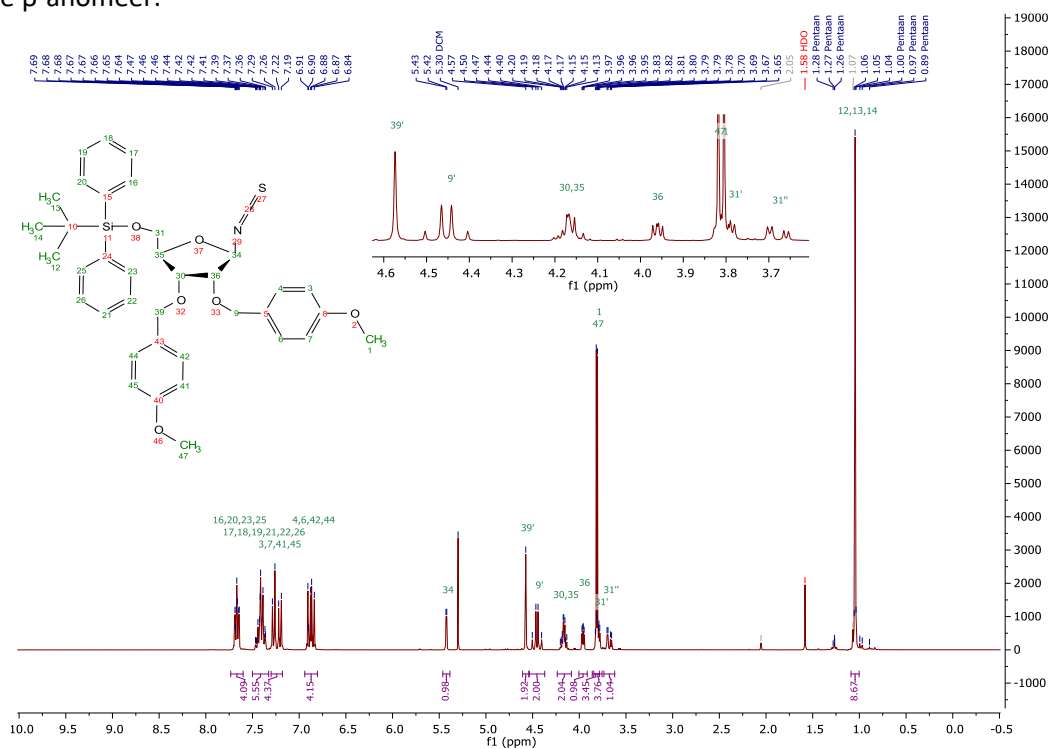
Figuur 16 - Het gemeten COSY spectrum van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7b**).

In figuur 17 is het NOESY spectrum te zien. Hier is de proton f1 signaal bij 4,08 ppm, het verwachtte H-4 signaal. Hier is te zien dat deze koppelt met het H-1 signaal (f2 5,35 ppm). Ook is er koppeling te zien tussen H-1 met H-2 (f1: 3,87 ppm), H-1 met H-3 (f1: 4,37 ppm) en een koppeling tussen H-1 en het CH₂ groep signaal van de PMB op C-2 (f1: 4,49 ppm). Dit verschilt van het eerder uitgewerkte NOESY spectrum (α -anomeer) en geeft de indicatie dat het gaat om de β -anomeer.

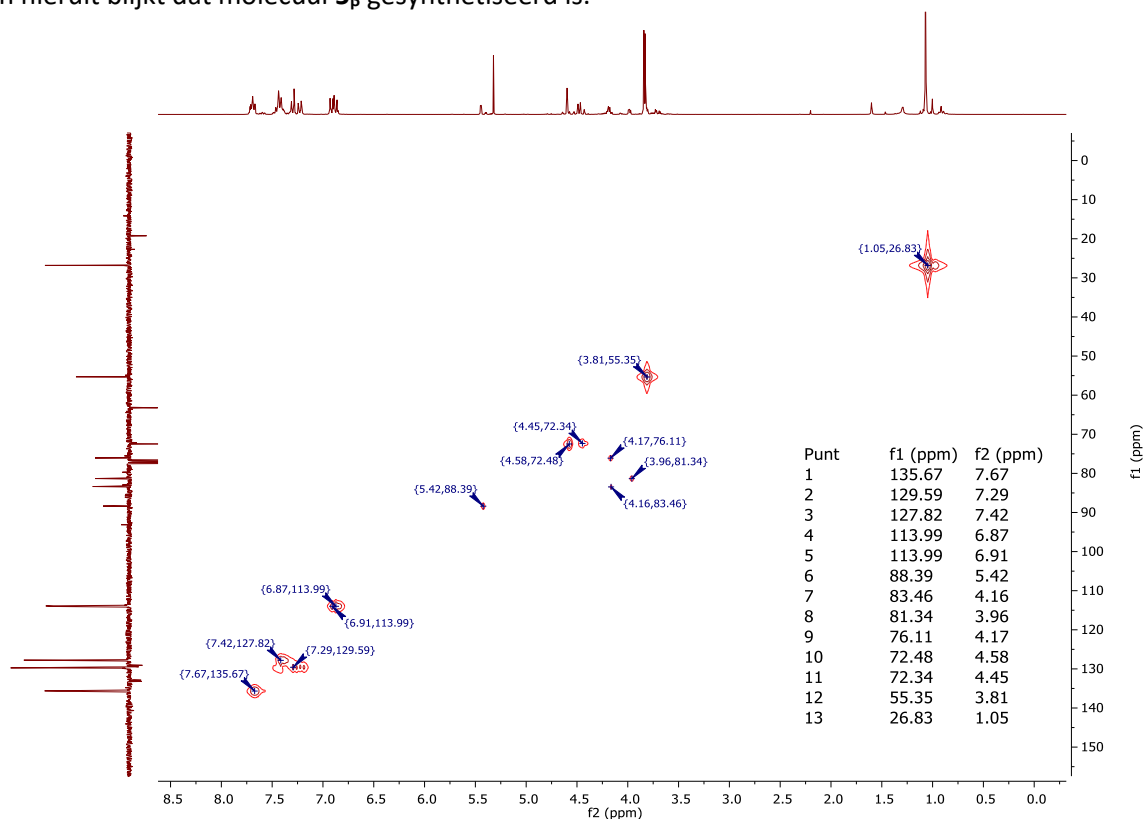


Figuur 17 - Het gemeten NOESY spectrum van 5-O-((tert-butyl)-diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranosyl isothiocanaat (**7p**).

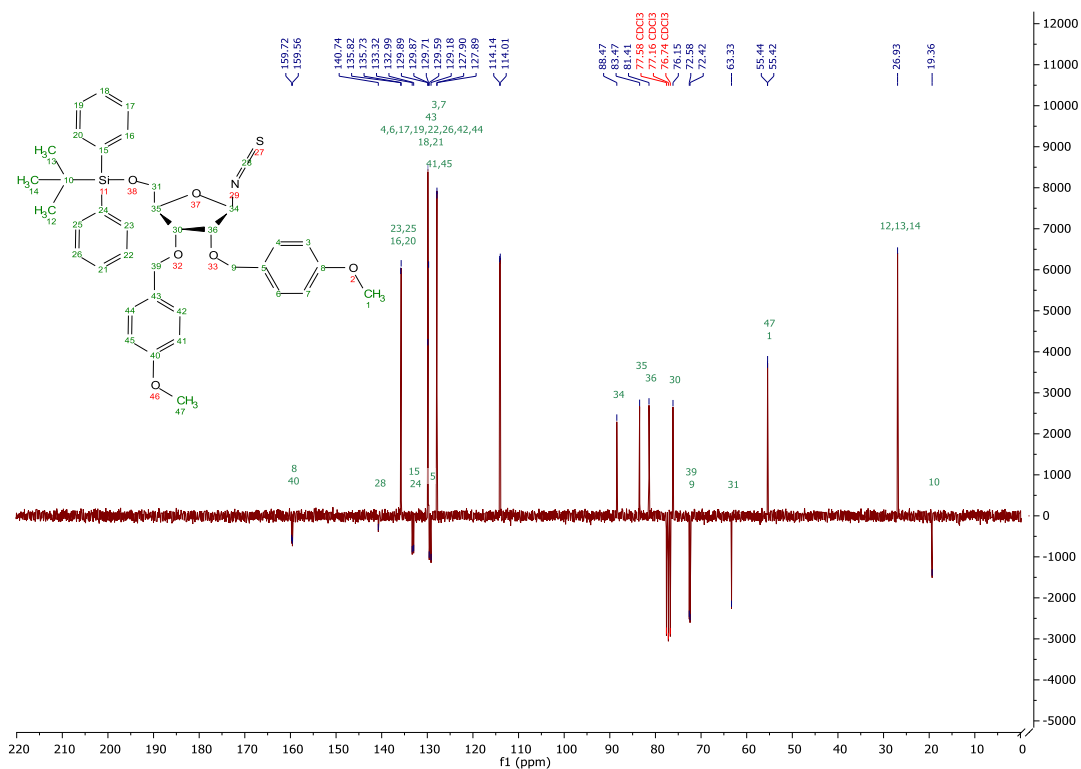
Uit het ^1H -NMR (figuur 18) is de J-koppeling gehaald ($J = 2,7 \text{ Hz}$) van het H-1 proton. Dit is een kleinere waarde dan de eerder verkregen J-koppeling ($J = 4,4 \text{ Hz}$). Dit komt overeen met de theorie dat de β-anomeer een lagere J-waarde zal hebben dan de α-anomeer. Het is dus waarschijnlijk dat het hier gaat om de β-anomeer.



Ter identificatie van het gehele molecuul is er een HSQC (figuur 19) en ^{13}C -NMR (figuur 20) gemeten en hieruit blijkt dat molecuul **5_p** gesynthetiseerd is.

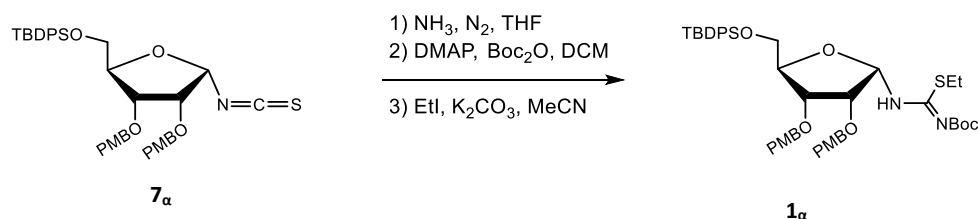


Figuur 19 - Het gemeten HSQC spectrum van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7_p**).



Figuur 20 - Het gemeten ^{13}C -NMR spectrum van 5-O-((tert-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7_p**).

Synthese van 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothioureia (**1 α**)



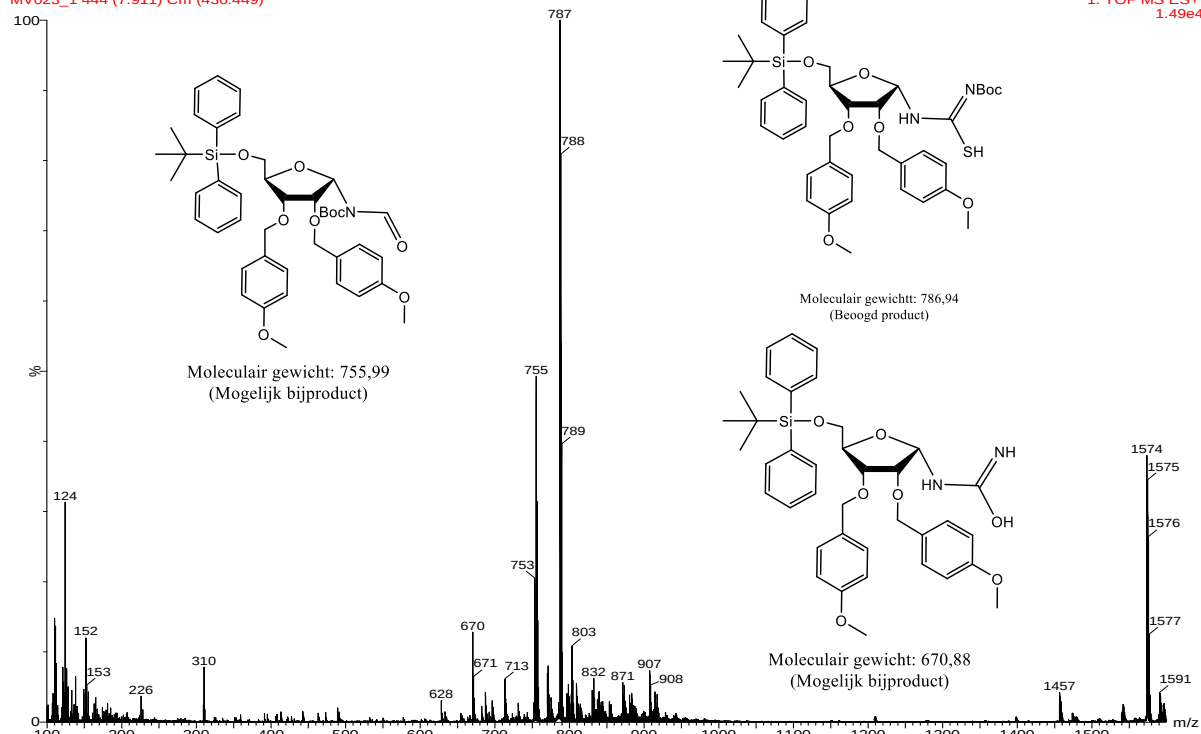
De synthese van de uitgangsstof **7 α** tot **1 α** is een uitdagende ruw doorgezette meerstapssynthese die de nodige aandacht en juiste condities vereist. Hierin wordt er eerst een guanidinium groep gemaakt van de isothiocyanaat-verbinding (additie aminogroep met NH₃), hierna de aminogroep beschermd met een Boc-groep en als laatste de zwavelgroep beschermd met een ethyl-groep. Het eerste deel van de reactie is voornamelijk uitgevoerd op een externe locatie. In de reactie wordt NH₃-gas door de oplossing gebubbeld. Als alternatief voor NH₃-gas is testreactie MV30 uitgevoerd. Hierin is in plaats van NH₃-gas een verzadigde NH₃/trifluorethanol-oplossing gebruikt om te kijken of het mogelijk was om met deze oplossing hetzelfde resultaat te verkrijgen. Het bleek echter dat tijdens de reactie bijproducten werden gevormd en dus werd deze methode verworpen.

Tabel 5- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothioureia (**1 α**).

Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV23	0,7440	0,3124	1,083	0,3832	36,9
MV30	0,1019	-	0,152	-	-
MV34	4,0837	3,1591	6,0959	3,8757	63,6

De procentuele opbrengst die in tabel 5 te zien is van synthese MV23 is aan de lage kant (36,9%). De reactie werd gevolgd met een LC-MS systeem en na synthese stap 2 werden de bijproducten 670 m/z en 755 m/z gemeten zoals in figuur 21 te zien is. Dit is de stap waarin de aminogroep van het guanidinium met een Boc-groep werd beschermd.

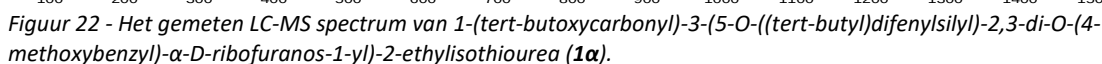
Crude isothiurea Boc 1h
MV023_1 444 (7.911) Cm (436:449)



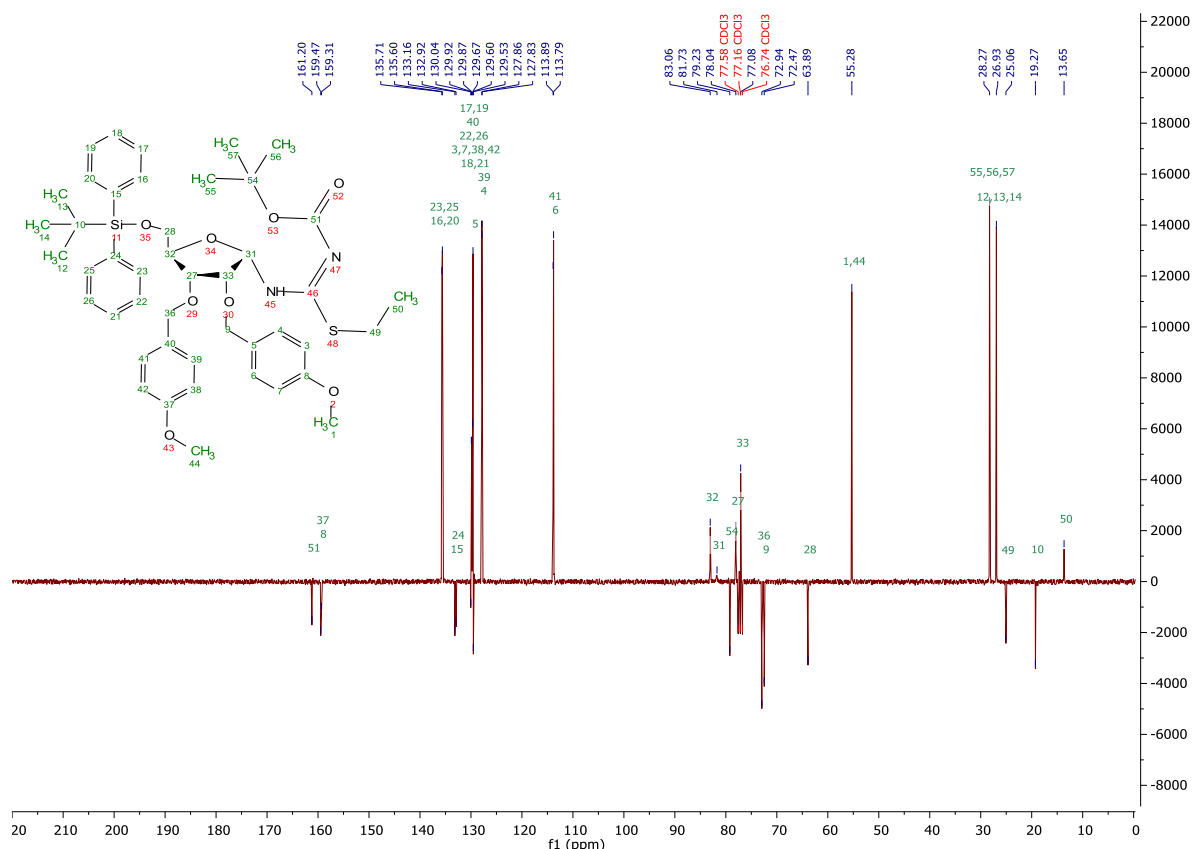
Figuur 21 – Het gemeten LC-MS spectrum na Boc-beschermingsstap in de synthese van 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1a**).

De 670 m/z-waarde kan verklaard worden doordat de isothiurea-verbinding wordt gehydrolyseerd of wordt geoxideerd. Dit zou volgens de LC-MS metingen zijn gevormd tijdens de beschermingsstap van de aminogroep. De uitgangsstof is niet van te voren gedroogd en onder inerte atmosfeer gezet. Ook is er geen droge THF als oplosmiddel gebruikt.

Bij synthese MV34 werden alle reactiestappen onder droge en inerte condities uitgevoerd. De reacties werden op de LCT-MS gevolgd en er werden weinig bijproducten geconstateerd. De reactie werd opgewerkt en er werd een laatste LCT-MS genomen ter identificatie. Dit is in figuur 22 te zien. De opbrengst van de synthese was 63,6%. Dit was hoger dan de gerapporteerde opbrengst van de referentie (50%; nog uit te brengen in paper).



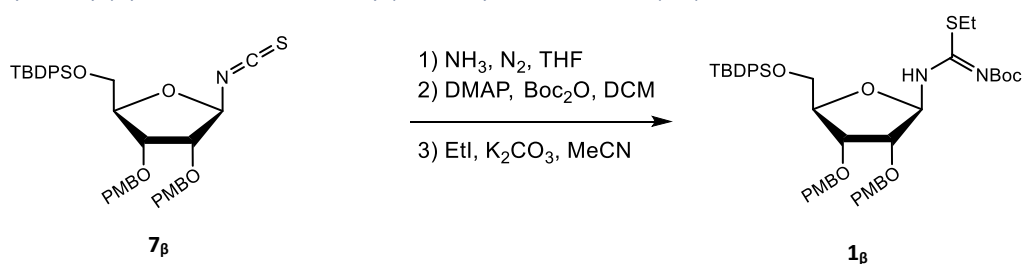
Figuur 23 – Het gemeten ^1H -NMR spectrum van 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothioureia (**1a**).



Figuur 24 – Het gemeten ^{13}C -NMR spectrum van 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (**1 α**).

De totaalsynthese tot molecuul **1 α** heeft geresulteerd in een totaal opbrengst van 9,3% over 6 stappen.

Synthese van 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (**1 β**)



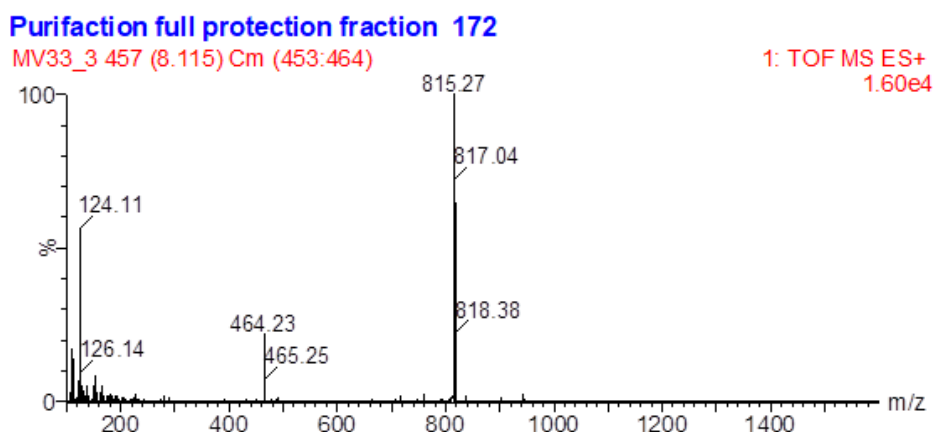
Nadat er voor de eerste keer molecuul **1 α** werd gesynthetiseerd (MV23) werd het volgende doel het synthetiseren van molecuul **1 β** . Dit is in experiment MV33 uitgevoerd met het al reeds gesynthetiseerde molecuul **7 β** met dezelfde kennis die in synthese MV23 (eerste synthese van molecuul **7 α**) aanwezig was. Hierin werden dezelfde reactiestappen uitgevoerd. Dit houdt ook in dat er niet onder droge en inerte condities is gewerkt.

Tabel 6- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1b**).

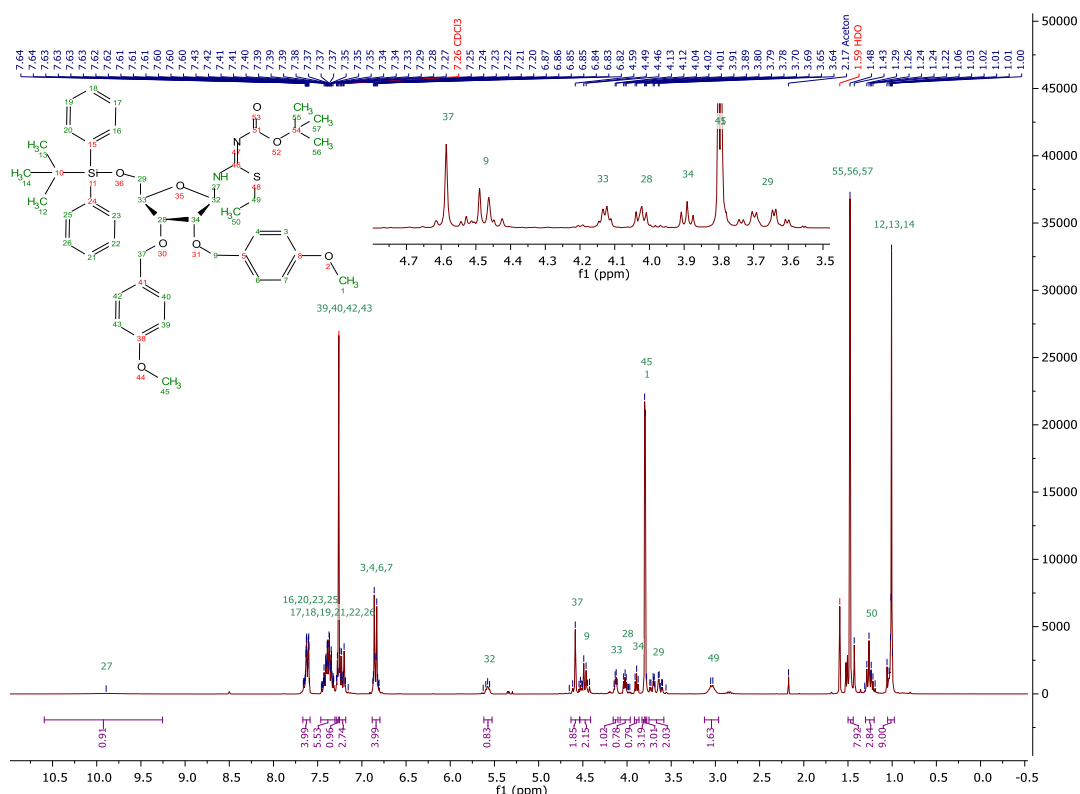
Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV33	2,3568	0,3530	3,518	0,4331	12,3

Er werd na syntheses stap 1 vrijwel volledige conversie gemeten tot de beoogde isothiurea-verbinding. Echter, tijdens het volgen van syntheses stap 2 werden veel zijproducten zichtbaar op de LC-MS metingen. Dit was het bijproduct van 670 m/z maar ook een bijproduct met 770 m/z wat de met Boc beschermde variant kan zijn van de gehydrolyseerde variant (670 m/z).

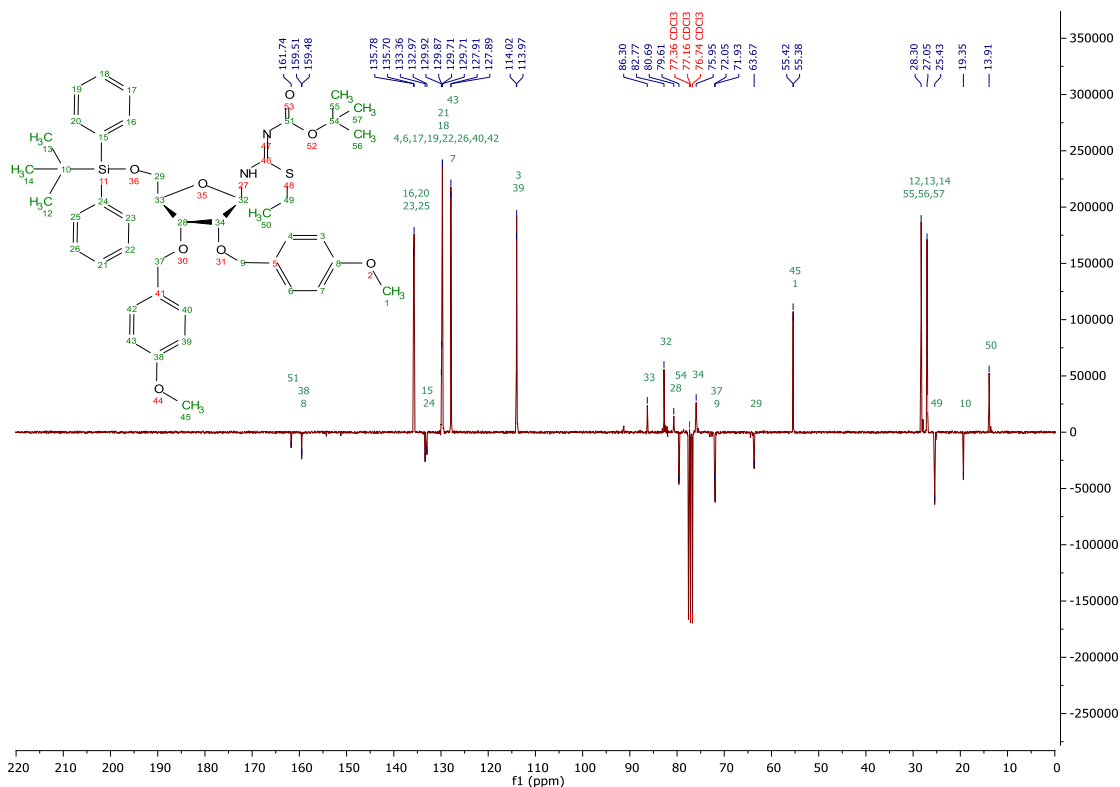
Na syntheses stap 3 werd de juiste massa gevonden en het product opgewerkt. Er werd een LC-MS spectrum opgenomen (figuur 25) en de structuur werd met behulp van een COSY en HSQC (zie bijlage B3) meting bepaald met een ¹H-NMR (figuur 26) en een ¹³C-NMR (figuur 27).



Figuur 25 - Het gemeten LC-MS spectrum van het eindmolecuul 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1b**).



Figuur 26 - Het gemeten ¹H-NMR spectrum van 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1b**).



Figuur 27 - Het gemeten ^{13}C -NMR spectrum van 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1p**).

De totaalsynthese tot molecuul **1p** heeft geresulteerd in een totaal opbrengst van 1,8% over 6 stappen.

Bouwsteen 2

In de synthese van bouwsteen 2 zijn er moleculen verkeerd geanalyseerd en zijn er meerdere synthesestappen uitgevoerd met een fout molecuul. Hierdoor wordt achter elke synthesecode een (-) of een (+)-teken gebruikt om aan te geven of het experiment bij de foute (-) synthese route of bij de juiste (+) synthese route hoort. In eerste instantie werd er doorgedaan met het product van MV08. Na de bevinding in MV13 werden deze foutieve moleculen niet meer gebruikt. Alleen de eerste foutieve synthesestap van molecuul **9** (MV08) zal volledig uitgelicht worden.

