Welche Faktoren beeinflussen die Eigenschaften von Nucleosidmonophosphaten? Untersuchungen zu den Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Hanns Christian Müller

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

> Hamburg 2003

Welche Faktoren beeinflussen die Eigenschaften von Nucleosidmonophosphaten? Untersuchungen zu den Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Hanns Christian Müller

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Hamburg 2003

Gutachter: Prof. Dr. C. Meier
Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Francke
Datum der Disputation: 17.04.2003

meinen Eltern und Sonja

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in der Zeit von März 1999 bis Februar 2003 angefertigt.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Meier für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie für die Freiheiten bei der Bearbeitung desselben. Ferner danke ich ihm für die gute Betreuung der Arbeit und für die hervorragenden experimentellen Bedingungen zu ihrer Durchführung sowie für zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

Für die Durchführung der enzymkinetischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. J. Reinstein sowie Herrn Dr. T. Veit vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund.

Ich danke Herrn Dr. V. Sinnwell und seinem Team, Frau E. Juhas, Frau V. Priegnitz und Frau S. Weidner für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.

Frau Meiners, Herrn Dipl. Chem. A. Hohlfeld und Herrn Dipl. Chem. N. Nagorny danke ich für die Messung zahlreicher Massenspektren.

Herrn Dipl. Chem. C. Ducho danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung des Cholinesterase-Assays.

Für die Anfertigung der Röntgenstrukturanalyse danke ich Herrn Dr. G. Adiwidjaja vom Mineralogisch-Petrographischen Institut der Universität Hamburg.

Ich danke Herrn Dr. A. Lomp, Herrn Dr. W. Maison und Frau Dipl. Chem. S. Gräsl für die kritische Durchsicht von Teilen des Manuskripts.

Mein Dank gilt allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Meier für die gute Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Frau Dipl. Chem. U. Muus und Herrn Dipl. Chem. O. Ludek.

Meiner Freundin, Frau Dipl. Chem. Sonja Gräsl, danke ich für ihre große Geduld sowie ihre fortwährende Unterstützung und kritische Anteilnahme an dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich meine gesamte Ausbildung hindurch nachhaltig unterstützt haben.

Abkürzungen und Symbole

3TC	2'-Desoxy-3'-thiacytidin, Lamivudin, Epivir [®]
А	Adenin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABC	carba-2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro-6-cyclopropylaminoguanosin,
	Abacavir, Ziagen [®]
AChE	Acetylcholinesterase
ACV	9-[2-Hydroxyethoxymethyl]guanin, Acyclovir, Zovirax [®]
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom (Acquired Immunodeficiency
	Syndrom)
AZT	3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin, Zidovudin, Retrovir®
BChE	Butyrylcholinesterase
BVDU	(<i>E</i>)-5-(2-Bromvinyl)-2 ^{\cdot} -desoxyurdin, Brivudin, Zostex [®]
CC ₅₀	Cytotoxische Konzentration
CDCl ₃	Deuterochloroform
CEM	Lymphozytenzellstamm
CMV	Cytomegalie Virus
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
D_2O	Deuteriumoxid
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin, Stavudin, Zerit®
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
ddA	2',3'-Didesoxyadenin
ddC	2',3'-Didesoxycytidin, Zalcitabin, Hivid [®]
ddI	2',3'-Didesoxyinosin, Didanosin, Videx [®]
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure

DP	Diphosphat
dT	2'-Desoxythymidin
DTE	Dithioethyl
EBV	Epstein-Barr Virus
EC ₅₀	Effektive Konzentration
ESI	Elektrosprayionisierung
FAB	fast atom bombardment
G	Guanin
GCV	9-[2-Hydroxy-1-hydroxymethylethoxymethyl]guanin, Ganciclovir, Cymevene [®]
HBV	Hepatitis-B Virus
HIV	Humanes Immunschwäche Virus (Human Immunodeficiency Virus)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPMPC	(S)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin, Cidofovir,
	Vistide [®]
HSV	Herpes Simplex Virus
IR	Infrarot
J	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
m	Multiplett
М	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MMTr	4-Monomethoxytriphenylmethyl
MP	Monophosphat
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MSNT	Mesitylensufonyl-3-nitrotriazol
$\widetilde{\nu}$	Wellenzahl
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCV	9-[4-Hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl]guanin, Penciclovir, Vectavir [®]
PMEA	9-[2-Phosphonylmethoxyethyl]adenin, Adefovir
PMPA	(R)-9-[2-Phosphonylmethoxypropyl]adenin, Tenofovir
POC	iso-Propyloxycarbonyloxymethyl

POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	parts per million
q	Quadruplett
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
Rt	Raumtemperatur
S	Singulett
SATE	S-Acylthioethyl
SG	Schutzgruppe
SGTE	S-(β-Glucopyranosidyl)-2-thioethyl
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS	tert-Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
ТК	Thymidinkinase
TK	Thymidinkinase-defizient
TmpK	Thymidylatkinase
ТР	Triphosphat
t _R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
VZV	Varicella-Zoster Virus

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	KENNTNISSTAND	5
2.1	WIRKUNGSWEISE ANTIVIRAL AKTIVER NUCLEOSIDANALOGA	5
2.2	AKTIVIERUNG DER NUCLEOSIDE	6
2.3	Limitierungen beim Einsatz von nucleosidischen Wirkstoffen	8
2.4	DAS PRO-NUCLEOTID-KONZEPT	9
2.5	DAS CYCLOSAL-KONZEPT	12
2.6	DER METABOLISMUS VON AZT	15
2.7	Die Thymidylatkinase	16
3.	AUFGABENSTELLUNG	20
4.	RESULTATE UND DISKUSSION	22
4.1	Synthese der modifizierten Nucleosidmonophosphate 31-33	22
4.1.1	Synthese von 1-[4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl]thymin	
	(T-Penciclovir) 40	22
4.1.1.1	Synthesestrategie	22
4.1.1.2	Darstellung von T-Penciclovir 40	24
4.1.2	Synthese von 1-[(2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)-	
	METHYL]THYMIN (T-GANCICLOVIR) 30	26
4.1.2.1	Synthesestrategie	26
4.1.2.2	Darstellung von T-Ganciclovir 30	27
4.1.3	Synthese von acyclischen Analoga von AZT ${f 1}$	32
4.1.3.1	Synthesestrategie	32
4.1.3.2	Darstellung von Azido-T-Ganciclovir 41a	33
4.1.3.3	Versuch der Darstellung beider Enantiomere von Azido-T-Ganciclovir 41a	38
4.1.3.4	Darstellung von Thiocyanato-T-Ganciclovir 41b	40
4.1.4	Synthese von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin und 2'-Desoxy-3'-	
	ISOTHIOCYANATOTHYMIDIN	41
4.1.4.1	Synthesestrategie	41
4.1.4.2	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin 42a und 2'-Desoxy-3'-	
	isothiocyanatothymidin 42b	42

4.1.5	SYNTHESE VON 3'-ALLYL-2'-DESOXYTHYMIDIN UND 2'-DESOXY-3'-	
	PROPARGYLTHYMIDIN	49
4.1.5.1	Synthesestrategie	49
4.1.5.2	Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin 42c und 2'-Desoxy-3'-	
	propargylthymidin 42d	50
4.1.6	Synthese der <i>cyclo</i> Sal-Nucleosidmonophosphate	55
4.1.6.1	Synthese der Phosphitylierungsreagenzien	55
4.1.6.2	Synthese der cycloSal-Nucleosidmonophosphate	56
4.1.7	Synthese der modifizierten Nucleosidmonophosphate	59
4.2	EIGENSCHAFTEN DER MODIFIZIERTEN 3-M ETHYL- <i>CYCLO</i> SAL-	
	NUCLEOSIDMONOPHOSPHATE	63
4.2.1	Hydrolysekinetiken der 3-Methyl- <i>cyclo</i> Sal-	
	NUCLEOSIDMONOPHOSPHATE	63
4.2.2	CHOLINESTERASE-ASSAY	72
4.2.3	ANTIVIRALE <i>IN-VITRO</i> -AKTIVITÄT	75
4.3	EIGENSCHAFTEN DER NUCLEOSIDMONOPHOSPHATE	76
4.4	SYNTHESE DER POTENTIELL ANTIVIRAL AKTIVEN CYCLOSAL-	
	NUCLEOSIDPHOSPHONATE	81
4.4.1	Synthese von 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124	81
4.4.2	Synthesestrategie zur Darstellung der $cycloS$ al-Phosphonatdiestei	r 82
4.4.3	VERSUCHE DER EINFÜHRUNG EINER BOC-SCHUTZGRUPPE	84
4.4.4	Synthese von 9-[2- <i>cyclo</i> Sal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin 34a	
	ÜBER EINE FMOC-SCHUTZGRUPPENSTRATEGIE	85
4.4.5	Synthese von 9-[2- <i>cyclo</i> Sal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin 34a	
	ÜBER EINE MMTR-SCHUTZGRUPPENSTRATEGIE	88
4.4.5.1	Synthese über das Phosphonsäuredichlorid	88
4.4.5.2	Darstellung durch direkte Kondensation des Phosphonates mit Salicylalkohol	93
4.4.6	DARSTELLUNG DER CYCLOSAL-PHOSPHONATDIESTER VON PMPA 12	94
4.4.7	DARSTELLUNG VON (S)-9-[3-HYDROXY-2-(3,5-DI-TERT-BUTYL-CYCLOSAL-	
	PHOSPHONYLMETHOXYPROPYL]CYTOSIN 36	95
4.5	EIGENSCHAFTEN DER <i>CYCLO</i> SAL-NUCLEOSIDPHOSPHONATE	101
4.5.1	HYDROLYSEKINETIKEN DER CYCLOSAL-NUCLEOSIDPHOSPHONATE	101
4.5.2	VERHALTEN DER CYCLOSAL-NUCLEOSIDPHOSPHONATE GEGENÜBER	
	Serumcholinesterase	110

ANTIVIRALE <i>IN-VITRO</i> -AKTIVITÄT DER CYCLOSAL-PHOSPHONATDIESTER	112
MENFASSUNG	114
ARY	123
CK	125
EXPERIMENTALTEIL	127
ALLGEMEINES	127
Lösungsmittel	127
VERWENDETE PUFFER UND REAGENZIEN	128
Chromatographie	129
Dünnschichtchromatographie (DC)	129
Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)	129
Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)	130
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	130
KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	131
MASSENSPEKTROMETRIE (MS)	132
ULTRAVIOLETTSPEKTROSKOPIE (UV)	132
INFRAROTSPEKTROSKOPIE (IR)	132
GERÄTE	133
GEFRIERTROCKNUNG	133
THERMOMIXER	133
DARSTELLUNGEN	133
ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN (AAV)	133
Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate nach der	
Chlorphosphit-Methode (AAV 1)	133
Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate nach der	
Phosphoramidit-Methode (AAV 2)	134
Darstellung der Nucleosidmonophosphate durch Hydrolyse der 3-Methyl-	
cycloSal-Nucleosidmonophosphate (AAV 3)	135
Darstellung der cycloSal-Phosphonatdiester durch direkte Kondensation des	
Phosphonates mit Salicylalkoholen (AAV 4)	135
Darstellung der cycloSal-Phosphonatdiester aus den Phosphonatdiethylestern	
(AAV 5)	136
	ANTIVIRALE IN-VITRO-AKTIVITÄT DER CYCLOSAL-PHOSPHONATDIESTER MENFASSUNG RY CK EXPERIMENTALTEIL ALIGEMEINES LOSUNGSMITTEL VERWENDETE PUFFER UND REAGENZIEN CHROMATOGRAPHIE Dünnschichtromatographie (DC) Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtromatographie (CCTLC) Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR) MASSENSPEKTROMETRIE (MS) ULTRAVIOLETTSPEKTROSKOPIE (UV) INFRAROTSPEKTROSKOPIE (IR) GEFRIERTROCKNUNG THERMOMIXER DARSELLUNGEN ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN (AAV) Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate nach der Chlorphosphit-Methode (AAV 1) Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate nach der Phosphoramidit-Methode (AAV 2) Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate nach der Phosphoramidit-Methode (AAV 3) Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate nach der Phosphoramidit-Methode (AAV 3) Darstellung der CycloSal-Phosphonatdiester durch direkte Kondensation des Phosphonates mit Salicylalkoholen (AAV 4) Darstellung der cycloSal-Phosphonatdiester durch direkte Kondensation des Phosphonates mit Salicylalkoholen (AAV 4) Darstellung der cycloSal-Phosphonatdiester durch direkte Kondensation des Phosphonates mit Salicylalkoholen (AAV 4)

8.3.1.6	Abspaltung der Monomethoxytrityl- und Tritylschutzgruppen aus cycloSal-	
	Phosphonatdiestern (AAV 6)	137
8.3.2	DARSTELLUNG VON T-PENCICLOVIR	137
8.3.2.1	Darstellung von 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäuretriethylester 48	137
8.3.2.2	Darstellung von 2-Ethoxycarbonyl-2-[2-(1-thyminyl)ethyl]malonsäure-	
	diethylester 50 mit Natriumhydrid	138
8.3.2.3	Darstellung von 2-Ethoxycarbonyl-2-[2-(1-thyminyl)ethyl]malonsäure-	
	diethylester 50 mit Lithiumhydrid	139
8.3.2.4	Darstellung von 2-[2-(1-Thyminyl)ethyl]malonsäuredimethylester 46	140
8.3.2.5	Darstellung von 2-[2-(1-Thyminyl)ethyl]malonsäuredimethylester 46	
	aus dem Bromid 48	141
8.3.2.6	Darstellung von 1-(4-Hydroxy-3-hydroxymethylbutyl)thymin	
	(T-Penciclovir) 40	142
8.3.3	DARSTELLUNG VON T-GANCICLOVIR UND DERIVATEN	143
8.3.3.1	Darstellung von 4-(Chlormethyl)-1,3-dioxolan 54	143
8.3.3.2	Darstellung von 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan 56a	144
8.3.3.3	Darstellung von 1,3-Diacetoxy-2-(acetoxymethoxy)propan 52a	145
8.3.3.4	Darstellung von 1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin 58a	146
8.3.3.5	Darstellung von 1-[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]thymin	
	(T-Ganciclovir) 30	147
8.3.3.6	Darstellung von 5'-O-Trityl-T-Ganciclovir 66 aus T-Ganciclovir 30	148
8.3.3.7	Darstellung von 4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir 67	149
8.3.3.8	Darstellung von 4'-O-Acetyl-5'-O-trityl-T-Ganciclovir 68	150
8.3.3.9	Darstellung von 5'-O-Trityl-T-Ganciclovir 66	151
8.3.3.10	Darstellung von 4'-O-Mesyl-5'-O-trityl-T-Ganciclovir 70	152
8.3.3.11	Darstellung von 4'-Azido-5'-O-trityl-T-Ganciclovir 71	153
8.3.3.12	Darstellung von 1-(2-Azido-1-hydroxymethyl-ethoxymethyl)thymin	
	(Azido-T-Ganciclovir) 41a	154
8.3.3.13	Darstellung von 5'-O-Acetyl-4'-azido-T-Ganciclovir 72	155
8.3.3.14	Darstellung von Azido-T-Ganciclovir 41a aus Verbindung 72	156
8.3.3.15	Darstellung von 5'-O-((1S)-(-)-Camphanoyl)-Azido-T-Ganciclovir 73	157
8.3.3.16	Darstellung von 5'-O-(Campher-10-sulfonyl)-Azido-T-Ganciclovir 74	158
8.3.3.17	Darstellung von 5'-Thiocyanato-4'-O-trityl-T-Ganciclovir 75	159

8.3.3.18	Darstellung von 1-(2-Thiocyanato-1-hydroxymethyl-ethoxymethyl)thymin	
	(Thiocyanato-T-Ganciclovir) 41b	160
8.3.4	DARSTELLUNG VON 2'-DESOXY-3'-THIOCYANATO- UND 2'-DESOXY-	
	3'-ISOTHIOCYANATOTHYMIDIN	162
8.3.4.1	Darstellung von 2'-Desoxy-5'-O-tritylthymidin 80 ^[116]	162
8.3.4.2	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-O-mesyl-5'-O-tritylthymidin 79 ^[117]	163
8.3.4.3	Darstellung von 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-O-tritylthymindin 82 ^[115]	164
8.3.4.4	Versuch der Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-O-trityl-	
	thymidin 83a	165
8.3.4.5	Darstellung von 1-(2'-Desoxy-5'-O-trityl-β-D-threo-pentosyl)thymin 78	165
8.3.4.6	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83a und	
	2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83b	166
8.3.4.7	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin 42a und 2'-Desoxy-3'-	
	isothiocyanatothymidin 42b	168
8.3.4.8	Darstellung von 3'-Azido-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 84	170
8.3.4.9	Darstellung von 3'-Azido-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 84 aus AZT 1	171
8.3.4.10	Darstellung von 3'-Amino-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 85	172
8.3.4.11	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83b	173
8.3.4.12	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin 42b	174
8.3.5	DARSTELLUNG VON 3'-ALLYL-2'-DESOXYTHYMIDIN 42C UND 2'-DESOXY-	
	3'-propargylthymidin 42d	175
8.3.5.1	Versuch der Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 89	175
8.3.5.2	Darstellung von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin 91	176
8.3.5.3	Darstellung von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'-desoxy-3'-O-	
	(methoxythiocarbonyl)thymidin 92	177
8.3.5.4	Versuch der Darstellung von 3'-Allyl-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-2'-	
	desoxythymidin 88	178
8.3.5.5	Darstellung von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'-desoxy-3'-O-(phenoxythio-	
	carbonyl)thymidin 90	179
8.3.5.6	Darstellung von 3'-Allyl-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin 88	180
8.3.5.7	Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin 42c	181
8.3.5.8	Darstellung von 3'-(2,3-Dibrompropyl)-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-2'-	
	desoxythymidin 87a	183
8.3.5.9	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin 42d aus Verbindung 87a	184

8.3.5.10	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin 42d aus Verbindung 87b	186
8.3.6	DARSTELLUNG DER SALICYLALKOHOLE UND CYCLISCHEN CHLORPHOSPHITE	
	BZWAMIDITE	186
8.3.6.1	Darstellung von 3-Methylsalicylalkohol 95	186
8.3.6.2	Darstellung von 3,5-Di-tert-Butylsalicylalkohol 140	187
8.3.6.3	Darstellung von 3-Methyl-cycloSalchlorphosphit 96	188
8.3.6.4	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-N,N-di-iso-propylphosphoramidit 97	189
8.3.7	DARSTELLUNG DER MODIFIZIERTEN 3-METHYL-CYCLOSAL-	
	NUCLEOSIDMONOPHOSPHATE	189
8.3.7.1	Darstellung von 4'-O-Dimethoxytrityl-T-Penciclovir 98	189
8.3.7.2	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-T-Penciclovirmonophosphat 37a	190
8.3.7.3	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-Azido-T-Ganciclovirmonophosphat 38b	191
8.3.7.4	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-Thiocyanato-T-	
	Ganciclovirmonophosphat 38c	193
8.3.7.5	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-O-acetyl-T-Ganciclovir-	
	monophosphat 38d	194
8.3.7.6	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidin-	
	monophosphat 39b	196
8.3.7.7	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-3'-allyl-2'-	
	desoxythymidinmonophosphat 39c	197
8.3.7.8	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxy-3'-	
	propargylthymidinmonophosphat 39d	199
8.3.7.9	Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxy-3'-thiocyanatothymidin-	
	monophosphat 39a	200
8.3.8	DARSTELLUNG DER MODIFIZIERTEN NUCLEOSIDMONOPHOSPHATE	202
8.3.8.1	Darstellung von Azido-T-Penciclovirmonophosphat 31b	202
8.3.8.2	Darstellung von Azido-T-Ganciclovirmonophosphat 32b	203
8.3.8.3	Darstellung von Thiocyanato-T-Ganciclovirmonophosphat 32c	204
8.3.8.4	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidinmonophosphat 33a	205
8.3.8.5	Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidinmonophosphat 33c	206
8.3.8.6	Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidinmonophosphat 33d	207
8.3.8.7	Versuch der Darstellung von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin-	
	monophosphat 33b	208

8.3.9	DARSTELLUNG DER CYCLOSAL-PHOSPHONATDIESTER VON	
	9-[2-(PHOSPHONYLMETHOXY)ETHYL]-ADENIN (PMEA) 11	209
8.3.9.1	Darstellung von Acetoxy-2-(chlormethoxy)ethan 120	209
8.3.9.2	Darstellung von Diethyl-[2-acetoxyethoxymethyl)phosphonat 121	209
8.3.9.3	Darstellung von Diethyl-[2-hydroxyethoxymethyl)phosphonat 122	210
8.3.9.4	Darstellung von Diethyl-[2-methansulfonyloxyethoxymethyl)-	
	phosphonat 123	211
8.3.9.5	Darstellung von 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124	211
8.3.9.6	Versuch der Darstellung von N-tert-Butyloxycarbonyl-9-[2-	
	diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 130 mit Di-tert-Butyldicarbonat	212
8.3.9.7	Versuch der Darstellung von N-tert-Butyloxycarbonyl-9-[2-diethyl-	
	phosphonyl-methoxyethyl]adenin 130 mit 2-(tert-Butyloxycarbonyl-	
	oxyimin)-2-phenylacetonitril	213
8.3.9.8	Darstellung von N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-diethylphosphonyl	-
	methoxyethyl]adenin 131a	214
8.3.9.9	Darstellung von N-Fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSal-phosphonyl-	
	methoxyethyl]adenin 132b	216
8.3.9.10	Darstellung von N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSal-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 132a Variante 1	217
8.3.9.11	Darstellung von N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSal-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 132a Variante 2	219
8.3.9.12	Versuche der Darstellung von 9-[2-cycloSal-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 34a durch Abspaltung der	
	Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe	220
8.3.9.13	Darstellung von 9-[2-cycloSal-phosphonylmethoxyethyl]adenin 34a durch	
	Abspaltung der Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe	221
8.3.9.14	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxy-	
	ethyl]adenin 133	222
8.3.9.15	Versuch der Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-cycloSal-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 134a	223
8.3.9.16	Darstellung von N-Trityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 135	224
8.3.9.17	Darstellung von N-Trityl-9-[2-cycloSal-phosphonylmethoxyethyl]-	
	adenin 136	225