Synthese van 2',3',5',-tri-*O*-butyl-di-methylsilyl adenosine (9)



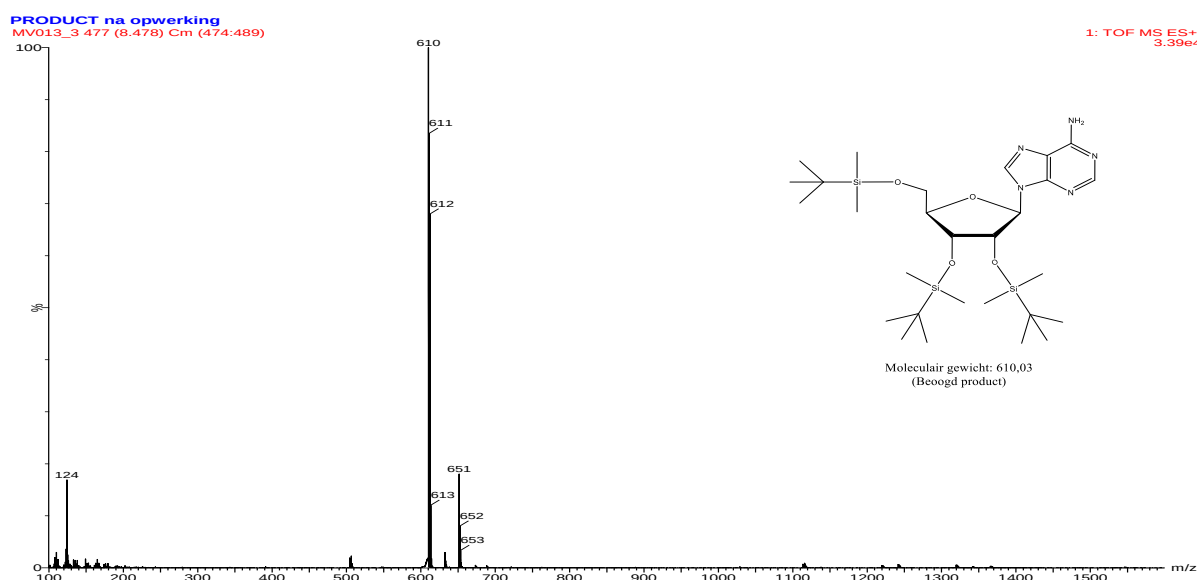
De synthese van molecuul **9** is tweemaal uitgevoerd. De bijbehorende data staat weergegeven in tabel 7.

Tabel 7- Overzicht belangrijke data in de syntheses van 2',3',5',-tri-*O*-butyl-di-methylsilyl adenosine (**9**).

Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV08-	4,9897	2,463	18,7	4,03	21,6
MV13+	2,0005	3,9486	7,486	6,473	86,5

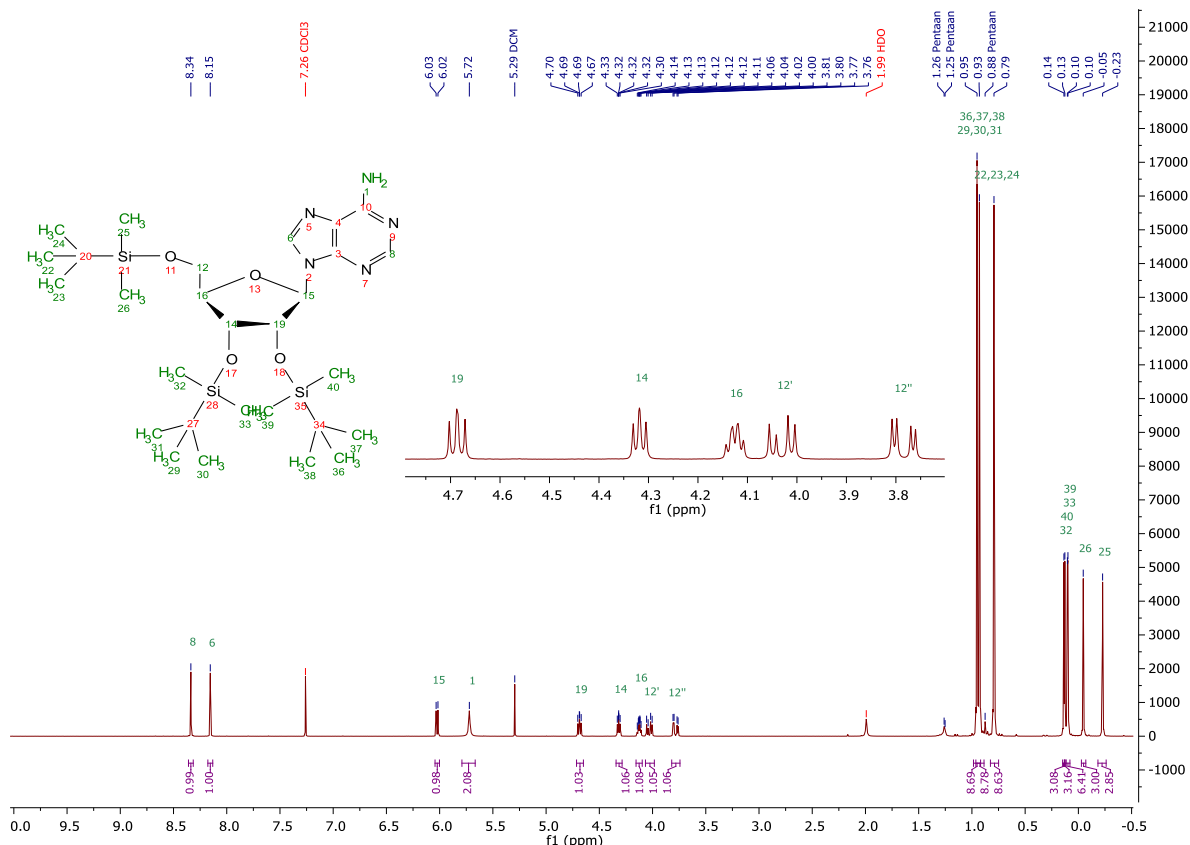
In de synthese van MV08 heeft de reactie meerdere dagen op 50°C in DMF gereageerd. De reactie werd gevolgd via TLC en verwacht werd dat een volledig met TBS beschermd adenosine een hoog eluerende stip zou geven. Volgens deze beredenering werd er geen volledige conversie van materiaal geconstateerd en werd de reactie verlengd. De reactie werd opgewerkt, gezuiverd en geanalyseerd met ¹H-NMR en ³¹C-NMR.

Tijdens de synthese MV13 werd er eenzelfde “onvolledige” conversie geconstateerd op TLC. Van dit product werd een LC-MS genomen. Hieruit bleek dat dit “onvolledige” conversie product de juiste massa te geven van molecuul **9** (610 m/z in figuur 28).

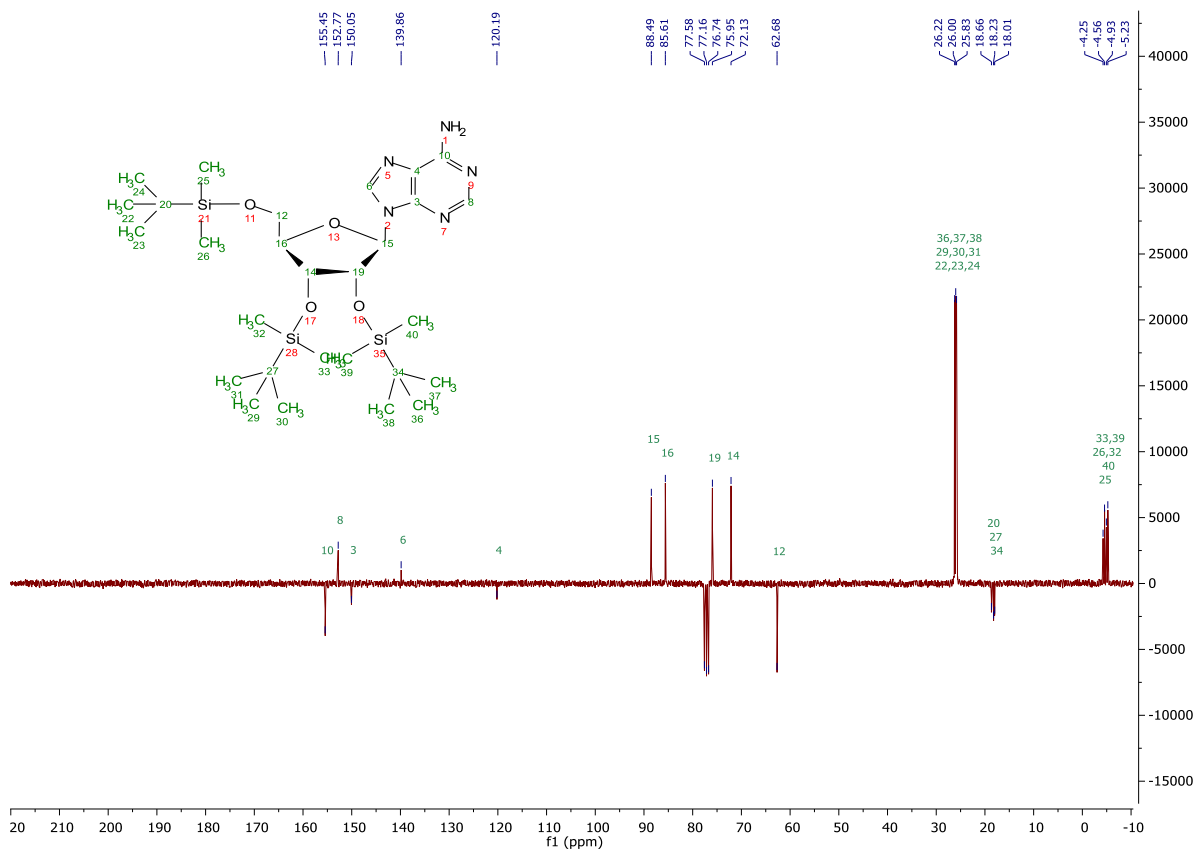


Figuur 28 - Het gemeten LC-MS spectrum van 2',3',5',-tri-*O*-butyl-di-methylsilyl adenosine (**9**)

Het product van MV13 werd met behulp van een COSY, HSQC metingen (zie bijlage B5), ¹H-NMR (figuur 29) en ³¹C-NMR spectra (figuur 30) verder geïdentificeerd. Hieruit blijkt dat het juiste product is gevormd.

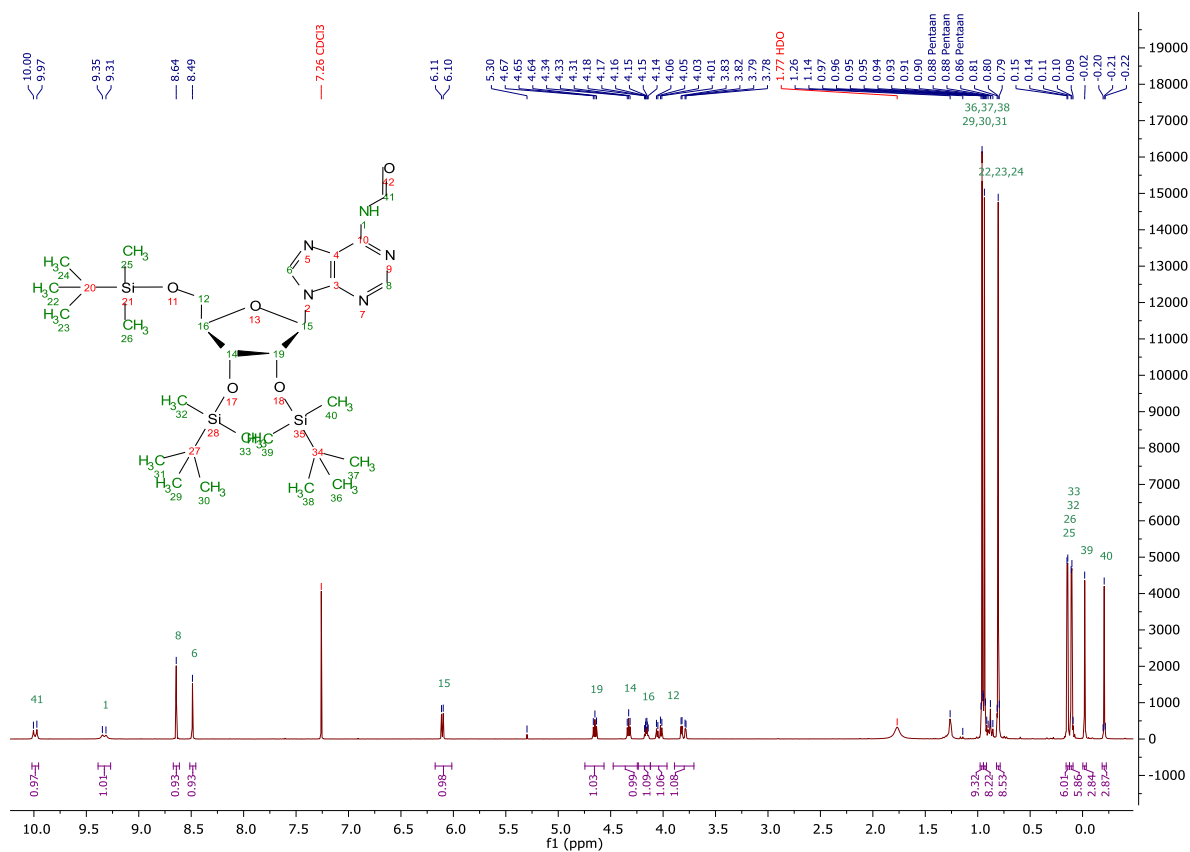


Figuur 29 - Het gemeten ¹H-NMR spectrum van 2',3',5'-tri-O-butyl-di-methylsilyl adenosine (9)



Figuur 30 - Het gemeten ¹³C-NMR spectrum van 2',3',5'-tri-O-butyl-di-methylsilyl adenosine (9)

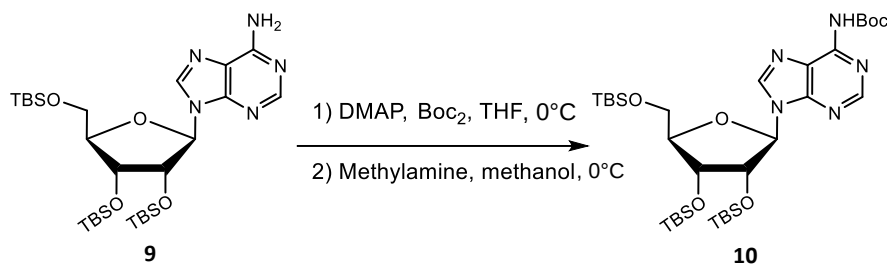
Het eind product van MV08 werd ter controle gemeten op de LC-MS en hier werd een onjuiste massa van 638 m/z gemeten (zie bijlage B4). Vermoedelijk is in synthese MV08 het DMF op 50°C ontleed en heeft zich een nieuwe formamide binding gevormd met de exocyclische amine van de adenosine. Dit beeld kan worden bevestigd met het ^1H -NMR van synthese MV08 is te zien in figuur 31.



Figuur 31 – Het gemeten ^1H -NMR spectrum van de foutieve synthese MV08 met de verwachte formamide binding op de positie van het exocyclische primaire amine.

Proton-1 ligt veel verder in het veld in chemical shift dan in figuur 29 te zien is. Hieruit kan opgemaakt worden dat er een formaldehyde op de exocyclische amine gebonden zit. Het verkorten van de reactietijd heeft er toe geleid dat het juiste product gevormd en geïsoleerd is in MV13.

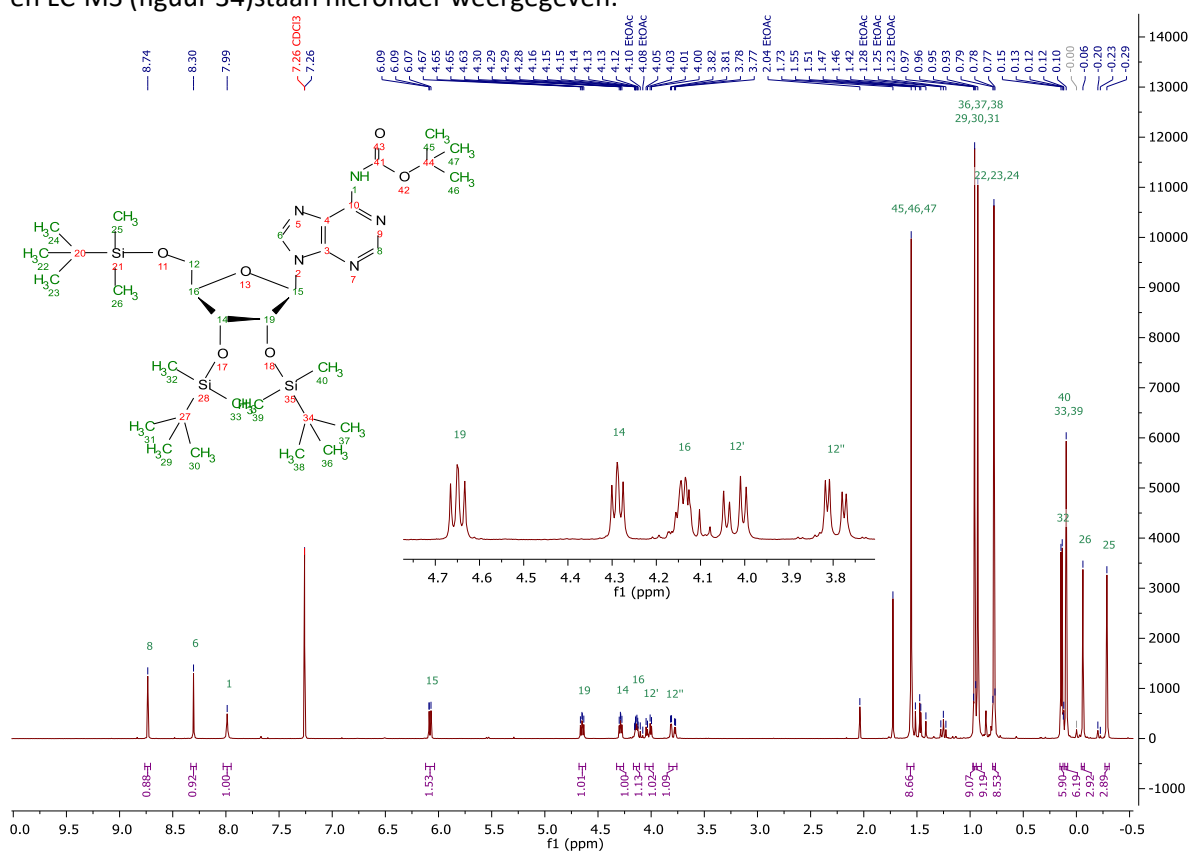
Synthese van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (**10**)



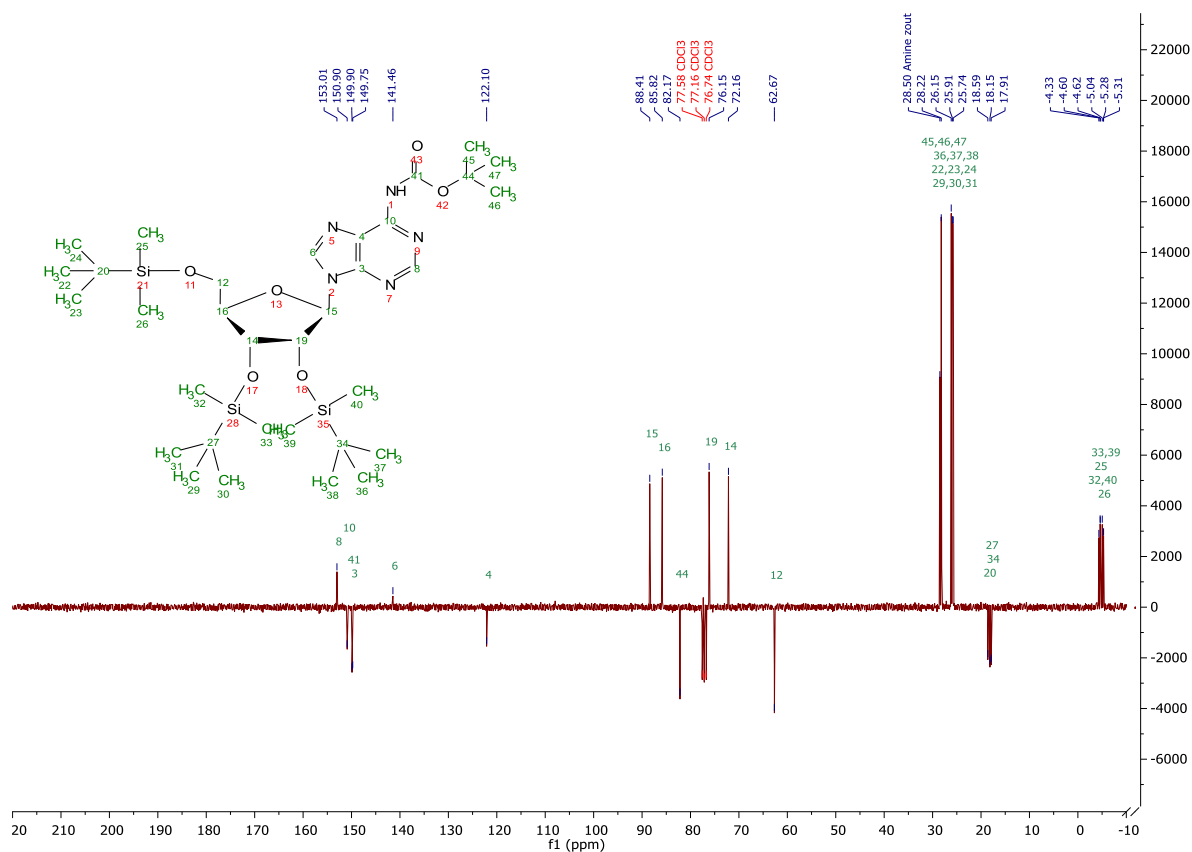
Tabel 8 - Overzicht belangrijke data in de syntheses van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (**10**).

Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV09-	2,1631	2,0137	3,546	2,836	80,0
MV19+	2,0007	2,1477	3,28	3,0327	92,5
MV36+	1,9479	2,7892	3,193	3,9276	123

De Boc bescherming van de primaire amine was een efficiënte reactie. Zoals in tabel 8 te zien is, is er bij synthese MV19 een procentuele opbrengst van 92,5% gehaald. Bij synthese MV36 was dit 123%. Dit is naar verwachting te wijden aan het co-evaporeren met chloroform (spectra in bijlage 6). Dit werd gebruikt om de rest van de oplosmiddelen uit het product te krijgen. Hierin is ook te zien dat het product nog een beetje vervuild is met het *tert*-butyl alcohol (een van de rest producten van Boc₂) en mogelijk een methylamine zout (2,69 ppm). De uitgewerkte ¹H-NMR (figuur 32), ¹³C-NMR (figuur 33) en LC-MS (figuur 34) staan hieronder weergegeven.



Figuur 32 - Het gemeten ¹H-NMR spectrum van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (**10**).

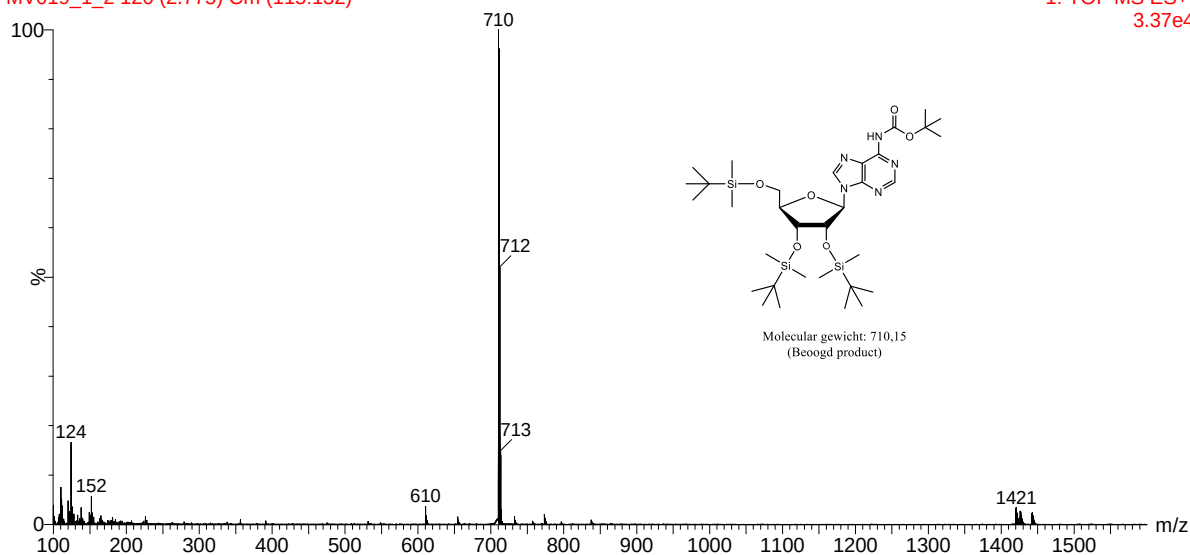


Figuur 33 - Het gemeten ^{13}C -NMR spectrum van N^6 -tert-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-O-tert-butyldimethylsilyl adenosine (**10**).

Uitloop run Blanc

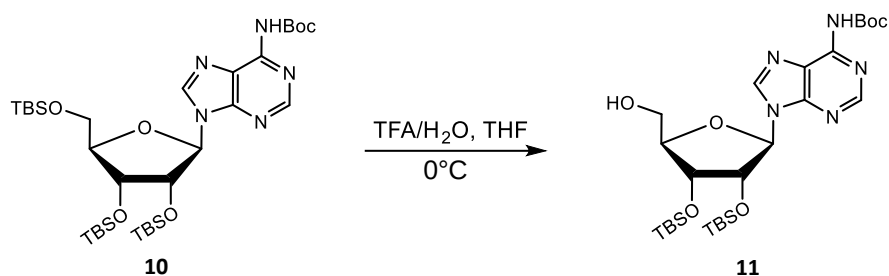
MV019_1_2 126 (2.775) Cm (115:132)

1: TOF MS ES+
3.37e4



Figuur 34 - Het gemeten LC-MS spectrum van N^6 -tert-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-O-tert-butyldimethylsilyl adenosine (**10**).

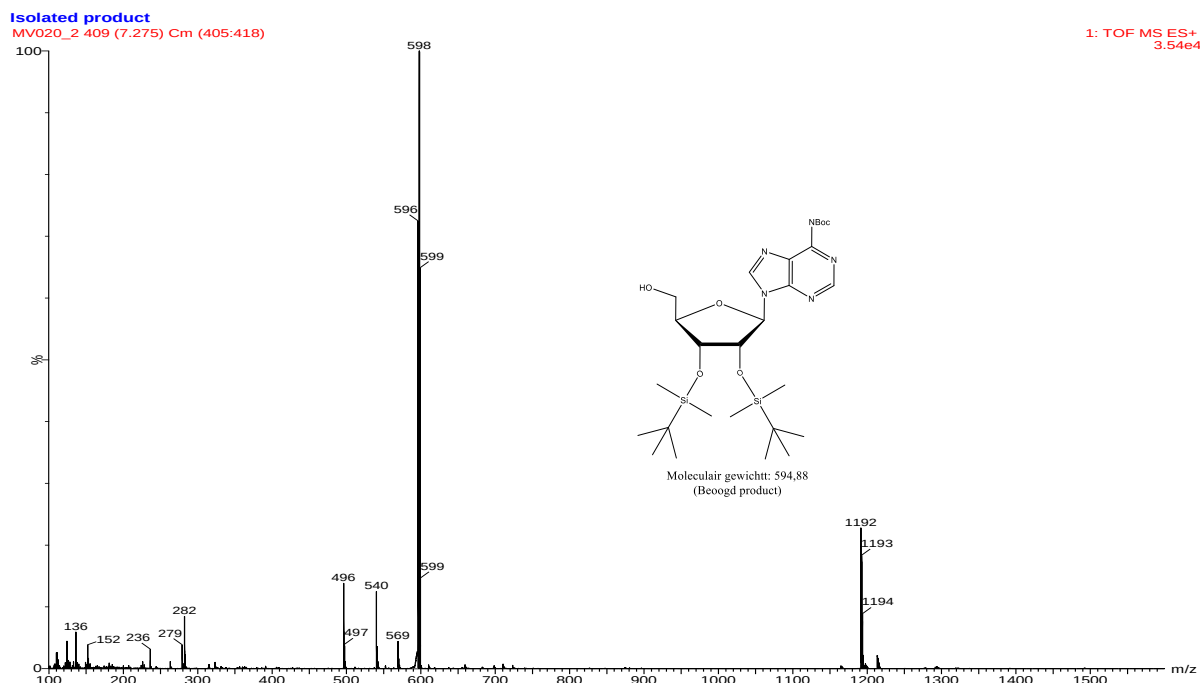
Synthese van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (**11**)



Tabel 9 - Overzicht belangrijke data in de syntheses van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (**11**).

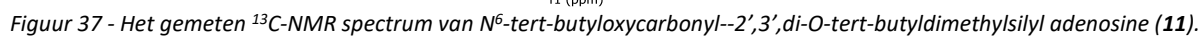
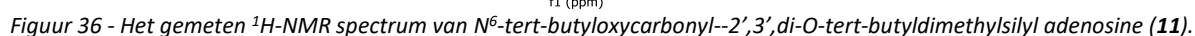
Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV14-	0,3003	0,183	0,423	0,348	82,2
MV18-	1,0002	0,1742	1,408	0,2923	20,8
MV20+	1,0044	0,6763	1,414	1,1349	80,3
MV38+	3,3477	2,7059	4,714	4,54	96,3

De ontscherming van de primaire TBS-groep is een effectieve reactie. De reactie werd op 0°C uitgevoerd om zo selectief de primaire alcohol te ontschermen met TFA. TFA doneert hierin een proton waardoor het primaire alcohol gevormd kan worden. De trifluor-groep zorgt voor een elektronen zuigend effect, waardoor het gemakkelijker is om het proton los te laten omdat de geconjugeerde base gestabiliseerd wordt. Na het opwerken van beide syntheses is een LC-MS genomen (figuur 35). Hierin is de gewenste massa gevonden.

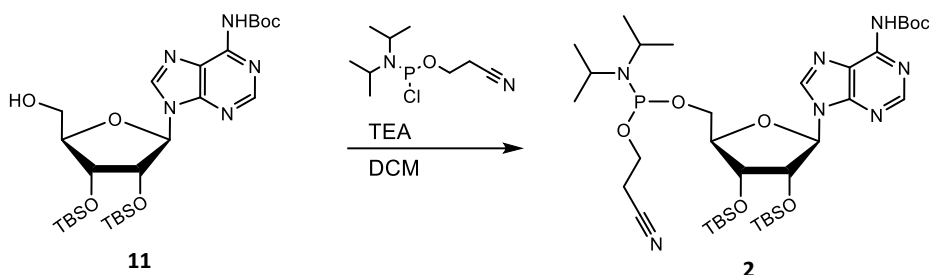


Figuur 35 - Het gemeten LC-MS spectrum van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (**11**).

Vervolgens zijn er een ¹H-NMR en ¹³C-NMR spectrum genomen (figuur 36 en 37). Hierin is te zien dat een TBS-groep verdwenen is (¹H-NMR en ¹³C-NMR) en een OH-sigitaal (6,24 ppm) is terug gekomen (¹H-NMR).



Synthese van 5'-O-(*N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl-*N*-*N*-diisopropylfosforamidiet (**2**)

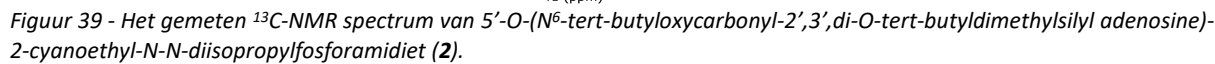
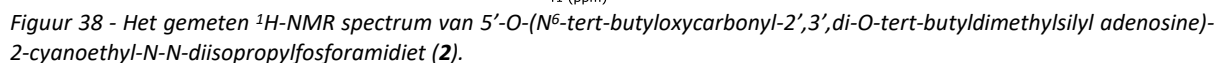


Tabel 10 - Overzicht belangrijke data in de syntheses van 5'-O--(*N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl-*N*-*N*-diisopropylfosforamidiet (**2**).