8.3.9.18	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-cycloSal-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 134a nach AAV 5	226
8.3.9.19	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-Methyl-cycloSal)-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 134b	227
8.3.9.20	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-tert-Butyl-cycloSal)-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 134c	229
8.3.9.21	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3,5-Di-tert-Butyl-cycloSal)-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 134d	230
8.3.9.22	Darstellung von 9-[2-cycloSal-phosphonylmethoxyethyl]adenin 34a	
	nach AAV 6	231
8.3.9.23	Darstellung von 9-[2-(3-Methyl-cycloSal)-phosphonylmethoxyethyl]-	
	adenin 34b	232
8.3.9.24	Darstellung von 9-[2-(3-tert-Butyl-cycloSal)-	
	phosphonylmethoxyethyl]adenin 34c	234
8.3.9.25	Darstellung von 9-[2-(3,5-Di-tert-Butyl-cycloSal)-phosphonyl-	
	methoxyethyl]adenin 34d	235
8.3.9.26	Darstellung von Bis-(Triethylammonium)-N-4-monomethoxytrityl-2-	
	(aden-9-yl)ethoxymethylphosphonat 129	236
8.3.9.27	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-cycloSal-phosphonylmethoxy	-
	ethyl]adenin 134a nach AAV 4	237
8.3.10	DARSTELLUNG DER CYCLOSAL-PHOSPHONATDIESTER VON (R)-9-[2-	
	(PHOSPHONOMETHOXY)PROPYL]ADENIN (PMPA) 12	238
8.3.10.1	Darstellung von (<i>R</i>)-9-[2-(3- <i>tert</i> -Butyl- <i>cyclo</i> Sal)-phosphonylmethoxypropyl]-
	adenin 35a	238
8.3.10.2	Darstellung von (R)-9-[2-(3,5-Di- <i>tert</i> -Butyl- <i>cyclo</i> Sal)-phosphonylmethoxy-	
	propyl]adenin 35b	240
8.3.11	DARSTELLUNG DER CYCLOSAL-PHOSPHONATDIESTER VON (S)-9-[3-HYDROXY	-
	2-PHOSPHONYLMETHOXYPROPYL]CYTOSIN (HPMPC) 13	241
8.3.11.1	Versuche der Darstellung von (S)-9-[3-Hydroxy-2-(3,5-di-tert-butyl-	
	cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 36	241
8.3.11.2	Darstellung von O-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-[3-Hydroxy-2-	
	phosphonylmethoxypropyl]cytosin 135	242
8.3.11.3	Versuche der Darstellung von O-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-	
	(3-tert-butyl-cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 136 nach AAV 4	244

8.3.11.4	Versuch der Darstellung von O-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-[3-hydroxy-	
	2-(3-tert-butyl-cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 136 mit	
	Phosphorpentachlorid	245
8.3.11.5	Versuch der Darstellung von N,O-Bis-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-	
	[3-hydroxy-2-(3-tert-butyl-cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 138	246
8.3.11.6	Darstellung von O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonyl-	
	methoxypropyl]-cytosin 140	247
8.3.11.7	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-O-trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-	
	diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin 141	248
8.3.11.8	Versuch der Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-O-trityl-(S)-9-	
	[3-hydroxy-2-(3-tert-butyl-cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 142	
	nach AAV 5	249
8.3.11.9	Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-O-trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-(3,5-D)i-
	tert-butyl-cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 142	250
8.3.11.10	Darstellung von (S)-9-[3-Hydroxy-2-(3,5-Di-tert-butyl-cycloSal-	
	phosphonylmethoxypropyl]cytosin 36	251
8.4	Hydrolyseexperimente	253
8.4.1	Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer	253
8.4.2	Hydrolysekinetiken in Zellextrakt (CEM/0)	253
8.4.3	Hydrolysekinetiken in humanem Serum	254
8.4.4	³¹ P-NMR-Hydrolysestudien	254
8.5	Cholinesterase-Assay	255
9.	GEFAHRSTOFFE	256
10.	LITERATURVERZEICHNIS	258
	AUSKLAPPTAFEL	274
	PUBLIKATIONSLISTE	277
	LEBENSLAUF	278

1. Einleitung

Mitte der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts gelang die Entdeckung und Isolierung^[1, 2, 3] des HI-Virus (*H*uman *I*mmunodeficiency *V*irus), das die Immunschwächekrankheit AIDS (*A*cquired *I*mmunodeficiency *S*yndrom) auslöst.

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO sowie UNAIDS sind derzeit etwa 40 Millionen Menschen weltweit mit dem HI-Virus infiziert oder leiden an AIDS, 5 Millionen davon haben sich im Jahr 2001 neu infiziert.^[4] 70 % der Infizierten stammen aus dem südlichen Afrika, wo die Krankheit bereits ein schwerwiegendes gesellschaftliches Problem darstellt. So sind in manchen Regionen 40 % aller schwangeren Frauen mit dem HI-Virus infiziert und Ende 2001 lebten 14 Millionen Kinder, die durch AIDS zu Waisen wurden.

Trotz zweier Jahrzehnte intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen, einen Impfstoff zu entwickeln, der vor einer Infektion schützen kann und somit eine medikamentöse Behandlung infizierter Personen überflüssig macht, noch existieren Medikamente, die die virale Replikation vollständig unterbinden und somit Patienten heilen. Dies ist im wesentlichen darauf zurückzuführen, daß das HI-Virus ein hochvariables Virus ist, das zwei große Familien bildet, HIV-1 und HIV-2, die ihrerseits weiter in Subtypen zerfallen. Genetisch unterscheiden sich die einzelnen Typen um etwa 30 % in ihrer Erbinformation.^[5] Das RNA-Genom des HI-Virus ist von einem zweischichtigen Capsid sowie einer Lipiddoppelschichtmembran umhüllt, welche die beiden Glycoproteine gp41 und gp120 enthält. Zusätzlich befinden sich im Kern noch mehrere Moleküle des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), die für die Replikation des Virus essentiell sind.^[6]

HIV befällt in der Regel CD4-positive Zellen, d.h. Zellen, welche den Oberflächenrezeptor CD4 tragen (beispielsweise T-Helferzellen des Immunsystems). Zunächst binden die gp120-Moleküle des HIV an die CD4-Proteine auf der Zelloberfläche und ermöglichen somit die Verschmelzung beider Membranen. Der Kern des Virus kann nun direkt in das Cytoplasma der Wirtszelle entlassen werden.^[6] Der Replikationszyklus eines Retrovirus ist, im Gegensatz zu "normalen" cytolytischen Viren, die ihr Erbgut unabhängig vom Metabolismus der Wirtszelle replizieren, eng mit der Wirtszelle verbunden (Abb. 1, S. 2). Zu Beginn der Replikation wird die virale einzelsträngige RNA zunächst in ein RNA/DNA-Hybrid und dann in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Beide Vorgänge werden durch die Reverse Transkriptase katalysiert. Die neugebildete DNA wird anschließend im Zellkern in das Genom der Wirtszelle integriert und dort transkribiert. Dabei entsteht nicht nur die virale einzelsträngige RNA, sondern es werden auch die mRNAs für einige Vorläuferproteine gebildet. Aus diesen werden die entsprechenden Proteine mit Hilfe des Enzyms HIV-Protease freigesetzt. Virusproteine und virale RNA bilden abschließend durch Ausknospung neue Viren, die weitere Zellen infizieren können.^[6]



Abb. 1 Der retrovirale Replikationszyklus

Die genaue Kenntnis des biochemischen Verlaufs der Virusreplikation eröffnet die Möglichkeit, gezielt in den Mechanismus einzugreifen und somit die Ausbreitung des Virus zu unterbinden. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, in den Replikationszyklus einzugreifen. So kennt man beispielsweise Virusadsorptionsinhibitoren, Inhibitoren, die die Virus-Zell-Fusion unterbinden, nucleosidische und nicht-nucleosidische RT-Inhibitoren und Inhibitoren der viralen Protease.^[7] Ferner ist es möglich, durch Hybridisierung der mRNA mit Antisense-Oligonucleotiden die Translation zu unterbinden. Schließlich gibt es die Möglichkeit, durch die Bildung einer Tripel-Helix die Transkription der DNA in virale mRNA zu unterbinden.

Von den genannten Möglichkeiten ist die Inhibition der Reversen Transkriptase von besonderem Interesse, da dieser Vorgang für Retroviren spezifisch, für die Wirtszelle hingegen von keinerlei Bedeutung ist. Nucleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren (NRTIs) gehörten zu den ersten AIDS-Medikamenten. Derzeit werden die als kompetitive Inhibitoren agierenden Nucleosidanaloga 3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin (AZT; Zidovudin, Retrovir[®]) 1, 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T; Stavudin, Zerit[®]) 2, 2',3'-Didesoxycytidin (ddC; Zalcitabin, Hivid[®]) 3, 2',3'-Didesoxyinosin (ddI; Didanosin, Videx[®]) 4, 3'-Thiacytidin (3TC; Lamivudin, Epivir[®]) 5 sowie *carba*-2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro-6-cyclopropylaminoguanosin (ABC, Abacavir, Ziagen[®]) 6 klinisch gegen das HI-Virus eingesetzt (Abb. 2, S. 3).



Abb. 2 In der Anti-HIV-Therapie eingesetzte Nucleosidanaloga

Allen gegen das HI-Virus eingesetzten Nucleosidanaloga ist eine Modifikation in der 3'-Position des Desoxyriboseringes gegenüber dem natürlichen Nucleosid gemeinsam. Werden sie also in einen entstehenden DNA-Strang eingebaut, so kann keine Elongation in 3'-Richtung erfolgen, so daß die reverse Transkription an dieser Stelle abbricht. Die genetische Information des Virus bleibt somit unvollständig.^[8]

Im Gegensatz zu Retroviren benötigen DNA-Viren wie die Herpesviren keinen reversen Transkriptionsschritt in ihrem Replikationszyklus. Dies bedeutet, daß ihr Genom durch die virale DNA-Polymerase repliziert werden kann, nachdem die letztere in der infizierten Zelle exprimiert wurde. Alle derzeit zur Behandlung von Infektionen mit Herpesviren verfügbaren Wirkstoffe sind Nucleosidanaloga, die auf eine Inhibition der viralen DNA-Polymerase abzielen.



Abb. 3

Anti-Herpesvirus aktive Nucleosidanaloga

Eine herausragende Bedeutung kommt dabei neben (E)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin Zostex[®]) 10 (BVDU, Brivudin. acyclischen Guanosinanaloga wie 9-[2-Zovirax[®]) 7, Hvdroxyethoxymethyl]guanin (ACV, Acyclovir, 9-[4-Hydroxy-3hydroxymethylbut-1-yl]guanin (PCV, Penciclovir, Vectavir[®]) 8 und 9-[2-Hydroxy-1hydroxymethylethoxymethyl]guanin (GCV, Ganciclovir, Cymevene[®]) 9 zu (Abb. 3, S. 3). Eine weitere Klasse von antiviral aktiven Nucleosidanaloga stellen die acyclischen Nucleosidphosphonate wie 9-[2-Phosphonylmethoxyethyl]adenin (PMEA, Adefovir) 11, (R)-9-[2-Phosphonylmethoxypropyl]adenin (PMPA, Tenofovir) 12 und (S)-9-[3-Hydroxy-2phosphonylmethoxypropyl]cytosin (HPMPC, Cidofovir, Vistide[®]) **13** dar.



Abb. 4 Antiviral aktive Nucleosidphosphonate

Erstmals berichteten DE CLERCQ und HOLY 1986 über die antivirale Aktivität eines acyclischen Nucleosidphosphonates gegenüber DNA-Viren.^[9] In der Folge wurde eine Reihe von antiviral aktiven Nucleosidphosphonaten entwickelt. PMEA **11** und PMPA **12** zeigen Aktivität gegen Retroviren sowie Hepdnaviren wie das Hepatitis B Virus (HBV). HPMPC **13** zeigt eine breit gefächerte Aktivität gegen DNA-Viren, darunter die gesamte Herpesviren Familie, Pockenviren,^[10] sowie das menschliche Papillomavirus, das an der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs beteiligt ist. 1996 erhielt HPMPC **13** unter dem Handelsnamen Vistide[®] die Zulassung zur klinischen Behandlung von AIDS-Patienten mit CMV Retinitis, einer schweren Infektion des Auges, die zu Erblindung führen kann.

2. Kenntnisstand

Im folgenden Kapitel sollen zunächst die Wirkungsweise sowie der Metabolismus von antiviral aktiven Nucleosidanaloga erläutert werden.

2.1 Wirkungsweise antiviral aktiver Nucleosidanaloga

Zur Weitergabe der genetischen Information eines Retrovirus muß eine DNA-Kopie des RNA-Genoms erstellt werden. Die Übersetzung wird durch die Reverse Transkriptase katalysiert. Dieses Enzym benötigt einzelsträngige RNA als Matrize. Ausgehend von einer kurzen Startsequenz (Primer) synthetisiert das Enzym an dieser Vorlage den komplementären DNA-Strang. Das Produkt ist ein RNA/DNA-Hybrid. Als Substrate der Reversen Transkriptase dienen die Triphosphate der vier Bausteine der DNA, 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxythymidin (dT) sowie 2'-Desoxycytidin (dC). Beim Aufbau des DNA-Stranges wird zunächst durch spezifische Basenpaarung das zur jeweiligen Base des Matrizenstranges komplementäre Nucleosidtriphosphat gebunden. Danach greift die 3'-Hydroxylgruppe des zuletzt eingebauten Bausteins nucleophil den α -Phosphatrest des nächsten Triphosphats an. Es kommt zur Knüpfung einer neuen Phosphatdiesterbrücke unter Austritt von Pyrophosphat (Abb. 5). Nach Verschieben des aktiven Zentrums des Enzyms zur nächsten Base auf der Matrizen-RNA wiederholen sich diese Schritte. Die Reverse Transkriptase ist somit eine 5' \rightarrow 3'-Polymerase.^[6]



Abb. 5 Schematische Darstellung der reversen Transkription

Die Replikation der viralen DNA bei DNA-Viren verläuft nach einem sehr ähnlichen Mechanismus wie oben für die Reverse Transkriptase beschrieben. Die Reaktion wird durch eine Virus-codierte DNA-Polymerase katalysiert. Als Matrize dient in diesem Fall die virale DNA.

Im Gegensatz zu humanen DNA-Polymerasen, verfügt die virale RT nicht über ein "Proof-Reading-System", welches in den DNA-Strang eingebaute, fehlgepaarte Nucleotide erkennt und eliminiert.^[11] Antiviral aktive Nucleosidanaloga werden, in Form ihrer Triphosphate, von der Reversen Transkriptase somit nicht als Fremdkörper erkannt, und in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut. Nach dem Einbau gibt es für das Enzym nun keinerlei Möglichkeit mehr, das falsche Nucleotid herauszuschneiden und es kommt zum Abbruch der DNA-Synthese.^[12]

In den Fällen, in denen das Nucleosidanalogon keine weitere freie Hydroxylgruppe trägt, genügt ein einfacher Einbau in die DNA, um einen Kettenabbruch zu verursachen. Dies gilt beispielsweise für die anti-HIV aktiven Wirkstoffe AZT **1**, d4T **2** und PMEA **11**^[13] sowie für den anti-Herpesvirus Wirkstoff ACV **7**. Es sind jedoch eine Reihe antiviral aktiver Nucleosidanaloga bekannt, die noch eine freie Hydroxylgruppe tragen. Dies sind in der Regel acyclische Nucleosidanaloga, die entweder als kompetitive Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase agieren, oder aufgrund ihres modifizierten Rückgrates Konformationsänderungen im neu gebildeten DNA-Strang verursachen und so einen Kettenabbruch erzwingen. Dies gilt insbesondere für den mehrfachen Einbau. So konnte gezeigt werden, daß für die Unterdrückung der viralen DNA-Synthese ein aufeinanderfolgender Einbau von zwei HPMPC-Molekülen notwendig ist.^[14]

2.2 Aktivierung der Nucleoside

Die Nucleotide gehören zu den komplexesten Metaboliten im Organismus. Ihre Biosynthese ist langwierig und mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Neben der Neusynthese von Nucleosiden (*de novo* Synthese) hat sich daher ein Syntheseweg unter Wiederverwertung von DNA-Abbauprodukten herausgebildet (*salvage pathway*). Dieser Syntheseweg spielt für die Purinbasen Adenin und Guanin eine große Rolle. Im tierischen Organismus werden sie bis zu ca. 90 % durch Glycosylierung mit 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) wieder zu Nucleosidmonophosphaten aufgebaut. Der Anteil der wiederverwerteten Pyrimidinbasen ist sehr viel geringer.

Für beide Synthesewege sind Phosphotransferasen von großer Bedeutung. Diese Enzyme übertragen einen Phosphatrest von einem hochenergetischen Donormolekül, in der Regel ATP, auf Nucleosid- oder Nucleotidakzeptoren. Die Phosphotransferasen werden nach ihrer Spezifität für den Phosphorylgruppenakzeptor eingeteilt. Ist der Akzeptor ein Nucleosid, heißt die entsprechende Kinase Nucleosidkinase; bei einem Nucleosidmonophosphat vermittelt eine Nucleosidmonophosphatkinase (NMP-Kinase) und bei einem Nucleosiddiphosphat eine Nucleosiddiphosphatkinase (NDP-Kinase) die Reaktion.



Abb. 6 Phosphorylierungsschritte vom Nucleosid zum Nucleosidtriphosphat

Die hohe Spezifität der Nucleosid- und NMP-Kinase kommt in ihren Namen zum Ausdruck: Der Metabolit, der als Phosphorylgruppenakzeptor dient, wird dem Namen der Kinase als Präfix vorangestellt. Die Kinase, die 2'-Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) als Substrat akzeptiert, heißt daher dTMP-Kinase oder auch Thymidylatkinase (TmpK). NDP-Kinasen sind in der Wahl ihrer Substrate weit weniger spezifisch.^[15]

Wie bei den natürlichen Nucleosiden sind bei den antiviral aktiven Nucleosidanaloga die aktiven Metaboliten nicht die Nucleoside selbst, sondern die entsprechenden Triphosphate, die erst in der Zelle selbst gebildet werden müssen.^[8, 16, 17] Als Ausgangsverbindungen eignen sich in erster Linie die Nucleosidanaloga selbst, da für die Diffusion durch die unpolare Zellmembran eine Ladung des Moleküls sehr unvorteilhaft ist.^[18] Antiviral aktive Nucleosidanaloga sind somit im strengen Sinne keine Wirkstoffe sondern lediglich Wirkstoffvorstufen (engl.: prodrug). Die Aktivierung läuft im Falle von anti-HIV aktiven Substanzen über das gleiche enzymatische System, das auch die natürlichen Bausteine als Substrate verwendet.^[19, 20]

Die antivirale Aktivität und Selektivität von Acyclovir 7, Penciclovir 8, Ganciclovir 9 und verwandten Verbindungen beruht dagegen auf ihrer spezifischen Aktivierung durch Herpesvirus-codierte Kinasen, die diese Nucleosidanaloga in die entsprechenden Monophosphate umwandeln.^[21] Die durch das Herpes Simplex Virus (HSV) oder das Varizella Zoster Virus (VZV) codierte Thymidinkinase (TK) hat eine breite Substratspezifität, so daß sogar Purinderivate wie ACV 7 und GCV 9 als Substrate akzeptiert werden. Die weiteren Phosphorylierungsschritte werden dann wieder von zellulären Kinasen katalysiert.^[22] Es sollte erwähnt werden, daß im Falle von Pyrimidin-haltigen Nucleosidanaloga wie

BVDU **13** auch die Phosphorylierung vom Monophosphat zum Diphosphat von der HSVbzw. VZV-codierten Thymidinkinase katalysiert wird.^[23]

Acyclische Nucleosidphosphonate können als Nucleosidanaloga angesehen werden, die durch eine Phosphonatgruppe verlängert wurden. Die Phosphonatgruppe ist einer Phosphatgruppe äquivalent, kann jedoch im Gegensatz zu letzterer nicht mehr durch Esterasen, die Nucleosidmonophosphate in die Nucleoside zurück überführen, gespalten werden.^[7] Die aktiven Metaboliten der Nucleosidphosphonate sind deren Diphosphate,^[24] die bei den Adenin-haltigen Phosphonaten durch aufeinanderfolgende Phosphorylierung durch Adenylatkinase (AmpK) gebildet werden. Die Phosphonatdiphosphate können auch direkt aus den Phosphonaten durch 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphatsynthetase (PRPP-Synthetase) gebildet werden.^[25]

2.3 Limitierungen beim Einsatz von nucleosidischen Wirkstoffen

Bei der Gabe von nucleosidischen Wirkstoffen tritt eine Reihe von Problemen auf. Langzeittherapien mit Gabe von Nucleosidanaloga wie AZT **1** haben zu einer verminderten Aktivität des ersten phosphorylierenden Enzyms, der Thymidinkinase und damit zum Aufbau von Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff geführt.^[26] Diese Art von Resistenz beobachtet man nicht nur im Gewebe von Patienten, die Nucleosidanaloga erhalten, sondern auch in Viren selbst.^[27] So sind vom HI-Virus Thymidinkinase-defiziente (TK⁻) Virusstämme bekannt. Hinzu kommt, daß die Substratspezifität der phosphorylierenden Enzyme und die strukturellen Unterschiede der Nucleosidanaloga eine durchgehende Umsetzung zu den entsprechenden Triphosphaten unterbinden. Diese Beobachtung wurde beispielsweise für die Nucleosidanaloga AZT **1**, d4T **2** sowie ddA gemacht.^[18]

Durch die Abhängigkeit von der Aktivierung durch die virale Thymidinkinase wird die Anwendung von acyclischen Nucleosidanaloga wie ACV 7, PCV 8 und GCV 9 als antiviral aktive Substanzen auf Viren wie HSV und VZV beschränkt, da nur diese Viren eine eigene Thymidinkinase mit breiter Substratspezifität codieren.