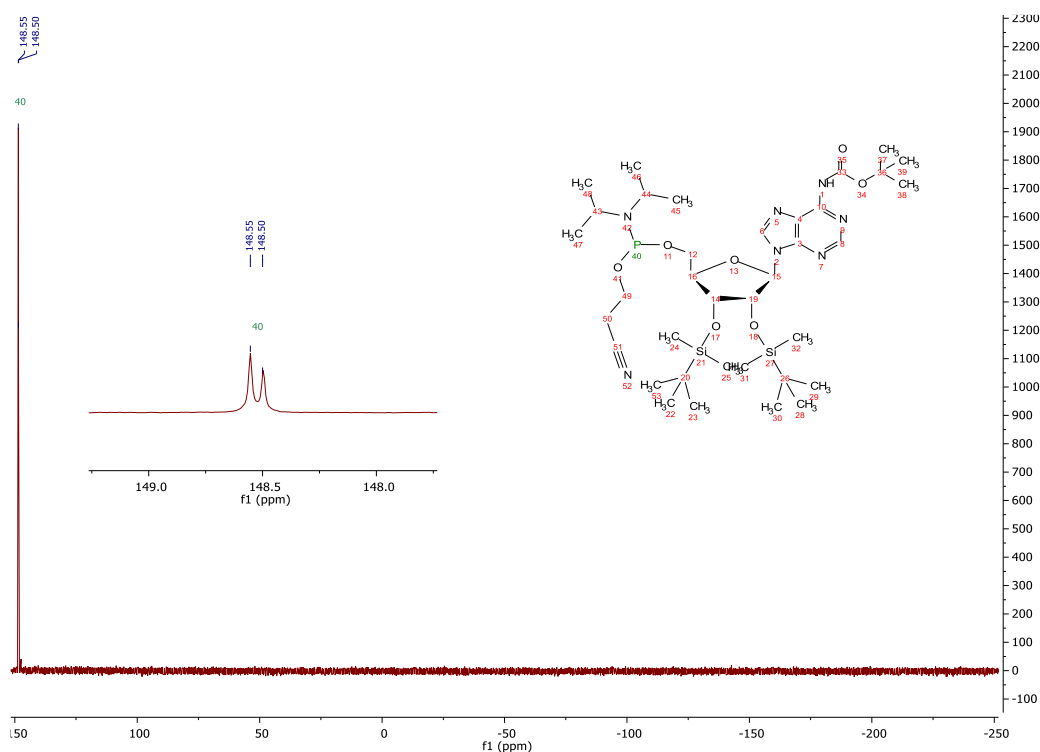
Synthese	m _(start) (g)	m _(opbrengst) (g)	mmol _(start)	mmol _(opbrengst)	Opbrengst (%)
MV21+	0,1036	0,1085	0,1739	0,136	78,6

De synthese van molecuul **2** (het vormen van een fosforamidiet) werd onder droge en inerte atmosfeer uitgevoerd. Het gebruikte fosforreagens is erg reactief en gevoelig voor water. Het fosforamidiet werd gevormd middels een SN2 reactie met het vrije primaire alcohol. De juiste massa werd gevonden op de LC-MS (794 m/z). Echter in de lichtzure condities van de LC-MS meting ontleed de amidiet-binding van het molecuul. Het gevormde fosforamidiet is reactief onder lichtzure condities, zelfs het lichtzure silica kan het amidiet activeren. De reactie werd opgewerkt, gezuiverd via kolomchromatografie (kolom voorgespoeld met 0,5% triethylamine-oplossing) en geanalyseerd met ¹H-NMR, ¹³C-NMR en ³¹P-NMR.

In het ¹H-NMR-spectrum (figuur 38) is bij 1,22 ppm een signaal te zien dat integreert voor 16 protonen. Dit zouden er 12 moeten zijn (2x RNCH(CH₃)₂) en is hoger uitgevallen door een vervuiling van heptaan en ethylacetaat. Deze vervuiling is ook terug te vinden in het ¹³C-NMR (figuur 39). Het spectrum heeft veel dubbele signalen omdat het fosfor een chiraal centrum is en twee verschillende configuraties heeft. Hierdoor krijg je een verschuiving van de ppm en worden er dubbele signalen waargenomen. Dit heeft verder geen gevolgen voor de vervolgsyntheses aangezien het chirale centrum bij de uiteindelijke synthese van de fosforbrug wordt opgeheven.



Als bevestiging dat de fosfityleringsreactie heeft plaatsgevonden, is er ook een ^{31}P -NMR genomen. Dit is figuur 40 te zien en zijn hier wederom 2 signalen voor twee verschillende configuraties. De gemeten chemical shift (148 ppm) komt overeen met de literatuur^[15].



Bij het analyseren van syntheses op resin wordt er gebruik gemaakt van kleine test ontschermingsreacties. Hiervoor wordt een klein beetje resin genomen en hieraan werd 200 µL ontschermingsmix aan toegevoegd (90,5% TFA; 5% H₂O; 2,5% fenol; 2% triisopropyl silaan). Hierdoor splitst het eiwit zich af van de resin en kan het eiwit gemeten worden op een LC-MS. Echter worden er ook beschermgroepen verwijderd, dus kunnen er verschillende massa's worden gemeten die wel overeenkomen met product. Er kan zo worden nagegaan of er volledige conversie is behaald.

Synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76 met vrije ornithine op positie 42

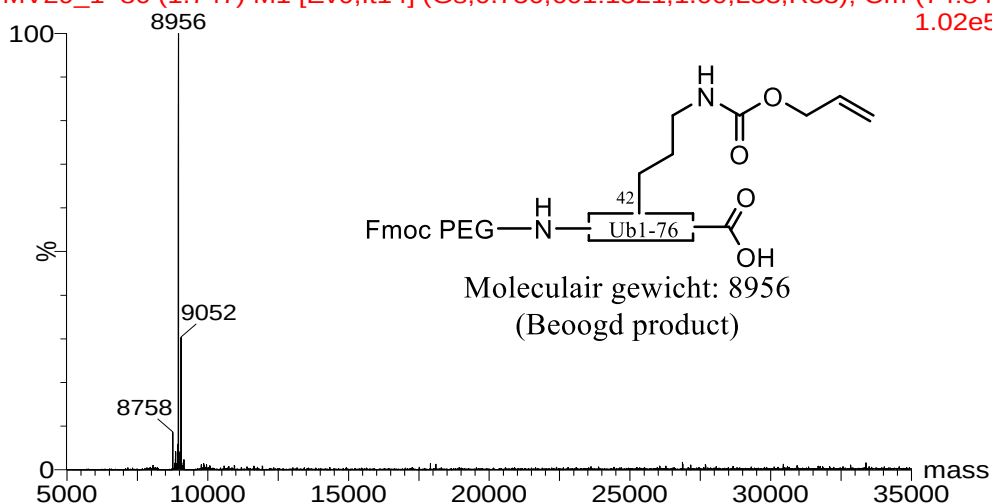
Spacer koppeling:



Er werd een test cleavage uitgevoerd en de juiste massa van molecuul **13** werd gevonden zoals in figuur 41 te zien is. Een deel startmateriaal was aanwezig in het spectrum (8758 m/z). Additioneel is een signaal bij 9052 m/z te zien. Dit is eveneens product (**13**) met een gekoppeld TFA adduct (+96 m/z). Dit is een bijproduct wat ontstaat door ontscherming met TFA. Bij de uiteindelijke zuivering en afsplitsing zal dit adduct weggewassen worden en blijft het gewilde eiwit over.

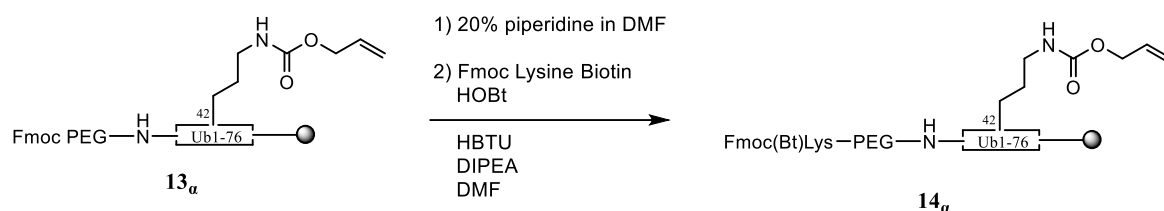
Test cleavage

MV29_1 80 (1.747) M1 [Ev0,lt14] (Gs,0.750,601:1521,1.00,L33,R33); Cm (74:84) 1.02e5



Figuur 41 - Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na de PEG-spacer koppeling (13_a).

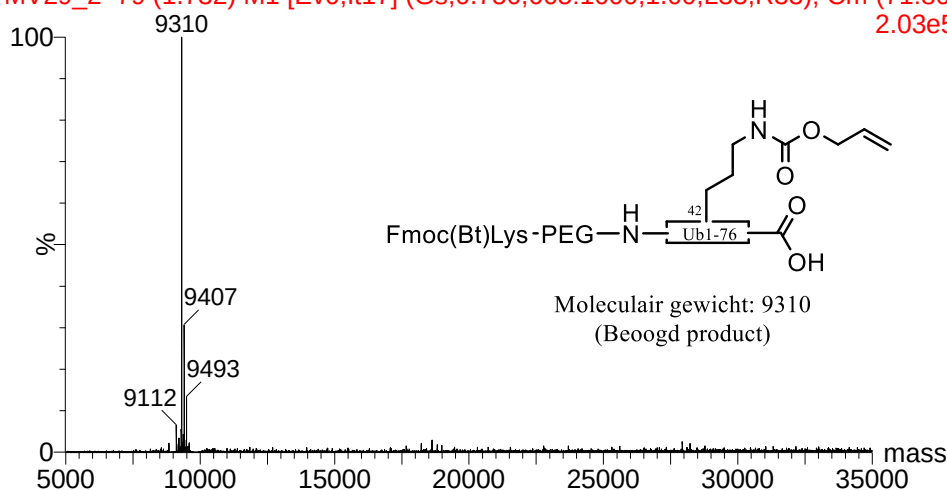
Ontscherming Fmoc en koppeling Lysine biotine:



De Fmoc-groep van de PEG-spacer werd ontschermd en Fmoc-Lysine biotine werd gekoppeld aan het vrije amine op de N-terminus. De gewenste massa van 9310 m/z werd teruggevonden evenals het TFA adduct (9407 m/z) (figuur 42). Er zijn ook wat bijproducten te zien bij 9112 en 9493 m/z. Het volledige eiwit op de resin heeft meerdere beschermgroepen in de structuur zitten. Mogelijk is een deel niet ontschermd door de TFA. Het belangrijkste echter is dat er geen startmassa gemeten is (8956 m/z).

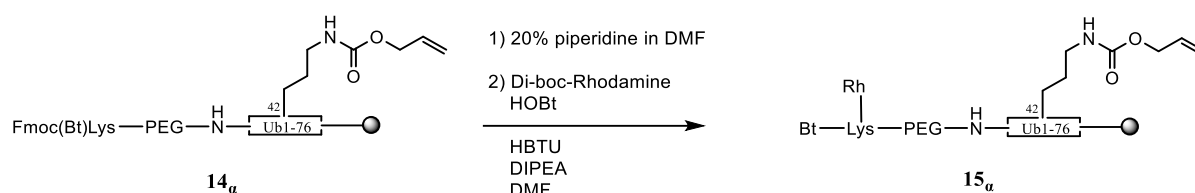
Test cleavage Lysine biotin coupling

MV29_2 79 (1.732) M1 [Ev0,lt17] (Gs,0.750,665:1600,1.00,L33,R33); Cm (71:86) 2.03e5



Figuur 42 – Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na de lysine biotine koppeling (**14_a**).

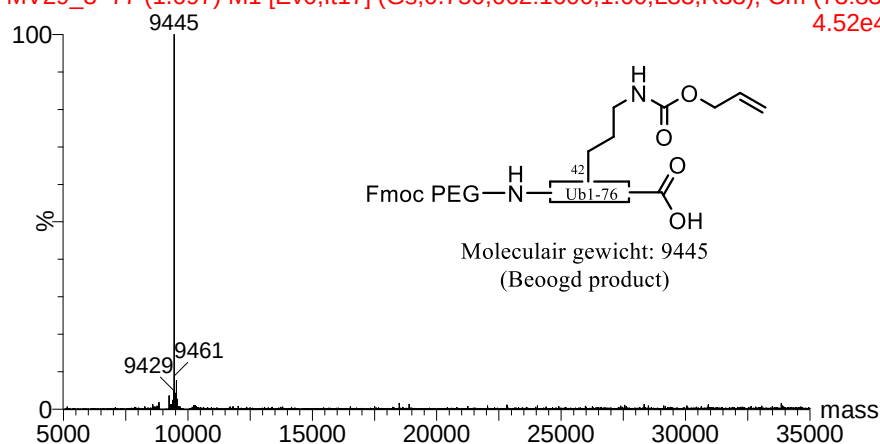
Ontscherming Fmoc-Lys-Bt en rhodamine koppeling



De Fmoc-groep van de lysine werd ontschermd en op het vrije amine werd de rhodamine via een peptide koppeling met de reagentia HOBt en HBTU geïnstalleerd. De gewenste massa (9445 m/z) werd teruggevonden evenals het TFA adduct van 9461 m/z (figuur 43). Er werd ook een klein bijproduct geconstateerd van 9429 m/z.

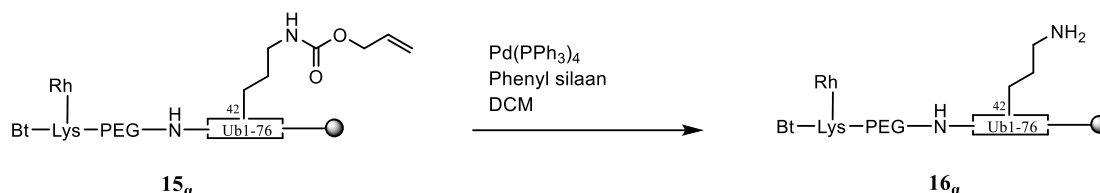
Rhodamine coupling test cleavage

MV29_3 77 (1.697) M1 [Ev0,It17] (Gs,0.750,662:1600,1.00,L33,R33); Cm (73:83) 4.52e4



Figuur 43 – Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na de rhodamine koppeling (**15_a**).

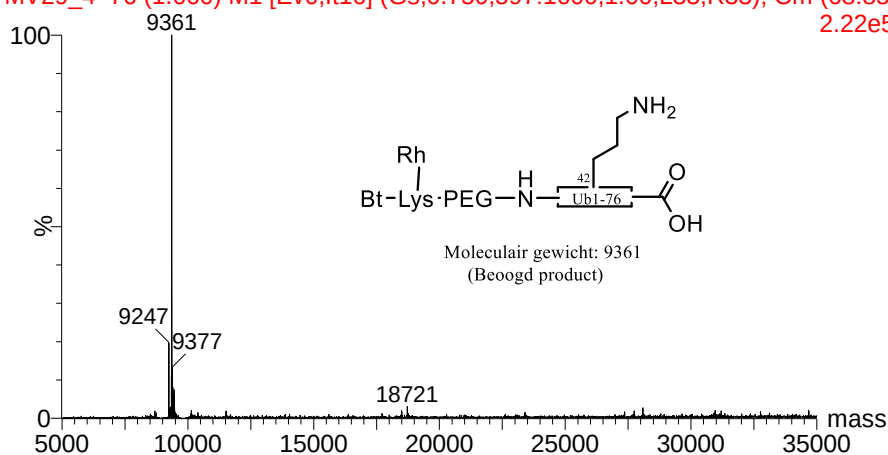
Alloc ontscherming



De Alloc-beschermgroep werd ontschermd met $\text{Pd(PPh}_3)_4$ en fenylsilaan. Het $\text{Pd(PPh}_3)_4$ coördineert aan de allyl-groep en het fenylsilaan werkt als scavenger (wegvanger) om het allyl kation weg te vangen. Ook werkt de fenylsilaan als proton donor voor de vorming van de primaire amine. Bij deze reactie komt ook CO_2 vrij. De gewenste massa werd gevonden (9361 m/z) evenals het TFA adduct (9377 m/z) (figuur 44). Ook is tweemaal de gewenste massa gevonden (18721 m/z), wat ook beschouwd kan worden als product. Er is ook een bijproduct gemeten van 9247 m/z. Dit zou mogelijk kunnen komen doordat een andere beschermgroep is ontschermd in het proces. Verder is er geen startmateriaal meer gemeten, dus de reactie was beëindigt.

Alloc deprotection test cleavage

MV29_4 76 (1.660) M1 [Ev0,It16] (Gs,0.750,597:1600,1.00,L33,R33); Cm (68:85) 2.22e5

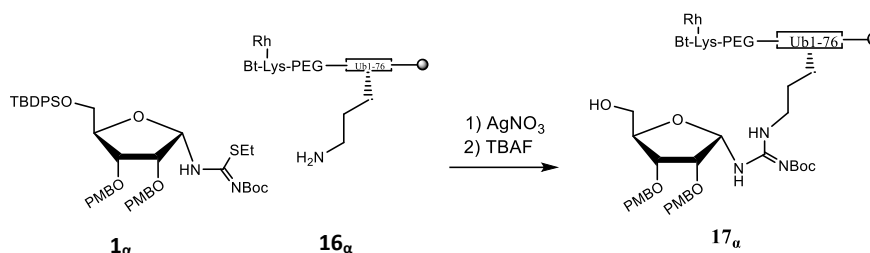


Figuur 44 - Het gemeten LC-MS test cleavage spectrum na de alloc ontscherming (**16_a**).

Synthese van α -ADPr-Ub-76-Lys(Bt)-rhodamine

1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (**6_a**) op gemodificeerd ubiquitine (**20**) koppeling:

Nu de synthetische modificatie van Ub-76 op resin gelukt is (molecuul **16_a**) en de vrije amine op ornitine is gevormd, was de vervolgstap het α -ADPr maken.

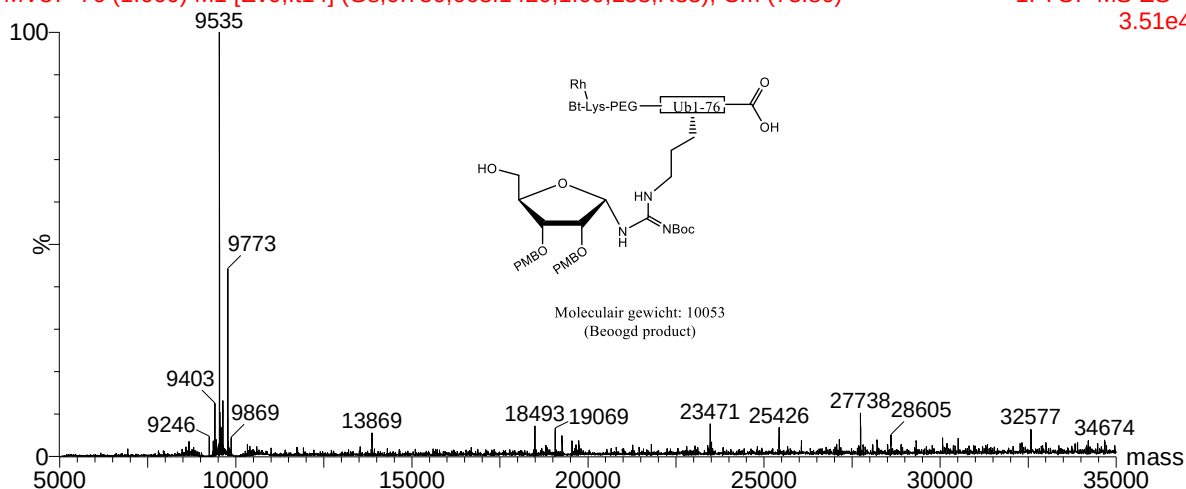


De ribosylering met molecuul **1a** werd uitgevoerd met AgNO_3 om de zwavel-ethyl groep te activeren. Na de ribosylering werd er vrijwel geen start materiaal gemeten (9361 m/z) (figuur 45). Wel zijn de massa's gemeten van het product minus beschermgroepen. De massa's komen overeen met de volgende samenstellingen: m/z: 9535: volledig onbeschermd suiker ; m/z: 9631: TFA adduct ; 9773: onbeschermd +TBDPS ; m/z: 9869: TFA adduct + TBDPS.

Ribosyl addition TC1 overnight

MV37 76 (1.660) M1 [Ev0,l14] (Gs,0.750,663:1420,1.00,L33,R33); Cm (73:80)

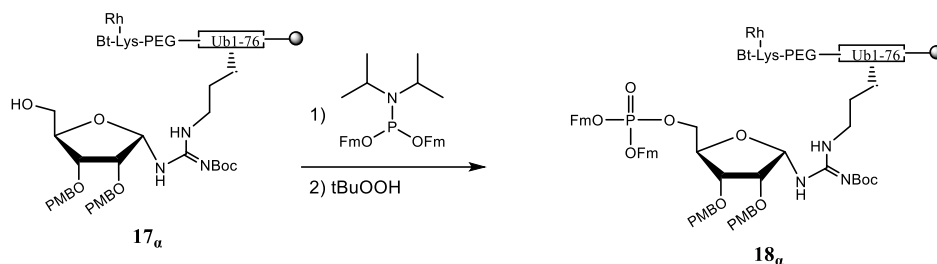
1: TOF MS ES+
3.51e4



Figuur 45 - Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na de ribosyl koppeling aan het gemodificeerde ubiquitine (**17_a**).

Er werd vrijwel geen startmateriaal meer gemeten en het juiste product is gevormd. De volgende syntheses stap was het ontschermen van de TBDPS-groep op de primaire alcohol. Dit werd gedaan met TBAF. Wanneer het zout oplost komt er fluor vrij. Fluor is meer elektronegatief dan de zuurstof en dus vormt de silyl-groep liever een binding met de fluor. Er ontstaat zo een ontschermd primair alcohol.

Fosforylering vrije primaire alcohol

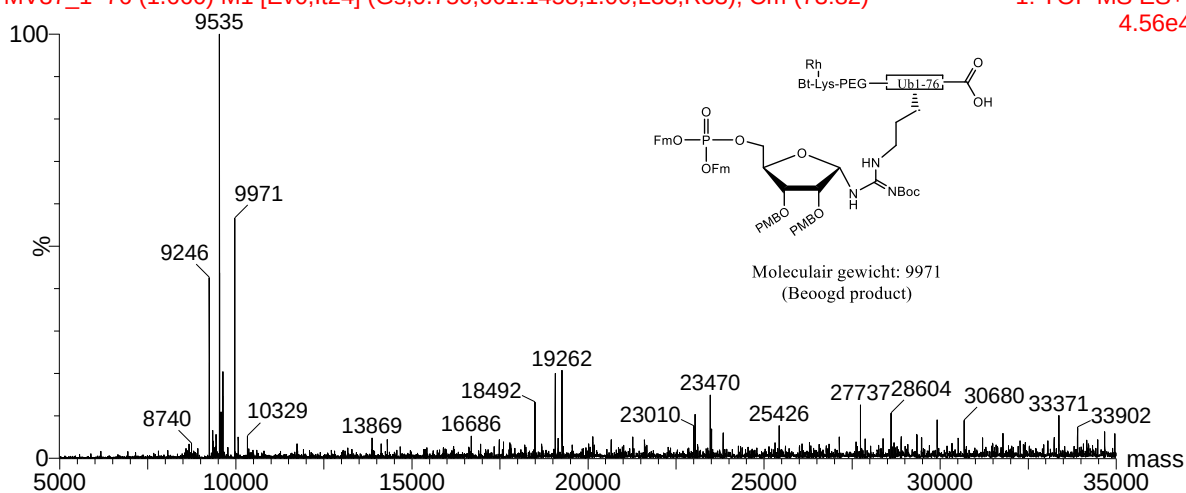


Na het ontschermen van de primaire alcohol van ribose werd deze gefosfityleerd en vervolgens geoxideert om zo tot molecuul **18_a** te komen. Het fosfityleren wordt gedaan met een fosforamitiet met een diisopropyl amine groep en tweemaal Fm beschermde zuurstofgroepen. De diisopropyl amine is een goede vertreksgroep en wordt hier afgestoten. De oxidatiestap wordt uitgevoerd met de overige vrije elektronenparen die het fosfor molecuul bezit. Bij de fosforylering van het vrije primaire alcohol werd een lage conversie gevonden ($\pm 38\%$) van 9971 m/z (figuur 46). De reactie is erg gevoelig voor water en de reactie werd uitgevoerd op een moment dat de luchtvochtigheid erg hoog was. Door de aanhoudende luchtvochtigheid en het tekort aan beschermd fosforamidiet reagens is er doorgegaan met het oxideren van de 38% gekoppelde fosforamidiet. Het is niet gelukt om de conversie verder te verhogen.

Alfa fosfitylering and oxidation overnight

MV37_1 76 (1.660) M1 [Ev0,lt24] (Gs,0.750,661:1458,1.00,L33,R33); Cm (73:82)

1: TOF MS ES+
4.56e4



Figuur 46 - Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na fosfitylering en oxidatie stap (**18_a**).

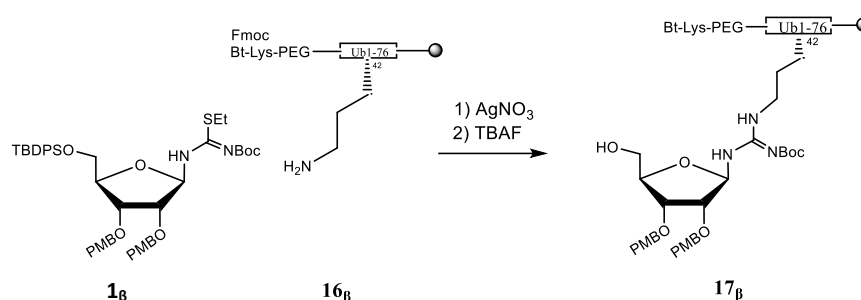
De reagentia om het beschermde fosforamidiet te maken konden niet op tijd geleverd worden, dus de synthese van α -ADPr-Ub-76-Lys(Bt)-rhodamine eindigt hier.

Synthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)

1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (6β) op gemodificeerd ubiquitine (12) koppeling:

Naast de synthese van α -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)-Rhodamine is er gewerkt aan de synthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt). Hierin is de syntheseroute identiek aan de α -route. Het verschil zit hem in de gekoppelde reporter moleculen aan het eiwit en het gebruik van molecuul 1β . In de synthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt) is er enkel een biotine molecuul gekoppeld.

De eerste stap is het ribosyleren met molecuul 1β op de vrije amine (positie-42) in de ubiquitine sequentie.

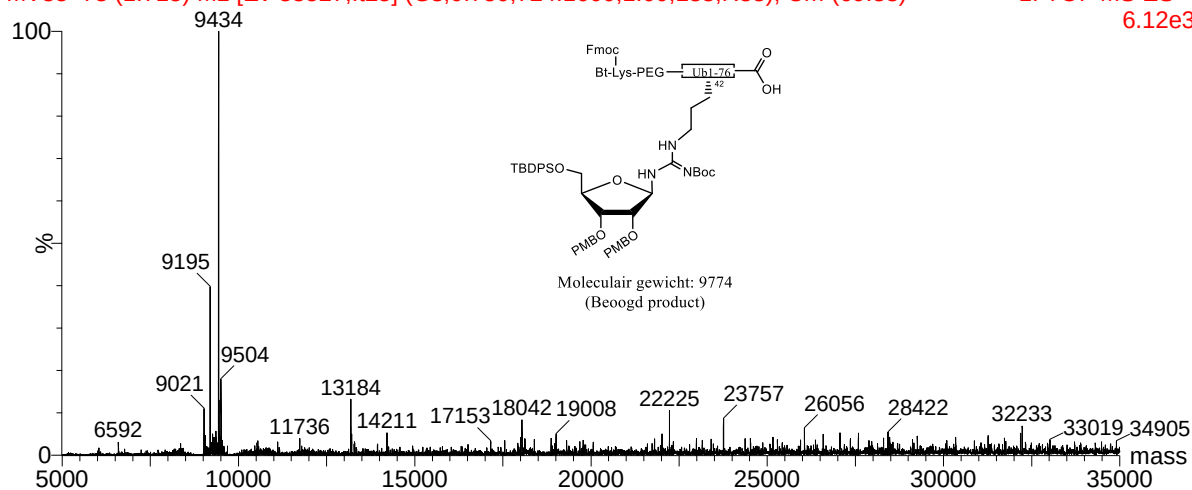


In het koppelen van molecuul 1β werd de gewenste massa (9774 m/z) niet gemeten (figuur 47). Door het ontschermen met TFA worden ook verschillende beschermgroepen van molecuul 1β ontschermd. Wel zijn tijdens de meting verschillende m/z waarden gemeten die overeenkomen met massa's van de gewenste massa, min de massa's van verschillende ontkoppelde beschermgroepen. Deze gemeten massa's komen overeen met de volgende ontkoppelingen van het beoogde product: m/z: 9195: - TBDPS, - 2x PMB, -Boc ; m/z: 9434: -TBDPS, -Boc. Aangezien deze waarden gemeten zijn kan er geconcludeerd worden dat de koppeling van molecuul 1β aan molecuul 17β heeft plaatsgevonden.

Test cleavage beta isothiurea coupling T1

MV35 78 (1.715) M1 [Ev-83527,It25] (Gs,0.750,724:1600,1.00,L33,R33); Cm (69:83)

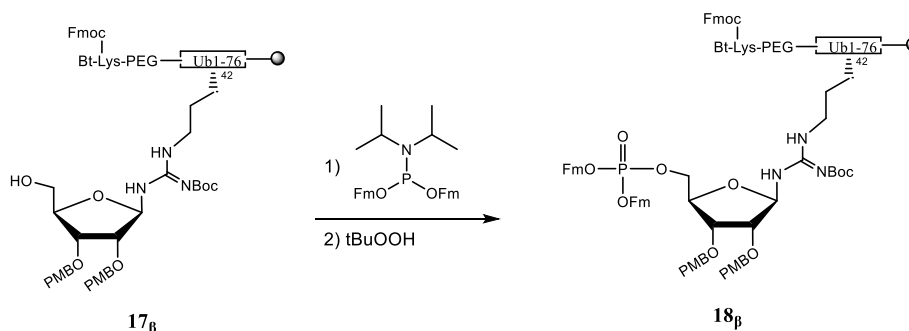
1: TOF MS ES+
6.12e3



Figuur 47 - Het gemeten test cleavage LC-MS na de ribosyl koppeling aan het gemodificeerde ubiquitine (17β).

Echter heeft de koppeling niet volledig plaatsgevonden, aangezien de startmassa (9021 m/z) nog aanwezig is. De proportie is echter dusdanig klein dat de syntheseroute is vervolgd. De TBDPS-groep is selectief ontschermd met TBAF, om een primaire alcohol te vormen voor de fosforyleringsstap.

Fosforylering vrije primaire alcohol

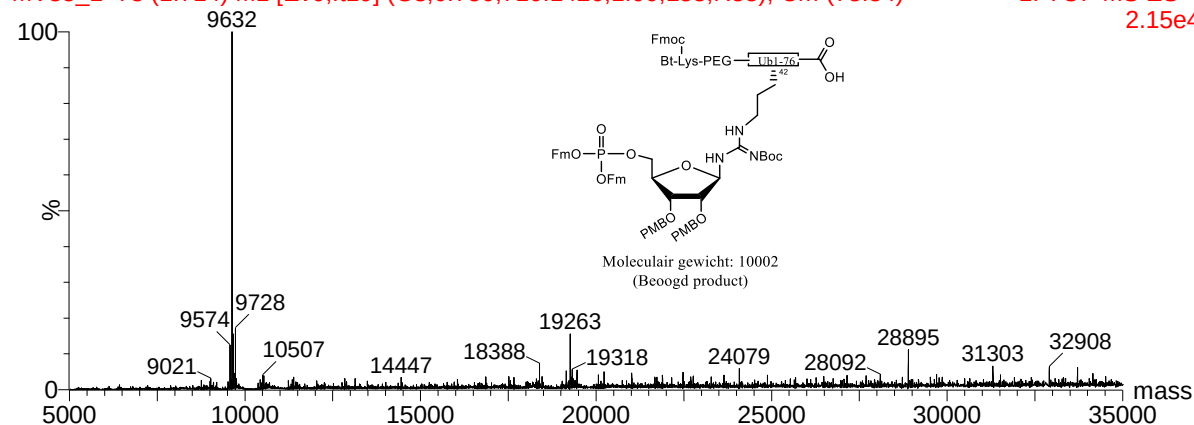


Volledige conversie naar het product is geobserveerd aangezien de verwachte massa's werden terug gevonden en de massa van het startmateriaal ontbrak (9774 m/z) (figuur 48). De verwachte massa's zijn de massa's met afgesplitste beschermgroepen. Dit zijn de volgende massa's: m/z: 9632: -2x PMB, -TFA adduct ; m/z: 9728: -2x PMB, +TFA adduct

Test cleavage phosphorylation and oxidation

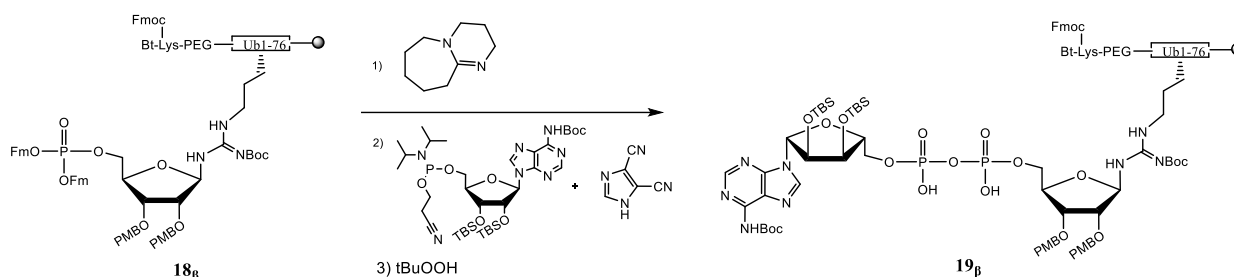
MV35_1 78 (1.714) M1 [Ev0,lt19] (Gs,0.750,710:1426,1.00,L33,R33); Cm (73:84)

1: TOF MS ES+
2.15e4



Figuur 48 - Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na fosfitylering en oxidatie stap (**18_β**).

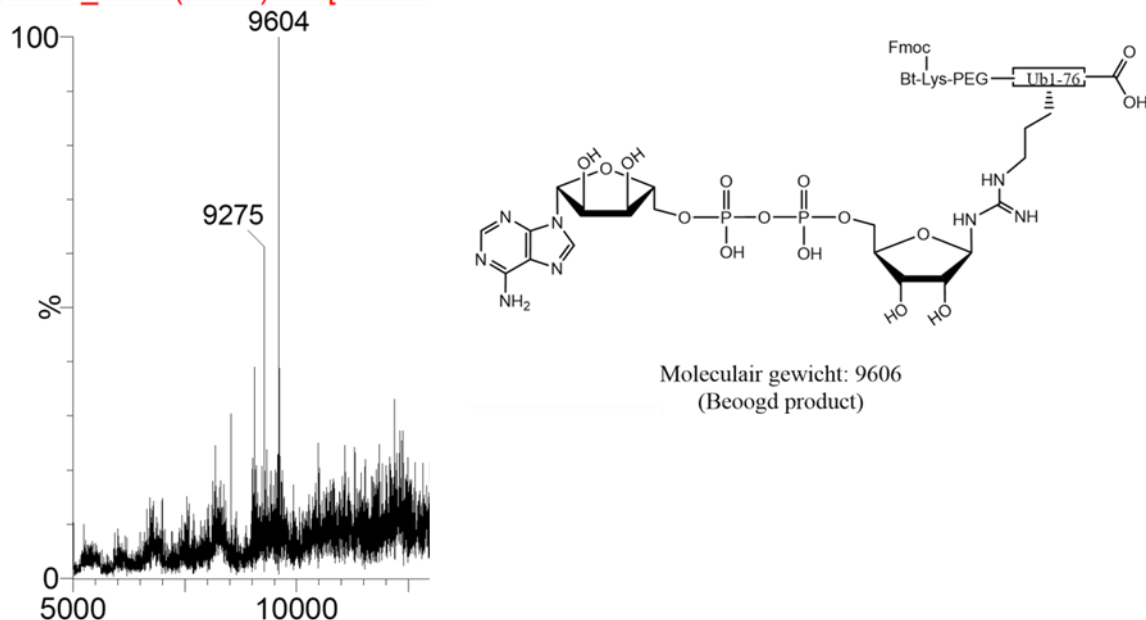
Synthese β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)



Aangezien in de eindsynthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt) de ADPr-groep vrij labiel is, zijn de laatste stappen: Fm-ontscherming, adenosine amidiet koppeling, fosfor oxidatie en de cyanoethyl ontscherming, achtereenvolgens uitgevoerd. De eindverbinding werd van de resin afgesplitst door middel van TFA. De eindverbinding na afsplitsing werd geanalyseerd met LCT-MS (figuur 49).

Test Cleavage Ub76 ADPr

MV35_2 76 (1.660) M1 [Ev-765]



Figuur 49 - Het gemeten test cleavage LC-MS spectrum na vorming β -Ub^{ADPr} (**19_p**)

Na de totale beschermgroep ontschermingsstap (TFA) werd er een test cleavage uitgevoerd. Hieruit kwam de gewenste massa 9606 m/z van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt) uit. Buiten de gewenste massa is er startmateriaal (9275 m/z) gemeten. Dit kan verklaard worden door het niet volledig verlopen van een van de uitgevoerde reactiestappen. Ook is de pyrofosfaat-binding zuur labiel en zou deze verbroken kunnen worden tijdens de ontschermstappen met TFA. Dit zou een ander scenario kunnen zijn voor de gevonden massa van 9275 m/z. Buiten dit is er erg veel ruis te zien. Dit komt doordat er te weinig resin is gebruikt voor de test cleavage. Dit is te zien aan de ion-count van 690. Er is conversie geconstateerd, dus het gehele product werd ontkoppeld van de resin en het product werd gezuiverd door middel van HPLC.

Conclusie

Het doel in dit onderzoek was het valideren, optimaliseren van de synthese route van bouwstenen 1 en 2 en het synthetiseren van het alfa en bèta Ub-76^{ADPr} met een natieve link met arginine 42. Hierin was het belangrijk om zo veel mogelijk van de bouwstenen te synthetiseren omdat deze syntheses veel tijd innemen en voor veel doeleinden gebruikt kunnen worden op de afdeling. Hierin lag de nadruk op bouwsteen 1 door de hogere complexiteit van syntheseroute en de grotere vraag naar het gebruik.

In de totaal synthese van bouwsteen 1 is er 3,472 g (4,26 mmol; $Y_{\text{tot}} = 9,3\%$ over 6 stappen) van de alfa variant gesynthetiseerd en 0,3530 g (0,433 mmol; $Y_{\text{tot}} = 1,8\%$ over 6 stappen) van de bèta variant gesynthetiseerd. Dit is middels ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, NOESY spectra bepaald en bij de LC-MS metingen is de massa gevonden (815,11 m/z). Voor de synthese zijn verder belangrijke syntheseschappen geoptimaliseerd. De grootste hiervan is het ruw doorzetten van de synthese van beginstof molecuul **3** naar molecuul **6**. Dit gaf ondanks een fout tijdens de eindsynthese een hogere eind opbrengst dan het synthetiseren met daarbij zuiveringsstappen (36,9% i.p.v. 29,0%). Ook in de eindsynthese van bouwsteen 1α is verbetering geboekt. Hierin is een opbrengst van 63,6% behaald, waarin het referentie paper 50% opbrengst rapporteerde.

In de totaal synthese van bouwsteen 2 zijn er initieel fouten gemaakt. ¹H-NMR en ¹³C-NMR spectra zijn verkeerd geïnterpreteerd en hierdoor zijn verschillende synthese stappen foutief doorgezet. Dit is echter op relatief kleine schaal gebeurd. Dit is op tijd opgemerkt en heeft dit geen ernstige gevolgen gehad voor het onderzoek. In de juiste synthese route is er een totaal opbrengst van 60,6% over 4 stappen behaald en is er 0,1085 g (0,136 mmol) van molecuul 2 gesynthetiseerd. Dit was genoeg voor vervolg syntheses voor het maken van Ub^{ADPr}.

In de ubiquitine modificatie met biotine en rhodamine is duidelijk de massa terug gevonden van 9361 m/z mede als het product met het TFA adduct (9377 m/z). De eind test ontscerming geeft weer dat het product (**16α**) voor ±80% zuiver is.

Tijdens de synthese van α-Ub^{ADPr} is de synthese gestrand bij de fosforyleringsstap. De reactiecondities bleken te vochtig te zijn waardoor het reagens kapot ging. Er een maximale een conversie werd gehaald van ± 38% met de juiste massa van 9971 m/z. Ook was er te weinig reagens over om de reactie opnieuw in te zetten en kon het reagens ook niet meer bijgemaakt worden door lange levertijden. Het doel om α-Ub^{ADPr} te synthetiseren is niet gelukt.

De synthese van β-Ub^{ADPr} is gelukt. Middels de LC-MS is de juist massa van 9606 m/z terug gevonden. De ion-count was alleen erg laag dus er valt lastig te stellen in welke verhouding er nog start en gedegradeerd product aanwezig is (9275 m/z), versus de gevormde α-Ub^{ADPr}. Het signaal ligt in het ruis gebied en is deze verhouding lastig te bepalen. Wel is het product gebruikt in een vervolg proefje. Dit heeft geresulteerd in bruikbare data voor het manuscript en zal dus gepubliceerd worden.

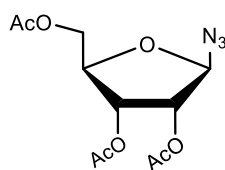
Aanbevelingen

De synthese van $\beta\text{-Ub}^{\text{ADPr}}$ heeft laten zien dat de fosforylering reactie vrijwel volledige conversie kan weergeven. Dit experiment is uitgevoerd eind juni. Bij de synthese van $\alpha\text{-Ub}^{\text{ADPr}}$ is gebleken dat de fosforylering erg afhankelijk is van de droogheid van het reactiemengsel en dus geen volledige conversie geeft. Er is al geprobeerd om onder inerte omstandigheden en met mol sieves te werken en materiaal te drogen met een droogstoof. Met al deze voorbereidingen werd er alsnog geen volledige conversie geconstateerd. Er wordt verwacht dat het met de luchtvochtigheid te maken heeft die vooral in de hoog zomermaanden erg hoog is (eind juli). Het is dus aan te raden om deze tijd te mijden voor deze reactie en goed de luchtvochtigheid in de gaten houden wanneer het experiment gepland wordt.

Voor de synthese van $\beta\text{-Ub}^{\text{ADPr}}$ is verder bij het eindstappen van de synthese (vorming pyrofosfaat binding, ontscherming beschermgroepen en oxidatie na ontscherming) gebleken dat er een onvolledige conversie wordt verkregen. Bij de test ontscherming wordt gebruik gemaakt van een erg zuur mengsel met TFA. Hierdoor wordt niet alleen het Ub^{ADPr} en de beschermgroepen van de resin ontkoppeld, maar gaat ook de pyrofosfaat binding verloren. Echter zijn deze zure omstandigheden nodig en zou er gekeken kunnen worden naar of de concentratie geoptimaliseerd kan worden. Ook kan een optimalisatie proces voor de reactietijd van de ontscherming worden toegepast. Mogelijk zorgt dit voor een grotere opbrengst van het $\beta\text{-Ub}^{\text{ADPr}}$.

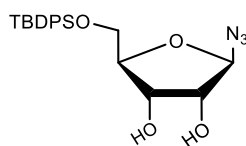
Experimenteel

Synthese van 2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (4)



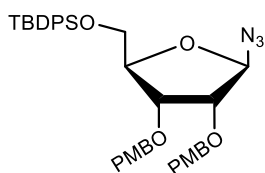
Commercieel verkregen 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (**3**) (9,9788 g, 31,4 mmol) werd onder argon gezet en opgelost in DCM (313 mL, 0,1M). TMS- N_3 (4,54 mL, 34,5 mmol, 1,1 eq.) en een 1,0M SnCl_4 oplossing in DCM (31,4 mL, 31,4 mmol, 1,0 eq.) werden toegevoegd aan het reactiemengsel. Het reactiemengsel werd geroerd totdat volledige conversie was aangetoond middels TLC (eluens: 3:7, EtOAc : heptaan met CAM-stain) na ± 30 minuten. De reactie werd gestopt door toevoeging van een verzadigde NaHCO_3 -oplossing (100 mL) en de waterlaag werd gewassen met DCM (2x 100 mL). De organische laag werd tweemaal gewassen met verzadigde NaCl -oplossing (2x 150 mL). De organische laag werd gedroogd met MgSO_4 , gefiltreerd en geconcentreerd in vacuüm op een rotafilmverdampers. De overgebleven olie werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 10 $\rightarrow$ 50% EtOAc in heptaan). Het product werd verkregen als kleurloze olie (8,3299 g, 27,65 mmol, 88,2%). **$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):** δ 5.35 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-1), 5.34 – 5.28 (m, 1H, H-3), 5.12 (dd, $J = 4.8, 2.0$ Hz, 1H, H-2), 4.39 (dd, $J = 12.0, 3.3$ Hz, 1H, H-5'), 4.36 – 4.30 (m, 1H, H-4), 4.14 (dd, $J = 12.0, 4.1$ Hz, 1H, H-5''), 2.11 (s, 3H, C=O Ac), 2.10 (s, 3H, C=O Ac), 2.06 (s, 3H, C=O Ac). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3):** δ 170.68, 169.65, 169.51 (C=O Ac), 92.75 (C-1), 79.47 (C-4), 74.57 (C-2), 70.55 (C-3), 63.10 (C-5), 20.78, 20.62, 20.56 (CH_3 Ac).

Synthese van 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (5)



2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (**4**) (2,1262 g, 7,06 mmol) werd opgelost in MeOH (35 mL, 0,2M). Er werd een 13 wt% NaOMe/MeOH -oplossing gemaakt (0,5 mL, 3,65 mmol, 0,52 eq.) en aan de oplossing toe gedruppeld. Er werd een TLC genomen en hierop werd volledige spotconversie geconstateerd en de reactie werd gestopt door toevoeging van Amberlite H+. De oplossing werd ingedampt en co-geëvaporeerd met pyridine en werd opgelost in pyridine (70 mL, 0,1M). TBDPS-Cl (5,5 mL, 21,18 mmol, 3 eq.) werd toe gedruppeld aan de oplossing en overnacht laten staan. Er werd volledige conversie gezien op TLC (eluens: 3:7 EtOAc : heptaan met CAM-stain). De reactie werd gestopt door toevoeging van MeOH (30mL). De oplossing werd ingedampt en het product opgelost in EtOAc en gewassen met opeenvolgend HCl (2x 40 mL, 1M), verzadigde NaHCO_3 -oplossing (2x 40 mL) en verzadigde NaCl -oplossing (2x 40 mL). Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 20 $\rightarrow$ 40% EtOAc in heptaan: 500 mL 2:8 & 500 mL 4:6). Het product werd geïsoleerd en ingedampt (2,5988 g, 6,2898 mmol, 89,1% yield). **$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):** δ 7.75 – 7.70 (m, 4H, arom. TBDPS), 7.43 (dd, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 6H, arom. TBDPS), 5.32 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1), 4.36 (dd, $J = 6.3, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 4.07 (dt, $J = 6.3, 4.2$ Hz, 1H, H-4), 3.97 (dd, $J = 4.8, 2.0$ Hz, 1H, H-2), 3.92 – 3.78 (m, 2H, H-5), 2.86 (s, 2H, OH), 1.11 (s, 9H, tBu TBDPS). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3):** δ 135.70 (CH arom. TBDPS), 133.09, 132.96 (Cq TBDPS), 130.02, 129.98, 127.96, 127.92 (CH arom. TBDPS), 94.86 (C-1), 83.94 (C-4), 75.55 (C-2), 71.50 (C-3), 63.92 (C-5), 26.91 (CH_3 tBu TBDPS), 19.32 (Cq tBu TBDPS).

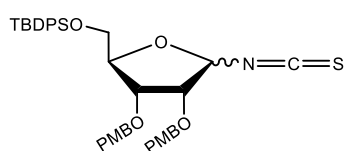
Synthese van 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (6)



5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (**5**) (7,3063 g, 17,667 mmol) en TBA-Br (1,1562 g, 3,587 mmol, 0,2 eq.) werden co-geëvaporeerd in toluen (3x20 mL). De opstelling werd onder argon gezet en de stoffen werden opgelost in droge DMF (120 mL, 0,28M). PMB-Cl (17,0 mL, 125,9 mmol, 3,73 eq.) en mole sieves werden toegevoegd en de oplossing werd gekoeld tot 0°C. Er werd NaH (60 wt% dispersie in olie, 2,1345 g, 53,37 mmol,

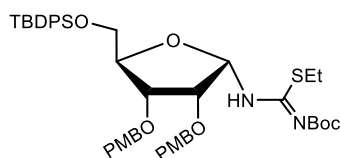
3,0 eq.) toegevoegd en 15 minuten gekoeld geroerd. Het ijsbad werd weggehaald en de reactie werd 60 minuten gevolgd. De reactie werd gestopt door toedruppeling van verzadigde NaHCO₃-oplossing. Nadat er geen bubbels meer werden geconstateerd, werd de oplossing overgebracht in een scheitrechter en verdund met meer NaHCO₃-oplossing (200 mL). De waterige laag werd gewassen met Et₂O (3x 250 mL). De organische lagen werden bij elkaar gevoegd en gedroogd met MgSO₄. De organische laag werd vacuüm gefiltreerd en geconcentreerd op een rotatiefilmverdamper. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 10% EtOAc in heptaan ; TLC-eluens: 3:7, EtOAc : heptaan met CAM-stain). Het product werd verkregen als doorzichtige olie (5,9679 g, 9,127 mmol, 51,7% yield). **¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.72 – 7.64 (m, 4H, arom. TBDPS), 7.48 – 7.34 (m, 6H, arom. TBDPS), 7.31 – 7.25 (m, 2H, arom. PMB), 7.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, arom. PMB), 6.87 (dd, *J* = 13.6, 8.7 Hz, 4H, arom. PMB), 5.38 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-1), 4.64 – 4.50 (m, 2H, CH₂ PMB), 4.43 (q, *J* = 11.4 Hz, 2H, CH₂ PMB), 4.23 (dt, *J* = 6.6, 3.3 Hz, 1H, H-4), 4.16 (dd, *J* = 6.6, 4.5 Hz, 1H, H-3), 3.90 – 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.82 (s, 3H, CH₃ PMB), 3.80 (s, 3H, CH₃ PMB), 3.74 (dd, *J* = 4.5, 2.3 Hz, 1H, H-2), 3.70 (dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz, 1H, H-5''), 1.05 (s, 9H, *t*Bu TBDPS). **¹³C-NMR (75,5 MHz, CDCl₃):** δ 159.62, 159.51 (Cq arom.), 135.76, 135.75 (TBDPS arom.), 133.34, 133.17 (Cq TBDPS), 129.87, 129.83, 129.79, 129.62 (CH arom. TBDPS/PMB), 129.58 (Cq PMB), 127.87, 127.83, 114.05, 113.96 (CH arom. PMB), 93.27 (C-1), 83.08 (C-4), 79.86 (C-2), 76.16 (C-3), 72.27, 72.18 (CH₂ PMB), 63.28 (C-5), 55.43, 55.40 (CH₃ PMB), 26.88 (CH₃ tbdps), 19.34 (Cq *t*Bu TBDPS).

Synthese van 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)-α,β-D-ribofuranosyl isothiocyanaat (7_{α,β})



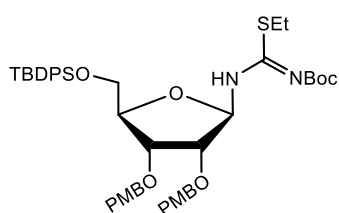
5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranosyl azide (**6**) (1,0069 g, 1,54 mmol) werd opgelost in EtOAc (15,5 mL, 0,1M) opgelost, onder argon gezet en voor 10 minuten gesonificeerd. Er werd PtO₂ (0,08515 g, 0,358 mmol, 0,24 eq.) toegevoegd en H₂-gas door de oplossing gebubbeld voor een uur. Het mengsel werd gefiltreerd over Celite en werd nagespoeld met EtOAc. Er werd H₂O (15,5 mL, 0,1M) aan de oplossing toegevoegd. Onder hard roeren werd er opeenvolgend K₂CO₃ (0,8515 g, 6,16 mmol, 4,0 eq.) en CCl₄ (85% zuiver, 0,250 mL, 2,772 mmol, 1,8 eq.) toegevoegd. De reactie werd overnacht laten staan en werd geneutraliseerd door toevoeging van verzadigde NaHCO₃-oplossing (100 mL). De waterige oplossing werd geëxtraheerd met EtOAc (3x 100 mL) en de organische lagen werden gedroogd met MgSO₄, gefiltreerd en ingedampt op een rotatiefilmverdamper. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 0 → 15% Et₂O in heptaan ; TLC-eluens: 2:8, Et₂O : heptaan met CAM-stain). De producten werden apart geïsoleerd als gele oliën (α-anomeer: 0,4055 g, 0,605 mmol, 39,3%. β-anomeer: 0,2144 g, 0,320 mmol, 20,8%. Totaal opbrengst: 60,1%). **α-anomeer: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.59 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 7.47 – 7.38 (m, 7H), 7.31 (dd, *J* = 8.5, 6.3 Hz, 5H), 6.88 (t, *J* = 8.7 Hz, 4H), 5.34 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.51 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.28 (q, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.12 – 3.99 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.66 (dd, *J* = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J* = 11.4, 2.8 Hz, 1H), 0.99 (s, 9H). **¹³C-NMR (75,5 MHz, CDCl₃):** δ 159.68, 159.30 (Cq PMB), 139.98 (NCS), 135.65, 135.59 (CH arom. TBDPS), 133.03, 132.83 (Cq TBDPS), 130.26 (Cq PMB), 130.03, 129.97, 129.75, 129.61 (CH arom. TBDPS/PMB), 129.29 (Cq PMB), 127.92, 127.89, 114.09, 113.84 (CH arom. PMB), 86.15 (C-1), 85.75 (C-4), 79.66 (C-3), 75.61 (C-2), 72.87, 72.66 (CH₂ PMB), 63.74 (C-5), 55.38 (CH₃ PMB), 26.90 (CH₃ TBDPS), 19.30 (Cq *t*Bu TBDPS). **β-anomeer: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.73 – 7.60 (m, 4H, CH arom. TBDPS), 7.50 – 7.33 (m, 6H, CH arom. TBDPS), 7.24 (dd, *J* = 20.4, 8.4 Hz, 4H, CH arom. PMB), 6.87 (dd, *J* = 11.9, 8.7 Hz, 4H, CH arom. PMB), 5.42 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-1), 4.57 (s, 2H, CH₂ PMB), 4.54 – 4.37 (m, 2H, CH₂ PMB), 4.24 – 4.08 (m, 2H, H-3 + H-4), 3.96 (dd, *J* = 4.0, 2.7 Hz, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, CH₃ PMB), 3.80 (s, 3H, CH₃ PMB), 3.78 (dd, *J* = 11.5, 3.2 Hz, 1H, H-5'), 3.68 (dd, *J* = 11.5, 3.2 Hz, 1H, H-5''), 1.05 (s, 9H, CH₃ *t*Bu TBDPS). **¹³C-NMR (75,5 MHz, CDCl₃):** δ 159.72, 159.56 (Cq PMB), 140.74 (NCS), 135.82, 135.73 (CH arom. TBDPS), 133.32, 132.99 (Cq TBDPS), 129.89, 129.87 (CH arom. TBDPS/PMB), 129.71, 129.59 (Cq PMB), 129.18, 127.90, 127.89 (CH arom. PMB), 114.14, 114.01 (CH arom. PMB), 88.47 (C-2), 83.47 (C-4), 81.41 (C-2), 76.15 (C-3), 72.58, 72.42 (CH₂ PMB), 63.33 (C-5), 55.44, 55.42 (CH₃ PMB), 26.93 (CH₃ TBDPS), 19.36 (Cq *t*Bu TBDPS).

Synthese van 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1_a**)



5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7_a**) (4,0837 g, 6,0959 mmol) werd opgelost in watervrije THF (31 mL, 0,2M) en doorgeëubeld met NH₃-gas voor een uur. De oplossing werd 1 minuut doorgeëubeld met N₂-gas en ingedampt tot een gele olie en onder argon gezet. Het ruwe thiourea werd opgelost in watervrije DCM (61 mL, 0,1M) en er werden mole sieves aan de oplossing toegevoegd. Er werd achtereenvolgens DMAP (0,0747 g, 0,611 mmol, 0,1 eq.) en di-*tert*-butyl dicarbonaat (1,5 mL, 6,53 mmol, 1,1 eq.) toegevoegd. De reactie werd 2 uur geroerd en werd verdunt met DCM (100mL) en gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (100 mL). De waterige laag werd terug geëxtraheerd met DCM (2x100 mL) en gedroogd met MgSO₄, gefiltreerd en ingedampt op een rotatiefilmverdamer. Het overgebleven ruwe product werd opgelost in MeCN (61 mL, 0,1M) en er werd onder hard roeren achtereenvolgens K₂CO₃ (8,4456 g, 69,1 mmol, 11,3 eq.) en EtI (1,75 mL, 21,88 mmol, 3,6 eq.) toegevoegd (start en overnacht). De oplossing werd verdunt met EtOAc (100 mL) en werd gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (100 mL) en een keer terug geëxtraheerd met EtOAc (100 mL). De organische laag werd gedroogd met MgSO₄, gefiltreerd en ingedampt op een rotatiefilmverdamer. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 0 → 45% EtOAc in heptaan ; TLC-eluens: 2:8, Et₂O : heptaan met CAM-stain). Na indampen bleef er een kleurloze olie over (3,1591 g, 3,8757 mmol, 63,6%). **¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.70 – 7.60 (m, 4H, CH arom. TBDPS), 7.50 – 7.35 (m, 6H, CH arom. TBDPS), 7.35 – 7.28 (m, 4H, CH arom. PMB), 6.92 – 6.82 (m, 4H, CH arom. PMB), 5.74 (bs, 1H, H-1), 4.70 (d, J = 11.2 Hz, 1H, CH₂' PMB), 4.60 – 4.50 (m, 3H, CH₂ PMB + CH₂'' PMB), 4.23 (td, J = 3.7, 1.5 Hz, 1H, H-4), 4.16 (dd, J = 3.3, 1.1 Hz, 2H, H-3), 3.81 (s, 3H, CH₃ PMB), 3.80 (s, 3H, CH₃ PMB), 3.70 – 3.66 (m, 2H, H-5), 2.91 (bs, 2H, CH₂ Et), 1.53 (s, 9H, *t*Bu Boc), 1.34 – 1.11 (m, 3H, CH₃ Et), 1.05 (s, 9H, *t*Bu TBDPS). **¹³C-NMR (75,5 MHz, CDCl₃):** δ 161.30 (C=O Boc), 159.57, 159.41 (Cq PMB), 135.81, 135.70 (CH arom. TBDPS), 133.26, 133.02 (Cq TBDPS), 130.14 (Cq PMB), 130.02, 129.97, 129.77, 129.70 (CH arom. TBDPS/PMB), 129.63 (Cq PMB), 127.96, 127.93, 113.99, 113.89 (CH arom. PMB), 83.16 (C-4), 81.83 (C-1), 79.33 (Cq *t*Bu Boc), 78.14 (C-3), 77.18 (C-2), 73.04, 72.57 (CH₂ PMB), 63.99 (C-5), 55.38 (CH₃ PMB), 28.37 (*t*Bu CH₃ Boc), 27.03 (*t*Bu CH₃ TBDPS), 25.16 (CH₂ Et), 19.37 (Cq *t*Bu TBDPS), 13.75 (CH₃ Et).

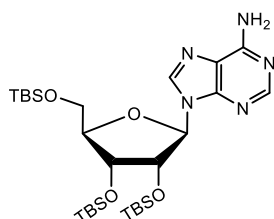
Synthese van 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiurea (**1_b**)



5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl isothiocyanaat (**7_b**) (2,3568 g, 3,518 mmol) werd opgelost in THF (18 mL, 0,2M) en doorgeëubeld met NH₃-gas voor een uur. De oplossing werd 1 minuut doorgeëubeld met N₂-gas en ingedampt tot een gele olie. Het ruwe thiourea werd opgelost in watervrije DCM (35 mL, 0,1M) en er werd achtereenvolgens DMAP (0,0466 g, 0,0381 mmol, 0,11 eq.) en di-*tert*-butyl dicarbonaat (0,560 mL, 2,43 mmol, 1,1 eq.) toegevoegd. De reactie werd 2 uur geroerd en werd verdunt met DCM (100mL) en gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (100 mL). De waterige laag werd terug geëxtraheerd met DCM (2x100 mL) en gedroogd met MgSO₄, gefiltreerd en ingedampt op een rotatiefilmverdamer. Het overgebleven ruwe product werd opgelost in MeCN (61 mL, 0,1M) en er werd onder hard roeren achtereenvolgens K₂CO₃ (8,4456 g, 69,1 mmol, 11,3 eq.) en EtI (1,75 mL, 21,88 mmol, 3,6 eq.) toegevoegd (start en overnacht). De oplossing werd verdunt met EtOAc (100 mL) en werd gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (100 mL) en een keer terug geëxtraheerd met EtOAc (100 mL). De organische laag werd gedroogd met MgSO₄, gefiltreerd en ingedampt op een rotatiefilmverdamer. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 0 → 45% EtOAc in heptaan ; TLC-eluens: 2:8, Et₂O : heptaan met CAM-stain). Na indampen bleef er een kleurloze olie over (0,3530 g, 0,4331 mmol, 12,3%). **¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 9.72 (d, J = 105.0 Hz, 1H), 7.67 – 7.59

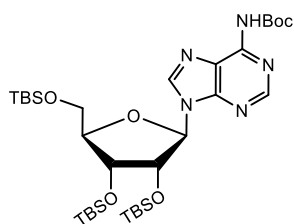
(m, 4H), 7.46 – 7.31 (m, 6H), 7.27 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 3H), 6.88 – 6.80 (m, 4H), 5.58 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.54 – 4.41 (m, 2H), 4.13 (q, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.08 – 3.96 (m, 1H), 3.89 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.75 – 3.58 (m, 2H), 3.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.48 (s, 8H), 1.30 – 1.20 (m, 3H), 1.05 – 0.98 (m, 9H). δ $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3): δ 161.74 (C=O), 159.51, 159.48 (Cq PMB), 135.78, 135.70 (CH arom. TBDPS), 133.36, 132.97 (Cq TBDPS), 129.92, 129.87, 129.71, 129.71 (CH arom. TBDPS/PMB), 127.91, 127.89, 114.02, 113.97 (CH arom. PMB), 86.30 (C-4), 82.77 (C-1), 80.69 (C-3), 79.61 (Cq *t*Bu Boc), 75.95 (C-2), 72.05, 71.93 (CH₂ PMB), 63.67 (C-3), 55.42, 55.38 (CH₃ PMB), 28.30 (CH₃ Boc), 27.05 (CH₃ TBDPS), 25.43 (CH₂ Et), 19.35 (Cq *t*Bu TBDPS), 13.91 (CH₃ Et).