Ein weiteres Problem tritt bei acyclischen Nucleosidanaloga und insbesondere bei Nucleosidphosphonaten auf: Sie besitzen eine schlechte Bioverfügbarkeit aufgrund ihrer Polarität.^[28] Insbesondere die Nucleosidphosphonate werden nicht passiv die lipophile Zellmembran durchdringen können, da sie in physiologischem Medium (pH = 6.9 - 7.4) deprotoniert vorliegen.^[29, 30] Diese Verbindungen werden vermutlich durch einen langsam verlaufenden aktiven Prozeß wie z.B. Endocytose^[30] von der Zelle aufgenommen.

2.4 Das Pro-Nucleotid-Konzept

Wie in Kapitel 2.3 erwähnt, kann ein Nucleosidanalogon seine potentielle Wirksamkeit aufgrund von Resistenzbildung, nicht vorhandener TK oder mangelnder Bioaktivierung verlieren, obwohl der aktive Metabolit, das Triphosphat, ein sehr guter Inhibitor des Zielenzyms ist.

Liegt die Limitierung wie im Fall von d4T **2** am Anfang der Phosphorylierungskaskade, so liegt es nahe zu versuchen, der Zelle direkt das Nucleosidmonophosphat anzubieten. Wie schon erwähnt, könnten diese Substanzen aufgrund ihrer Ladung die Zellmembran nicht durchdringen. Darüber hinaus werden derartige Verbindungen im Blut durch Nucleotidasen und nichtspezifische Phosphatasen schnell dephosphoryliert, was ihre Verfügbarkeit für den Organismus stark einschränkt.^[31] Schon 1961 schlug MONTGOMERY vor,^[32] daß "diese Schwierigkeiten überwunden werden könnten, wenn es gelänge, einen Ester des Nucleotids darzustellen, der die Zellmembran penetrieren könnte und anschließend zum Nucleotid selbst metabolisiert würde." Abbildung 7 zeigt schematisch die selektive Freisetzung von d4TMP aus einem Nucleotid-Vorläufer (Pro-Nucleotid) und damit die Umgehung des limitierenden Schrittes der Bioaktivierung (TK-Bypass).



Abb. 7 Schematische Darstellung des TK-Bypasses

In Nucleotiden sind unter physiologischen Bedingungen zwei negativ geladene Sauerstoffatome anwesend. Diese müssen maskiert und in neutrale, lipophile Phosphatester überführt werden (Abb. 8).





Vom Nucleotid zum Pro-Nucleotid

Neben der Erhöhung der Lipophilie erfordert die effiziente intrazelluläre Freisetzung des Nucleotids einen selektiven Freisetzungsmechanismus unter Abspaltung einer nicht toxischen Maske. In der Folge wurden eine Reihe von Pro-Nucleotid-Systemen entwickelt.^[18, 27, 33]

Erste Versuche mit Dialkylphosphatestern stellten sich als nicht erfolgreich heraus, da nach der ersten Hydrolyse der neutralen Phosphattriester die resultierenden Phosphatdiester häufig extrem persistent gegenüber einer weiteren chemischen Hydrolyse sowie einer enzymatischen Spaltung waren. Daher konnte das Nucleotid nicht freigesetzt werden.

Neuere dreiteilige Prodrug-Systeme^[34] basieren auf dem Prinzip einer selektiven chemischen oder enzymatischen Aktivierung der maskierenden Gruppe, gefolgt von der Freisetzung des Nucleotids durch eine zweite spontane Reaktion. Als Beispiele für enzymatisch gesteuerte Pro-Nucleotid-Systeme seien genannt:

- Bis-(POM)-Nucleotide [Bis-(Pivaloyloxymethyl)-]^[35, 36,]
- Bis-(POC)-Nucleotide [Bis-(*iso*-Propyloxycarbonyloxymethyl)-]^[37]
- Bis-(DTE)-Nucleotide [Bis-(Dithioethyl)-]^[38]
- Bis-(SATE)-Nucleotide [Bis-(S-Acyl-2-thioethyl)-]^[39, 40, 41]
- Bis-(SGTE)-Nucleotide [Bis-(*S*-(β-Glucopyranosidyl)-2-thioethyl)-]^[42]
- Bis-(AB)-Nucleotide [Bis-(4-Acyloxybenzyl)-]^[43, 44]
- APA-Nucleotide [Arylphosphoramidat-]^[45, 46, 47]
- Phosphoramidatnucleosidmonoester^[48]
- Phosphoramidatnucleosiddiester^[49, 50]

Diese Pro-Nucleotid-Systeme konnten erfolgreich auf eine Vielzahl von Nucleosidanaloga angewandt werden. Es konnte gezeigt werden, daß alle Strategien über eine enzymatische Aktivierung erfolgreich intrazellulär die entsprechenden Nucleotide freisetzen und damit die antivirale Aktivität zum Teil deutlich steigern konnten.

Die Motivation für die Anwendung eines Pro-Nucleotid-Systems auf die acyclischen Nucleosidphosphonate ist eine andere, als die für Nucleosidanaloga beschriebene. Während bei letzteren ein geschwindigkeitsbestimmender Aktivierungsschritt umgangen werden soll, so müssen bei den Nucleosidphosphonaten die beiden unter physiologischen Bedingungen vorherrschenden negativen Ladungen kompensiert werden. Damit soll ein passiver, und damit schnellerer Membrantransport und eine höhere Aktivität erreicht werden. Von den oben beschriebenen Pro-Nucleotid-Systemen konnten einige auf Nucleosidphosphonate übertragen werden (Abb. 9, S. 11).



Bis-(AB)-PMEA 16

Bis-(SATE)-PMEA 17

Abb. 9 Prodrugs der Nucleosidphosphonate PMEA 11 und PMPA 12

Die von STARRET et al. entwickelte Verbindung Bis-(POM)-PMEA (Adefovir Dipivoxil, Hepsera[®]) 14^[51, 52] zeigt hohe Aktivität gegen das HI-Virus sowie das Hepatitis B Virus. Die weitere Entwicklung als anti-HIV Medikament wurde jedoch Ende 1999 aufgrund von Toxizitätsproblemen eingestellt. Klinische Studien zeigten, daß mehr als ein Drittel der Personen, die die höchste Dosis für mehr als sechs Monate erhielten, Symptome schwerer Nierenschäden entwickelten.^[53] Die Food and Drug Administration (FDA) in den USA erteilte Adefovir Dipivoxil im September 2002 die Zulassung als anti-HBV Medikament.^[54] Die eng verwandte Verbindung Bis-(POC)-PMPA (Tenofovir Disoproxil, Viread[®]) 15^[55] erhielt als Fumarsäuresalz im Oktober 2001 die Zulassung zur Behandlung von HIV-Infektionen.

Neben diesen, in ihrer Entwicklung als Medikament abgeschlossenen oder weit fortgeschrittenen Verbindungen wurden weiterhin Bis-(AB)-PMEA-Prodrugs **16**^[56] sowie die Bis-(SATE)-PMEA-Prodrugs **17**^[57] dargestellt. Diese Prodrugs zeigten gute anti-HSV bzw. anti-HIV-Aktivitäten.

All diese Pro-Nucleotide durchlaufen einen ähnlichen Abbauweg: Am Rande der Maske wird von einem Enzym, genauer einer Esterase, ein Carbonsäureester gespalten, wodurch die Maske aktiviert wird. Durch diese Aktivierung erfolgt die spontane Abspaltung des Rests der Maske unter Spaltung eines Phosphatesters. Dieser Spaltmechanismus muß zweimal durchlaufen werden. Das hat den Nachteil, daß bei der zweiten Reaktion eine enzymatische Reaktion in räumlicher Nähe zu einer negativen Ladung stattfinden muß. Dadurch kann der intermediäre Phosphatdiester an Substrataffinität zur Carboxyesterase verlieren. Weiterhin haben die Pro-Nucleotid-Systeme den Nachteil, daß zum Teil mehrere Äquivalente von potentiell toxischen Produkten wie Formaldehyd oder Episulfid freigesetzt werden.

Einen anderen, wenn auch ebenfalls enzymatisch induzierten, Abbauweg nehmen die unlängst von McGUIGAN et al. dargestellten Arylphosphoramidat-Prodrugs^[58] von PMEA **11** und PMPA **12** (Abb. 10).



Abb. 10 Phosphoramidatprodrugs acyclischer Nucleosidphosphonate

Die Phosphoramidat-Verbindungen **18** und **19** zeigten eine gute anti-HIV Aktivität und den gleichen Abbauweg wie die APA-Nucleotide.

Allen bislang vorgestellten Pro-Nucleotid-Systemen ist gemeinsam, daß sie zur Freisetzung des Nucleotids einer enzymatischen Aktivierung bedürfen. Dadurch sind diese Systeme auf Zellen beschränkt, die das entsprechende Enzym enthalten. Die notwendige enzymatische Aktivierung ist zudem eine mögliche Quelle für Resistenzbildung.

2.5 Das *cyclo*Sal-Konzept

Um die bei den im vorigen Kapitel genannten Pro-Nucleotid-Systemen notwendige enzymatische Aktivierung zu umgehen, wurde 1996 von MEIER et al. ein neuartiges Pro-Nucleotid-System entworfen und synthetisiert: die *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphate (*cyclo*Sal-NMPs)^[59], deren allgemeine Struktur in Abbildung 11 dargestellt ist.



Abb. 11 Allgemeine Struktur der cycloSaligenyl-Nucleotide

Der hochselektive Freisetzungsmechanismus beruht auf einer pH abhängigen chemischen Reaktion, der ein selektiver Kaskadenmechanismus zugrunde liegt.^[59] Dabei ist die Kombination zweier Hydrolyseschritte von entscheidender Bedeutung, da die chemische^[60] und häufig auch die enzymatische^[61] Hydrolyse der intermediär gebildeten Phosphatdiester große Schwierigkeiten bereitet. Durch die Einführung der unterschiedlich stabilen Phenyl-^[62], Benzyl-^[63] und Alkyl-Phosphatester in der *cvclo*Sal-Grundstruktur gelingt es jedoch, chemisch zwischen den einzelnen Phosphatesterbindungen zu diskriminieren und so eine kontrollierte Hydrolyse des Pro-Nucleotid-Systems zu ermöglichen. Es konnte dagegen gezeigt werden, daß Bis-Phenyl-^[62] und Bis-Benzylphosphattriester^[63] lediglich zu den Phenyl- bzw. Benzylphosphatdiestern hydrolysieren. Der Grund hierfür liegt in der negativen Ladung am Phosphoratom, die einen weiteren nucleophilen Angriff unterbindet. Beide Hydrolysen zeigen eine Abhängigkeit vom Substitutionsmuster am aromatischen Ring: während Elektronen-ziehende Gruppen Bis-Phenylphosphattriester labilisieren,^[62] nimmt die Stabilität von Bis-Benzylphosphattriestern mit steigender Donorstärke der Substituenten ab.^[63] Die Mechanismen der Hydrolyse unterscheiden sich grundlegend. Im Fall der Bis-Phenylphosphattriester erfolgt ein nucleophiler Angriff auf das Phosphoratom, gefolgt von der Spaltung der P-O_{Phenvl}-Bindung. Die Hydrolyse der elektronenreichen Bis-Benzylphosphattriester wird dagegen von einem spontanen C_{Benzyl}-O-Bindungsbruch eingeleitet. Das resultierende Benzylkation wird von Wasser zum Benzylalkohol abgefangen. Kombiniert man jetzt beide Hydrolysemechanismen, so erklärt sich der hochselektive Freisetzungsmechanismus der cycloSal-NMPs (Abb. 12).



Abb. 12 *Hydrolyseweg von cycloSal-Phosphattriestern*

Die Freisetzung des Nucleotids aus dem Phosphattriester 20 wird durch eine hydrolytische Spaltung der phenylischen Phosphatesterbindung eingeleitet. Diese Bindung sollte die labilste sein, da nach ihrer Spaltung die negative Ladung im 2-Hydroxybenzylphosphatdiester 21 am besten Mesomerie-stabilisiert werden kann. Der alternative Bruch der Benzylesterbindung in 20 2-Hydroxymethylphenylphosphatdiester **22** ist unwahrscheinlich, zum da der Phosphatester als schwacher Elektronendonor in ortho-Position zum Benzvlester diese Bindung nicht labilisiert. Der schwache Elektronendonor Phosphatester in 20 wird jedoch zu einem starken Donor in 21. Dieser Effekt aktiviert den Rest der Maske und führt zu einem spontanen Bruch der C_{Benzvl}-O-Bindung, der das Nucleotid 23 sowie, nach Reaktion mit Wasser, den Salicylalkohol 24 liefert. Der genaue Hydrolysemechanismus konnte mit Hilfe von NMR-Spektroskopie (¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMR)^[64] und Massenspektrometrie aufgeklärt werden.

Das *cyclo*Sal-Pro-Nucleotid-Konzept wurde erfolgreich auf das anti-HIV aktive Nucleosid d4T **2** für den TK-Bypass angewandt werden.^[64, 65] Einige Verbindungen zeigten in Wildtyp-Zelllinien sogar eine höhere Aktivität als d4T **2** selbst. Ein überzeugender Befund ist die Beibehaltung der biologischen Aktivität der meisten *cyclo*Sal-d4TMPs in Thymidinkinase-defizienten CEM Zellen. Diese Aktivität läßt stark auf die intrazelluläre Freisetzung von d4TMP schließen. Die selektive intrazelluläre Freisetzung von d4TMP konnte durch Tritiummarkierte *cyclo*Sal-Nucleotide bewiesen werden.^[66, 67]

Ferner wurde mit dem *cyclo*Sal-Konzept erfolgreich der Adenosin-Desaminase (ADA)-Bypass für die Nucleosidanaloga ddA,^[68] d4A^[69] und 2'-F-*ara*-ddA^[70] realisiert. Mit Hilfe des *cyclo*Sal-Konzeptes konnte sogar das inaktive Nucleosidanalogon 2'-F-*ribo*-ddA in eine anti-HIV aktive Verbindung überführt werden.^[71]

Auch auf einige anti-Herpesvirus aktive Nucleosidanaloga wie ACV 7 konnte das *cyclo*Sal-Konzept erfolgreich übertragen werden.^[72, 73] Durch den Einsatz von *cyclo*Sal-BVDUMPs konnten die Anwendungsmöglichkeiten des Nucleosidanalogons drastisch erweitert werden. Während BVDU selbst gegen das Epstein-Barr-Virus (EBV) inaktiv ist, zeigen die entsprechenden *cyclo*Sal-Phosphattriester eine sehr gute Aktivität gegen das Virus.^[74, 75]

Es ist bisher nicht gelungen, das *cyclo*Sal-Konzept auf Nucleosidphosphonate zu übertragen.^[76] Der Versuch, das erfolgreiche *cyclo*Sal-Konzept auf antiviral aktive Nucleosidphosphonate zu übertragen, soll ein Gegenstand dieser Arbeit sein.
2.6 Der Metabolismus von AZT

Die Gabe von AZT **1** an HIV positive Patienten über einen längeren Zeitraum führt zu einer eingeschränkten Aktivität der Thymidinkinase und damit zur Resistenz gegenüber dem Medikament (vgl. Kapitel 2.3). Daher liegt es nahe, Pro-Nucleotid-Konzepte auf AZT **1** anzuwenden. Neben anderen konnte dies für das *cyclo*Sal-Konzept verwirklicht werden. Dabei konnte eine selektive Freisetzung von AZTMP aus den Pro-Nucleotiden nach dem im vorigen Kapitel beschriebenen Mechanismus beobachtet werden.^[77] Die antivirale Aktivität der *cyclo*Sal-Phosphattriester entsprach der von AZT **1**. Es wurde darüber hinaus ein Verlust der antiviralen Aktivität in Thymidinkinase-defizienten CEM Lymphozytenzellen beobachtet, obwohl AZTMP intrazellulär freigesetzt wurde. Ein Grund für das Versagen wurde in dem speziellen Metabolismus von AZT **1** gefunden (Abb. 13).^[67]



Abb. 13 Metabolismus von AZT 1 und cycloSal-AZTMP 25 in CEM/0 Zellen

AZT **1** ist ein gutes Substrat für die zelluläre Thymidinkinase und wird von dieser schnell in das Monophosphat **26** überführt (Abb. 13). Dieses ist jedoch ein schlechtes Substrat für das nachfolgende Enzym, die Thymidylatkinase (TmpK).^[8, 19] Daraus resultiert eine langsame Bildung des Diphosphates **27** sowie eine intrazelluläre Akkumulation von AZTMP **26**. AZTDP **24** wird von Nucleosiddiphosphatkinasen rasch in den aktiven Metaboliten AZTTP **28** überführt, der jedoch intrazellulär nur in geringen Dosen vorhanden ist.^[78] Das Akkumulieren von AZTMP **26** legt den Schluß nahe, daß der Anabolismus von AZT **1** zu AZTMP **26** durch cytosolische TK deutlich schneller verläuft als der Katabolismus von AZTMP **26** zu AZT **1** durch 5'-Nucleotidasen.^[67]

Der Versuch, die schlechte Aktivierung von AZT 1 durch Verabreichung höherer Dosen auszugleichen, führte ebenfalls nicht zu einer höheren intrazullulären AZTTP-Konzentration. Kinetische Daten, die aus Untersuchungen mit *S. cerevisiea*-Thymidylatkinase (Hefe-Thymidylatkinase) gewonnen wurden, belegen, daß AZTMP 26 durch Bindung auf der Phosphoryldonorseite des Enzyms die Kinaseaktivität inhibiert.^[79] Dadurch wird ebenfalls die dTTP-Synthese, die für den DNA-Aufbau entscheidend ist, eingeschränkt. Dies könnte neben

der Reduktion von AZT **1** in das cytotoxische 3'-Aminothymidin^[80] ein möglicher Grund für die Toxizität von AZT **1** und die damit verbundenen ernsthaften Nebenwirkungen, wie eine Störung der Reifung von Blutstammzellen besonders im späten Stadium der Krankheit sein.^[81]

Die Limitierung im Metabolismus zeigt auch, warum die antivirale Aktivität durch *cyclo*Sal-AZTMP Derivate **25** nicht verbessert werden konnte. Zwar setzen diese selektiv intrazellulär AZTMP **26** frei, jedoch wird der limitierende Schritt im Metabolismus nicht umgangen. Dies erklärt jedoch noch nicht den Verlust an antiviraler Aktivität in TK-defizienten Zellen (Abb. 14).

in CEM/TK⁻ Zellen



Abb. 14 Metabolismus von AZT 1 und cycloSal-AZTMP 25 in CEM/TK⁻ Zellen

Nach der Freisetzung vom AZTMP **26** in TK⁻ Zellen, wird dieses durch die TmpK nur sehr langsam in AZTDP **27** phosphoryliert. Jedoch ist AZTMP **26** ein Substrat für eine 3',5'-(Desoxy)-Nucleotidase, die es zu AZT **1** dephosphoryliert. AZT **1** kann nun aufgrund der nicht vorhandenen Thymidinkinase nicht wieder rephosphoryliert werden und somit auch seine antivirale Aktivität nicht mehr entfalten. In dieser Hinsicht ist AZT **1** möglicherweise nicht das einzige Nucleosidanalogon, dessen metabolische Aktivierung auf der Stufe der Thymidylatkinase gehemmt ist. Die Mehrzahl von Nucleosidanaloga wurde bislang noch nicht eingehend hinsichtlich ihres exakten Metabolismus untersucht.

2.7 Die Thymidylatkinase

Für den intrazellulären Anabolismus von Nucleosidanaloga kommt dem Verständnis der Thymidylatkinasereaktion eine besondere Bedeutung zu. Nachfolgend sollen einige kinetische und strukturelle Eigenschaften der Thymidylatkinase erläutert werden.