Synthese van 2',3',5',-tri-*O*-butyl-di-methylsilyl adenosine (9)



Adenosine (**8**) (2,0005 g, 7,486 mmol) werd gecoëvaporeerd met watervrije pyridine (3x 10mL) en de kolf werd onder argon gezet. De adenosine werd in watervrije DMF (37,5 mL, 0,2M) opgelost en de oplossing werd verwarmd tot 50°C. Er werd achtereenvolgens imidazole (2,5725 g, 37,8 mmol, 5,0 eq.) en TBS-Cl (4,5014 g, 29,943 mmol, 4,0 eq.) toegevoegd aan het reactiemengsel en de reactie werd overnacht laten staan. De reactie werd gestopt door toevoeging van H₂O (50 mL) en het reactiemengsel werd verdunt met Et₂O (100 mL). Het reactiemengsel werd gewassen met H₂O (150 mL) en de organische laag afgenomen. De waterige laag werd terug geëxtraheerd met Et₂O (3x 150 mL). De organische lagen werden bij elkaar gevoegd en gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (150 mL). De organische laag werd gescheiden van de waterige laag en gedroogd met MgSO₄ en onder vacuüm gefiltreerd. Het filtraat werd geconcentreerd op een rotatiefilmverdamer. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 20 → 50% EtOAc in heptaan ; TLC-eluens: 3:7, EtOAc : heptaan met CAM-stain). Na indampen bleef er een wit poeder over (3,9486 g, 6,473 mmol, 86,5%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.34 (s, 1H, H-2), 8.15 (s, 1H, H-8), 6.02 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-1'), 5.72 (s, 2H, 6-NH₂), 4.69 (dd, $J = 5.2, 4.3$ Hz, 1H, H-2'), 4.34 – 4.29 (m, 1H, H-3'), 4.15 – 4.10 (m, 1H, H-4'), 4.03 (dd, $J = 11.3, 4.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.78 (dd, $J = 11.3, 2.8$ Hz, 1H, H-5'), 0.95 (s, 9H, CH₃ *t*Bu TBS), 0.93 (s, 9H, CH₃ *t*Bu TBS), 0.79 (s, 9H, CH₃ *t*Bu TBS), 0.14 (s, 3H, CH₃ SiMe), 0.13 (s, 3H, CH₃ SiMe), 0.10 (d, $J = 1.5$ Hz, 6H, CH₃ SiMe), -0.05 (s, 3H, CH₃ SiMe), -0.23 (s, 3H, CH₃ SiMe). $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3): δ 155.45 (C-6), 152.77 (C-2), 150.05 (C-4), 139.86 (C-8), 120.19 (C-5), 88.49 (C-1'), 85.61 (C-4'), 75.95 (C-2'), 72.13 (C-3'), 62.68 (C-5') 26.22, 26.00, 25.83 (*t*Bu TBS), 18.66, 18.23, 18.01 (Cq *t*Bu TBS), -4.25, -4.56, -4.93, -5.23 (SiMe). **LCT-MS**: 610 m/z.

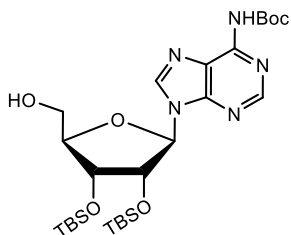
Synthese van *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine (10)



2',3',5',-tri-*O*-butyl-di-methylsilyl adenosine (**9**) (2,0007 g, 3,28 mmol) werd gecoëvaporeerd met toluen (2x 20 mL) en opgelost in watervrije THF (33 mL, 0,1M) en afgekoeld tot 0°C. Er werd achtereenvolgens DMAP (0,0879 g, 0,719 mmol, 0,22 eq.) en di-*tert*-butyl dicarbonaat (2,3 mL, 10,0 mmol, 3,1 eq.) toegevoegd. De reactie werd verwarmd tot reflux en werd 2 uur laten staan. De oplossing werd gekoeld tot kamertemperatuur en geconcentreerd op een rotatiefilmverdamer. De overgebleven olie werd opgelost in EtOAc (100 mL) en werd gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (100 mL). De waterlaag werd gewassen met EtOAc (100 mL) en de organische lagen werden bij elkaar gevoegd en ingedampt op een rotatiefilmverdamer. De overgebleven rode olie werd opgelost in MeOH (33 mL, 0,1M) en werd gekoeld tot 0°C. Er werd vervolgens methylamine (33 wt. % in EtOH, 1,2 mL, 4,0 eq.) toegevoegd en overnacht laten staan terwijl de temperatuur rustig tot kamertemperatuur steeg. De oplossing werd ingedampt en gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 10 → 20% EtOAc in heptaan ; TLC-eluens: 3:7, EtOAc : heptaan met CAM-stain). Het product werd verkregen als een gele olie (2,1477 g, 3,0327 mmol, 92,5%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.74 (s, 1H, H-2), 8.30 (s, 1H, H-8), 7.99 (s, 1H, 6-NH),

6.08 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-1'), 4.65 (dd, $J = 5.3, 4.3$ Hz, 1H, H-2'), 4.29 (dd, $J = 4.3, 3.3$ Hz, 1H, H-3'), 4.14 (td, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-4'), 4.02 (dd, $J = 11.4, 3.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.79 (dd, $J = 11.4, 2.7$ Hz, 1H, H-5'), 1.55 (s, 9H, CH₃ tBu Boc), 0.96 (s, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.93 (s, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.78 (s, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.14 (d, $J = 3.6$ Hz, 6H, CH₃ SiMe), 0.10 (s, 6H, CH₃ SiMe), -0.06 (s, 3H, CH₃ SiMe), -0.29 (s, 3H, CH₃ SiMe). $\delta^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl₃): δ 153.01 (C-2), 150.90 (C-6), 149.90 (C-4), 149.75 (C=O), 141.46 (C-8), 122.10 (C-5), 88.41 (C-2'), 85.82 (C-3'), 82.17 (Cq tBu Boc), 76.15 (C-1'), 72.16 (C-4'), 62.67 (C-5'), 28.22 (tBu Boc), 26.15, 25.91, 25.74 (tBu TBS), 18.59, 18.15, 17.91 (Cq tBu TBS), -4.33, -4.60, -4.62, -5.04, -5.28, -5.31 (SiMe). **LCT-MS**: 710 m/z.

Synthese van *N*⁶-tert-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-tert-butyldimethylsilyl adenosine (11)

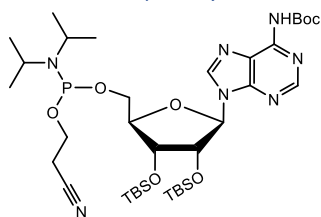


*N*⁶-tert-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-*O*-tert-butyldimethylsilyl adenosine (**10**) (3,3477 g, 4,714 mmol) werd opgelost in THF (33 mL, 0,14M) en gekoeld tot 0°C. Er werd nieuw gemaakte TFA/H₂O-oplossing (1:1 ; v/v, 36 mL, 50,0 eq.) toegevoegd. Na 2,5 uur roeren werd de oplossing geneutraliseerd met vast NaHCO₃ tot pH $\pm$ 7, verdunt met NaHCO₃-oplossing (100 mL) en de waterlaag gewassen met EtOAc (3x 150 mL). De verkregen organische lagen werden bij elkaar gevoegd en gedroogd met

MgSO₄, gefiltreerd onder vacuüm en geconcentreerd op een rotatiefilmverdamer. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 30 → 40% EtOAc in heptaan ; TLC-eluens: 2:3, EtOAc : heptaan met CAM-stain). Na indampen bleef er een wit poeder over (2,7059 g, 4,54 mmol, 96,3%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.74 (s, 1H, H-2), 8.01 (s, 1H, 6-NH), 7.95 (s, 1H, H-8), 6.22 (dd, $J = 12.2, 2.1$ Hz, 1H, 5'-OH), 5.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.02 (dd, $J = 7.9, 4.6$ Hz, 1H, H-2'), 4.33 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3'), 4.17 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-4'), 3.95 (dt, $J = 13.1, 2.0$ Hz, 1H, H-5'), 3.77 – 3.65 (m, 1H, H-5'), 1.57 (s, 9H, CH₃ tBu Boc), 0.95 (s, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.73 (s, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.13 (s, 3H, CH₃ SiMe), 0.12 (s, 3H, CH₃ SiMe), -0.15 (s, 3H, CH₃ SiMe), -0.67 (s, 3H, CH₃ SiMe). **¹³C-NMR (75,5 MHz, CDCl₃):** δ 152.66 (C-2), 150.79 (C6), 149.73 (C=O), 149.46 (C-4), 142.83 (C-8), 123.11 (C-5), 91.28 (C-1'), 89.73 (C-4'), 82.79 (Cq tBu Boc), 74.19 (C-2'), 73.99 (C-3'), 63.02 (C-5'), 28.24 (tBu Boc), 25.94, 25.78 (tBu TBS), 18.21, 17.90 (Cq tBu TBS), 14.24, -4.42, -4.44, -4.48, -5.77 (SiMe). **LCT-MS**: 596 m/z.

Synthese van 5'-*O*-(*N*⁶-tert-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-tert-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylfosforamidiet (2)

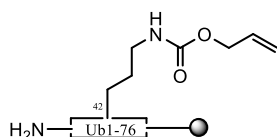


*N*⁶-tert-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-tert-butyldimethylsilyl adenosine (**11**) (0,1036 g, 0,1739 mmol) werd gecoëvaporeerd met toluen (5x 10 mL). Het poeder werd onder argon gezet, opgelost in watervrije DCM (1,74 mL, 0,1M) en actieve mole sieves toegevoegd. Er werd triethylamine (0,075 mL, 0,538 mmol, 3,1 eq.) toegevoegd en gekoeld tot 0°C. Vervolgens werd er 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorofosforamidiet (0,050 mL, 0,224 mmol, 1,29 eq.)

toegevoegd en na 1,5 uur werd de reactie gestopt en verdunt met DCM (10mL). De organische laag werd gewassen met verzadigde NaCl-oplossing (20 mL) en de waterige laag terug geëxtraheerd met DCM (20mL). De verkregen organische lagen werden bij elkaar gevoegd en gedroogd met MgSO₄, gefiltreerd onder vacuüm en geconcentreerd op een rotatiefilmverdamer. Het product werd gezuiverd met kolomchromatografie (eluens: 20 → 30% EtOAc in heptaan +0,5% triethylamine ; TLC-eluens: 2:3, EtOAc : heptaan met CAM-stain). Na indampen bleef er een wit poeder over (0,1085 g, 0,136 mmol, 78,6%). **¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 8.72 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-2), 8.33 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-8), 8.05 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 6-NH), 6.04 (dd, $J = 11.2, 5.3$ Hz, 1H, H-1'), 4.85 – 4.69 (m, 1H, H-2'), 4.33 – 4.18 (m, 2H, H-3' + H-4'), 4.15 – 3.75 (m, 4H, H-1' + OC + OCH₂CH₂CN), 3.77 – 3.51 (m, 3H, H-5' + 2x RNCH(CH₃)₂), 2.75 – 2.61 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 1.55 (d, $J = 1.5$ Hz, 9H, CH₃ tBu Boc), 1.27 – 1.18 (m, 12H, 2x RNCH(CH₃)₂), 0.92 (d, $J = 1.9$ Hz, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.77 (d, $J = 13.0$ Hz, 9H, CH₃ tBu TBS), 0.12 – 0.07 (m, 6H, CH₃ SiMe), -0.07 (d, $J = 17.2$ Hz,

3H, CH₃ SiMe), -0.27 (d, *J* = 34.0 Hz, 3H, CH₃ SiMe). ¹³C-NMR (75,5 MHz, CDCl₃): δ 153.01, 152.93 (C-2), 151.04, 150.77 (C-6), 149.94, 149.93, 149.77, 149.75 (C=O + C-4), 141.25 (C-8), 122.31, 122.16 (C-5), 117.55, 117.51 (Cq CN), 89.12, 88.38 (C-1'), 85.18, 85.06, 84.42, 84.30 (C-4'), 82.31, 82.28 (Cq tBu Boc), 75.63, 75.49 (C-2'), 72.96, 71.99 (C-3'), 63.02, 62.80, 62.20, 62.01 (C-5'), 58.85, 58.80, 58.57, 58.51 (OCH₂CH₂CN), 43.36, 43.26, 43.20, 43.10 (RNCH(CH₃)₂), 28.25 (CH₃ tBu Boc), 25.94, 25.79, 25.77 (CH₃ tBu TBS), 24.90, 24.82, 24.79, 24.73, 24.73 (RNCH(CH₃)₂), 20.57, 20.48, 20.46 (OCH₂CH₂CN), 18.18, 18.16, 17.95 (Cq tBu TBS), -4.26, -4.34, -4.53, -4.58, -4.60, -4.85, -5.05 (CH₃ SiMe). ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 148.55, 148.50.

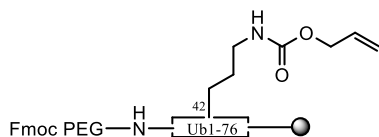
Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76 met vrije ornithine op positie 42 (16_α).



12_α

(startmateriaal op resin gekoppelde gemodificeerde ubiquitine)

Spacer koppeling

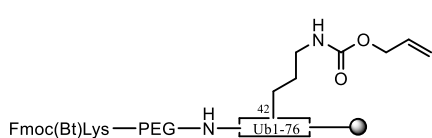


13_α

Er werd 20 μmol van molecuul **12_α** gewassen met DMF (2mL). De resin werd gefiltreerd onder vacuüm en er werd DMF toegevoegd (2mL). Er werd achtereenvolgens Fmoc-PEG2 spacer (39,16 mg, 101,7 μmol, 5,1 eq.), HOBt (14,43 mg, 106,8 μmol, 5,3 eq.) en HBTU (37,83 mg, 99,8 μmol, 5 eq.) toegevoegd aan de oplossing.

De oplossing werd een minuutje geschud, er werd DIPEA (26,1 μL, 149,8 μmol, 15 eq.) toegevoegd en schuddend overnacht laten staan. Er werd een 5 mL test cleavage mix gemaakt van TFA (4,525 mL), H₂O (0,250mL), fenol (0,125 mL) en TIPS (0,100 mL). Het reactiemengsel werd gewassen met DMF (3x5 mL) en er werd een test cleavage uitgevoerd (fractie van resin in 200 μL cleavage mix voor 1,5 uur shaken). LCT-MS gaf volledige conversie weer (m/z: 8956).

Ontscherming Fmoc en koppeling Lysine biotine

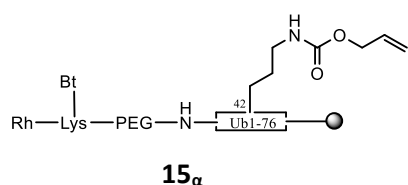


14_α

Molecuul **13_α** werd gezwelt in DMF (2 mL), werd vacuüm gefiltreerd en de resin werd geschud in 20% piperidine/DMF-oplossing (3x5 mL, 2 min). De resin werd meermaals gewassen met NMP en vervolgens met DCM. De Fmoc-Lysine-Biotine (59,99 mg, 100,9 μmol, 5 eq.) werd opgelost in NMP (0,5 mL, 60°C) en de resin gesuspenderd in NMP (1,5 mL). Aan de resin

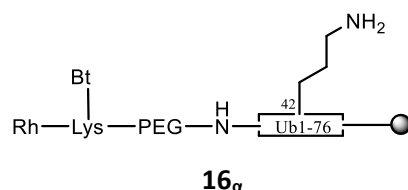
werd achtereenvolgens de Fmoc-Lysine-Biotine, HOBt (13,56 mg, 100,3 μmol, 5 eq.), HBTU (38,18 mg, 100,7 μmol, 5 eq.) en DIPEA (26,0 μL, 138,5 μmol, 15 eq.) toegevoegd en overnacht geschud. De resin werd grondig gewassen met NMP (5x5 mL) en droog gemaakt met DCM (3x5 mL). Er werd een test cleavage uitgevoerd en succesvolle koppeling werd geconstateerd (m/z: 9310).

Ontscherming Fmoc-Lys-Bt en rhodamine koppeling



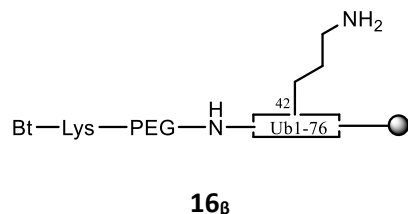
Molecuul **14_α** werd gezweld in DMF (2 mL), werd vacuüm gefiltreerd en de resin werd geschud in 20% piperidine/DMF-oplossing (3x5 mL, 2 min). De resin werd meermaals gewassen met NMP en vervolgens met DCM. De resin werd heropgelost in DMF (2 mL) en er werd achtereenvolgens di-Boc-rhodamine (57,46 mg, 100,1 μmol, 5 eq.), HOBt (14,58 mg, 107,9 μmol, 5,4 eq.), HBTU (37,74 mg, 99,5 μmol, 5 eq.) en DIPEA (26,0 μL, 138,5 μmol, 15 eq.) toegevoegd en overnacht geschud. Het reactiemengsel werd gewassen met NMP, DMF en gedroogd met DCM. Er werd een test cleavage uitgevoerd en grotendeels werd de massa gevonden (m/z: 9445).

Alloc ontscherming



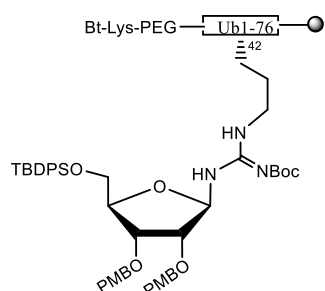
Molecuul **15_α** werd gezweld in DCM (2 mL), werd vacuüm gefiltreerd en gesuspenderd in DCM (2 mL). Er werd achtereenvolgens Pd(PPh₃)₄ (5 mg, 4,33 μmol, 0,22 eq.) en fenylsilaan (10 μL, 104 μmol, 5,2 eq.) toegevoegd en 15 minuten geschud. De oplossing werd op vacuüm gefiltreerd en de vorige stap nog tweemaal herhaald. De resin werd gewassen met DCM en er werd een test cleavage genomen. De massa van molecuul **16_α** werd gemeten (m/z: 9361).

Synthese van β-ADPr(42)-Ub76-PEG-Lys(Bt) (19_β)



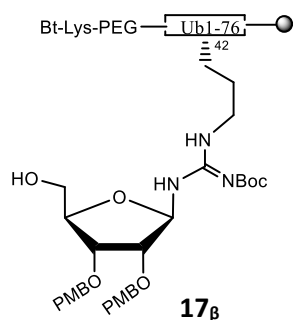
(Op resin gekoppelde gemodificeerde ubiquitine)

1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (1_β) op gemodificeerd ubiquitine (16_β) koppeling



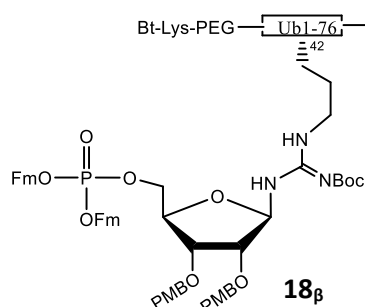
Er werd 2 μmol van de resin (**16_β**) gezweld in DMF (266 μL). 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)difenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (**1_β**) (21,52 mg, 26,4 μmol, 13,2 eq.) werd opgelost in DMF (266 μL) en aan de suspensie toegevoegd. Er werd TEA (40 μL, 28,7 μmol, 14,3 eq.) en in een donkere omgeving AgNO₃ (6,22 mg, 36,6 μmol, 18,3 eq.) toegevoegd. Vervolgens werd de spuit ingepakt met aluminiumfolie en overnacht geschud. Het reactiemengsel werd gewassen met DMF. Aan de resin werd DCM toegevoegd en de stijgende resin werd geïsoleerd. Er werd een test cleavage uitgevoerd en de gewenste massa's werden gevonden (m/z: 9196: -TBDPS, -2x PMB, -Boc ; m/z: 9434: -TBDPS, -Boc).

Ontscherming TBDPS-groep



De resin werd gezweld in THF (2 mL), onder vacuüm gefiltreerd en gesuspenseerd in 1M TBAF/THF-oplossing (1 mL, 2 mM). De resin werd geschud (30 min.). De vloeistof werd onder vacuüm af gefiltreerd en gewassen met DMF (3x 4 mL) en DCM (3x 4 mL). De voorgaande stappen werden herhaald. De resin werd onder vacuüm gefiltreerd en gewassen met THF (3x 5 mL) en DCM (3x 5 mL).

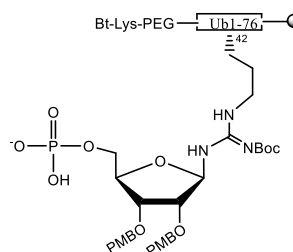
Fosforylering vrije primaire alcohol



De resin (**17_β**) werd gespoeld met droge MeCN (5x 5 mL), vacuüm gefiltreerd en de resin werd belucht met argon. Er werd DCI (5,77 mg, 48,9 μmol, 24,4 eq.) opgelost in droge MeCN (192 μL, 0,25M) en beschermde fosforamidiet (12,63 mg, 24,2 μmol, 12,1 eq.) opgelost in droge MeCN (185 μL, 0,13M). De oplossingen werden snel toegevoegd aan de resin en geschud (30 min.). De vloeistof werd af gefiltreerd en gewassen met MeCN. Er werd 0,5M tBuOOH/MeCN-oplossing (1,5 mL) toegevoegd en geschud (30 min.). De vloeistof werd onder vacuüm gefiltreerd en gewassen

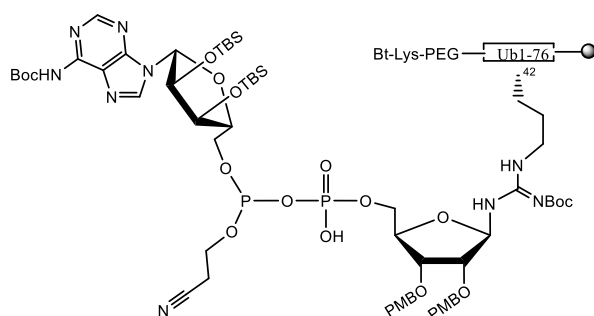
met MeCN (3x 5 mL). Er werd een test cleavage uitgevoerd en de gewenste massa's werden gevonden (m/z: 9632: -2x PMB, -TFA adduct ; m/z: 9728: -2x PMB + TFA adduct).

Fm-groep ontscherming



De resin (**18_β**) werd gezweld in DMF (2 mL), vacuüm gefiltreerd en gesuspenseerd in DBU/DMF-oplossing (10%, 1 mL). Er werd 15 minuten geschud en de oplossing werd afgefiltreerd waarna gewassen met DMF (3x 5 mL). De voorgaande stappen werden herhaald en de resin werd gewassen met DMF (3x 5 mL) en DCM (3x 5 mL).

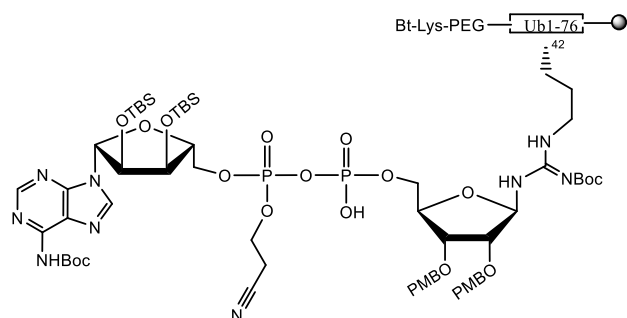
Fosforamidiet koppeling



De resin werd gespoeld met droge MeCN (5x 5 mL), vacuüm gefiltreerd en de resin werd belucht met argon. DCI (10,31 mg, 87,3 μmol, 43,6 eq.) opgelost in droge MeCN (352 μL, 0,25M) en 5'-O-(*N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl-*N*-*N*-diisopropyl fosforamidiet (**2**) (33,49 mg, 44 μmol, 22 eq.) opgelost in droge MeCN (338,5 μL, 0,13M) werd toegevoegd aan de resin. De reactie werd geschud en na 30 min werd de oplossing

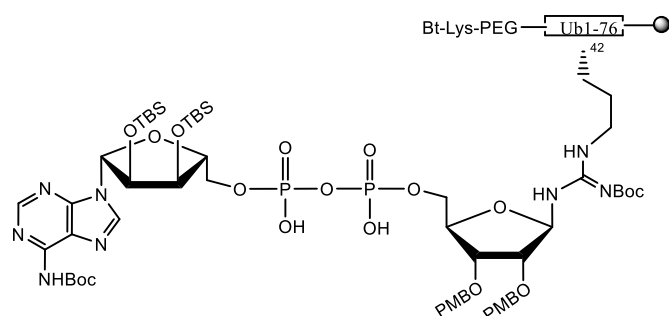
vacuüm gefiltreerd en de resin gewassen met MeCN (4x 5 mL).

Oxidatie fosfor



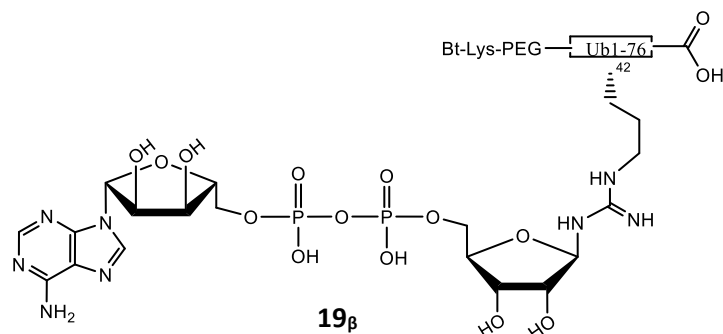
De resin werd gezweld in MeCN, vacuüm gefiltreerd en er werd 1,5 mL tBuOOH/MeCN-oplossing (0.5M) toegevoegd. De resin werd geschud (30 min.). Vervolgens werd de vloeistof onder vacuüm gefiltreerd en de resin gewassen met MeCN (3x 5 mL).

Cyanoethyl ontscherming



De resin werd gezweld in DMF (2 mL), vacuüm gefiltreerd en opgelost in DBU/DMF-oplossing (10%, 1 mL). Er werd 15 minuten geschud en de oplossing werd af gefiltreerd en de resin gewassen met DMF (3x 5 mL). De voorgaande stappen werden herhaald en de resin werd gewassen met DMF (3x 5 mL) en DCM (3x 5 mL).

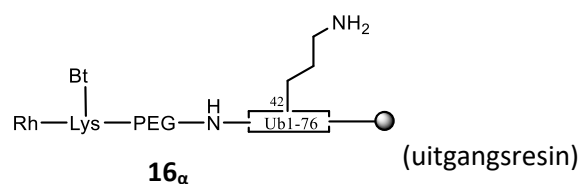
Totale ontscherming β -Ub^{ADPr}



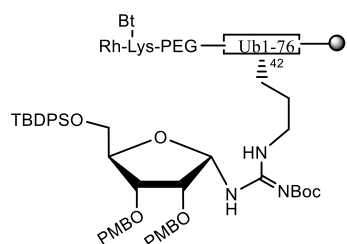
De resin werd gezweld in THF (2 mL), onder vacuüm gefiltreerd en opgelost in 1M TBAF/THF-oplossing (1 mL). De resin werd geschud (30 min.) De vloeistof werd onder vacuüm af gefiltreerd en de resin gewassen met DMF (3x 4 mL) en DCM (3x 4 mL). De voorgaande stappen werden herhaald. De resin werd onder vacuüm gefiltreerd en gewassen met

THF (3x 5 mL) en DCM (3x 5 mL). Er werd een test cleavage uitgevoerd en de gewilde massa was aanwezig (m/z: 9606) (**19_β**).

Synthese van α -ADPr-Ub76-Lys(Bt)-rhodamine (**19_α**)

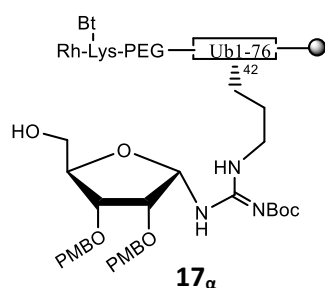


1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (**1 α**) op gemodificeerd ubiquitine (**16 α**) koppeling:



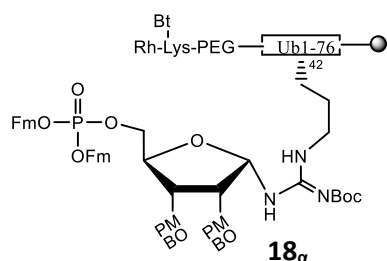
Er werd resin (**16 α**) (42,04 mg, 5,0 μ mol) gezweld in DMF (750 μ L), onder vacuüm gefiltreerd en 1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(5-O-((tert-butyl)diphenylsilyl)-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (**1 α**) (62,28 mg, 76,4 μ mol, 15,3 eq.) werd opgelost in DMF (750 μ L, 0,1M) en aan de resin toegevoegd. Er werd TEA (100 μ L, 71,7 μ mol, 14,3 eq.) en in het donker AgNO₃ (13,17 mg, 77,5 μ mol, 15,5 eq.) toegevoegd en de spuit ingepakt in aluminiumfolie. De spuit werd overnacht geschud, de resin onder vacuüm gefiltreerd en gewassen met DMF (3x 5 mL). Aan de resin werd DCM toegevoegd en de stijgende resin werd geïsoleerd. Er werd een test cleavage uitgevoerd en de gewenste massa's werden gevonden (m/z: 9535: onbeschermd suiker ; m/z: 9631: + TFA adduct ; 9773: +TBDPS ; m/z: 9869: +TBDPS + TFA adduct).

Ontscherming TBDPS-groep



De resin werd gezweld in THF (2 mL), onder vacuüm gefiltreerd en opgelost in 1M TBAF/THF-oplossing (1,5 mL) in de resin werd geschud (30 min.). De vloeistof werd onder vacuüm af gefiltreerd en gewassen met THF (3x 4 mL) en DCM (3x 4 mL) tot de resin niet meer paars kleurde. De voorgaande stappen werden herhaald. De resin werd onder vacuüm gefiltreerd en gewassen met THF (3x 5 mL) en DCM (3x 5 mL).

Fosforylering vrije primaire alcohol



De resin (**17 α**) werd gespoeld met droge MeCN (5x 5 mL), vacuüm gefiltreerd en de resin werd belucht met argon. Er werd DCI (18,67 mg, 158,1 μ mol, 31 eq.) opgelost in droge MeCN (600 μ L, 0,26M) en beschermde fosforamidiet (39,58 mg, 49 μ mol, 9,9 eq.) opgelost in droge MeCN (575 μ L, 0,09M). De oplossingen werden snel toegevoegd aan de resin en geschud (30 min.). De vloeistof werd af gefiltreerd en de resin gewassen met MeCN. Er werd 0,5M tBuOOH/MeCN-oplossing (1,5 mL) toegevoegd en geschud (30 min.). De vloeistof werd onder vacuüm gefiltreerd en de resin gewassen met MeCN (3x 5 mL). Er werd een test cleavage uitgevoerd en de gewenste massa's werden gevonden (m/z: 9632: -2x PMB, -TFA adduct ; m/z: 9728: -2x PMB + TFA adduct).

Literatuurlijst

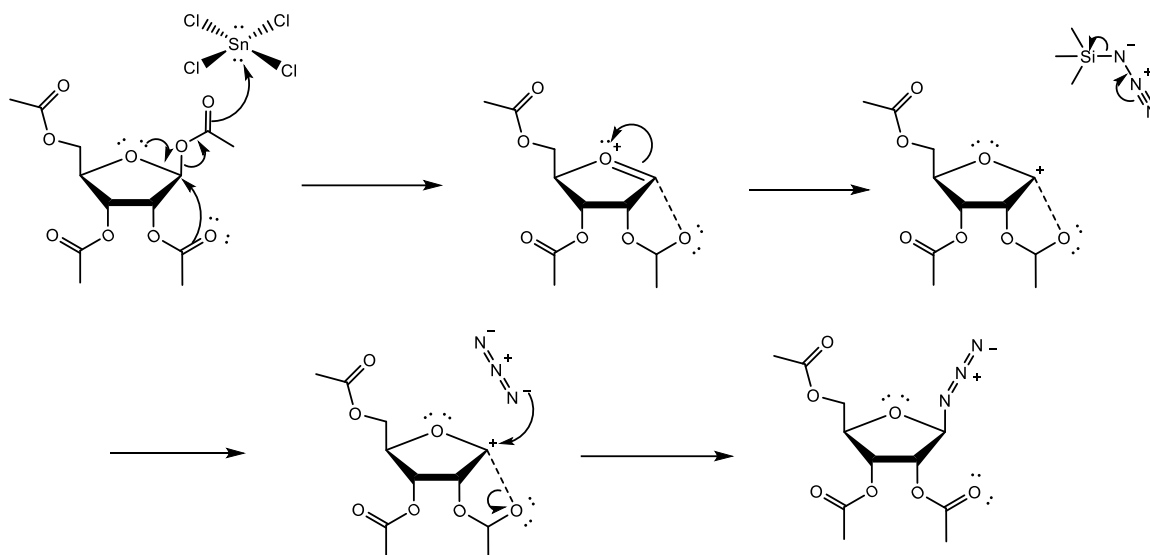
- [1] <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/legionellose> (geraadpleegd 30-07-2022)
- [2] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis> (geraadpleegd 30-07-2022)
- [3] Hayley J. Newton, Desmond K. Y. Ang, Ian R. van Driel, and Elizabeth L. Hartland; Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*; Clin Microbiol Rev. Apr., 2010, 23(2), 274-98
- [4] Ines Tomaskovic, Alexis Gonzalez, Ivan Dikic; Ubiquitin and Legionella: From bench to bedside; Seminars in Cell & Developmental Biology, 2022
- [5] Yu-Shan Chen and Xiao-Bo Qiu; Ubiquitin at the crossroad of cell death and survival; Chin J Cancer, 2013; Vol. 32 Issue 12
- [6] Donghyuk Shin, Rukmini Mukherjee, Yaobin Liu, Zhao-Qing Luo, Sagar Bhogaraju, Ivan Dikic; Regulation of Phosphoribosyl-Linked Serine Ubiquitination by Deubiquitinases DupA and DupB; Shin et al., 2020, Molecular Cell 77, 164–179
- [7] Sagar Bhogaraju, Sissy Kalayil, Yaobin Liu, Florian Bonn, Thomas Colby, Ivan Matic, Ivan Dikic; Phosphoribosylation of Ubiquitin Promotes Serine Ubiquitination and Impairs Conventional Ubiquitination; Bhogaraju et al., 2016, Cell 167, 1636–1649
- [8] Sissy Kalayil, Sagar Bhogaraju, Florian Bonn, Donghyuk Shin, Yaobin Liu, Ninghai Gan, Jérôme Basquin, Paolo Grumati, Zhao-Qing Luo, Ivan Dikic; Insights into catalysis and function of phosphoribosyl-linked serine ubiquitination; Nature, 2018, 557, 734–738
- [9] Qiang Liu, Dr. Hans A. V. Kistemaker, Dr. Sagar Bhogaraju, Prof. Dr. Ivan Dikic, Prof. Dr. Herman S. Overkleeft, Prof. Dr. Gijsbert A. van der Marel, Prof. Dr. Huib Ovaa, Dr. Gerbrand J. van der Heden van Noort, Dr. Dmitri V. Filippov; A General Approach Towards Triazole-Linked Adenosine Diphosphate Ribosylated Peptides and Proteins; Angew.Chem., 2018, 130, 1675–1678
- [10] <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/pull-down-assays.html> (geraadpleegd 09-08-2022)
- [11] Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz, James R. Vyvyan; Introduction To Spectroscopy; 5^e editie; Cengage Learning; 2015, Stamford, Verenigde Staten; 539-540.
- [12] <https://cnx.org/contents/uieDnVBC@25.2:MGxFIYDn@2/P-31-NMR-Spectroscopy>, (geraadpleegd op 22-08-2022)
- [13] John E. McMurry; Organic Chemistry (international edition); 8^e editie; Brooks/Cole, Cengage Learning; 2011, 1018
- [14] Hugo E. Gottlieb, Vadim Kotlyar, and Abraham Nudelman; NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities; J. Org. Chem.; 1997; 62 (21); 7512-7515

[15] Jim Voorneveld, Johannes Gregor Matthias Rack, Luke van Gijlswijk, Nico J. Meeuwenoord, QiangLiu, Herman S. Overkleeft, Gijsbert A. van der Marel, Ivan Ahel and Dmitri V. Filippov; Molecular Tools for the Study of ADP-Ribosylation: A Unified and Versatile Method to Synthesise Native Mono-ADP-Ribosylated Peptides; Chem.Eur. J., 2021, 27, 10621– 10627

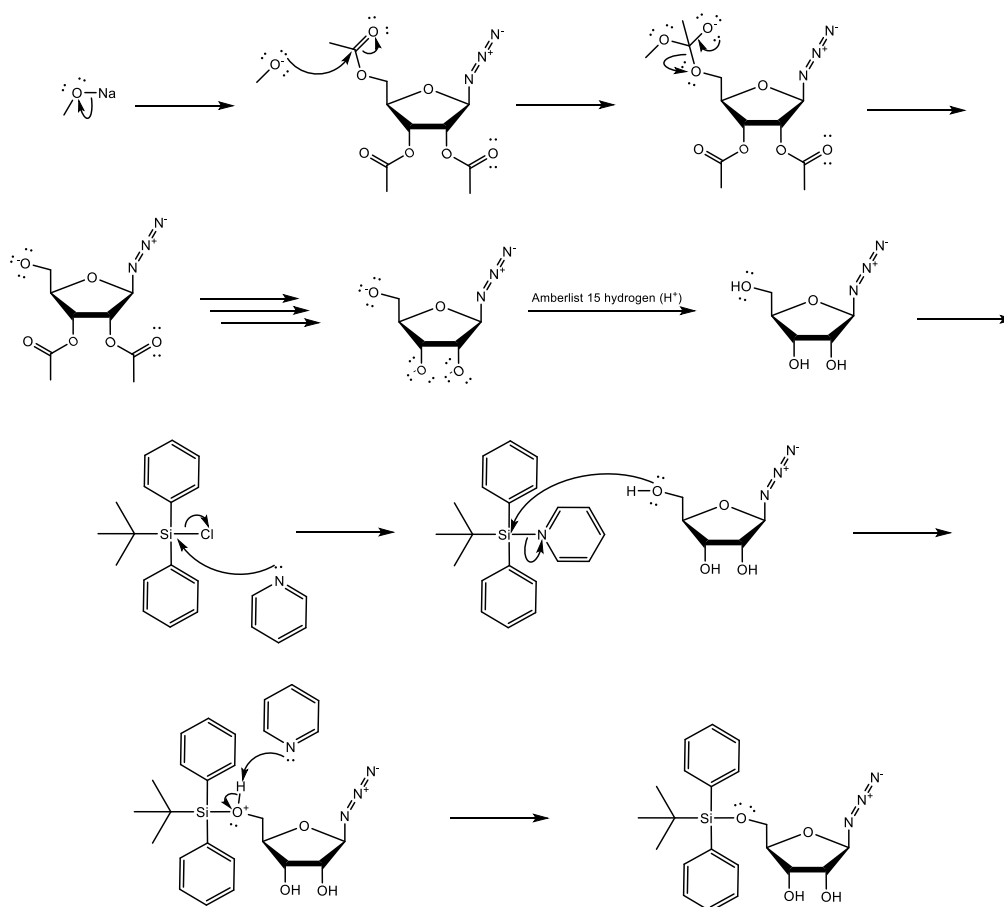
Bijlagen

[A] Mechanismen

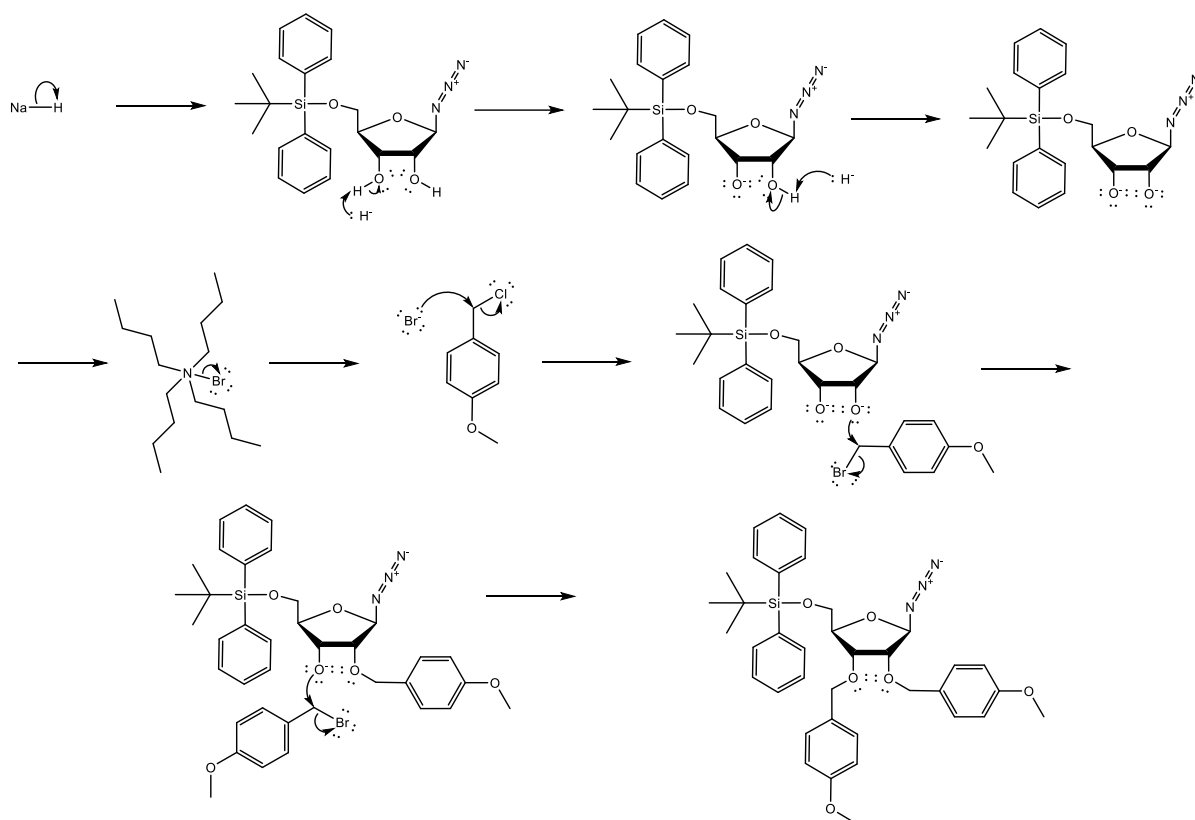
[1] 2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl azide (2)



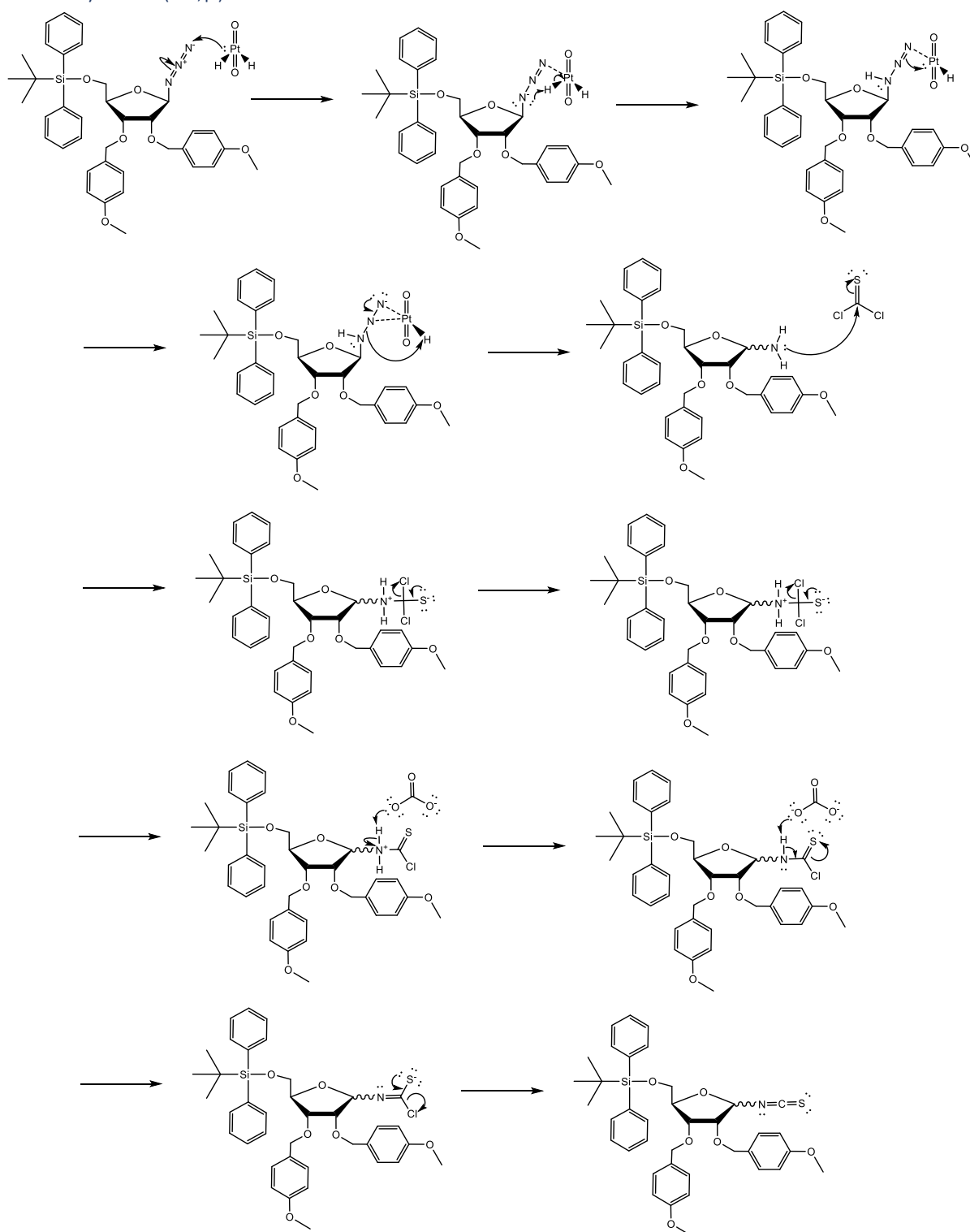
[2] 5-*O*-((*tert*-butyl)-diphenylsilyl)- β -D-ribofuranosyl azide (3)



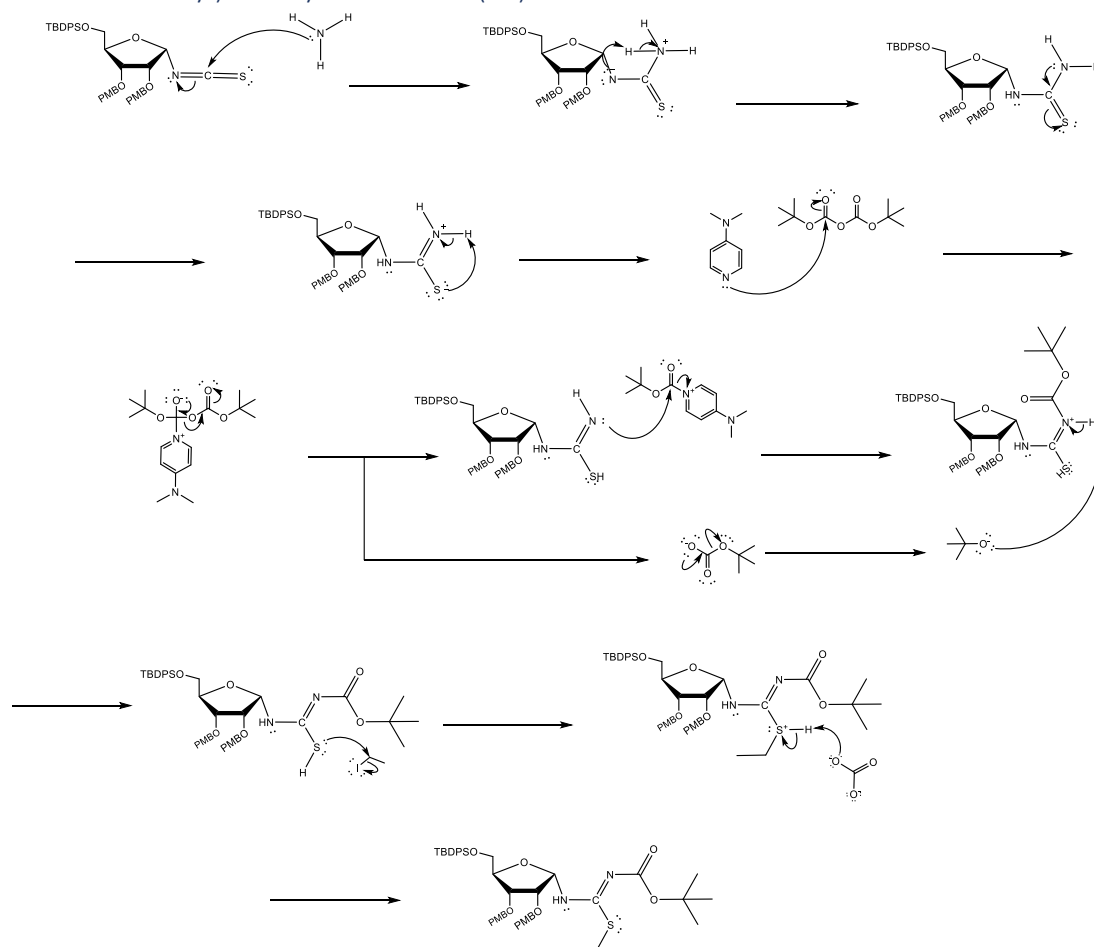
[3] 5-*O*-((*tert*-butyl)-diphenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-ribofuranosyl azide (4)



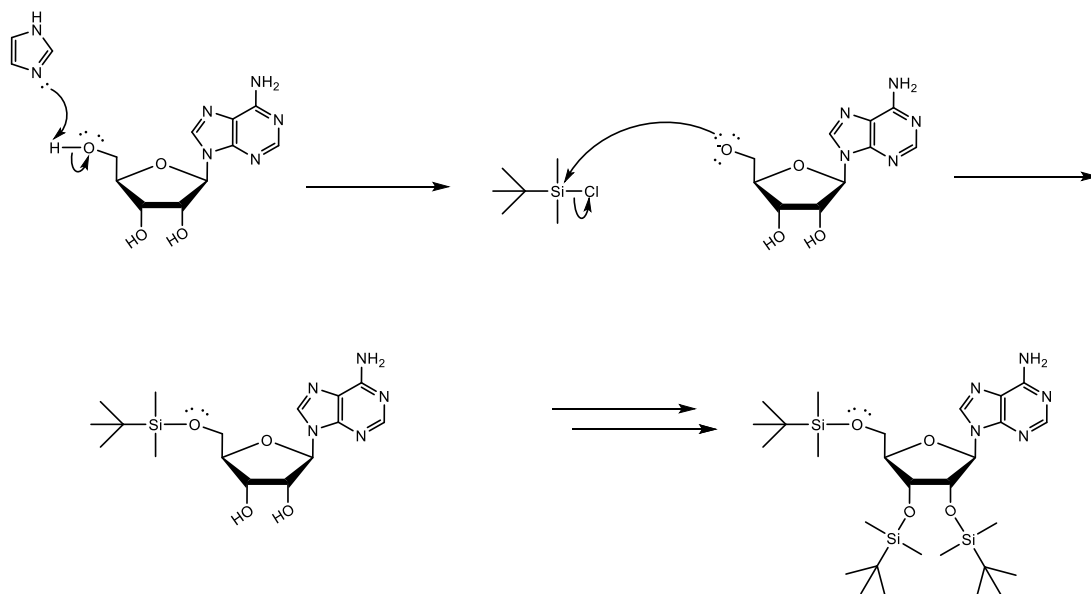
[4] 5-*O*-((*tert*-butyl)-difenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α,β -D-ribofuranosyl isothiocyanate (5 α,β)



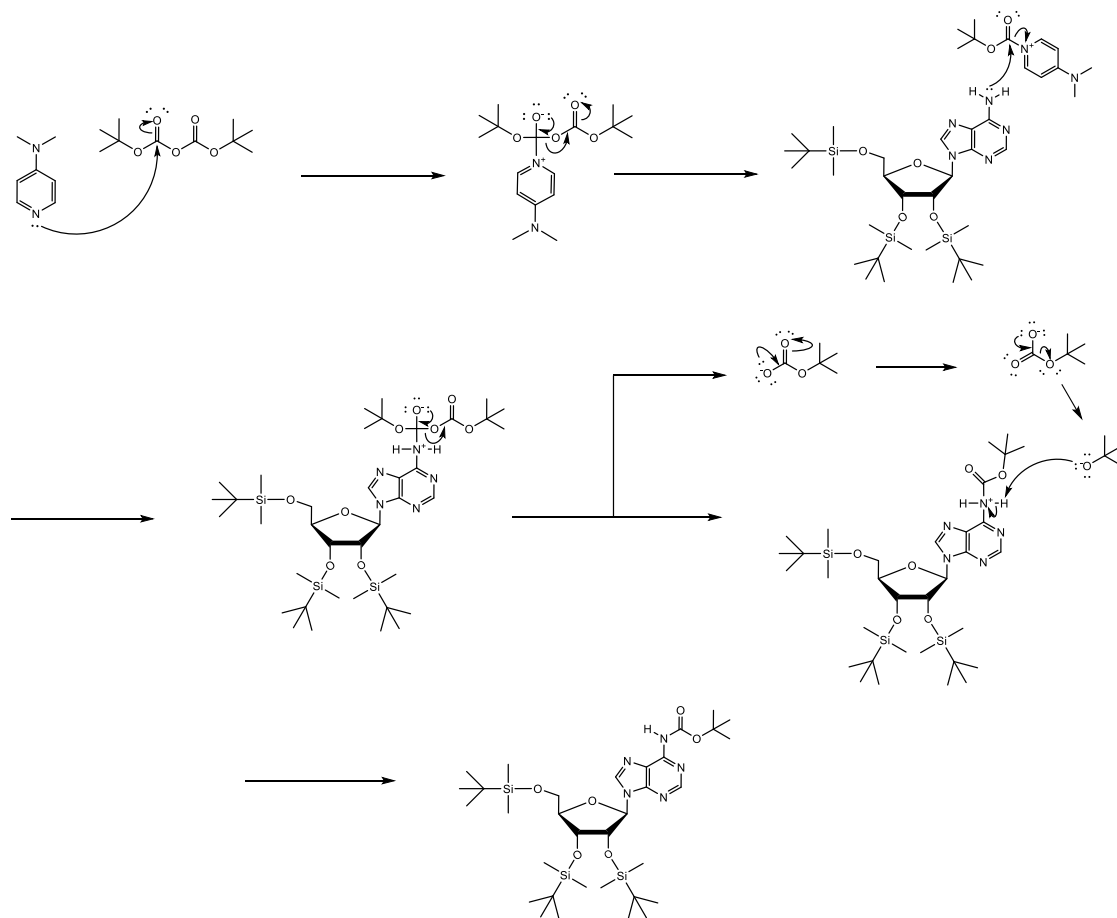
[5] 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-(5-*O*-((*tert*-butyl)diphenylsilyl)-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α -D-ribofuranos-1-yl)-2-ethylisothiourea (6a)



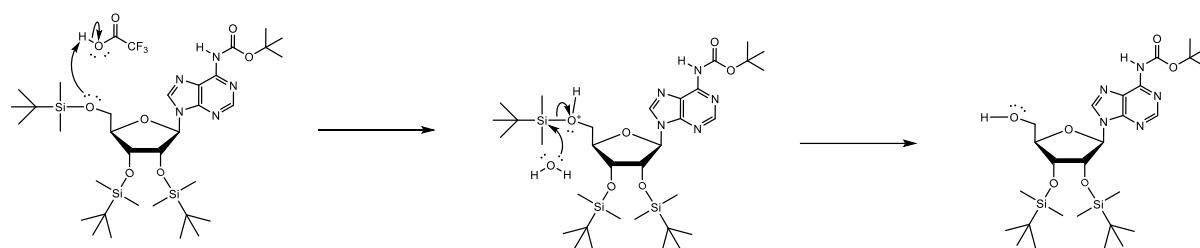
[6] 2',3',5',-tri-*O*-butyl-di-methylsilyl adenosine (8)



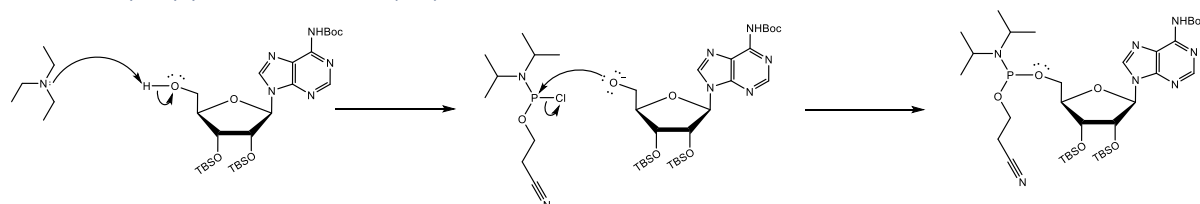
[7] *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',5',tri-*O-tert*-butyldimethylsilyl adenosine (9)



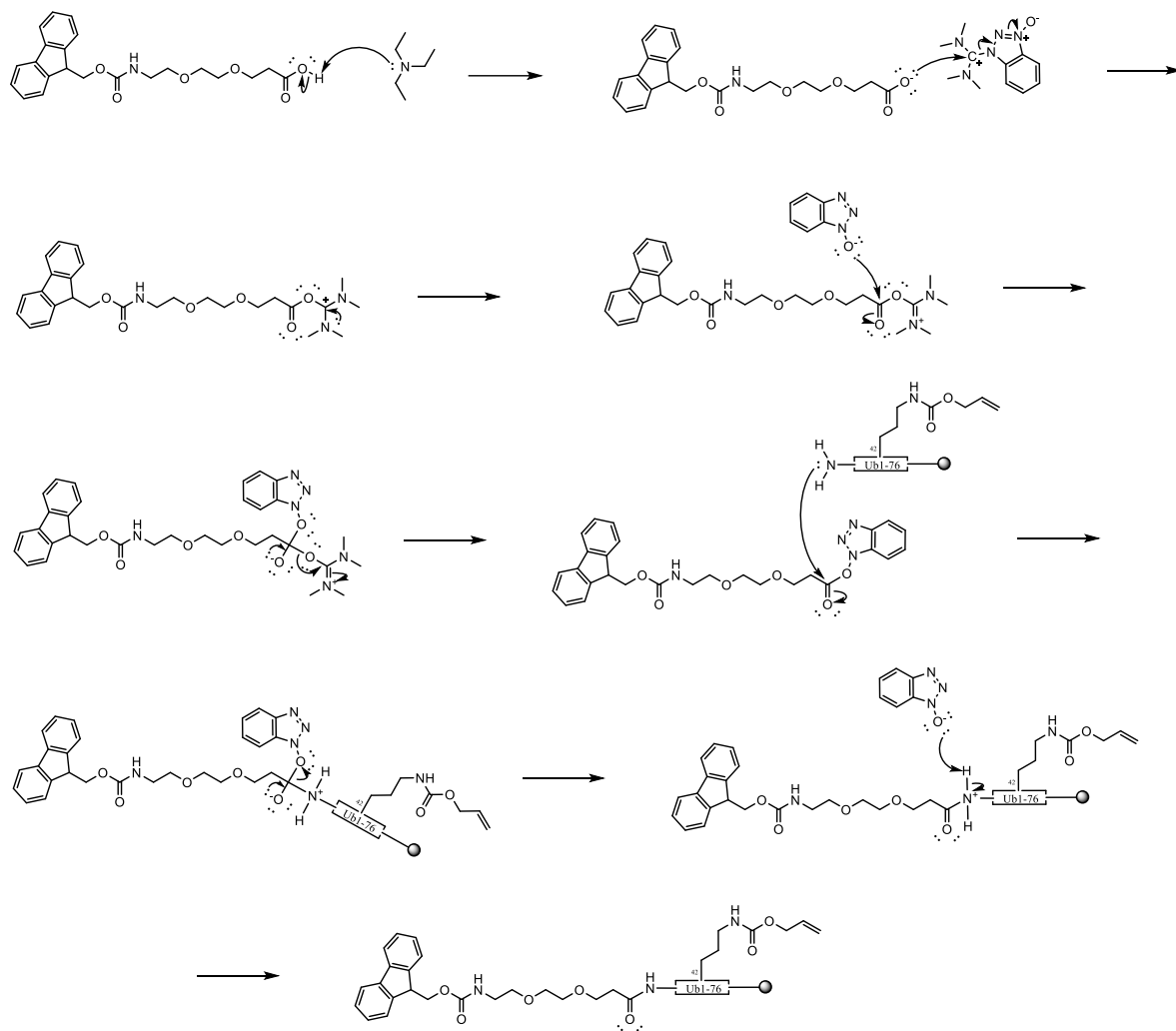
[8] *N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O-tert*-butyldimethylsilyl adenosine (10)