Die Thymidylatkinase (TmpK) katalysiert die Phosphorylierung von 2'-Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) zu 2'-Desoxythymidindiphosphat (dTDP) mit Magnesium-Adenosintriphosphat (MgATP) als bevorzugtem Phosphoryldonor (Abb. 15).^[82]

TmpK

MgATP + dTMP _____ MgADP + dTDP

Abb. 15 Die Thymidylatkinasereaktion

Für die Adenylatkinase (Myokinase, AmpK) wurde ein Substratmechanismus abgeleitet,^[83, 84] der als *random bi-bi* Mechanismus bezeichnet wird (Abb. 16).

Das Enzym muß zwei Bindungsstellen besitzen, weil zwei Substrate gleichzeitig gebunden sind. Die Bindung und Freisetzung der Substrate bzw. Produkte unterliegt keiner bestimmten Reihenfolge. Sind beide Substrate gebunden, so wird die Phosphorylgruppe direkt zwischen den Nucleotiden übertragen. Ein Phosphoenzymintermediat tritt aufgrund der beobachteten stereochemischen Inversion (*Walden'sche Umkehr*) nicht auf.^[85]



Abb. 16 Schematische Darstellung des random bi-bi Mechanismus

Der Thymidylatkinasereaktion kommt in der menschlichen Zelle eine besondere Bedeutung zu. Dieses Enzym ist an der Verbindungsstelle der beiden Synthesewege für 2'-Desoxythymidintriphosphat lokalisiert. Die Ausgangspunkte für diese Synthesewege sind 2'-Desoxyuridinmonophosphat (*de novo*) oder 2'-Desoxythymidin (*salvage*). Das erste gemeinsame Intermediat ist dTMP. TmpK ist somit essentiell für die DNA-Synthese.^[86]

Die Tertiärstruktur der Thymidylatkinase besteht aus fünf parallelen β -Faltblättern, die eine Art Höhle bilden, die wiederum von α -Helices umgeben ist. Das Nucleotid wird in einer Tasche gebunden, so daß die Nucleobase vollständig von Aminosäuren des Enzyms umgeben ist. Die Bindungsstelle des Phosphoryldonors liegt in einer Schleife der β -Faltblattregion, die auch als P-Loop bezeichnet wird. Sie besteht aus einer Aminosäuresequenz, die häufig in ATP- und GTP-bindenden Proteinen anzutreffen ist.^[87] Die Bindung der Substrate führt zu Konformationsänderungen der Thymidylatkinase,^[88] bei denen sich die Aminosäuren aus der "Lid"-Region wie ein Deckel über das Triphosphat legen. Hierbei werden katalytisch wirksame Reste in das aktive Zentrum geschoben und der Phosphoryltransfer ermöglicht.^[89] Durch diesen, als *induced fit* bezeichneten, Mechanismus wird zugleich die Hydrolyse des Phosphoryldonors verhindert.^[90] Sind keine Substrate gebunden, so ist das Enzym inaktiv und man spricht von der offenen Konformation. Durch Bindung der Substrate wird das Enzym aktiv und geht in die geschlossene Konformation über, aus der heraus der Phosphoryltransfer erfolgt.^[91]

Enzym-kinetische Untersuchungen konnten zeigen, daß die schlechte Aktivierung von AZTMP **26** nicht durch die schlechten Bindungseigenschaften des Nucleotidanalogons an die Thymidylatkinase zu erklären ist. Sie wird vielmehr durch eine Störung des katalytischen Mechanismus bei der Phosphorylgruppenübertragung von ATP auf AZTMP **26** verursacht.^[79]

Die kristallographische Analyse eines Komplexes aus humaner Thymidylatkinase, AZTMP **26** sowie einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon lieferte die strukturelle Erklärung für die gefundenen kinetischen Befunde. In diesem Komplex ist die P-Loop Region aufgrund einer starken Wechselwirkung zwischen einem Aspartat-Rest des P-Loop und der 3'-Azidgruppe um 50 pm gegenüber ihrer Position im Komplex mit dTMP verschoben (Abb. 17).



Abb. 17 Aktives Zentrum der TmpK mit AZTMP bzw. dTMP als Substrat

Diese Verschiebung erschwert den strukturellen Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation, wodurch der Übergangszustand der

Phosphorylgruppenübertragung nicht ausreichend stabilisiert wird. Die hiermit verbundene Aktivierungsenergie ist gleichbedeutend mit einer Verringerung der Übertragungsrate.^[92]

Als Lösungsansatz bieten sich zwei Strategien an. Zunächst ist es möglich, die Thymidinkinase so zu modifizieren, daß das Enzym AZTMP **26** besser als Substrat akzeptiert. Es konnten bereits Mutantenproteine dargestellt werden, die AZTMP **26** schneller phosphorylieren als das natürliche Substrat dTMP^[91]

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Analoga von AZT 1 zu synthetisieren und deren Monophosphate auf ihre Substrateigenschaften gegenüber der menschlichen Thymidylatkinase zu untersuchen, um daraus Rückschlüsse ziehen zu können, wie ein Nucleotidanalogon zu modifizieren ist, damit es von der TmpK als Substrat erkannt wird.

Computergestützte Rechnungen haben für Thymin-haltige Analoga der acyclischen Nucleoside PCV **8** und GCV **9** gute Bindungseigenschaften an TmpK vorausgesagt.^[92] Einige Analoga wie Azido-T-PCV **29** und T-GCV **30** (Abb. 18) sowie die entsprechenden Monophosphate konnten bereits in meiner Diplomarbeit^[93] dargestellt werden.



Abb. 18 Modifizierte acyclische Nucleosidanaloga

Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortführung dieser Arbeiten dar und soll einen Beitrag zum Verständnis der Thymidylatkinasereaktion leisten.

3. Aufgabenstellung

"Welche Faktoren beeinflussen die Eigenschaften von Nucleosidmonophosphaten? Untersuchungen zu den Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase"

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die strukturellen und elektronischen Parameter die die Substrateigenschaften von Nucleosidmonophosphaten gegenüber Thymidylatkinase beeinflussen, untersucht werden. Abbildung 19 zeigt die allgemeine Struktur der zu untersuchenden Nucleotidanaloga.



Abb. 19 Nucleotide als potentielle Substrate für die TmpK

Zur Klärung, ob die Substratakzeptanz von Nucleotiden lediglich auf sterischen Effekten beruht, oder ob ebenfalls elektronische Effekte involviert sind, sollte zunächst eine Serie von Nucleotidanaloga **33** synthetisiert werden, die Substituenten in der 3'-Position tragen, die der Azidgruppe in AZTMP **23** eng verwandt oder isoelektronisch zu ihr sind.

Um den Einfluß der Rigidität des Nucleosidrückgrates zu untersuchen, sollte eine Serie von thyminhaltigen Nucleotiden **31** dargestellt werden, die das Rückgrat des anti-Herpes Wirkstoffs Ganciclovir **9** besitzen. Ferner sollte untersucht werden, ob der Aminalsauerstoff an der Bindung des Nucleotids an das aktive Zentrum des Enzyms beteiligt ist. Der formale Ersatz des Sauerstoffatoms durch eine Methylengruppe führte zu Verbindungen **32** mit einem Rückgrat, welches sich von dem des anti-HSV Wirkstoffs Penciclovir **8** ableitet.

Die enzymkinetischen Daten der Nucleotidanaloga sollten in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. R. S. Goody sowie Herrn Dr. J. Reinstein vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund bestimmt werden.

Die Nucleotide sollten durch chemische Hydrolyse der entsprechenden *cyclo*Sal-Phosphattriester dargestellt werden. Die letzteren lassen sich aus den Nucleosiden nach der Chlorphosphit- bzw. Phosphoramidit-Methode synthetisieren. Nach vollständiger Charakterisierung sollte das Hydrolyseverhalten der *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate in Puffersystemen insbesondere auf einen etwaigen Einfluß des Substituenten in 3'-Position sowie des Rückgrates untersucht werden.

Zudem sollten die antivirale Aktivität der Nucleosidanaloga sowie deren Phosphattriester in Zusammenarbeit mit Prof. J. Balzarini von der Katholischen Universität Leuven, Belgien bestimmt werden.

Des Weiteren sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das *cyclo*Sal-Konzept auf die antiviral aktiven Nucleosidphosphonate PMEA **12**, PMPA **13** und HPMPC **14** übertragen werden (Abb. 20).



 $\begin{array}{ll} \mathsf{B} = \mathsf{Adenin}, & \mathsf{R} = \mathsf{H} & cyclo\mathsf{Sal}\text{-}\mathsf{PMEA} & \mathbf{34} \\ \mathsf{B} = \mathsf{Adenin}, & \mathsf{R} = \mathsf{CH}_3 & cyclo\mathsf{Sal}\text{-}\mathsf{PMPA} & \mathbf{35} \\ \mathsf{B} = \mathsf{Cytosin}, & \mathsf{R} = \mathsf{CH}_2\mathsf{OH} & cyclo\mathsf{Sal}\text{-}\mathsf{HPMPC} & \mathbf{36} \\ \end{array}$

Abb. 20 cycloSal-Nucleosidphosphonate

Aufgrund der vorhandenen P-C-Bindung in diesen Verbindungen, konnte der etablierte Syntheseweg mittels Phosphor(III)-Chemie nicht beschritten werden, sondern es mußten alternative Synthesemöglichkeiten gefunden werden.

Um die Eignung der *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate als Pro-Nucleotide nachzuweisen, sollten zunächst die Hydrolysehalbwertszeiten der Verbindungen mittels HPLC-Methoden bestimmt werden. Durch ³¹P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolysen sollten die Hydrolyseprodukte identifiziert werden. Nach Bestimmung der biophysikalischen Daten dieser Verbindungen sollten auch diese auf ihre antivirale Aktivität hin untersucht werden.

4. **Resultate und Diskussion**

4.1 Synthese der modifizierten Nucleosidmonophosphate **31-33**

Die Darstellung der modifizierten Nucleosidmonophosphate sollte aus den entsprechenden *cyclo*Sal-Phosphattriestern erfolgen, um deren Eignung als Synthesebausteine für Nucleotide zu belegen. Da sich die *cyclo*Sal-Phosphattriester aus den entsprechenden Nucleosiden nach der Chlorphosphit- bzw. Phosphoramiditmethode darstellen lassen, sollten zunächst die entsprechenden modifizierten Nucleoside dargestellt werden (Abb. 21).



Abb. 21 Synthesestrategie für die AZTMP-Analoga 31-33

Im folgenden sollen zunächst die Synthesen der modifizierten Nucleosidanaloga beschrieben werden.

4.1.1 Synthese von 1-[4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl]thymin (T-Penciclovir) 40

4.1.1.1 Synthesestrategie

Betrachtet man T-Penciclovir **40** retrosynthetisch, so sind verschiedene Syntheseansätze denkbar. Bisher konnten nur solche Ansätze verwirklicht werden, die die Nucleobase in einem späten Stadium der mehrstufigen Synthese einführen.^[93, 94] Aus der Literatur sind einige Synthesewege für Penciclovir **8** bekannt,^[95, 96] die sich prinzipiell auch auf die Synthese von T-Penciclovir (T-PCV) **40** übertragen lassen (Abb. 22, S. 23).



Abb. 22 Retrosynthese von T-Penciclovir 40

Für die Synthese über Weg A benötigt man fünf Reaktionsschritte. Zudem traten bei der Durchführung dieser Syntheseroute in der Diplomarbeit erhebliche Schwierigkeiten auf. So war die Einführung der acetalischen Schutzgruppe in das durch Reduktion von 1,1,2-Ethantricarbonsäuretriethylester **45** entstehende Triol **44** nur in einer mäßigen Ausbeute von 55% möglich. Dies ist auf die mangelnde Differenzierung zwischen den Hydroxylgruppen zurückzuführen. Ferner entstand bei der Einführung der Nucleobase nicht nur das gewünschte Intermediat **43**. Dieses war zu etwa 10% mit dem unerwünschte *N*-3-Isomer verunreinigt. Die Isomere ließen sich mit herkömmlichen chromatographischen Methoden nicht separieren.

Syntheseroute B, ausgehend von Methantricarbonsäuretriethylester **47** umgeht die Problematik der Differenzierung zwischen funktionellen Gruppen gleicher Reaktivität. Zudem sind für diese Syntheseroute abhängig von der Durchführung lediglich drei bzw. vier Reaktionsschritte notwendig. Es bleibt allerdings das Problem der selektiven Alkylierung von Thymin.

Die Darstellung von T-Penciclovir 40 geschah daher nach Syntheseroute B.

4.1.1.2 Darstellung von T-Penciclovir 40

Für die Synthese von T-Penciclovir **40** wurde von Methantricarbonsäuretriethylester **47** ausgegangen. Zunächst wurde mit Natriumethanolat das Natriumsalz des Triesters **47** generiert, welches mit 1,2-Dibromethan zu 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäuretriethylester **48** alkyliert wurde. Nach Kugelrohrdestillation konnte **48** in einer Ausbeute von 78% isoliert werden (Abb. 23).^[97]



Abb. 23 Synthese von T-Penciclovir 40

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine modifizierte Malonestersynthese. Die Einführung einer dritten Alkoxycarbonylgruppe ist notwendig, da bei der herkömmlichen Malonestersynthese mit 1,2-Dihalogenalkanen die entsprechenden Cyclopropane entstehen. Die dritte, als Schutzgruppe fungierende Alkoxycarbonylfunktion kann in einem späteren Stadium der Synthesesequenz durch ein Retro-Claisen-Reaktion wieder abgespalten werden. Die Reaktion von 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäuretriethylester **48** mit Thymin **49** in Gegenwart von Natriumhydrid in wasserfreiem *N*,*N*-Dimethylformamid bei 80 °C lieferte nach chromatographischer Aufarbeitung 2-Ethoxycarbonyl-2-[2-(1-thyminyl)ethyl]malonsäurediethylester **50** in einer Ausbeute von 38%. Die Verwendung von Lithiumhydrid anstelle von Natriumhydrid brachte keine Verbesserung der Ausbeute, Verbindung **50** konnte in einer Ausbeute von lediglich 35% isoliert werden. Zudem konnte beim Waschen der organischen Phase mit Wasser eine deutlich schlechtere Phasentrennung und damit erschwerte Aufarbeitung beobachtet werden.

Der Triethylester **50** wurde in der Retro-Claisen-Reaktion mit Natriummethanolat in Methanol behandelt. Nach Neutralisation mit saurem Ionentauscher und chromatographischer

Aufreinigung konnte der Dimethylester **46** in einer Ausbeute von 78% isoliert werden. Die abschließende Reduktion der beiden Methoxycarbonylgruppen zu T-Penciclovir **40** gelang mit Natriumborhydrid als Reduktionsmittel in Dichlormethan/Methanol in einer Ausbeute von ebenfalls 78%. T-Penciclovir **40** konnte demnach in einer Gesamtausbeute von 18% ausgehend von Methantricarbonsäuretriethylester **47** dargestellt werden. Gegenüber der früheren, fünfstufigen, Synthese^[93] mit einer Gesamtausbeute von 13% stellt dies allerdings nur eine moderate Verbesserung dar.

Die Ausbeute des Schlüsselschrittes der Synthesesequenz, der Alkylierung von Thymin **49** konnte jedoch durch Verwendung des Kaliumsalzes von Thymin^[98] und direkt anschließende Retro-Claisen-Reaktion verbessert werden (Abb. 24).



Abb. 24 Alkylierung von Thymin 49 mit 48 in Gegenwart von Kaliumcarbonat

Zur Generierung des Kaliumsalzes von Thymin wurde Thymin in trockenem Dimethylsulfoxid suspendiert und anschließend mit wasserfreiem Kaliumcarbonat versetzt. Nach Addition von 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäuretriethylester **48** wurde die Reaktionsmischung 16 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Der nach Abdestillieren des Dichlormethans resultierende Rückstand wurde direkt der Retro-Claisen-Reaktion mit Natriummethanolat in Methanol unterworfen. 2-[2-(1-Thyminyl)ethyl]malon-säuredimethylester **46** konnte nach chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 39% isoliert werden. Damit konnte die Gesamtausbeute über zwei isolierte Stufen ausgehend von Methantricarbonsäuretriethylester **47** auf 24% gesteigert werden.

Noch wichtiger als die Verbesserung der Ausbeute ist jedoch die Tatsache, daß bei allen hier beschriebenen Alkylierungen von Thymin **49** im Gegensatz zu früheren Arbeiten^[93, 99, 100] lediglich das gewünschte *N*-1-alkylierte Produkt isoliert werden konnte. Dies ist insbesondere bei der Verwendung des Kaliumsalzes bemerkenswert, da bei dieser Reaktionsführung in meiner Diplomarbeit^[93] neben dem gewünschten *N*-1-alkylierten Produkt auch die unerwünschte *N*-3-alkylierte sowie die *N*-1,3-dialkylierte Verbindung detektiert werden

konnten (Abb. 25, S. 26). Insbesondere die Entstehung des *N*-3-alkylierten Produktes war äußerst problematisch, da dieses vom gewünschten *N*-1-alkylierten Produkt mit herkömmlichen chromatographischen Methoden nicht abgetrennt werden konnte.



Abb. 25 Mögliche Alkylierungsprodukte von Thymin 49

Die Tatsache, daß bei der hier beschriebenen Reaktionsführung mit dem Kaliumsalz des Thymins kein dialkyliertes Produkt detektiert werden konnte, ist auf die Verwendung von Dimethylsulfoxid anstelle von *N*,*N*-Dimethylformamid zurückzuführen. Vermutlich erfolgt durch den Wechsel des Lösungsmittels eine Destabilisierung des Kaliumsalzes in der 3-Position von Thymin **49** selbst oder dem schon in der 1-Position alkylierten Produkt, so daß weder das *N*-3-alkylierte noch das dialkylierte Produkt entstehen.

4.1.2 Synthese von 1-[(2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]thymin (T-Ganciclovir) **30**

4.1.2.1 Synthesestrategie

T-Ganciclovir **30** konnte bereits früher in einer vierstufigen Synthese,^[93, 101] ausgehend von 1,3-Dichlor-2-propanol **53** dargestellt werden (Abb. 26, S. 27). Die Gesamtausbeute betrug 43%. Trotz dieser guten Ausbeute ist die Reaktion noch verbesserungswürdig. Zunächst erfordert diese Syntheseroute die Darstellung des Chlormethylethers **51**. Neben der hohen potentiellen Toxizität der Verbindung selbst ist für ihre Darstellung aus dem entsprechenden Alkohol neben dem krebserregenden Lösungsmittel 1,2-Dichlorethan der Einsatz von korrosivem Chlorwasserstoffgas notwendig. Dieses muß über einen Zeitraum von acht Stunden durch die Reaktionslösung geleitet werden. Eine Synthesestrategie, die den Einsatz dieser potentiell gefährlichen Substanzen vermeidet, wäre vorteilhaft. Ferner ließe sich womöglich die Ausbeute der Alkylierung von Thymin **49** verbessern, wenn statt des Chlormethylethers **51** der Acetoxymethylether **52** eingesetzt würde. Dieser läßt sich durch Lewissäuren aktivieren und somit könnte eine höhere Ausbeute erzielt werden.



Abb. 26 Retrosynthese von T-Ganciclovir 30

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Verbindung **52** wäre, daß zur abschließenden Darstellung von T-Ganciclovir **30** lediglich zwei Acetylgruppen abgespalten werden müßten. Diese lassen sich nicht nur unter milden Bedingungen abspalten, sondern sollten es außerdem prinzipiell möglich machen, durch selektive Abspaltung nur einer der beiden Acetylgruppen mit Hilfe von Enzymen einen Zugang zu enantiomerenreinen Derivaten von T-Ganciclovir **30** zu erlangen.^[102]

4.1.2.2 Darstellung von T-Ganciclovir **30**

Der Acetoxymethylether **52** läßt sich in drei Stufen aus 3-Chlor-1,2-propandiol **55** darstellen (Abb. 27).^[103, 104]



Abb. 27 Darstellung von 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan **56a** und 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan **56b**

Zur Darstellung von 4-(Chlormethyl)-1,3-dioxolan 54 wurde 3-Chlor-1,2-propandiol 55 mit para-Formaldehyd in Wasser in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure erhitzt. Das entstehende Acetal 54 wurde der Gleichgewichtsreaktion entzogen, indem es kontinuierlich azeotrop mit Wasser aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert wurde. Nach Abtrennen des Wassers ließ sich 4-(Chlormethyl)-1,3-dioxolan 54 nach Destillation im Vakuum in einer Ausbeute von 62% als farbloses Öl isolieren. Bei der nachfolgenden Öffnung des Acetals 54 unter lewissauren Bedingungen mit Zinkchlorid in Gegenwart von Essigsäure und entstanden die Essigsäureanhydrid, beiden isomeren Verbindungen 1-Chlor-2acetoxymethoxy-3-acetoxypropan 56a und 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan 56b im Verhältnis 3:1.^[103] Dieses Isomerenverhältnis ist auf den sterischen Einfluß der Chlormethylgruppe in 4-Position zurückzuführen. Der sterische Anspruch der Chlormethylgruppe läßt die Lewissäure bevorzugt an O-1 angreifen (Abb. 28). Ein Angriff der Lewissäure in dieser Position führt zum Bruch der C-2-O-3-Bindung und damit zur Bildung von Verbindung 56a. Diese Ringöffnung verläuft für 4-substituierte 1,3-Dioxolane mit geringerer Selektivität als für 4-substituierte 1,3-Dioxane, da die letzteren ein definiertes Energieminimum mit dem Substituenten in equatorialer Position besitzen und dann bevorzugt aus dieser Konformation reagieren.^[103]



Abb. 28 Lewissäure-katalysierte Öffnung des Acetals 54

FIELD et al. detektierten in ihrer Synthese von Ganciclovir **9** einen Unterschied der Retentionsfaktoren von **56a** und **56b** in Diethylether/Petrolether 1:1 von ca. 0.1.^[104] Nach diesen Angaben sollte es möglich sein, die Isomere **56a** und **56b** durch Säulenchromatographie voneinander zu trennen. Den Autoren gelang eine Trennung der Isomere jedoch lediglich mittels präparativer HPLC. Dünnschichtchromatographisch ließ sich in dem angegebenen Lösungsmittelgemisch keine Trennung der Isomere feststellen. Auch ein Versuch der säulenchromatographischen Trennung mit Diethylether/Petrolether 1:3 scheiterte.

Da eine Trennung mittels präparativer HPLC unter den angegebenen Bedingungen apparativ nicht möglich war, wurde zunächst die Synthesesequenz mit dem Isomerengemisch fortgesetzt und versucht, die Isomere in einem späteren Stadium der Synthese voneinander zu trennen.

1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan **56a** und 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan **56b** wurden in Gegenwart von wasserfreiem Kaliumacetat in *N*,*N*-Dimethylformamid zwei Stunden auf 150 °C erhitzt (Abb. 29). Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit Wasser und Extraktion mit Essigsäureethylester konnten 1,3-Diacetoxy-2acetoxymethoxypropan **52a** und 1,2-Diacetoxy-3-acetoxymethoxypropan **52b** in einer Rohausbeute von 76% isoliert werden. Das Rohprodukt konnte direkt für die weitere Umsetzung verwandt werden.



Abb. 29 Darstellung von T-Ganciclovir 30

Zunächst wurde Thymin **49** mit Hexamethyldisilazan (HMDS) unter Säurekatalyse (Ammoniumsulfat) intermediär in die disilylierte Verbindung **57** überführt. 2,4-Bis-*O*-(trimethylsilyl)thymin **57** wurde anschließend in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und das Elektrophil **52a/b** sowie eine katalytische Menge Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) zugegeben. Zur Aktivierung des Acetoxymethoxyethers **52a/b** wurde die starke

Lewissäure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) zugegeben und die Reaktionslösung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen der Reaktionslösung mit Dichlormethan und wäßriger Extraktion wurde der resultierende Rückstand am Chromatotron aufgereinigt.

1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin **58a** und 1-[2,3-Diacetoxypropyloxymethyl]thymin **58b** konnten in der sehr guten Ausbeute von 89% isoliert werden.

Wie schon in früheren Arbeiten^[93, 101] konnte auch in diesem Fall keinerlei Bildung des *N*-3alkylierten Produktes sowie des dialkylierten Produktes beobachtet werden. Dies ist auf die sterische Abschirmung des Stickstoffs in 3-Position durch die beiden Trimethylsilylgruppen zurückzuführen (Abb. 30).^[105]



57

58a/b

Abb. 30Postulierter Mechanismus der Alkylierung von Thymin über die disilylierteVerbindung 57

Nach Einführung der Nucleobase wurden 1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin **58a** und 1-[2,3-Diacetoxypropyloxymethyl]thymin **58b** in Methanol aufgenommen und mit einer katalytischen Menge an Natriumethanolat versetzt (Abb. 29, S. 29). Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach zwanzigstündigem Rühren konnte eine vollständige Abspaltung beider Acetylgruppen detektiert werden. Die Reaktionslösung wurde mit saurem Ionentauscher neutralisiert und vom Lösungsmittel befreit. Erste Versuche zur chromatographischen Aufreinigung des resultierenden Rückstands erlaubten zwar die Aufreinigung des Gemisches aus den Verbindungen 30 und 59, jedoch konnte keinerlei Anreicherung eines der beiden Isomere beobachtet werden. Da aus den Arbeiten zu meiner Diplomarbeit bekannt war, daß sich T-Ganciclovir 30 aus Ethanol umkristallisieren läßt, wurde in weiteren Versuchen direkt das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert. Nach einer ersten Umkristallisation konnte eine Anreicherung des Isomerenverhältnisses von Verbindung **30** zu Verbindung **59** von 3:1 auf 10:1 beobachtet werden. Nach einer weiteren Umkristallisation konnte T-Ganciclovir 30 isomerenrein erhalten werden. Die Ausbeute an isomerenreinem T-Ganciclovir 30 betrug 60%, bezogen auf die eingesetzte Mischung der

Verbindungen **58a** und **58b**. Bezogen auf die Menge an **58a** betrug die Ausbeute demnach 90%.



Abb. 311-[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]thymin (T-Ganciclovir) 30 und1-(2,3-Dihydroxy-propoxymethyl)thymin 59

Es wurde weiterhin versucht, 1-(2,3-Dihydroxypropoxymethyl)thymin **59** in isomerenreiner Form zu isolieren. Dazu wurde die Mutterlauge der Umkristallisation zur Trockene eingedampft und der Rückstand erneut aus Ethanol umkristallisiert. Das so erhaltene 1-(2,3-Dihydroxy-propoxymethyl)thymin **59** war jedoch noch mit T-Ganciclovir **30** verunreinigt. Auch eine weitere Umkristallisation aus Ethanol brachte keine Verbesserung der Reinheit, so daß 1-(2,3-Dihydroxy-propoxymethyl)thymin **59** nicht in isomerenreiner Form erhalten werden konnte.

T-Ganciclovir 30 konnte in einer Gesamtausbeute von 23% über fünf Stufen dargestellt werden. Durch Verwendung der Acetoxymethylether 52a/b als Elektrophil für die Alkylierung von Thymin 49 ließ sich die Ausbeute dieser Alkylierung auf 89% gegenüber 72% bei Verwendung des Chlormethylethers 51 steigern.^[93] Die Tatsache, daß bei der Darstellung der Acetoxymethylether 52a/b ein 3:1 Isomerengemisch entstand, verhinderte eine höhere Gesamtausbeute. Jedoch ließ sich das gewünschte Isomer auf der Stufe des freien Nucleosidanalogons 30 isomerenrein erhalten. Auch konnte durch diesen Syntheseweg die Verwendung bzw. Synthese potentiell gefährlicher Verbindungen wie dem Chlormethylether 51 vermieden werden.

Ein weiterer Vorteil der neuen Syntheseroute ließ sich ebenfalls nicht verwirklichen: Da das zweifach Acetyl-geschützte Nucleosidanalogon **58a** nicht in isomerenreiner Form erhalten werden konnte, konnte der Versuch einer stereoselektiven Abspaltung einer der beiden Acetylgruppen nicht unternommen werden.

4.1.3 Synthese von acyclischen Analoga von AZT 1

4.1.3.1 Synthesestrategie

Um den Einfluß der Rigidität des Nucleosidrückgrates auf die Substrateigenschaften von Nucleotiden gegenüber TmpK zu untersuchen, sollten acyclische Nucleotidanaloga dargestellt werden, die eine Azidgruppe oder die isoelektronische Thiocyanatgruppe tragen (Abb. 32).



Abb. 32 Acyclische Analoga von AZT 1

Der formale Ersatz einer Hydroxylgruppe in T-Ganciclovir **30** durch eine Azid- bzw. Thiocyanatgruppe führt zur Generierung eines stereogenen Zentrums am Kohlenstoffatom in der 3'-Position (Abb. 33), während T-Ganciclovir **30** selbst ein symmetrisches Grundgerüst besitzt und damit eine achirale Verbindung ist.

Es sind bereits einige Synthesen von Azido-T-Ganciclovir **41a** bekannt.^[106, 107]



Abb. 33 Synthese von Verbindung 41a nach GRIERSON et al.

GRIERSON et al. konnten Azido-T-Ganciclovir **41a** als Gemisch beider Enantiomere in sechs Stufen ausgehend von Epichlorhydrin **62** darstellen. Ein Nachteil dieser Syntheseroute besteht darin, daß die Azidgruppe bereits im dritten Reaktionsschritt eingeführt wird, so daß bei der Darstellung von Derivaten mit anderen Substituenten drei Synthesestufen parallel durchgeführt werden müssten.



Abb. 34 Synthese von Azido-T-Ganciclovir **41a** nach ACHIWA et al.

Der Zugang zu Azido-T-Ganciclovir **41a** nach ACHIWA et al.^[107] besitzt gegenüber dem von GRIERSON et al. einige Vorteile. So wird beispielsweise die Azidgruppe erst im letzten Schritt der Synthesesequenz durch nucleophile Substitution des Tosylates in Verbindung **63** eingeführt. Ferner erlaubt dieser Zugang bei Verwendung eines optisch aktiven Glycerolderivats **65** eine Synthese des enantiomerenreinen Azido-T-Ganciclovirs **41a**. Allerdings besitzt auch diese Synthesesequenz einige Nachteile. So handelt es sich ausgehend vom Glycerolderivat **65** um eine achtstufige Synthese. Ferner entstehen bei der Öffnung des Acetals **64** ebenfalls, wie schon bei der Synthese von T-Ganciclovir **30** in Kapitel 4.1.2.2 beschrieben, zwei isomere Acetoxymethylether, die voneinander separiert werden müssen.

Nach Abwägung der Vor- und Nachteile dieser beiden Synthesestrategien fiel die Entscheidung, Azido-T-Ganciclovir **41a** ausgehend von T-Ganciclovir **30** darzustellen. Die Synthese sollte analog der in meiner Diplomarbeit^[93] entwickelten Syntheseroute zur Darstellung von Azido-T-Penciclovir **29** durchgeführt werden.

Diese Synthesestrategie vermeidet es, das Grundgerüst für jedes Derivat separat aufbauen zu müssen. Außerdem sollte es möglich sein, ein racemisches Gemisch von substituierten T-Ganciclovir-Derivaten durch Veresterung mit einer chiralen Säure in Diastereomere zu überführen und somit eine Racematspaltung durchzuführen.

4.1.3.2 Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a**

Zur Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** muß zunächst selektiv eine der beiden Hydroxylgruppen von T-Ganciclovir **30** geschützt werden. Dazu ist es notwendig, zwischen zwei chemisch äquivalenten Hydroxylgruppen zu differenzieren. Aufgrund der guten Erfahrungen bei der Synthese von Azido-T-Penciclovir **29** sollte eine unter sauren Bedingungen abspaltbare Schutzgruppe eingeführt werden. Aus den Arbeiten der Diplomarbeit war bekannt, daß bei der Verwendung der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe nur eine Ausbeute von 23% erzielt werden konnte. Dies war darauf zurückzuführen, daß erhebliche Mengen des zweifach tritylierten Derivates entstanden. Offensichtlich ist die zweite Tritylierung gegenüber der ersten stark erleichtert. Möglicherweise erleichtern π -Wechselwirkungen der aromatischen Ringe der Schutzgruppe den Angriff eines zweiten Moleküls 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) an die bereits monotritylierte Verbindung, so daß die zweifache Tritylierung in erheblichem Maße zu beobachten war.

Es wurde versucht, die Ausbeute der Tritylierung zu steigern, indem statt des sehr reaktionsfreudigen 4,4'-Dimethoxytritylchlorids (DMTrCl) das weniger reaktive Chlortriphenylmethan (Tritylchlorid, TrCl) verwendet wurde. Dazu wurde T-Ganciclovir **30** in wasserfreiem Pyridin gelöst, 1.1 Äquivalente Chlortriphenylmethan (TrCl) zugegeben und zwei Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung zeigte auch in diesem Fall bereits nach kurzer Zeit die Bildung der zweifach tritylierten Verbindung. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte 4'-*O*-Trityl-T-Ganciclovir **66** in einer Ausbeute von 40% isoliert werden (Abb. 35).



Abb. 35 Darstellung von 4'-O-Trityl-T-Ganciclovir 66

Die Ausbeute von 40% stellt zwar gegenüber der Einführung der DMTr-Schutzgruppe eine Steigerung um 17% dar, ist jedoch im Hinblick auf mehrstufige Synthesen zur Darstellung der T-Ganciclovir-Derivate allenfalls als ausreichend zu bezeichnen. Es bleibt das Problem der selektiven Schützung nur einer der beiden chemisch äquivalenten funktionellen Gruppen. Im Falle der beiden Hydroxylgruppen im 2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl-Grundgerüst gelingt dies über ein cyclisches Intermediat und dessen nachfolgende Spaltung (Abb. 36).^[108] Dazu wurde zunächst T-Ganciclovir **30** mit Trimethylorthoacetat in Gegenwart von Trifluoressigsäure (TFA) in *N*,*N*-Dimethylformamid zum cyclischen Orthoester **69** umgesetzt. Dieser wurde dann direkt mit Wasser zu 4'-*O*-Acetyl-T-Ganciclovir **67** hydrolysiert. Die monoacetylierte Verbindung **67** konnte nach chromatographischer Aufarbeitung in einer Ausbeute von 89% als farbloser Feststoff isoliert werden (Abb. 35, S. 34).



Abb. 36 Mechanismus der Darstellung von 4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir 67

Die anschließende Tritylierung zu 4'-O-Acetyl-5'-O-trityl-T-Ganciclovir **68** gelang mit Chlortriphenylmethan in wasserfreiem Pyridin in einer Ausbeute von 76%. Dies stellt zwar eine deutliche Verbesserung gegenüber der Tritylierung von T-Ganciclovir **30** dar, ist jedoch nicht optimal. Die abschließende Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe gelang mittels Natriummethanolat in Methanol bei Raumtemperatur. Nach Aufreinigung am Chromatotron konnte 4'-O-Trityl-T-Ganciclovir **66** in einer sehr guten Ausbeute von 98% als farbloser Feststoff isoliert werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die Gesamtausbeute der Tritylierung von T-Ganciclovir **30** über die vorübergehende, selektive Einführung einer Acetyl-Schutzgruppe von 40% auf 66% ausgehend von T-GCV **30** steigern ließ.

Zur Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** mußte nun die verbliebene freie Hydroxylgruppe in eine sehr gute Abgangsgruppe überführt werden, um bei der Synthese des Azids **71** bereits mit Natriumazid anstelle des sehr nucleophilen aber auch sehr reaktiven Lithiumazids eine nucleophile Substitution zu erreichen.

Die monotritylierte Verbindung 4'-O-Trityl-T-Ganciclovir **66** wurde daher in wasserfreiem Pyridin gelöst und mit Methansulfonsäurechlorid (MsCl) bei 0 °C zu Reaktion gebracht. Nach

Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte das Mesylat **70** in einer Ausbeute von 83% isoliert werden (Abb. 37).



Abb. 37 Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** mit einer Trityl-Schutzgruppe

Zur Darstellung des Azids 71 wurde das Mesylat 70 in Gegenwart von 15 Moläquivalenten Natriumazid in N,N-Dimethylformamid für zwei Stunden auf 105 °C erhitzt.^[109] Dabei war keine Abspaltung der potentiell thermolabilen Trityl-Schutzgruppe zu beobachten. Das Produkt, 5'-Azido-4'-O-trityl-T-Ganciclovir 71, konnte in einer hervorragenden Ausbeute von 96% isoliert werden. Im abschließenden Schritt dieser Synthesesequenz mußte die Trityl-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen abgespalten werden. Dazu wurde die Tritylgeschützte Verbindung 71 in Dichlormethan aufgenommen und mit einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure (2% BSA) behandelt. Im Gegensatz zur Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe, die mit diesem Reagenz bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde abgespalten werden kann, war im vorliegenden Fall ein Erwärmen der Reaktionslösung auf 40 °C für 24 Stunden nötig. Das Produkt, 1-(2-Azido-1-hydroxymethylethoxymethyl)thymin (Azido-T-Ganciclovir) 41a, konnte in einer Ausbeute von 89% isoliert werden.

Azido-T-Ganciclovir **41a** konnte demnach in einer Gesamtausbeute über sechs Stufen von 47% ausgehend von T-Ganciclovir **30** dargestellt werden (vgl. Abb. 35, S. 34). Verglichen mit der Synthese der analogen Verbindung Azido-T-Penciclovir **29**^[93] auf einem

vergleichbaren Weg, welche mit einer Gesamtausbeute von 15% gelang, stellt dies eine enorme Verbesserung der Ausbeute dar.

Es stellt sich allerdings die Frage, ob die Verwendung der säurelabilen Schutzgruppe wirklich notwendig ist, oder ob die Synthese von Azido-T-Ganciclovir **41a** auch mit einer Acetyl-Schutzgruppe erfolgreich durchgeführt werden kann. Durch die Verwendung einer Acetyl-Schutzgruppe könnte die Synthese des Azids **41a** in lediglich vier Stufen gelingen. Die oben beschriebene Schutzgruppenmanipulation könnte damit überflüssig werden.

4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir 67 wurde in wasserfreiem Pyridin aufgenommen und mit Methansulfonsäurechlorid (MsCl) zur Reaktion gebracht. Das intermediäre Mesylat wurde ohne weitere Aufreinigung in *N*,*N*-Dimethylformamid aufgenommen und mit 15 Moläquivalenten Natriumazid zwei Stunden auf 105 °C erhitzt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte das Azid 72 in einer Ausbeute von 61% isoliert werden.



Abb. 38 Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** mit einer Acetyl-Schutzgruppe

Die Ausbeute für die Einführung der Azidgruppe liegt damit signifikant niedriger als bei Verwendung der Trityl-Schutzgruppe (80% über zwei Stufen). Die Gründe hierfür konnten nicht eindeutig geklärt werden. Es ist jedoch zu vermuten, daß die Acetyl-Schutzgruppe unter den relativ harschen Bedingungen der nucleophilen Substitution des Mesylates durch Azid nicht hinreichend stabil genug war.

Die abschließende Entschützung zu Azido-T-Ganciclovir **41a** gelang mit Natriummethanolat in Methanol in einer Ausbeute von 86%, die nahezu identisch mit der der entsprechenden Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe war.

Obwohl die Synthese von Azido-T-Ganciclovir **41a** auf diesem Weg in lediglich drei isolierten Stufen gelang, ist die Gesamtausbeute niedriger als bei der Variante über sechs Stufen. Möglicherweise könnte die Einführung einer Trifluormethansulfonylgruppe anstelle der Methansulfonylgruppe die Elektrophilie dieser Verbindung derart steigern, daß

die Einführung der Azidgruppe mit einer höheren Ausbeute gelingen könnte. Zusätzlich könnte versucht werden, statt Natriumazid das nucleophilere Lithiumazid einzusetzen.

4.1.3.3 Versuch der Darstellung beider Enantiomere von Azido-T-Ganciclovir **41a**

Nach der Synthese von Azido-T-Ganciclovir **41a** als racemisches Gemisch sollte nun versucht werden, eine Racematspaltung durchzuführen. Dazu sollte das Nucleosidanalogon **41a** mit einer optisch aktiven Säure verestert werden, um dann die entstandenen Diastereomere voneinander zu trennen. Aufgrund der guten Erfahrungen bei der Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen von α -Hydroxy- und α -Aminophosphonaten fiel die Wahl auf (1*S*)-(–)-Camphansäure.^[110, 111] Eine sehr häufig angewandte Methode ist die Veresterung mit der sog. "Moshersäure",^[112] die jedoch sehr teuer ist und deren Enatiomerenreinheit schwankt.

Zur Veresterung wurde Azido-T-Ganciclovir **41a** in Dichlormethan aufgenommen, die Base 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), der Aktivator *N*,*N*'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) sowie (1*S*)-(–)-Camphansäure zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 39). Nach Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung konnte der Camphansäureester **73a/b** in einer Ausbeute von 85% isoliert werden.



Abb. 39 Darstellung des Azido-T-Ganciclovir-Camphansäureesters 73a/b

Die NMR-spektrospkopische Untersuchung des Produktes konnte zeigen, daß ein 1:1 Gemisch des (S,S)-Diastereomers **73a** sowie des (S,R)-Diastereomers **73b** vorlag. Es sollte nun versucht werden, die beiden Diastereomere durch chromatographische Methoden voneinander zu trennen. Säulenchromatographische Versuche zeigten jedoch, daß keine Anreicherung eines der beiden Diastereomere erzielt werden konnte.

Die HPLC-Analytik an Normalphase mit Dichlormethan/Methanol-Gemischen zeigte ebenfalls keinerlei Trennung der Diastereomere, so daß auch auf diesem Weg keine Trennung im präparativen Maßstab zu erwarten war.

Neben der chromatographischen Trennung wurde ebenfalls eine Trennung durch fraktionierte Kristallisation versucht, die jedoch ebenso scheiterte.

In einem weiteren Versuch wurde Azido-T-Ganciclovir **41a** mit (+)-Campher-10-sulfochlorid zur Reaktion gebracht (Abb. 40).



Abb. 40 Darstellung des Azido-T-Ganciclovir-Camphersulfonsäureesters 74a/b

Das Nucleosidanalogon **41a** wurde in Pyridin aufgenommen und eine Lösung von (+)-Campher-10-sulfochlorid in Pyridin zugetropft. Nach zweistündiger Reaktion bei 0 °C und anschließender Aufarbeitung konnte der Sulfonsäureester **74a/b** in einer Ausbeute von 86% isoliert werden.

NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten erneut zeigen, daß das Produkt als 1:1 Gemisch der beiden Diastereomere (74a und 74b) vorlag.

Jedoch konnte auch im Fall des Sulfonsäureesters weder säulenchromatographisch noch mittels HPLC-Analytik eine Trennung der beiden Diastereomere beobachtet werden.