[9] 5'-*O*-(*N*⁶-*tert*-butyloxycarbonyl-2',3',di-*O-tert*-butyldimethylsilyl adenosine)-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylfosforamidet (11)

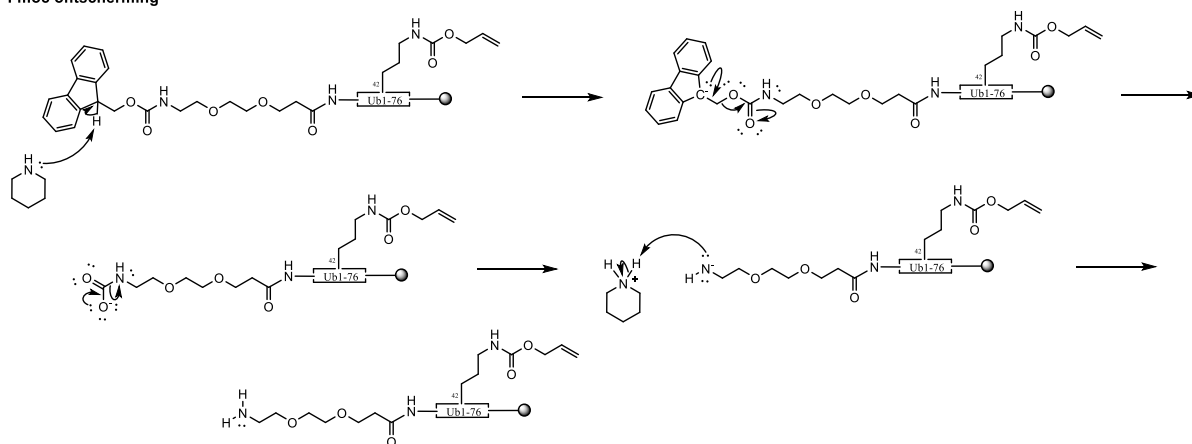


[10] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: PEG-spacer koppeling (17)

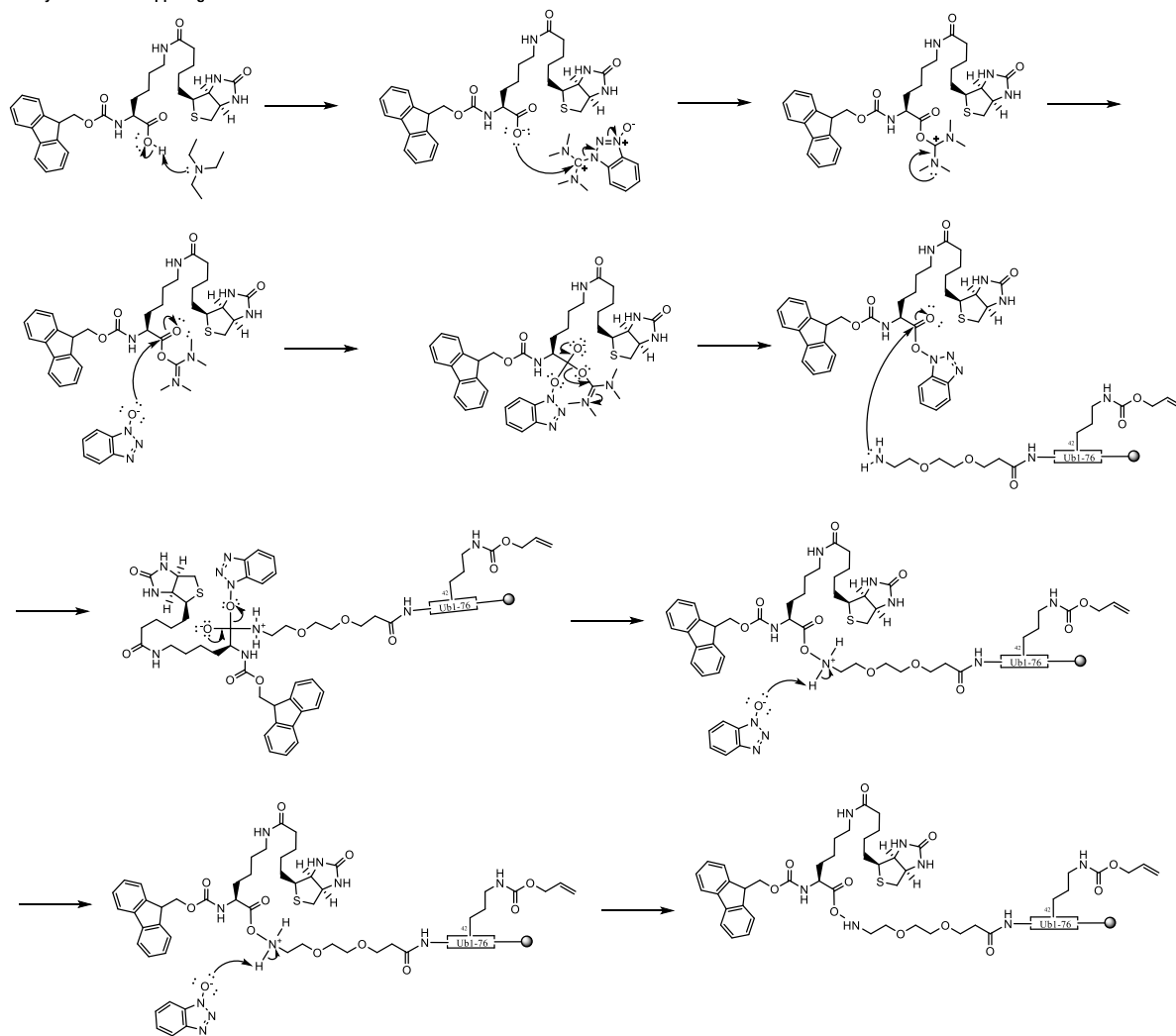


[11] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: Ontscherming Fmoc en koppeling Lysine biotine (18)

Fmoc ontscherming

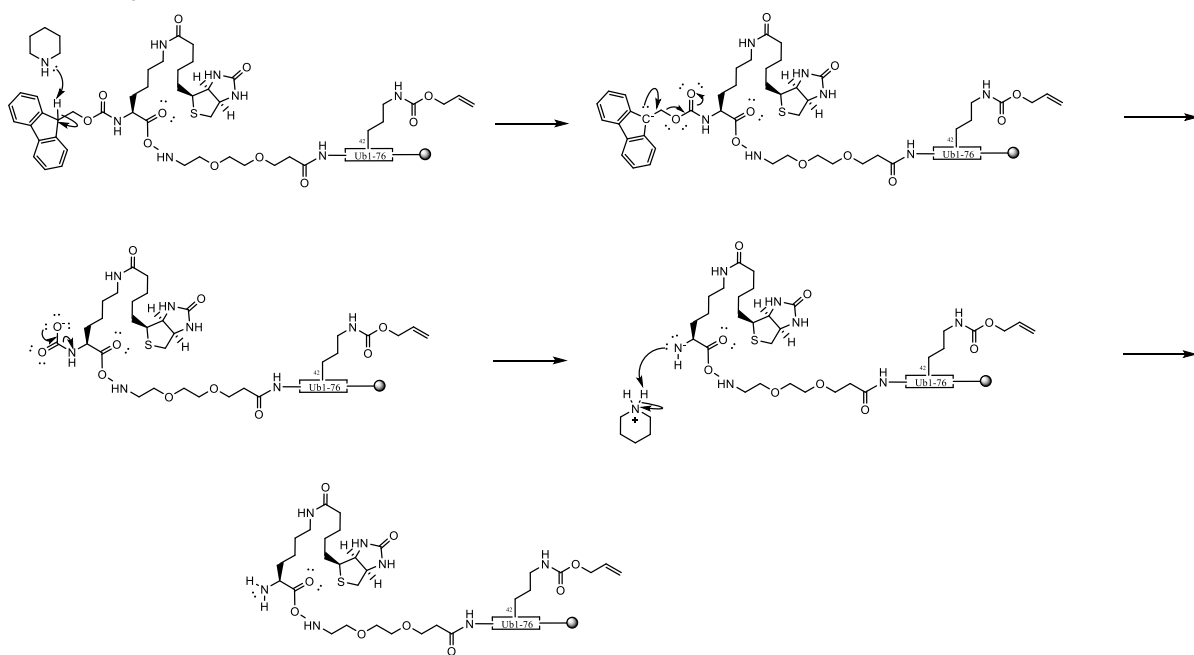


Fmoc-Lysine-biotine koppeling

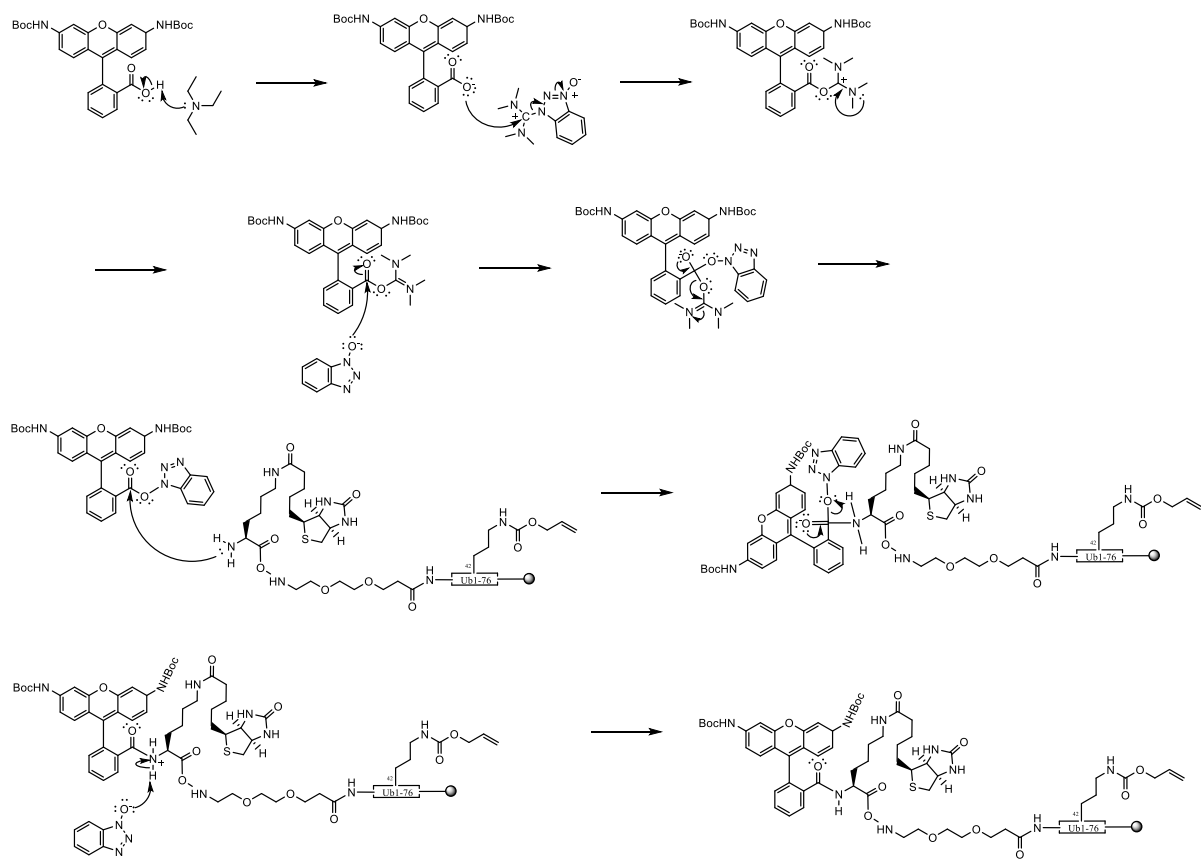


[12] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: Ontscherming Fmoc en koppeling di-boc rhodamine (19)

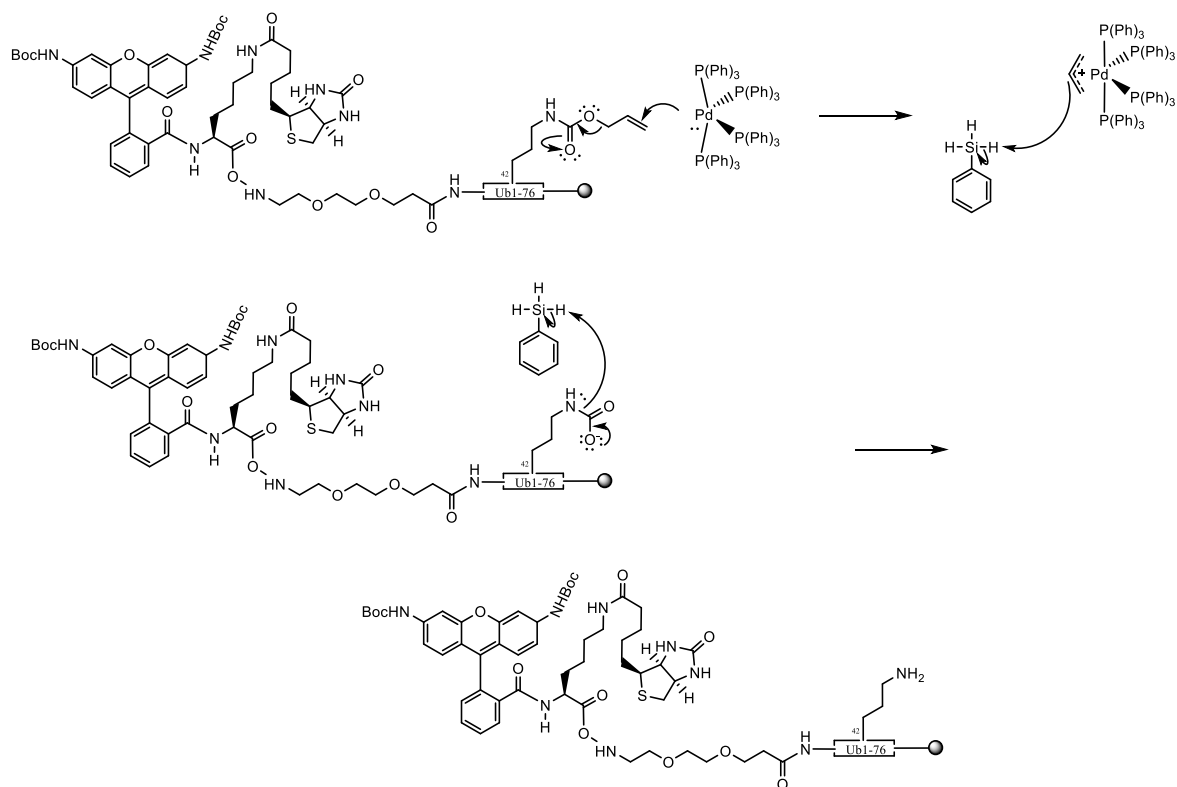
Fmoc ontscherming



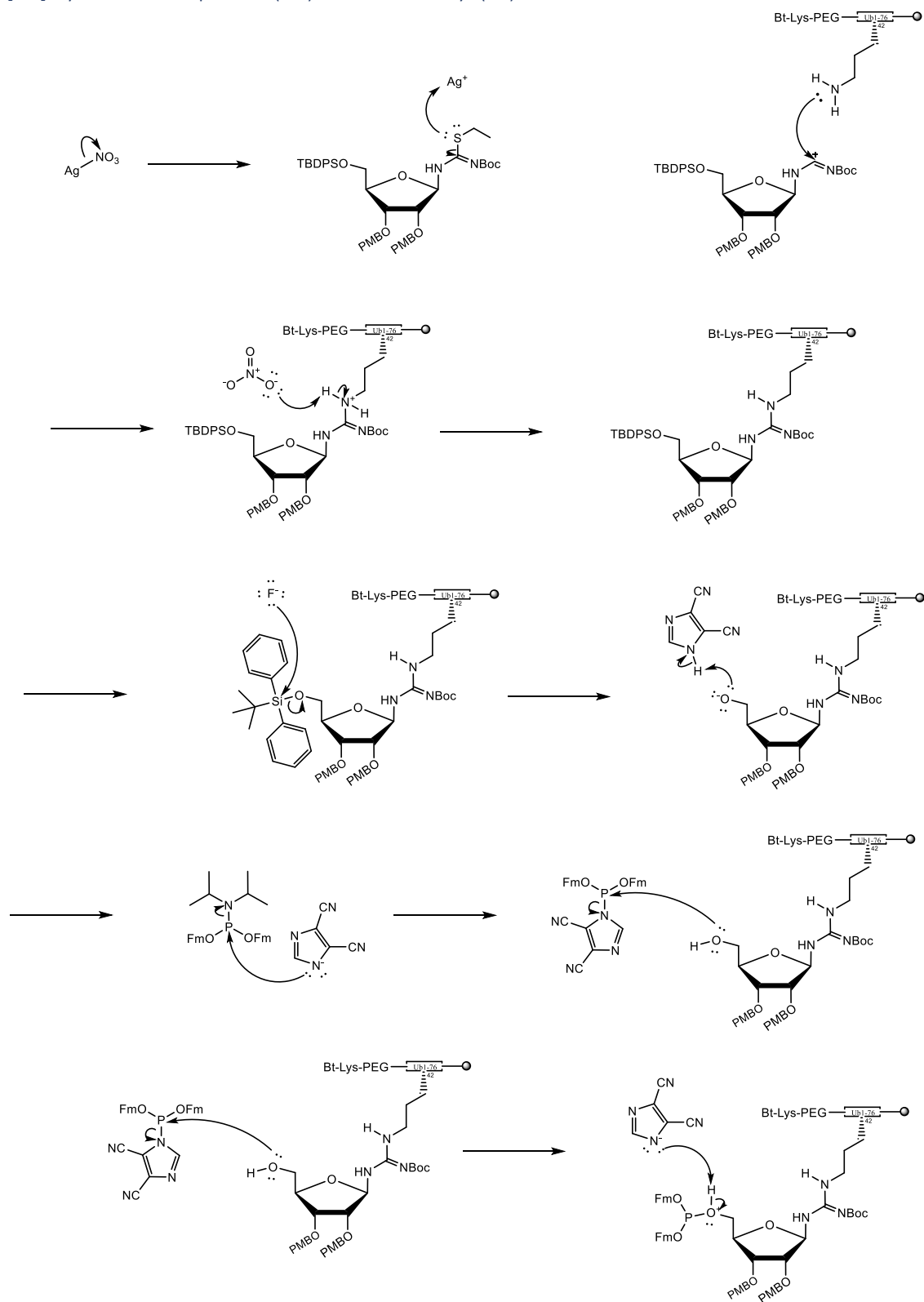
Fmoc-Lysine-biotine koppeling

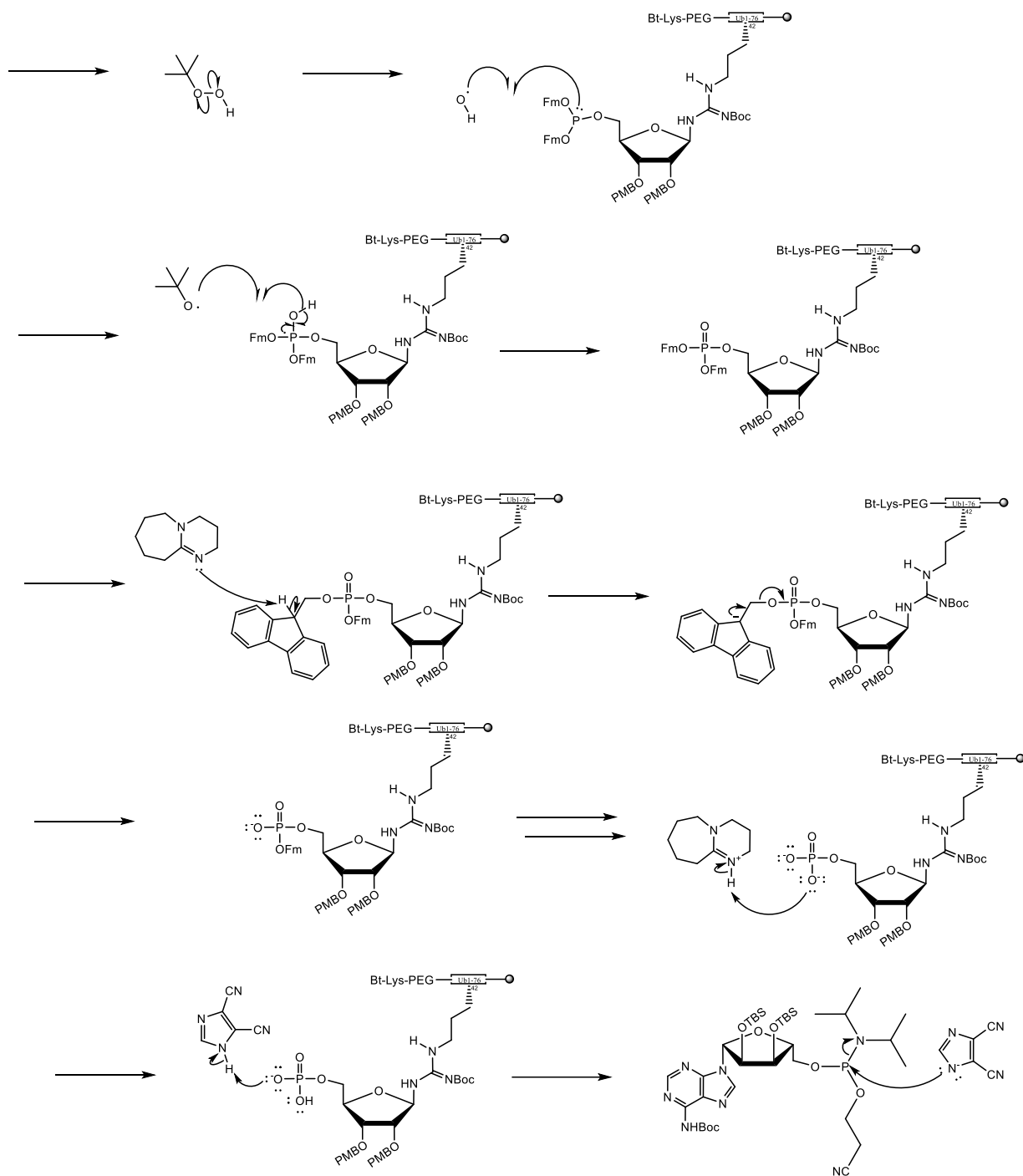


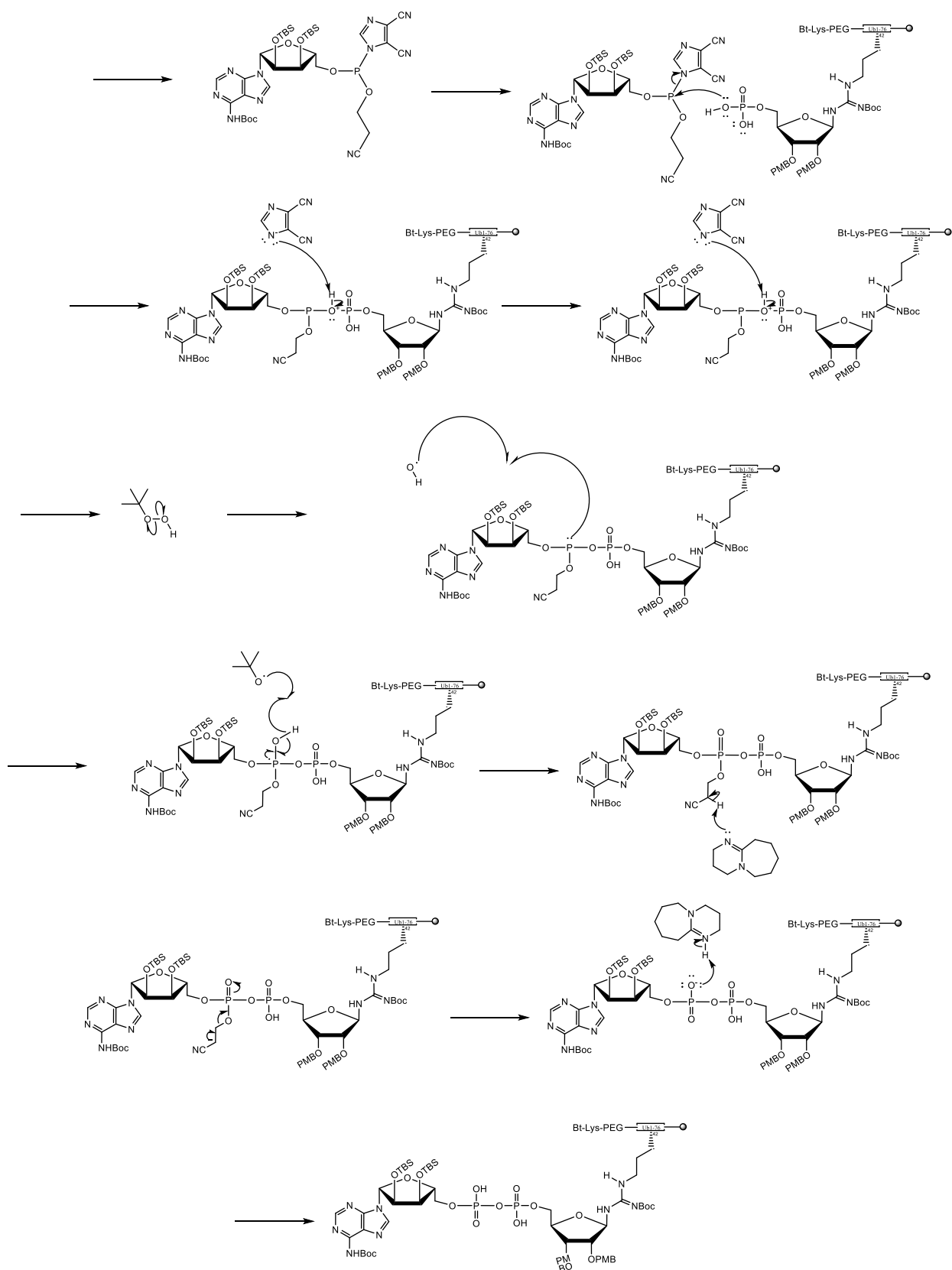
[13] Resin synthese van Biotine-Rhodamine-Ub-76: Ontscherming alloc-bescherm groep



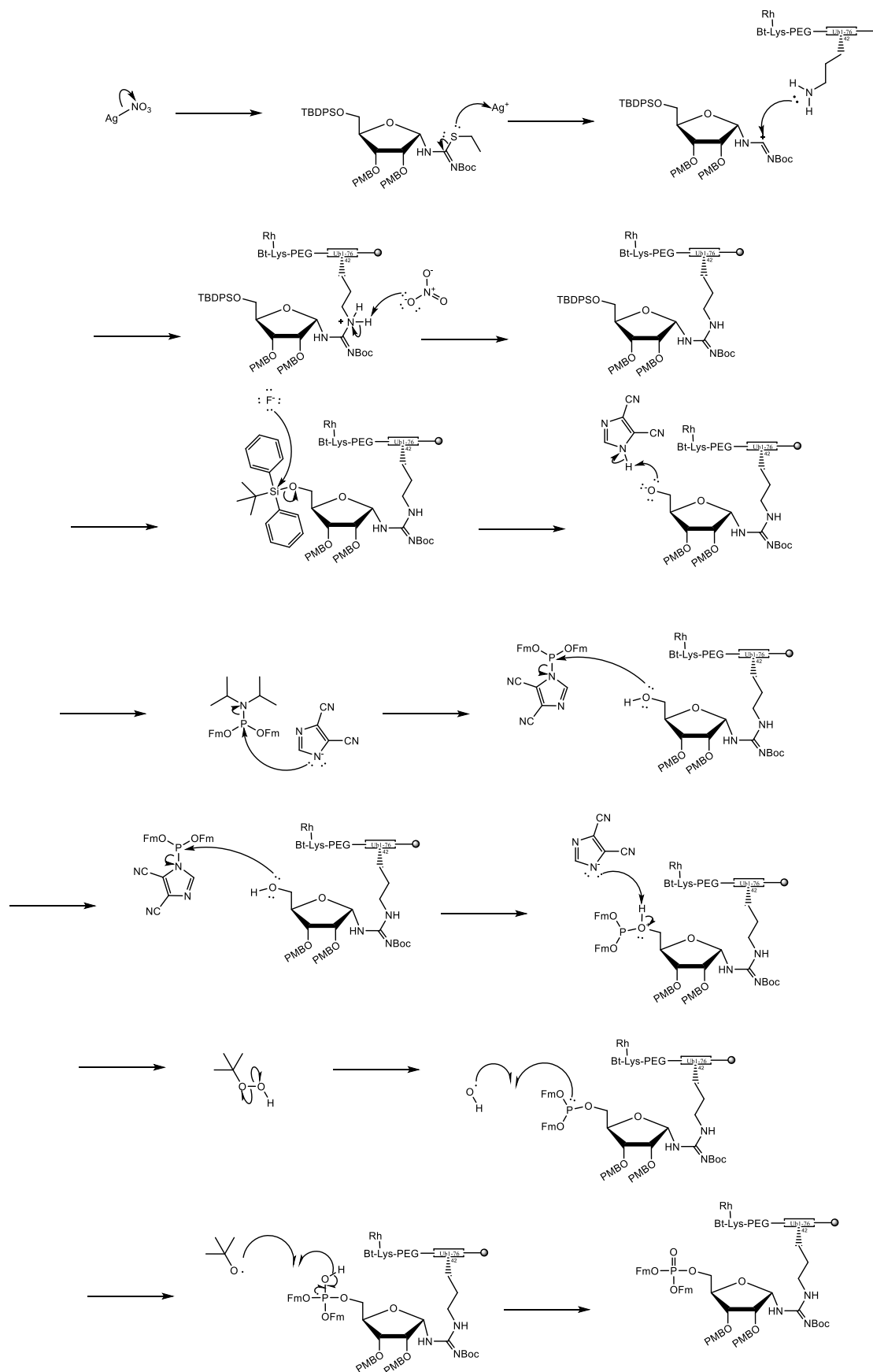
[14] Synthese van β -ADPr(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)