Möglicherweise hätte eine Veresterung mit (–)-O,O'-Dibenzoyl-L-weinsäure-mono(N,Ndimethylamid) zu einem positiven Ergebnis bei der Trennung der Diastereomere führen können. Diese Verbindung hat sich u.a. bei der Racematspaltung von α -Aminophosphonaten bewährt.^[111]

4.1.3.4 Darstellung von Thiocyanato-T-Ganciclovir **41b**

Die Darstellung von Thiocyanato-T-Ganciclovir **41b** sollte auf einem analogen Weg zur Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** erfolgen.

5'-O-Trityl-T-Ganciclovir **66** wurde in wasserfreiem Pyridin aufgenommen, die Lösung auf 0 °C gekühlt und Methansulfonsäurechlorid (MsCl) zugetropft. Das intermediäre Mesylat wurde ohne weitere Aufreinigung in *N*,*N*-Dimethylformamid aufgenommen und mit 15 Moläquivalenten Natriumrhodanid zwei Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte das Thiocyanat **75** in einer Ausbeute von 66% isoliert werden.



Abb. 41 Darstellung von Thiocyanato-T-Ganciclovir 41b

Die Ausbeute liegt unter der der analogen Synthese des Azids 71. Aufgrund der geringeren thermischen Stabilität des Thiocyanats war jedoch eine geringere Reaktionstemperatur und damit eine längere Reaktionszeit notwendig. Dies könnte die geringere Ausbeute erklären.

Interessanterweise konnte in diesem Fall keine Bildung des entsprechenden Isothiocyanats beobachtet werden (vgl. Kap. 4.1.4.2). Dies ist vermutlich auf die geringere Elektrophilie des Mesylats verglichen mit dem Triflat zurückzuführen.

Die abschließende Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe gelang mit 2%iger Benzolsulfonsäurelösung in Dichlormethan. Das Nucleosidanalogon, 1-(2-Thiocyanato-1hydroxymethyl-ethoxymethyl)thymin (Thiocyanato-T-Ganciclovir) **41b** konnte in einer Ausbeute von 80% isoliert werden. Verglichen mit der Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** war in diesem Fall kein Erwärmen für 24 Stunden auf 40 °C notwendig. Die Abspaltung konnte innerhalb von 16 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

4.1.4 Synthese von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin

4.1.4.1 Synthesestrategie

2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b** lassen sich nach einer bekannten Synthese in fünf^[113] bzw. sechs^[114] Stufen aus 2'-Desoxythymidin **81** darstellen (Abb. 42).



Abb. 42 Retrosynthetische Analyse von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b**

Da der Substituent in der 3'-Position durch eine S_N2 -Reaktion eingeführt wird, ist der Schlüsselschritt dieser Synthesesequenz die Darstellung von 1-(2'-Desoxy-5'-*O*-trityl- β -D-*threo*-pentosyl)thymin **78**, d.h. die Inversion der Konfiguration an C3'. Die freie Hydroxylgruppe in Verbindung **78** wird nachfolgend in ein gutes Nucleofug überführt. Bei Verwendung des Methansulfonates **76** in der Substitutionsreaktion^[114] mit Natriumrhodanid läßt sich lediglich das Thiocyanat isolieren, während die Verwendung des Trifluormethansulfonates **77**^[113] aufgrund der erhöhten Elektrophilie sowie der Ambidenz des Nucleophils die Darstellung sowohl des Thiocyanates als auch des Isothiocyanates erlaubt.

Es sollte weiterhin prinzipiell möglich sein, die Zielverbindungen analog zur Synthese von AZT $\mathbf{1}^{[115]}$ durch Öffnung des internen Azaenolethers in 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **82** darzustellen (Abb. 43).



Abb. 43 Alternative Syntheseroute zu den Verbindungen 42a und 42b

2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **82** läßt sich aus dem Mesylat **79** darstellen. Die Verbindung **79** ist damit das gemeinsame Intermediat beider Syntheserouten. Die Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b** wurde daher mit der Synthese der Verbindung **79** begonnen.

4.1.4.2 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b**

Zur Darstellung von 2'-Desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **80** wurde 2'-Desoxythymidin **81** in Gegenwart von Chlortriphenylmethan (TrCl) in Pyridin unter Rückfluß erhitzt.^[116] Nach wäßriger Aufarbeitung und Umkristallisation konnte das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 84% isoliert werden (Abb. 44).



Abb. 44 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-O-mesyl-5'-O-tritylthymidin 79

Das an der primären Hydroxylgruppe geschützte Nucleosid **80** wurde nun in der Kälte mit Methansulfonsäurechlorid (MsCl) in Pyridin zur Reaktion gebracht.^[117] Nach wäßriger Aufarbeitung konnte das Mesylat **79** ohne weitere Aufreinigung in einer Ausbeute von 92% erhalten werden. Ausgehend vom Mesylat **79** sollte nun versucht werden, die Isothiocyanatgruppe durch nucleophile Öffnung des internen Azaenolethers in Verbindung **82** einzuführen. Dazu wurde zunächst Verbindung **79** zu einer Lösung von Kaliumphthalimid in *N,N*-Dimethylformamid gegeben und 15 Minuten unter Rückfluß erhitzt.^[115] Durch Eintragen des Reaktionsgemisches in Eiswasser und Abfiltrieren des farblosen Niederschlags konnte das Produkt, 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **82** in einer nahezu quantitativen Ausbeute von 99% isoliert werden (Abb. 45).



Abb. 45 Versuch der Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-Otritylthymidin **83a**

Verbindung **82** wurde anschließend in Gegenwart von 10 Moläquivalenten Natriumrhodanid in *N*,*N*-Dimethylformamid auf 110 °C erhitzt. Es gelang nach Aufarbeitung jedoch nicht, ein eindeutiges Produkt zu isolieren. Vermutlich ist dies auf die mangelnde Elektrophilie des Substrates sowie die zu geringe Nucleophilie des Thiocyanat-Anions zurückzuführen.

Nachdem diese neue, verkürzte Syntheseroute nicht erfolgreich war, wurde die bekannte Syntheseroute weiterverfolgt. Dazu wurde das Mesylat **79** in Ethanol gelöst und mit wäßriger Natriumhydroxidlösung unter Rückfluß erhitzt. Das Produkt, 1-(2'-Desoxy-5'-*O*-trityl-β-D-*threo*-pentosyl)thymin **78**, konnte nach Neutralisieren und chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 86% isoliert werden (Abb. 46).



Abb. 46 Darstellung von 1-(2'-Desoxy-5'-O-trityl-β-D-threo-pentosyl)thymin 78

Der stereochemische Verlauf dieser Reaktion ist auf den Einfluß der Nucleobase zurückzuführen. Zunächst bildet sich ein Azaenolat, welches das Mesylat unter Bildung von 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **82** nucleophil verdrängt. Im Gegensatz zur

selektiven Synthese von Verbindung **82** wird in diesem Fall jedoch eine nucleophile Base, das Hydroxidion verwendet. Dieses harte Nucleophil greift nun selektiv an C2 der Nucleobase an und nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus wird der Azaenolether geöffnet. Verbindung **78** konnte als ein Diastereomer isoliert werden.

Zur Einführung der Substituenten in die 3'-Position wurde nun die sekundäre Hydroxylgruppe in Verbindung **78** durch Reaktion mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf₂O) in Dichlormethan in Gegenwart von Pyridin intermediär in das Trifluormethansulfonat überführt. Das Triflat **77** wurde dann direkt in einer Eintopf-Reaktion mit Natriumrhodanid in *N,N*-Dimethylformamid zur Reaktion gebracht (Abb. 47). Es konnte ein Gemisch des Thiocyanats **83a** und des Isothiocyanats **83b** in einer sehr guten Ausbeute von 85% isoliert werden. Aufgrund der ¹H-NMR Daten ließ sich schließen, daß es sich um ein 10:1 Gemisch der beiden Verbindungen handelte. Trotz mehrfacher Versuche ließen sich die beiden Verbindungen für mit herkömmlichen chromatographischen Methoden voneinander trennen. Damit konnten die Ergebnisse von SCHREIBER und IKEMOTO,^[113] die eine Trennung der Isomere ebenfalls nicht erreichen konnten, reproduziert werden. Zudem wurde nahezu das gleiche Isomerenverhältnis erhalten. Auch die Ausbeute an beiden Isomeren war nahezu identisch.



Abb. 47 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b**

Nachdem es nicht gelungen war, die Isomere voneinander zu trennen, wurde nun versucht, die Trityl-Schutzgruppe abzuspalten, um die entschützten Nucleosidanaloga voneinander zu trennen. Dazu wurde die Mischung aus dem Thiocyanat **83a** und dem Isothiocyanat **83b** in Dichlormethan gelöst und mit einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol 7:3 v/v (2% BSA) versetzt (Abb. 47, S. 44). Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch chromatographisch aufgereinigt. Nach einer ersten groben Trennung mit Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5% als Eluent, gelang eine Trennung der beiden entschützten Nucleosidanaloga am Chromatotron mit Dichlormethan mit einem Methanolgradient von 0 bis 3.75% als Eluent. Dabei konnte 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** in einer Ausbeute von 65% und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b** in einer Ausbeute von 7% isoliert werden. Das Verhältnis der Nucleosidanaloga zueinander ist demnach konstant geblieben.

Der stereochemische Verlauf der Einführung des Thiocyanato- bzw. Isothiocyanato-Substituenten konnte durch die Aufnahme eines NOESY-Spektrums bestätigt werden. Die NOE-Wechselwirkungen zwischen dem Proton in der 6-Position des Thyminringes sowie dem Proton in der 3'-Position des Desoxyriboseringes zeigen, daß das Nucleosidanalogon tatsächlich in der *ribo*-Konfiguration vorliegt.

2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** konnte in einer Gesamtausbeute von 37% ausgehend von 2'-Desoxythymidin **81** dargestellt werden. Die Gesamtausbeute für 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b** betrug dagegen lediglich 4%. Dies ist auf die geringe Ausbeute bei der Einführung des Substituenten zurückzuführen. Bei dem Rhodanid-Anion handelt es sich um ein ambidentes Nucleophil, welches bevorzugt am Schwefel reagiert.

Aufgrund der schlechten Gesamtausbeute für 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin 42b mußte die Verbindung auf einem anderen Weg selektiv dargestellt werden. Dazu wurde ein Syntheseweg analog zu ENGELS et al. eingeschlagen.^[118] Aliphatische Isothiocyanate lassen sich der entsprechenden Amine mit Schwefelkohlenstoff und durch Reaktion N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid darstellen.^[119] Das für diese Synthesesequenz notwendige 3'-Amino-2'-desoxythymidin-Derivat 85 läßt sich am zweckmäßigsten aus einem entsprechenden AZT-Derivat darstellen. 3'-Azido-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 84 ließ sich auf zwei Wegen darstellen (Abb. 48, S. 46). Zunächst wurde 1-(2'-Desoxy-5'-O-trityl-β-D*threo*-pentosyl)thymin **78** zur Darstellung der Verbindung **84** intermediär in das Trifluormethansulfonat überführt und anschließend mit Natriumazid in N,N-Dimethylformamid behandelt. Das gewünschte Produkt, 3'-Azido-2'-desoxy-5'-Otritylthymidin 84, ließ sich nach wäßriger Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 63% isolieren. Ferner konnte Verbindung **84** durch Tritylierung von AZT **1** mit Chlortriphenylmethan in Pyridin in einer Ausbeute von 89% dargestellt werden.



Abb. 48 Selektive Darstellung von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin 42b

Zur Reduktion der Azidgruppe in Verbindung **84** wurde diese in Pyridin gelöst und bei 0 °C nacheinander Triphenylphosphin und 25%ige Ammoniumhydroxidlösung zugegeben. Das Auftreten von Gasbläschen zeigte die Bildung von molekularem Stickstoff und damit die Bildung des Phosphinimins an. Dieses wurde im weiteren Verlauf der Reaktion zum Amin **85** und Triphenylphosphinoxid hydrolysiert. 3'-Amino-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **85** konnte in einer Ausbeute von 94% isoliert werden.

Zur Umwandlung der Aminofunktion in die Thiocyanatgruppe wurde das Amin **85** in Tetrahydrofuran gelöst und nacheinander Schwefelkohlenstoff sowie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugegeben.^[120] Bei dieser Reaktion entsteht zunächst die Dithiocarbaminsäure **86**, welche nachfolgend durch DCC zum Isothiocyanat **83b** und Dicyclohexylthioharnstoff fragmentiert wird (Abb. 49, S. 47).^[121]



Abb. 49 Mechanismus der Bildung des Isothiocyanats 83b

Die abschließende Entschützung von Verbindung **83b** gelang mit 2% BSA in einer Ausbeute von 76%. Das Nucleosidanalogon **42b** konnte auf diesem Syntheseweg in einer Gesamtausbeute von 29% in einer siebenstufigen Synthese ausgehend von 2'-Desoxythymidin **81** dargestellt werden. Dies stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber der zuvor beschrittenen fünfstufigen Syntheseroute dar. Die Gesamtausbeute der vierstufigen Synthese ausgehend von AZT **1** betrug sogar sehr gute 62%.

2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b** konnte aus Dichlormethan/Methanol kristallisiert und röntgenographisch untersucht werden (Abb. 50).



Abb. 50 ORTEP-Plot von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin 42b

Der Desoxyribosering von Verbindung **42b** zeigt eine C2'-*endo*, C3'-*exo*-Konformation bezüglich der Nucleobase. Der Pseudorotationswinkel P von 179.33 °, welcher sich aus allen vier Torsionswinkeln im Ribosering berechnen läßt,^[122] zeigt eine nahezu perfekte

"Southern"-Konformation (²₃T) an. Die maximale Abweichung des Riboseringes von der Planarität v_{max} beträgt 35.37. v_{max} läßt sich aus dem Pseudorotationswinkel P und dem Torsionswinkel entlang der C2'-C3'-Bindung berechnen.^[122] Der Torsionswinkel χ entlang der glycosidischen Bindung (O4'-C1'-N1-C2) zeigt mit einem Wert von -120.87 ° eine anti-Konformation, während der Torsionswinkel γ um die C4'-C5'-Bindung (C3'-C4'-C5'-O5') einen Wert von 55.72 ° annimmt. Der Grund für diese Konformation ist in der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton an C6 des Thyminringes und O5' zu suchen (Abb. 50, S. 47). Der Abstand zwischen diesen beiden Atomen beträgt 2.15 Å und liegt damit im Bereich einer Wasserstoffbrückenbindung. Alle diese Parameter entsprechen denen, die üblicherweise in der DNA vorliegen.^[123] Auch zeigt Verbindung **42b** in bezug auf die Anordnung des Riboseringes und der Nucleobase eine sehr gute Übereinstimmung mit einem der beiden im Kristall gefundenen Konformere von AZT 1. Eines der Konformere zeigt eine C3'-exo, C4'-endo-Konformation, während das andere eine C2'-endo, C3'-exo-Konformation wie Verbindung 42b einnimmt. Der Pseudorotationswinkel P zeigt für dieses Molekül einen Wert von 174°, während die Abweichung von der Planarität v_{max} 33 beträgt.^[123]

Neben den strukturellen Gemeinsamkeiten in bezug auf die Nucleobase und die Riboseeinheit zeigt das Nucleosidanalogon **42b** in bezug auf den 3'-Substituenten deutliche Unterschiede zu AZT **1**. Während die Azidgruppe in AZT **1** am ersten Stickstoffatom einen Winkel von 115 ° aufweist,^[124] ist die Isothiocyanatgruppe in Verbindung **42b** von C3' bis zum Schwefel nahezu gestreckt. Der Winkel am Stickstoff (C3'-N-C) beträgt 162.8 °, der Winkel am Kohlenstoff (N-C-S) beträgt 176.2 °. Der letzte Wert zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Azidgruppe in AZT **1**. Der Winkel innerhalb der Azidgruppe (N-N-N) beträgt 173.2 °.^[125] Der Grund für den Winkel am Stickstoffatom der Isothiocyanatgruppe in Verbindung **42b** ist vermutlich darin zu suchen, daß dieser sp-hybridisiert ist und das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms eine Wechselwirkung mit dem antibindenden Orbital der C-S-Dreifachbindung eingeht. Die Bindungslänge zwischen dem Einer C-N-Doppel- und einer C-N-Dreifachbindung.^[126] Die Bindungslänge der C-S-Bindung von 1.58 Å entspricht dagegen einer C-S-Doppelbindung.^[126]

4.1.5 Synthese von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin und2'-Desoxy-3'-propargylthymidin

4.1.5.1 Synthesestrategie

2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d** läßt sich auf einem bekannten Weg in zwei Stufen aus 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** darstellen (Abb. 51).^[127]



Abb. 51 Retrosynthetische Analyse von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin 42d

Erstes Ziel mußte also die Synthese eines 5'-*O*-geschützten 3'-Allyl-2'-desoxythymidin-Derivates **88** sein, aus dem sich ebenfalls 3'-Allyl-2'-desoxythymidin **42c** synthetisieren ließe.

Zunächst sollte versucht werden, die Allylgruppe durch Öffnung des internen Azaenolethers in Verbindung **82** mit einem Allyl-Grignardreagenz analog zur Synthese von AZT **1** einzuführen (Abb. 52). Dieser Syntheseansatz könnte von 3'-*O*-Mesyl-5'-*O*-tritylthymidin **79** ausgehen, welches bereits ein Intermediat der Synthese der Nucleosidanaloga **42a** und **42b** ist.



Abb. 52 Mögliche Darstellung von 3'-Allyl-5'-O-tritylthymidin 89

3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** läßt sich auf einem bekannten Wege in drei Stufen aus 2'-Desoxythymidin **81** darstellen (Abb. 53, S. 50).^[127, 128]



Abb. 53Retrosynthetische Analyse von 3'-Allyl-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-
2'-desoxythymidin 88

Schlüsselschritt dieser Synthese ist die diastereoselektive Einführung der Allylgruppe in die 3'-Position auf radikalischem Wege. Diese Syntheseroute sollte beschritten werden, falls die Einführung der Allylgruppe mit dem Grignardreagenz scheitern sollte.

4.1.5.2 Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin **42c** und 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d**

Zum Versuch, die Allylgruppe mit einem metallorganischen Reagenz einzuführen, wurde 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymindin **82** in Tetrahydrofuran gelöst und bei 0 °C mit einer zuvor bereiteten Lösung von Allylmagnesiumbromid versetzt. Nach wäßriger Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt 3'-Allyl-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **89** jedoch nicht isoliert werden (Abb. 54).



Abb. 54 Versuch der Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 89

Die dünnschichtchromatographische Analyse zeigte u.a. Substanzen an, die mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz die typische Farbreaktion für Zucker zeigten, jedoch nicht UV-aktiv waren. Dies läßt darauf schließen, daß eine Reaktion an der Nucleobase stattgefunden haben könnte. Das wäre vermutlich darauf zurückzuführen, daß das Grignardreagenz als hartes Nucleophil an C2 der Nucleobase angegriffen hat. Möglicherweise hätte eine vorherige
Überführung des Grignardreagenzes durch Zugabe von Kupfersalzen in das entsprechende weichere Cuprat-Nucleophil in diesem Fall zum Erfolg führen können.

Aufgrund dieses Mißerfolgs wurde nun der bekannte Syntheseweg beschritten. Zunächst wurde die primäre Hydroxylgruppe von 2'-Desoxythymidin **81** in den *tert*-Butyldimethylsilylether **91** überführt (Abb. 55).



Abb. 55 Versuch der Darstellung von 3'-Allyl-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-2'desoxythymidin **81** über das Methylthiocarbonat **92**

Aufgrund sehr guter Erfahrungen im Arbeitskreis bei Barton-Desoxygenierungen^[129] wurde der Alkohol **91** nun mit Thiocarbonyldiimidazol und Methanol in das Methylthiocarbonat **92** überführt. Verbindung **92** konnte in einer Ausbeute von 73% nach chromatographischer Aufreinigung am Chromatotron isoliert werden. Die nachfolgende radikalische Barton-Desoxygenierung mit Allyltri-*n*-butylstannan als Allyldonor und α,α' -Azoisobutyronitril (AIBN) als Radikalstarter lieferte jedoch nicht das gewünschte 3'-Allyl-5'-*O-tert*butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88**. Möglicherweise ist das Methylthiocarbonat **92** unter den Reaktionsbedingungen zu wenig reaktiv. Daher wurde in der Folge, 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **91** mit Phenoxythiocarbonyl-chlorid (PTC-Cl) in das Phenylthiocarbonat **90** überführt (Abb. 56, S. 52). Das Produkt **90** konnte zunächst nicht in reiner Form isoliert werden. Bei der chromatographischen Aufreinigung am Chromatotron kam es zur partiellen Zersetzung des Produktes. Dies ist auf die erhöhte Reaktivität des Phenylthiocarbonates zurückzuführen. Radikalreaktionen mit dieser Verbindungsklasse lassen sich durch UV-Strahlung initiieren.^[127] Da die Detektion der Verbindungen am Chromatotron mit UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm erfolgt, wurde dadurch vermutlich ein radikalischer Zerfall des Produktes verursacht. Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte Verbindung **90** in einer Ausbeute von 87% in reiner Form isoliert werden.



Abb. 56 Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin 42c

Für die Einführung der Allylgruppe unter Barton-Bedingungen wurde Verbindung **90** in absolutem Toluol gelöst, Allyltri-*n*-butylstannan sowie α,α' -Azoisobutyronitril zugegeben und die Reaktionslösung wiederholt entgast und mit Argon gesättigt. Nach 24 Stunden Erhitzen auf 80 °C konnte dünnschichtchromatographisch noch Ausgangsmaterial detektiert werden. Daher wurde weiteres α,α' -Azoisobutyronitril zugegeben und weitere 48 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung konnte 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** in einer Ausbeute von 63% als ein Diastereomer isoliert werden. Obwohl die Reaktion ein planares Radikalzentrum an C3' durchläuft, tritt die Allylgruppe nur unter Retention der Konfiguration an C3' ein. Diese Beobachtung ist vermutlich auf den sterischen Anspruch des Silylethers sowie der Nucleobase zurückzuführen. Die relative Konfiguration an C3' konnte nach Abspalten der Schutzgruppe durch Aufnahme eines NOESY-Spektrums verifiziert werden.

Neben 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** konnten außerdem 7% 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-didesoxythymidin **93** isoliert werden. Diese Nebenreaktion ist auf Wasserspuren zurückzuführen, die sich entweder im Ausgangsmaterial oder den Reagenzien befanden. Ferner ist es möglich, daß bei der Zugabe von α,α' -Azoisobutyronitril nach 24 Stunden oder bei der Entnahme von Proben für die Dünnschichtchromatographie Spuren von Wasser in das Reaktionsgefäß gelangten.

Die abschließende Spaltung des Silylethers gelang mit Ammoniumfluorid in Methanol in einer Ausbeute von 91% (Abb. 56, S. 52). 3'-Allyl-2'-desoxythymidin **42c** konnte damit in einer Gesamtausbeute von 41% in vier Stufen aus 2'-Desoxythymidin **81** dargestellt werden.

Zur Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d** wurde zunächst die allylische Doppelbindung von 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** in Tetrachlormethan bromiert (Abb. 57).



Abb. 57 Bromierung von 3'-Allyl-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin 88

Neben dem gewünschten Produkt, 3'-(2,3-Dibrompropyl)-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'desoxythymidin **87a**, welches in einer Ausbeute von 62% isoliert werden konnte, konnte auch 3'-(2,3-Dibrompropyl)-2'-desoxythymidin **87b** in einer Ausbeute von 29% isoliert werden. Die Gründe für die Bildung von Verbindung **87b** bleiben unklar, da Brom nicht im Überschuß zur Ausgangsverbindung eingesetzt wurde. Eine oxidative Spaltung des Silylethers ist zwar möglich, jedoch unwahrscheinlich, da die Bindungsenergie einer Silizium-Brom-Bindung deutlich unter der einer Silizium-Sauerstoff-Bindung liegt.

Die Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d** gelang durch Erhitzen von Verbindung **87a** in Ethanol in Gegenwart von wäßriger Kaliumhydroxidlösung (Abb. 58, S. 54). Dabei erfolgen sowohl eine doppelte Eliminierung in der Seitenkette unter Bildung der

Propinyl-Einheit als auch die Spaltung des Silylethers. Allerdings blieb die Ausbeute mit 36% deutlich unter der, die FIANDOR und TAM erzielen konnten.^[127] Allerdings konnten die genauen experimentellen Bedingungen dieser Autoren nicht ermittelt werden.



Abb. 58 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin 42d

Zunächst wurde vermutet, daß die geringe Ausbeute durch eine Bildung eines cyclischen Ethers nach Abspaltung der Schutzgruppe verursacht werden könnte. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, da sich die Zielverbindung **42d** ebenfalls aus dem Nebenprodukt der Bromierung, 3'-(2,3-Dibrompropyl)-2'-desoxythymidin **87b**, durch Behandlung mit Kaliumhydroxid darstellen ließ. Die Ausbeute dieser Reaktion lag mit 51% sogar merklich über der der zuvor diskutierten Umsetzung. 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d** konnte somit in einer Gesamtausbeute von 10% über fünf Stufen aus 2'-Desoxythymidin **81** dargestellt werden.

4.1.6 Synthese der *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate

4.1.6.1 Synthese der Phosphitylierungsreagenzien

Salicylalkohole sind die Grundbausteine der cycloSal-Nucleosidmonophosphate. Eine Vielzahl von Akzeptor- bzw. Donor-substituierten Salicylalkoholen wurde bisher für die Synthese von cycloSal-Nucleosidmonophosphaten verwandt.^[33] In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich 3-Methyl-Substituent gewählt, da Hydrolyseder aus und Aktivitätsuntersuchungen bei anderen *cvclo*Sal-Phosphattriesterderivaten für dieses Substitutionsmuster am Aromaten häufig sowohl eine günstige Hydrolysehalbwertszeit als auch eine hohe biologische Aktivität beobachtet worden war.^[33]

3-Methylsalicylalkohol **95** ließ sich durch Reduktion von 3-Methylsalicylsäure **94** mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran als Lösungsmittel in 83% Ausbeute darstellen (Abb. 59).



Abb. 59 Darstellung von 3-Methylsalicylalkohol 95

Zur Synthese des *cyclo*Salchlorphosphites **96** wurde 3-Methylsalicylalkohol **95** in absolutem Diethylether gelöst und langsam zu einer Lösung von Phosphortrichlorid in Diethylether zugetropft (Abb. 60). Nach Beendigung der Zugabe wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Kugelrohrdestillation wurde 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** in einer Ausbeute von 40% als farbloses Öl erhalten, das während der Lagerung bei -20 °C erstarrte.



Abb. 60 Darstellung der Phosphitylierungsreagenzien 96 und 97

3-Methyl-*cyclo*Sal-*N*,*N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **97** konnte durch Umsetzung des Chlorphosphits **96** mit Di-*iso*-propylamin in absolutem Diethylether erhalten werden. Nach

Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde vom ausgefallenen Di-*iso*propylammoniumchlorid abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-Methyl*cyclo*Sal-*N*,*N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **97** wurde in einer Ausbeute von 92% erhalten und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

4.1.6.2 Synthese der *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate

3-Methyl-*cyclo*Sal-T-Penciclovirmonophosphat **37a** konnte nicht durch Umsetzung von T-Penciclovir **40** mit dem Chlorphosphit **96** dargestellt werden. Es mußte zunächst eine der beiden identischen Hydroxylgruppen von T-Penciclovir **40** mit einer Schutzgruppe blockiert werden, um bei der Umsetzung mit dem Phosphor(III)-Reagenz **96** nicht das zweifach phosphitylierte Produkt zu erhalten. Da *cyclo*Sal-Phosphattriester basenlabil sind, mußte die Schutzgruppe unter sauren Bedingungen abspaltbar sein. T-Penciclovir **40** wurde in Pyridin gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) in Gegenwart einer katalytischen Menge 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) umgesetzt. Man erhielt das gewünschte monotritylierte Produkt **98** als racemisches Gemisch in einer Ausbeute von 30% (Abb. 61).



Abb. 61 *Synthese von 3-Methyl-cycloSal-T-Penciclovirmonophosphat* **37***a*

Das *O*-DMTr-geschützte Derivat **98** wurde in Acetonitril gelöst, mit Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA) versetzt und nach Abkühlen auf 0 °C 3-Methyl-*cyclo*Sal-chlorphosphit **96**

zugetropft. Nach vollendeter Reaktion wurde erneut auf 0 °C gekühlt und mit einer *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan oxidiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der *O*-DMTr-geschützte Phosphattriester **99** zur Abspaltung der Schutzgruppe in einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure aufgenommen und bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels und chromatographischer Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt, 3-Methyl-*cyclo*Sal-T-Penciclovirmonophosphat **37a** in einer Ausbeute von 35% als 1:1 Gemisch zweier zueinander diastereomerer Enantiomerenpaare isoliert werden.

Bei der Darstellung der übrigen cvcloSal-Phosphattriester konnte auf die Verwendung von Schutzgruppen verzichtet werden, da die entsprechenden Nucleosidanaloga keine reaktive Hydroxy- oder Aminogruppe aufwiesen. Die entsprechenden Nucleosidanaloga wurden mit 3-Methyl-cycloSalchlorphosphit 96 in Acetonitril in Gegenwart von DIPEA zu den korrespondierenden Phosphittriestern umgesetzt, welche in einer Eintopf-Reaktion direkt mit einer tert-Butylhydroperoxidlösung in n-Decan zu den Phosphattriestern 38b-d oxidiert wurden. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden in einer ersten chromatographischen Aufreinigung mit Essigsäureethylester/Methanol 9:1 v/v +0.1% Essigsäure entstandene Salze abgetrennt. Nach weiteren Aufreinigungen am Chromatotron mit Dichlormethan mit Methanolgradient konnten die Produkte 38b-d nach Gefriertrocknung als farblose Feststoffe in Ausbeuten von 60 bis 80% isoliert werden (Abb. 62).



Abb. 62 Darstellung der acyclischen Phosphattriester **38b-d**

Auch einige der cyclischen Nucleosidanaloga wurden nach der oben beschriebenen Methode in die entsprechenden 3-Methyl-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate überführt. Während der 3'-Allyl- sowie der 3'-Propargyl-substituierte Phosphattriester **39c** bzw. **39d** in für diese Reaktion üblichen Ausbeuten erhalten werden konnten, war die Ausbeute bei der Synthese von 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **39b** mit 33% deutlich geringer (Abb. 63). Diese geringe Ausbeute ist vermutlich auf Nebenreaktionen am Isothiocyanatsubtituenten zurückzuführen, welcher nucleophil angegriffen werden kann.^[113]



Abb. 63 Synthese der Phosphattriester **39b-d**

Da auch der Thiocyanatsubstituent im Nucleosidanalogon **42a** prinzipiell nucleophil angegriffen werden könnte, sollte der Phosphattriester in diesem Fall unter nicht-basischen Bedingungen eingeführt werden. Der *cyclo*Sal-Phosphittriester des Nucelosidanalogons **42a** wurde daher durch Umsetzung des letzteren mit 3-Methyl-*cyclo*Sal-*N*,*N*-di-*iso*propylphosphoramidit **97** unter Säurekatalyse mit Pyridiniumchlorid (PyH⁺Cl⁻) als Katalysator dargestellt.^[130] Dieser Triester wurde direkt in einer Eintopf-Reaktion weiter zum Phosphattriester **39a** oxidiert. Dieser konnte in einer Ausbeute von 60% isoliert werden. Vermutlich hätte auch der Phosphattriester **39b** bei Anwendung dieser Methode in höheren Ausbeuten isoliert werden können.



Abb. 64 Synthese des Phosphattriesters **39a** nach der Phosphoramidit-Methode

4.1.7 Synthese der modifizierten Nucleosidmonophosphate

Es sind eine Reihe von Synthesemöglichkeiten für Nucleosidmonophosphate bekannt. Eine der klassischen Methoden, die von YOSHIKAWA^[131, 132] entwickelt wurde, beruht auf der Umsetzung eines Nucleosids **100** mit Phosphorylchlorid in einem Trialkylphosphat als Lösungsmittel und anschließender Hydrolyse des Phosphodichloridates **101** zum entsprechenden Nucleosidmonophosphat **102** (Abb. 65).



Abb. 65 Synthese von Nucleosidmonophosphaten 102 nach YOSHIKAWA

Bei dieser Synthesemethode treten verschiedene Probleme auf. Wird Phosphorylchlorid im Überschuß eingesetzt, muß nach der Hydrolyse das Nucleotid **102** von einer Vielzahl weiterer geladener Verbindungen separiert werden. Für diese chromatographischen Aufreinigungen wird häufig Sephadex-Material verwendet, was die Verwendung großer Mengen an Laufpuffergemischen bedingt, deren Salze später wieder abgetrennt werden müssen. Zudem kommt es bei Anwesenheit einer 3'-Hydroxylgruppe häufig zur Bildung des unerwünschten 3',5'-Cyclophosphates als Nebenreaktion.

Diese Methode konnte einige Jahre später von SOWA und OUCHI verbessert werden.^[133] Sie ersetzten das Lösungsmittel Trialkylsulfat durch Acetonitril. Setzt man in diesem Lösungsmittelsystem Pyridin, Wasser und Phosphorylchlorid im Verhältnis 2:1:2 ein, so bildet sich intermediär Tetrachlorpyrophosphat, welches selektiv die primäre Hydroxylgruppe phosphoryliert. Nach Hydrolyse erhält man wiederum das Nucleosidmonophosphat (Abb. 66).





Synthese von Nucleosidmonophosphaten 102 nach SOWA und OUCHI

Diese Synthesemethode verbessert zwar deutlich die Selektivität der Phosphorylierung, jedoch entstehen auch hier, da Phosphorylchlorid im Überschuß eingesetzt wird, Salze, die von dem geladenen Nucleotid abgetrennt werden müssen.

Neben den bisher beschriebenen Methoden mit Phosphorylchlorid als Reagenz gibt es weitere Synthesemethoden für Nucleotide, die Organophosphorchloridate und -phosphoramidate als Reagenz verwenden. An dieser Stelle sei das Reagenz 1,2-Phenylenphosphorchloridat **103** erwähnt, welches mit einem Nucleosid in Gegenwart einer Base zum Phosphattriester **104** reagiert.^[134]



Abb. 67 Synthese von Nucleotiden mit 1,2-Phenylenphosphorchloridat 103

Der Phosphattriester **104** läßt sich nun zum Phenylphosphatdiester **105** hydrolysieren. Dieser Phosphatdiester ist jedoch persistent gegenüber einer weiteren Hydrolyse und muß oxidativ z.B. mit wäßriger Bromlösung oder wäßriger Periodsäure zum Nucleotid **102** gespalten werden, was insbesondere bei labilen Nucleotiden problematisch ist.

Im Gegensatz zu anderen Pro-Nucleotid Konzepten benötigt das cvcloSal Konzept keine enzymatische Aktivierung, sondern wurde entwickelt, um Nucleotide auf chemischhydrolytischem Weg freizusetzen. Es ist daher naheliegend, zu versuchen. Hydrolyse ihrer entsprechenden Nucleosidmonophosphate durch die cvcloSal-Phosphattriester zu synthetisieren. In meiner Diplomarbeit^[93] konnten bereits einige Nucleotide auf diesem Weg dargestellt werden. Die Methode konnte auch auf die Synthese weiterer Nucleotide übertragen werden.^[135]

Zur Darstellung der acyclischen Nucleotidanaloga **31-32** wurden die entsprechenden 3-Methyl-*cyclo*Sal-Phosphattriester **38b,c** sowie **37b**^[93] in Acetonitril gelöst und nach Zugabe von Wasser und Triethylamin bei 37 °C gelagert (Abb. 68). Nach vollständiger Hydrolyse wurde die wäßrige Lösung lyophilisiert. Es wurde zunächst versucht, das Nebenprodukt der Hydrolyse, 3-Methylsalicylalkohol **95** durch Extraktion einer wäßrigen Lösung des Rückstandes mit Essigsäureethylester bzw. Dichlormethan abzutrennen. Da jedoch nur eine schlechte Phasentrennung erzielt werden konnte, wurde in folgenden Versuchen auf diesen Schritt verzichtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand über eine Reversed-Phase C₁₈-Kieselgelsäule mit Wasser und einem Acetonitrilgradienten aufgereinigt. Dieses Säulenmaterial findet ebenfalls in HPLC-Säulen Anwendung.



Abb. 68 Synthese der acyclischen Nucleotidanaloga 31-32

Nach erneuter Gefriertrocknung wurden die Nucleotide mit einer Ionentauschersäule in das Dinatrium- bzw. Dikaliumsalz überführt. Die Nucleotide **31-32** konnten in Ausbeuten von 68 bis 74% isoliert werden. Neben diesen sehr guten Ausbeuten ist besonders die einfache Aufreinigung der Nucleotide zu erwähnen. Dies ist zum einen auf die Abwesenheit weiterer geladener Nebenprodukte zurückzuführen. Ein weiterer Grund dürfte in der Verwendung des Reversed-Phase Säulenmaterials anstelle von Sephadex-Material zu suchen sein. Durch diese Aufreinigung kann auf die Verwendung von Laufpuffergemischen verzichtet werden, was zum einen die Chromatographie deutlich beschleunigt und zum anderen eine Abtrennung der Puffersalze überflüssig macht.



Abb. 69 Darstellung der AZTMP-Analoga 33a,c,d

Auch die cyclischen AZTMP-Analoga **33a,c,d** konnten auf dem zuvor beschriebenen Weg dargestellt werden. Die Ausbeuten waren mit 62 bis 70% ebenfalls sehr gut und die Aufreinigung der Produkte gestaltete sich genauso problemlos wie für die acyclischen Verbindungen.

Bei dem Versuch 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **39b** auf die zuvor beschriebene Weise zu hydrolysieren, traten jedoch Probleme auf. Das Produkt wies einen deutlich niedrigeren R_f-Wert als die anderen Nucleotide auf, was auf die Entstehung eines polareren Produktes hinwies. Auch die Tatsache, daß das Produkt bereits mit Wasser nach sehr kurzer Zeit von der Reversed-Phase Säule eluiert werden konnte, stützte diese Vermutung. Im ¹³C-NMR-Spektrum des Produktes konnte der Kohlenstoff der Isothiocyanatgruppe nicht mehr detektiert werden, was den Schluß nahelegte, daß eine Reaktion an dieser Gruppe stattgefunden haben könnte. Diese Vermutung wurde durch die massenspektrometrische Untersuchung des Produktes untermauert. Es konnte lediglich 3'-Amino-2'-desoxythymidinmonophosphat **106** nachgewiesen werden (Abb. 70). Die Ausbeute von 67% war jedoch wiederum sehr gut.



Abb. 70 Hydrolyse von Verbindung **39b**

Offensichtlich waren die Reaktionsbedingungen zu basisch, so daß die Isothiocyanatgruppe ebenfalls nucleophil angegriffen wurde. Der Versuch, die Hydrolyse unter milderen Bedingungen in einer Triethylammoniumpufferlösung durchzuführen, schlug jedoch ebenfalls fehl. Es konnte auch nach mehreren Tagen Reaktionszeit nur eine unvollständige Hydrolyse beobachtet werden. Zudem konnte dünnschichtchromatographisch wiederum nur die Entstehung von 3'-Amino-2'-desoxythymidinmonophosphat **106** detektiert werden.

Da die Spaltung des *cyclo*Sal-Phosphattriesters wäßrig-basischer Bedingungen bedarf, kann 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **33b** auf diesem Weg nicht dargestellt werden.



Abb. 71 Möglicher Syntheseweg von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat 33b

Möglicherweise könnte eine Syntheseroute über das entsprechende 2-Cyanoethylphosphat $107^{[136, 137]}$ zum Erfolg führen, da die 2-Cyanoethylgruppe mit nichtnucleophilen Basen in einer β -Eliminierung abgespalten werden kann.

4.2 Eigenschaften der modifizierten 3-Methyl-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate

In diesem Kapitel sollen zunächst die Hydrolyseeigenschaften der darstellten 3-Methyl*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate in wäßrigem Phosphatpuffer dargestellt und diskutiert werden. Ferner soll ihr Verhalten gegenüber Serumcholinesterase sowie ihre Aktivität gegenüber dem HI-Virus vorgestellt und diskutiert werden.

4.2.1 Hydrolysekinetiken der 3-Methyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphate

Um die Hydrolysestabilität der synthetisierten Pro-Nucleotide zu untersuchen, wurden chemische Hydrolysekinetiken in basischem Medium bei 37 °C mit Phosphatpufferlösungen (pH 7.3) durchgeführt. Aufgrund des Wasserüberschusses konnte die Hydrolyse der Pro-Nucleotide als Reaktion *pseudo*-erster Ordnung aufgefaßt werden, so daß sich die Hydrolyse-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ ermitteln ließen.

Es wurde eine 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösung des jeweiligen Phosphattriesters durch Verdünnen einer 50 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit Wasser angesetzt. Diese Stammlösung wurde mit einem internen Standard versetzt und die Hydrolyse anschließend durch Zugabe der auf 37 °C temperierten Phosphatpufferlösung gestartet. Die Konzentration des Pro-Nucleotids in der so präparierten Lösung betrug 0.94 mM, die der Puffersalze 24.8 mM. Sofort nach Zugabe der Phosphatpufferlösung wurde jeweils ein Aliquot entnommen (t₀). Während der Hydrolysen wurden weitere Proben entnommen und zum Stoppen der Reaktion auf konzentrierte Essigsäure pipettiert sowie auf -196 °C (flüssiger Stickstoff) abgekühlt. Die so erhaltenen Proben wurden HPLC-analytisch untersucht.

Zur Auswertung der HPLC-Chromatogramme wurden die Peakflächenintegrale der Pro-Nucleotide mit Hilfe des internen Standards normiert und in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Durch die experimentell bestimmten Meßpunkte wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogammes (Excel[®]) exponentielle Ausgleichskurven bestimmt, so daß sich Werte für die jeweilige Geschwindigkeitskonstante k der Hydrolyse ergaben. Aus den so erhaltenen Werten für k konnten gemäß der Formel

$$\mathbf{t}_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet werden.