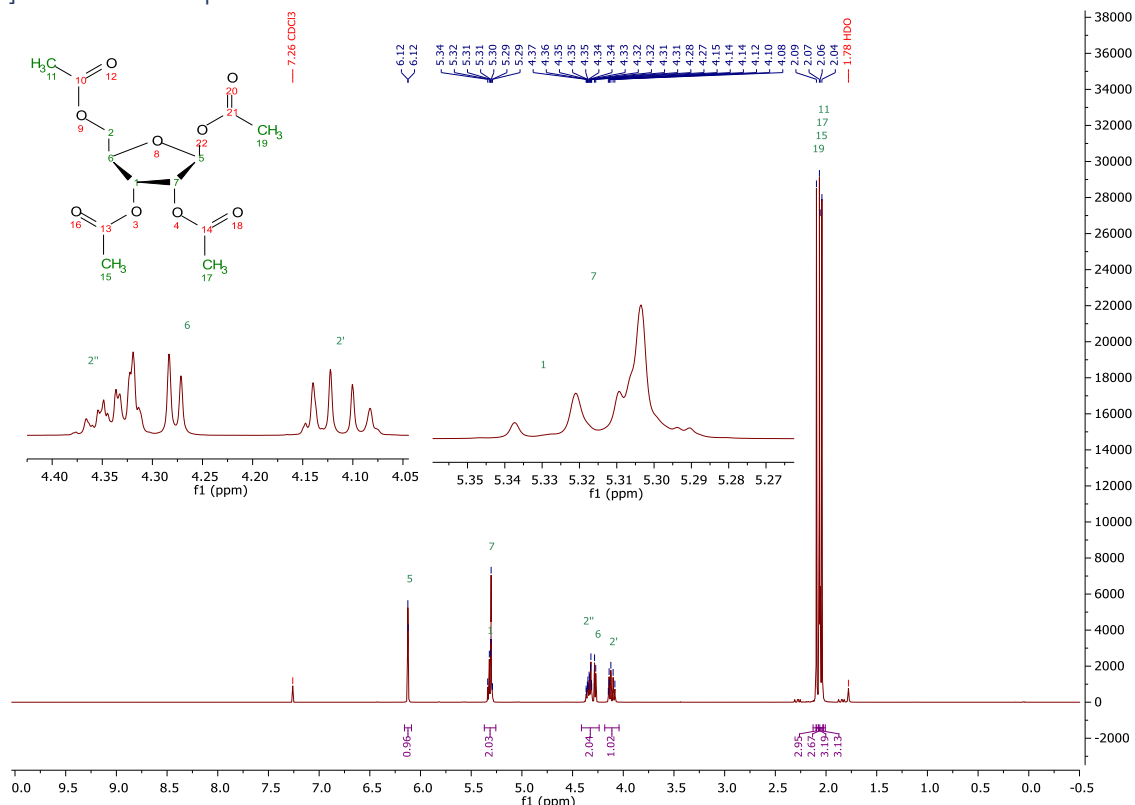


[15] Synthese van fosforamidiet α -ribosyl(42)-Ub-76-PEG-Lys(Bt)-rhodamine

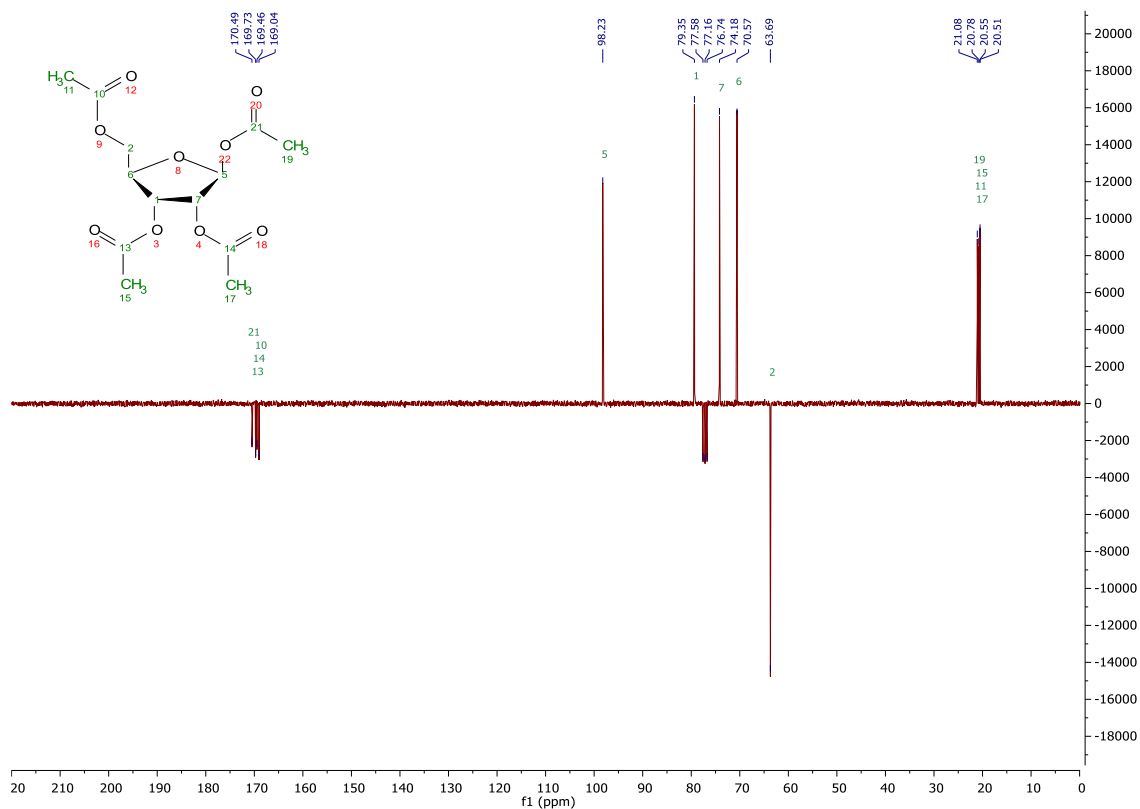


[B] Spectra

[1] Aanvullende spectra molecuul 1



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.12 (d, J = 0.7 Hz, 1H, H-1), 5.37 – 5.26 (m, 2H, H-2 + H-3), 4.41 – 4.24 (m, 2H, H-5' + H-4), 4.18 – 4.04 (m, 1H, H-5''), 2.09 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.07 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.06 (s, 3H, CH₃ acetyl), 2.04 (s, 3H, CH₃ acetyl).

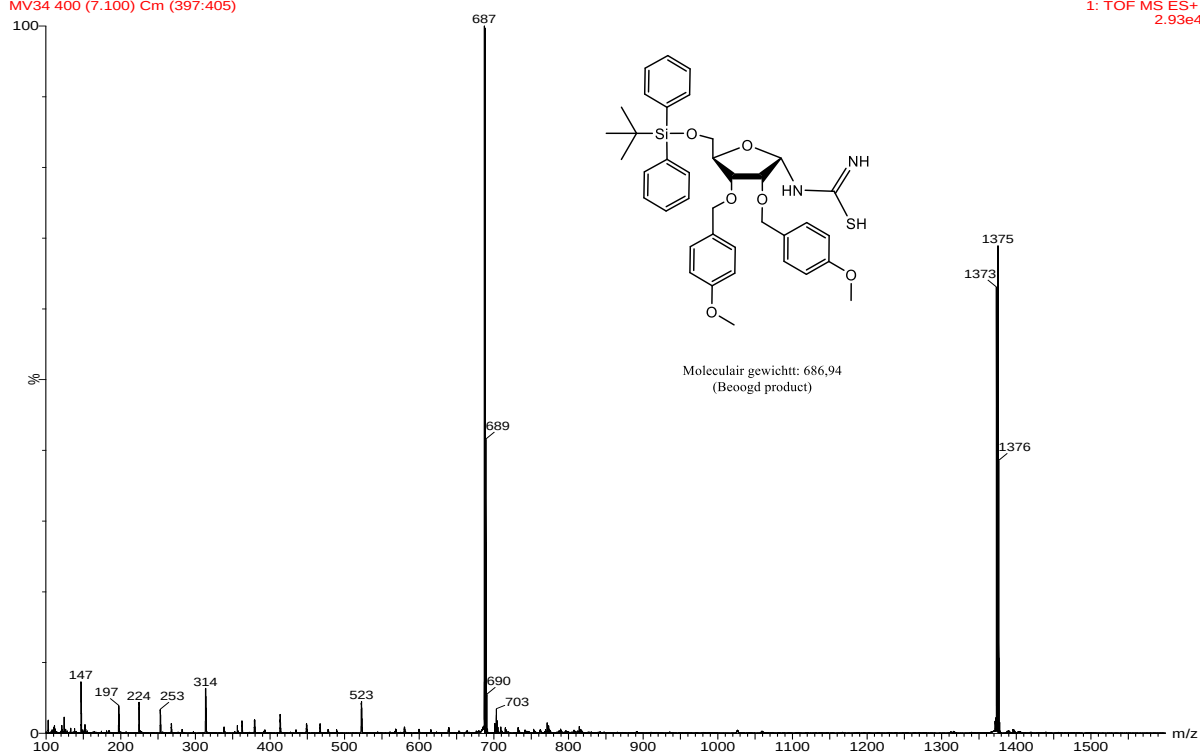


¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.49, 169.73, 169.46, 169.04 (C=O acetyl), 98.23 (C-1), 79.35 (C-3), 74.18 (C-2), 70.57 (C-4), 63.69 (C-5), 21.08, 20.78, 20.55, 20.51 (CH₃ acetyl).

[2] Aanvullende spectra synthese molecuul

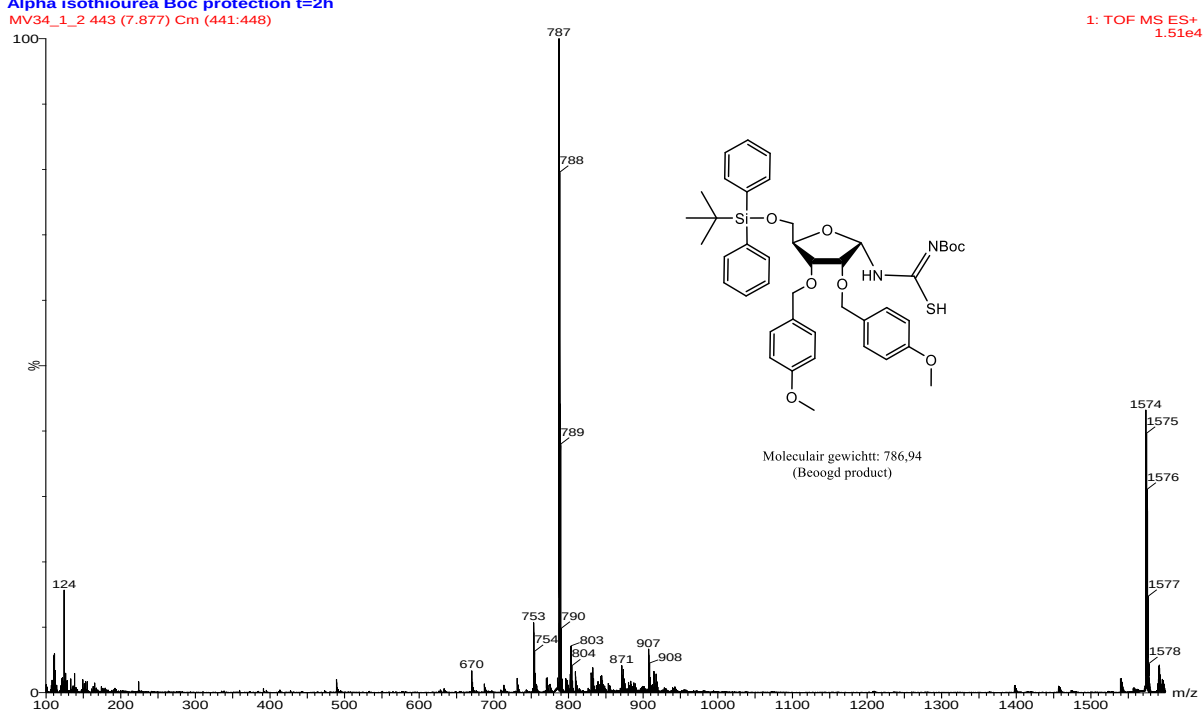
Synthesestap 1

Alpha isothioureia after LIC
MV34 400 (7.100) Cm (397:405)



Bocylering

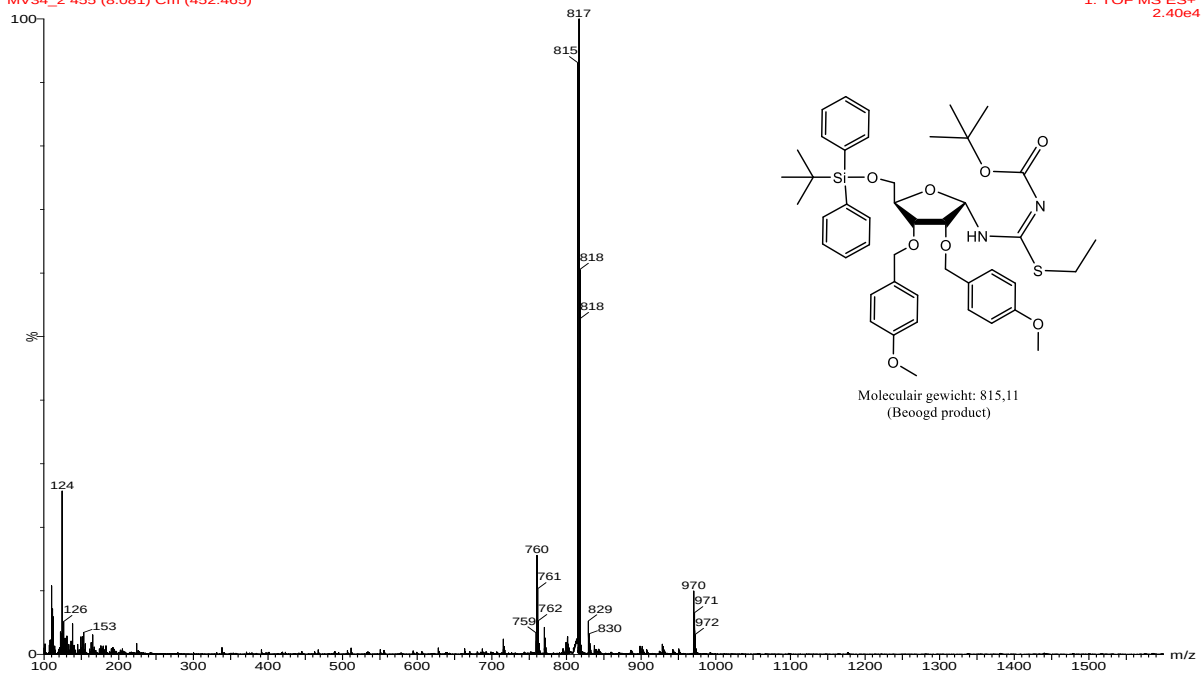
Alpha isothioureia Boc protection t=2h
MV34_1_2 443 (7.877) Cm (441:448)



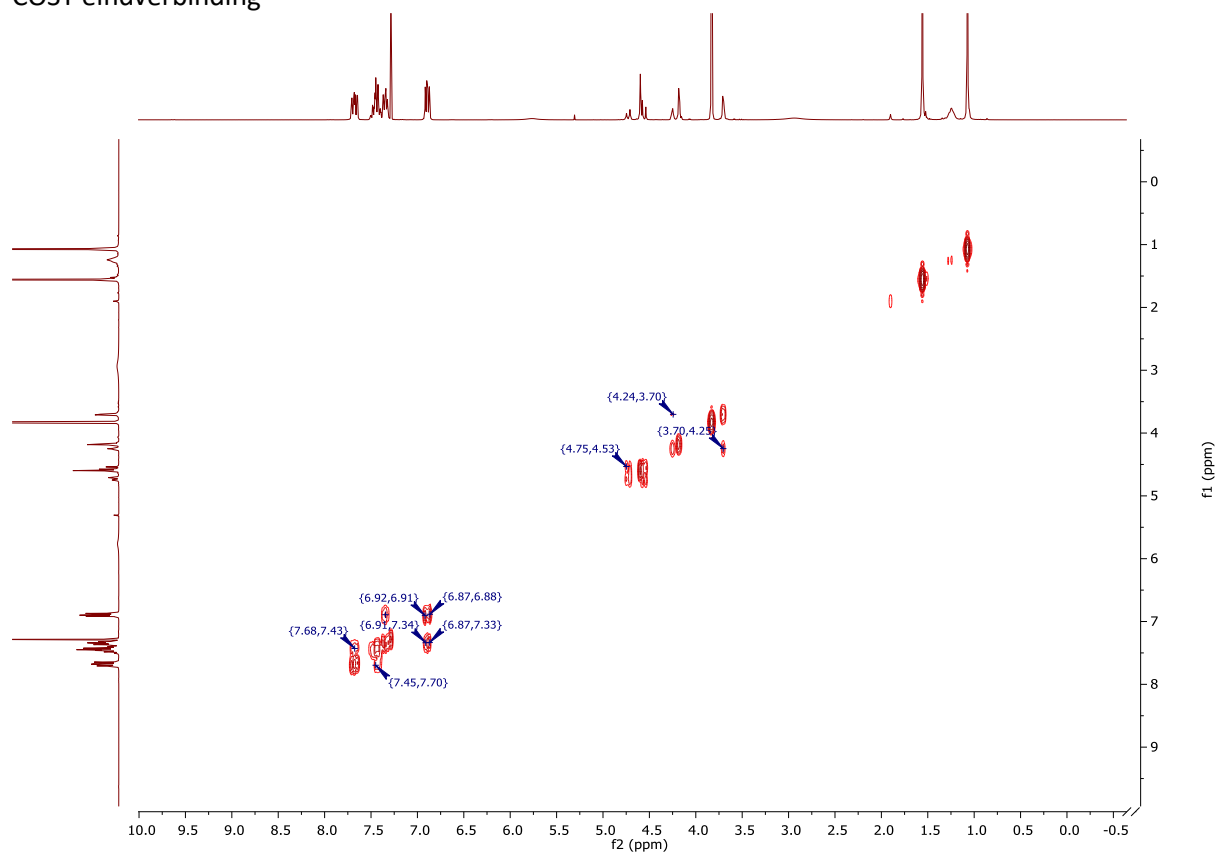
Etl overnight

Alpha isothioureia Etl protection overnight T1
MV34_2 455 (8.081) Cm (452:465)

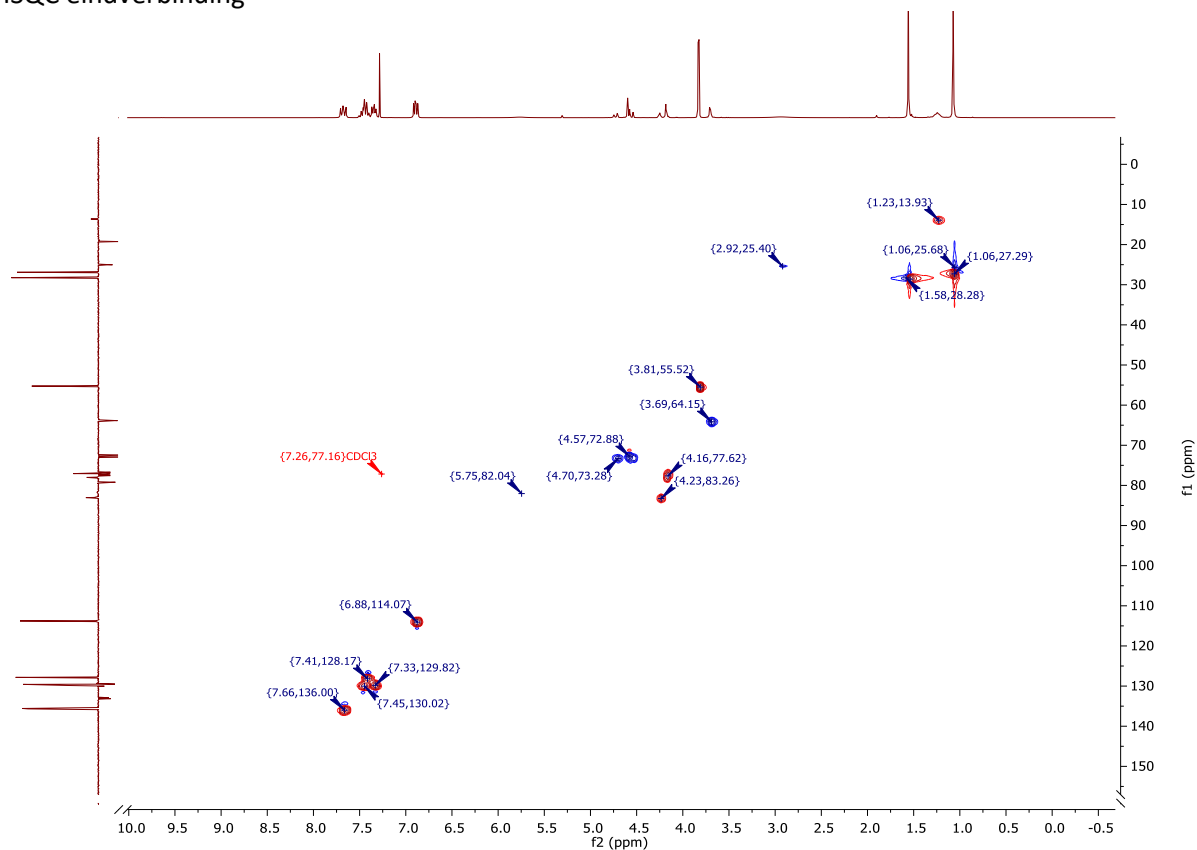
1: TOF MS ES+
2.40e4



COSY eindverbinding

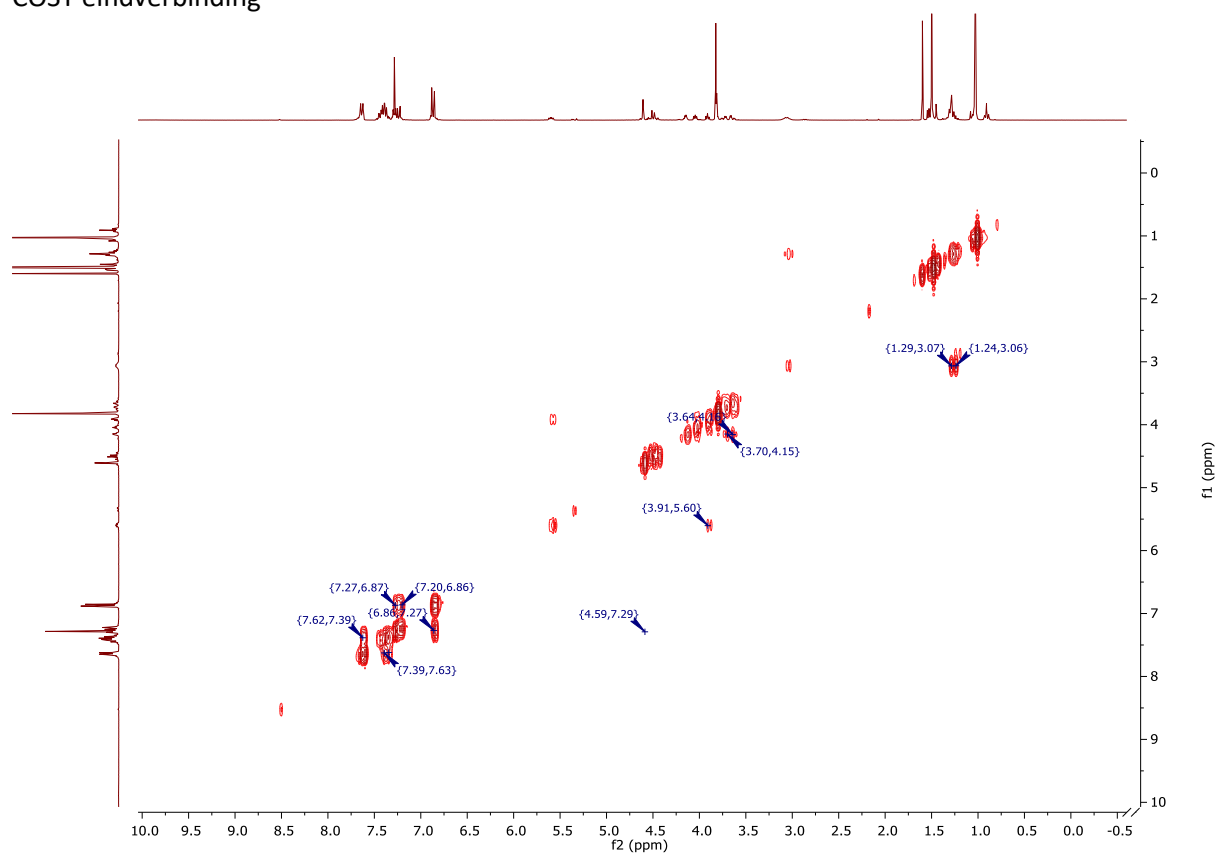


HSQC eindverbinding

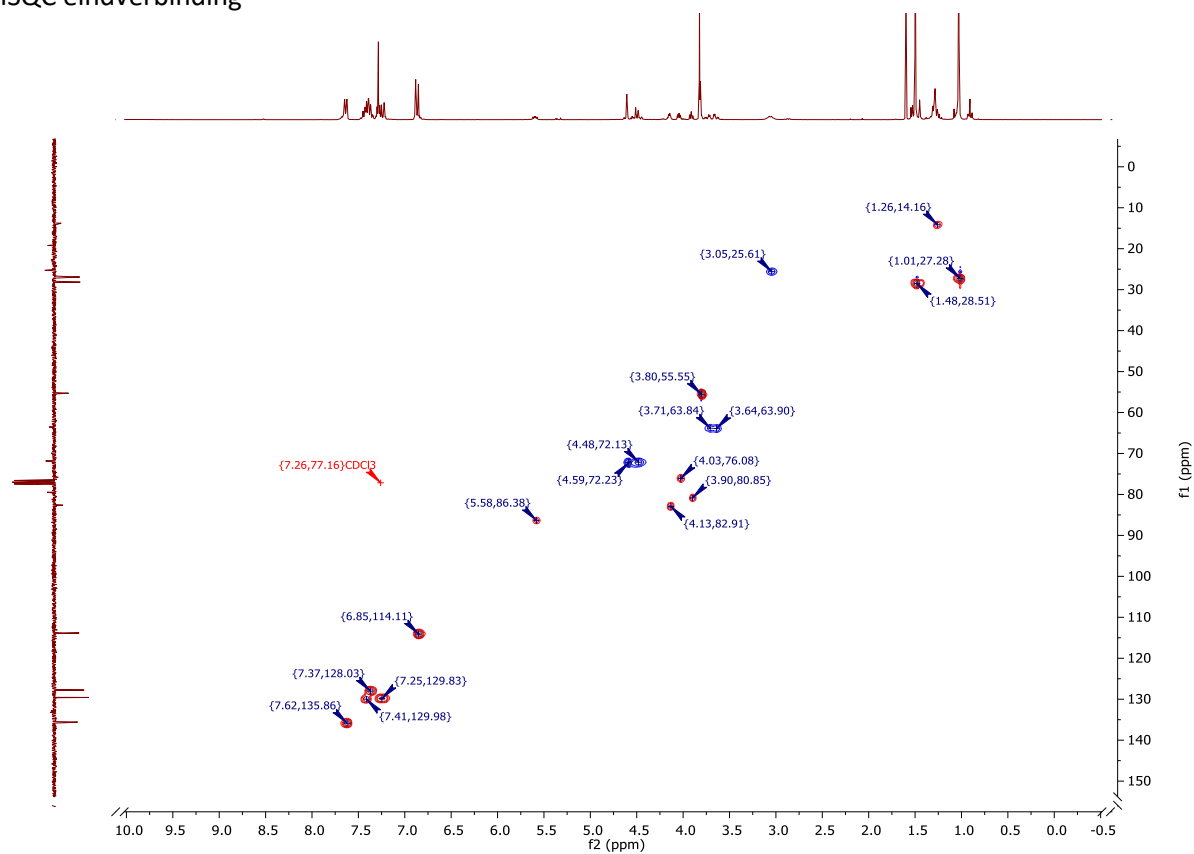


[3] Aanvullende COSY en HSQC spectra synthese molecuul 6 β

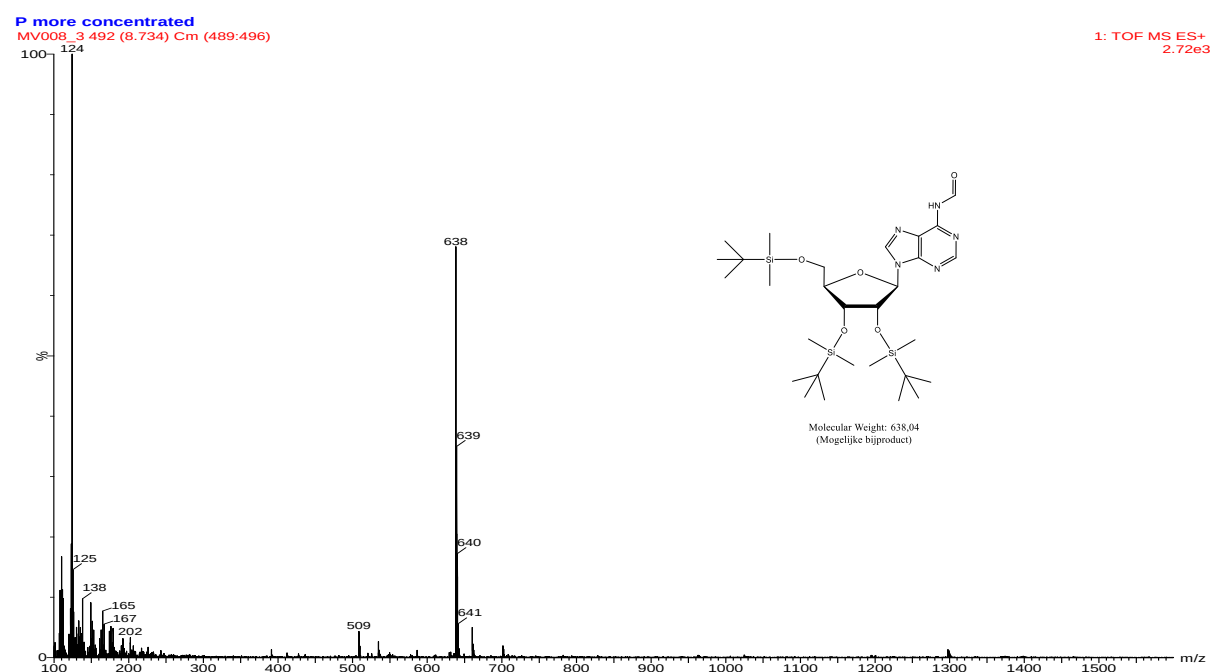
COSY eindverbinding



HSQC eindverbinding



[4] LC-MS foutief gesynthetiseerd molecuul 8.



[5] Aanvullende COSY en HSQC spectra juiste synthese molecuul 8.