Die Hydrolysegeschwindigkeit von *cyclo*Sal-Phosphattriestern kann durch die Wahl des Substituenten am aromatischen Ring beeinflußt werden (vgl. Kapitel 2.5, S. 12). Akzeptorsubstituenten (z.B. Chlor oder Nitro) in *para*-Stellung zur phenylischen Esterbindung sollten eine schnelle Hydrolyse bewirken. Donorsubstituenten (z.B. Methyl, *tert*-Butyl, Methoxy) in *ortho-* und/oder *para*-Stellung zur phenylischen Esterbindung sollten eine langsamere Hydrolyse bewirken. Dies konnte für die *cyclo*Sal-d4TMP-Derivate auch nachgewiesen werden.^[65, 138]

Darüber hinaus konnten jedoch auch Abhängigkeiten der Hydrolysehalbwertszeiten sowohl vom verwendeten Nucleosidanalogon^[65, 68, 75] als auch von der Natur des Substituenten in der 3'-Position^[75, 135, 139] beobachtet werden.

Die Hydrolysehalbwertszeiten der synthetisierten 3-Methyl-Phosphattriester sollten daher im Hinblick auf den Einfluß des Substituenten in der 3'-Position als auch auf den Einfluß des Rückgrates des Nucleosidanalogons hin untersucht werden. Zunächst sollen die Hydrolysehalbwertszeiten der modifizierten, cyclischen 3-Methyl*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate bestimmt und mit der Hydrolysehalbwertszeit von 3-Methyl-*cyclo*Sal-AZTMP **25b**^[77] verglichen werden.

Auf eine Untersuchung der Hydrolysehalbwertszeit von 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'isothiocyanatothymidin-monophosphat **39b** wurde verzichtet, da bei dem Versuch der Darstellung des entsprechenden Monophosphats **33b** auch in gepufferter Lösung eine Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe zu beobachten war (vgl. Kapitel 4.1.7, S. 59). Es hätte demnach keine isolierte Hydrolysehalbwertszeit für den Abbau der *cyclo*Sal-Maske beobachtet werden können, was die Vergleichbarkeit dieser Daten unmöglich gemacht hätte.

Abbildung 72 zeigt die ermittelten Hydrolysehalbwertszeiten der 3'-modifizierten 3-Methyl*cyclo*Sal-Phosphattriester.



Abb. 72Hydrolysehalbwertszeiten der 3'-modifizierten 3-Methyl-cycloSal-
Nucleosidmonophosphate

Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse der 3-Methyl-*cyclo*Sal-Maske vom Substituenten in der 3'-Position beobachtet werden. Während die beiden Verbindung **39c** sowie **39d**, die eine Alkenyl- bzw. Alkinylgruppe tragen mit 19.03 bzw. 16.42 Stunden recht hohe Halbwertszeiten besitzen, so ist die Halbwertszeit von Verbindung **39a**, die eine Thiocyanatgruppe trägt, gegenüber den anderen Verbindungen um den Faktor 3 bzw. 2.4 erniedrigt. Die Halbwertszeit der Verbindung **39a** liegt mit 6.25 Stunden jedoch in der gleichen Größenordnung wie die der AZT-Verbindung **25b**.

Bei den Substituenten der Verbindungen **39c** und **39d** handelt es sich um unpolare Seitenketten. Demgegenüber ist insbesondere die Polarität der Azidgruppe aufgrund ihrer zwitterionischen Struktur deutlich erhöht. Die ermittelten Hydrolysehalbwertszeiten deuten damit auf eine Abhängigkeit der Hydrolysehalbwertszeit von der Polarität des 3'-Substituenten hin. Auch der, wenn auch geringe, Unterschied der Hydrolysehalbwertszeiten der Verbindungen **39c** und **39d** ließe sich mit dieser Hypothese möglicherweise erklären. Die Propargylgruppe besitzt gegenüber der Allylgruppe ein azides Proton und ist demnach etwas polarer. Diese schwach erhöhte Polarität könnte zu der geringen Beschleunigung der Hydrolyse führen.

Um den beobachteten Einfluß des 3'-Substituenten genauer erklären zu können, wurden weitere 3-Methyl-*cyclo*Sal-Phosphattriester Thymin-haltiger Nucleosidanaloga auf ihre Hydrolysehalbwertszeit hin untersucht (Abb. 73). Die verwendeten Nucleosidanaloga waren 2',3'-Didesoxythymidin (ddT), d4T **2** sowie die Stammverbindung 2'-Desoxythymidin (dT).



Abb. 73 Hydrolysehalbwertszeiten weiterer 3-Methyl-cycloSal-Phosphattriester

Es konnte erneut ein signifikanter Einfluß des Substitutionsmusters am Desoxyribosering beobachtet werden. Die beiden Verbindungen **108** und **109**, die keinen Substituenten in der 3'-Position tragen, wiesen mit 14.93 bzw. 14.03 Stunden recht hohe Halbwertszeiten auf. Der Unterschied der Halbwertszeiten zwischen der gesättigten Verbindung **108** und der ungesättigten d4T-Verbindung **109** war zudem sehr gering. Der Einfluß der Konformation des Nucleosidanalogons auf die Halbwertszeit der chemischen Hydrolyse ist in diesem Fall demnach zu vernachlässigen.

Demgegenüber wies die Hydrolyse der dT-Verbindung **110** mit einer Halbwertszeit von 8.55 Stunden ein deutliche Beschleunigung auf. Die Halbwertszeit lag in der gleichen Größenordnung wie die von 3-Methyl-*cyclo*Sal-AZTMP **25c**.



Abb. 74 Mögliche Hydrolysemechanismen von 3-Methyl-cycloSal-dTMP 110

Durch die 3'-Hydroxylgruppe sind bei 3-Methyl-cycloSal-dTMP 110 prinzipiell zwei unterschiedliche Hydrolysewege denkbar (Abb. 74). Die gewünschte Hydrolyse führt durch Angriff Nucleophils am Phosphoratom zur Bildung eines des gewünschten Nucleosidmonophosphats 111 (vgl. Kapitel 2.5, S. 12). Bei der Hydrolyse des cycloSal-Phosphattriesters 110 ist jedoch, wie auch bei allen anderen cycloSal-Phosphattriestern mit Nucleosiden, die eine freie 3'-Hydroxylgruppe tragen, ein intramolekularer Angriff der freien Hydroxylgruppe auf das Phosphoratom möglich. Ergebnis dieses Hydrolyseweges wäre dann der cyclische Phosphatdiester 112, der unter chemischen Bedingungen vermutlich nicht weiter zum Monophosphat 111 hydrolysieren kann.

Um den Hydrolyseweg aufzuklären, wurde eine Probe von 3-Methyl-*cyclo*Sal-dTMP **110** in einem NMR-Probenrohr in 300 µL deuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst und 500 µL eines 50 mM Imidazol-Salzsäure-Puffers (pH 7.3) zugesetzt. Der Verlauf der Hydrolyse wurde ³¹P-NMR-spektroskopisch verfolgt (Abb. 75, S. 68). Die Zuordnung der Signale erfolgte auf Basis der chemischen Verschiebungen sowie teilweise mit Hilfe von ¹H-gekoppelter ³¹P-NMR-Spektroskopie.



Abb. 75 ³¹P-NMR-Hydrolysestudie von 3-Methyl-cycloSal-dTMP **110**

Kurz nach Beginn der Hydrolyse (t₀) konnten die Signale der beiden Diastereomere der Verbindung **110** bei -5.8 bzw -6.5 ppm detektiert werden. Diese Signale verschwanden im Verlauf der Untersuchung zugunsten eines Signals bei 1.2 ppm. Zwischen den NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die Probe bei Raumtemperatur gelagert. Die chemische Verschiebung des Hydrolyseproduktes mit einem Wert von 1.2 ppm zeigt eine gute Übereinstimmung mit der chemischen Verschiebung des cyclischen Phosphatdiesters **112** beträgt in reinem D₂O -2.56 ppm.^[135] Somit konnte in diesem Fall ausschließlich die Bildung des gewünschten Monophosphates **111** beobachtet werden. Die alternative Hydrolyse des Phosphattriesters zum cyclischen Phosphatdiester **112** findet nicht statt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen mit *cyclo*Sal-Phosphattriestern von BVDU **10**.^[75]

Die beobachtete Beschleunigung der Hydrolyse der Verbindung **110** im Vergleich zu den Phosphattriestern ohne 3'-Substituent (**108** und **109**) ist demnach nicht auf eine Konkurrenzreaktion zur gewünschten Hydrolyse zurückzuführen. Sie ist vermutlich, wie auch die Beschleunigung der Hydrolyse der Verbindungen **25b** und **39a**, auf einen assistierenden Effekt des 3'-Substituenten bei der Hydrolyse durch polare Wechselwirkungen oder, im Falle der Hydroxylgruppe, auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem angreifenden Nucleophil zurückzuführen (Abb. 76, S. 69).



Abb. 76 *Effekte der 3'-Substituenten auf die Hydrolyse von cycloSal-Phosphattriestern*

Die beobachtete Verlangsamung der Hydrolyse von Verbindungen, die einen unpolaren Substituenten in der 3'-Position tragen, relativ zu Verbindungen ohne 3'-Substituent, könnte mit einer sterischen Abschirmung des Phosphoratoms erklärt werden. Ferner ist es denkbar, daß die Lipophilie des Substituenten den Angriff des geladenen Nucleophils erschwert. Dieser Effekt wurde auch in Bezug auf den Substituenten in der 3-Postion des aromatischen Rings der *cyclo*Sal-Maske beobachtet.^[33] 3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-d4TMP weist eine bedeutend höhere Stabilität auf als 3-Methyl-*cyclo*Sal-d4TMP **109**, obwohl der +I-Effekt der *tert*-Butylgruppe nicht wesentlich größer ist als der der Methylgruppe.

Bei der Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten der 3-Methyl-*cyclo*Sal-Phosphattriester der acyclischen Nucleosidanaloga konnten überraschende Beobachtungen gemacht werden (Abb. 77).

3-Methyl-cycloSal-NN	ſP	t _{1/2} [h]	8 -				
OAc-T-GCV	38d	8.19					
N ₃ -T-GCV	38b	7.62	Ę				
SCN-T-GCV	38c	4.66	t _{1/2} [
T-GCV	38 a	1.12	2 -				<i>\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\</i>
T-PCV	37a	1.08	0 38d	38b	38c	38a	37a

Abb. 77 Hydrolysehalbwertszeiten der cycloSal-Phosphattriester 37-38

Es konnte eine Beschleunigung der Hydrolyse gegenüber den Phosphattriestern der cyclischen Nucleosidanaloga beobachtet werden. So beträgt die Hydrolysehalbwertszeit von 3-Methyl-*cyclo*Sal-Isothiocyanato-T-Ganciclovirmonophosphat **38c** 4.66 Stunden, während die analoge Verbindung **39a** eine Halbwertszeit von 6.25 Stunden besitzt. Dieser Effekt konnte auch, wenn auch nur in geringem Maße, bei den Verbindungen **25b** und **38b**, die eine

Azidgruppe besitzen, beobachtet werden. Diese leichte Beschleunigung ist vermutlich auf die höhere Flexibilität des Nucleosidrückgrates zurückzuführen, die die Annäherung des Nucleophils an das Phosphoratom erleichtert. Sehr auffällig sind jedoch die Halbwertszeiten der beiden Phosphattriester **37a** und **38a**, die jeweils eine freie Hydroxylgruppe besitzen. Diese Verbindungen hydrolysieren mit einer Halbwertszeit von 1.08 bzw. 1.12 Stunden und sind damit deutlich labiler als die analoge Verbindung 3-Methyl-*cyclo*Sal-dTMP **110**, die eine Halbwertszeit von 8.55 Stunden besitzt. Diese deutliche Beschleunigung ist nicht allein durch die erhöhte Flexibilität der Nucleosidanaloga zu erklären.

Auch in diesem Fall konnte eine ³¹P-NMR-Hydrolysestudie Aufklärung über den Verlauf der Hydrolyse bringen (Abb. 78).



Abb. 78 ³¹P-NMR-Hydrolysestudie von 3-Methyl-cycloSal-T-PCVMP **37a**

Zu Beginn der Hydrolyse (t₀) konnten die Signale der Ausgangsverbindung bei -6.6 bzw. -6.7 ppm detektiert werden. Das Verschwinden dieser Signale im Verlauf der Hydrolyse ging einher mit dem Erscheinen von zwei neuen Signalen bei 1.8 ppm bzw. -3.5 ppm. Nach zwei Wochen (t₂) konnte kein Ausgangsmaterial mehr detektiert werden. Ferner konnte nach diesem Zeitpunkt keine weitere Veränderung der Signale mehr beobachtet werden. Die Hydrolyse mußte also vollständig abgelaufen sein. Das Signal bei 1.8 ppm konnte durch Vergleich mit einer authentischen Probe von Penciclovirmonophosphat^[135] T-Penciclovirmonophosphat **31a** zugeordnet werden. Durch Vergleich mit der analogen Guanin-haltigen Substanz^[135] konnte das Signal bei -3.5 ppm dem Cyclophosphat **113** zugeordnet werden (Abb. 79). In diesem Fall entstanden lediglich 4% des gewünschten Monophosphates **31a**, während das Hydrolyseprodukt zu 96% aus dem unerwünschten cyclischen Phosphatdiester **113** bestand.



Abb. 79 Produktverteilung bei der Hydrolyse des Phosphattriesters 37a

Eine ³¹P-NMR-spektroskopische Untersuchung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-T-GCVMP **38a**^[93] konnte zeigen, daß auch in diesem Fall das Monophosphat zu 6% und zu 94% das unerwünschte Cyclophosphat entstand. Das Hydrolyseverhalten ist demnach unabhängig von dem Rückgrat der acyclischen Nucleosidanaloga.

In früheren Arbeiten^[72, 76] konnte gezeigt werden, daß auch bei der Hydrolyse von *cyclo*Sal-Phosphattriestern des Guanin-haltigen Nucleosidanalogons PCV **8** das Cyclophosphat entsteht. Sollte auch in diesem Fall die Produktverteilung bei der Hydrolyse unabhängig vom Nucleosidrückgrat sein, so war ein analoges Hydrolyseverhalten für 3-Methyl-*cyclo*Sal-Ganciclovirmonophosphat **114**^[135] zu erwarten.

Tatsächlich konnte mittels ³¹P-NMR-spektroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, daß auch diese Verbindung zu 94% den cyclischen Phosphatdiester **115** liefert (Abb. 80). Die getrennten Diastereomerenpaare dieser Verbindung zeigten dabei sowohl eine nahezu identische Hydrolysehalbwertszeit als auch eine identische Produktverteilung.



Abb. 80 Hydrolyse von 3-Methyl-cycloSal-Ganciclovirmonophosphat 114

Untersuchungen der Verbindung **114** bezüglich ihrer antiviralen Aktivität gegenüber dem Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) konnten zeigen, daß diese Verbindung im Gegensatz

zu *cyclo*Sal-Phosphattriestern von Penciclovir **8** eine gute Aktivität gegen das Virus besitzt.^[135] Auch wurde ein vollständiger Erhalt der antiviralen Aktivität in Thymidinkinasedefizienten Zellinien festgestellt. Diese Aktivität ist auf das Vorhandensein von GCVMP **115** zurückzuführen. Bisher ging man davon aus, daß die Verbindung **114** im Gegensatz zu den analogen Penciclovir-Verbindungen das Monophosphat liefert und daher Aktivität gegen das Virus entwickelt. Diese neuen Ergebnisse zeigen jedoch, daß bei der Hydrolyse von Verbindung **114** ebenfalls das Cyclophosphat **116** freigesetzt wird. Dieses muß in biologischen Medien enzymatisch in das Monophosphat **115** hydrolysiert werden, so daß sich die biologische Aktivität entfalten kann, während Penciclovircyclophosphat kein Substrat für das Enzym ist.

4.2.2 Cholinesterase-Assay

Die in vielen Spezies vorkommenden Cholinesterasen gehören zur Klasse der Serin-Hydrolasen. Beim Menschen unterscheidet man zwischen der hochspezifischen Acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) und der unspezifischen Butyrylcholinesterase (Serumcholinesterase, BChE, E.C. 3.1.1.8).^[140] Beide Enzyme hydrolysieren Acetylcholin zu Essigsäure und Cholin. Die Acetylcholinesterase ist ein physiologisch essentielles Enzym aus der Nervenreizleitung. Die Butyrylcholinesterase ist dagegen ein Leber- und Plasmaenzym. Ihre genaue physiologische Bedeutung ist noch unklar, da kein spezifisches Substrat bekannt ist.

Es ist ein seit langem bekanntes und unter anderem auch militärisch genutztes Faktum, daß verschiedene Organophosphate starke Inhibitoren der AChE sind. Diese Organophosphate reagieren nach einem Additions-Eliminierungsmechanismus mit dem hochreaktiven Serin-Rest im aktiven Zentrum der AChE und bilden ein kovalentes Addukt (*suicide inhibition*).^[140] Da *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate reaktive Organophosphate darstellen, sind auch sie potentielle Inhibitoren der AChE. Untersuchungen an einer Vielzahl von *cyclo*Sal-Phosphattriestern konnten zeigen, daß eine Reihe diesen Verbindungen gute Inhibitoren der BChE, jedoch nicht der AChE sind.^[139, 141] Dabei konnte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt werden. Insbesondere die Konfiguration am Phosphoratom ist von entscheidender Bedeutung. So konnte bewiesen werden, daß in der Regel lediglich eines der beiden Diastereomere der *cyclo*Sal-Phosphattriester die BChE inhibitorische Aktivität besitzt. Auch der Substituent in der 3'-Position ist von Bedeutung für die inhibitorischen Eigenschaften. Sperrige Substituenten in dieser

Position verringern die inhibierende Wirkung, während die Abwesenheit eines Substituenten zu verstärkter Inhibition des Enzyms führt.

Um den Einfluß des Nucleosidrückgrates auf die Inhibition der BChE zu untersuchen, wurden ausgewählte acyclische Nucleosidanaloga untersucht. Ziel des Assays war die Bestimmung von IC₅₀-Werten nach fünf und fünfzehn Minuten Reaktionszeit. Dazu wurden eine Acetylcholinchloridlösung, eine Natriumchloridlösung, eine Lösung des jeweiligen *cyclo*Sal-Nucleotids in Dimethylsulfoxid sowie eine auf pH 7.8 gepufferte *m*-Nitrophenollösung gemischt und mit Wasser verdünnt. Zu dieser Testmischung wurde humanes Blutserum (Mix von fünf Probanden) gegeben, um die enzymatische Reaktion zu starten. Die Reaktion wurde direkt im auf 25 °C temperierten Photometer verfolgt. Ein Reaktionsansatz lieferte als Referenzwerte Abnahmen der Extinktion nach fünf bzw. fünfzehn Minuten. Die Konzentrationen der potentiellen Inhibitoren wurde variiert, um den IC₅₀-Wert zu ermitteln. Zur Auswertung wurde für jede getestete Substanz die Abnahme der Extinktion bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration nach fünf bzw. fünfzehn Minuten ermittelt. Diese Werte wurden graphisch gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die so erhaltenen empirischen Kurven zeigten einen pseudolinearen Bereich, in dem eine lineare Regression erfolgte. Aus der so erhaltenen Geraden ließen sich die entsprechenden IC₅₀-Werte ablesen.

Tabelle 1 stellt die IC₅₀-Werte ausgewählter *cyclo*Sal-Phosphattriester gegenüber Butyrylcholinesterase dar.

	3-Methyl-cycloSal-NMP	IC ₅₀ [µM] 5 Minuten	IC ₅₀ [µM] 15 Minuten
dT	110	36	23
AZT	25b	40	21
d4T	109	1.2	0.71
GCV	114	> 50	37
PCV	117	> 50	47
T-GC	V 38a	38	13
T-PCV	37a	46	10

Tabelle 1Inhibitorische Eigenschaften verschiedener cycloSal-Phosphattriester

Betrachtet man die ermittelten IC_{50} -Werte, so erkennt man zunächst den Einfluß eines Substituenten in 3'-Position. Während die d4T-Verbindung **109** ein sehr guter Inhibitor der

BChE ist, sind die entsprechenden dT- bzw. AZT-Verbindungen **110** und **25b** nur mäßige Inhibitoren der BChE. Vergleicht man die Werte der T-GCV-Verbindung **38a** und der T-PCV-Verbindung **37a** mit denen der Stammverbindung **110**, so zeigt sich, daß die beiden acyclischen Verbindungen insbesondere nach 15 Minuten deutlich stärker inhibieren als die dT-Verbindung **110**. Diese Tatsache ist vermutlich auf die erhöhte Flexibilität des Nucleosidrückgrates zurückzuführen, die es den Phosphattriestern ermöglicht, sich besser an das aktive Zentrum des Enzyms anzupassen.

Jedoch ist nicht allein das Rückgrat des Nucleosids von Bedeutung, sondern auch die Nucleobase. Die Verbindungen **114** und **117**, die Guanin-haltig sind, zeigen trotz des gleichen Rückgrates eine deutlich geringere Inhibierung des Enzyms als die Verbindungen **37a** und **38a**. Guanin-haltige *cyclo*Sal-Phosphattriester sind demnach schwächere Inhibitoren der Serumcholinesterase als Thymin-haltige. Dieser Befund konnte auch bei anderen Nucleosidanaloga gefunden werden.^[141]

4.2.3 Antivirale *in-vitro*-Aktivität

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, wurden die synthetisierten Nucleosidanaloga sowie deren *cyclo*Sal-Phosphattriester (Abb. 81) *in-vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen unterzogen. Als Testsysteme kamen HIV-1bzw. HIV-2-infizierte humane T-Lymphozyten (CEM/0) ebenso zum Einsatz wie HIV-2infizierte Thymidinkinase-defiziente Zellen (CEM/TK⁻).



Abb. 81Auf ihre Aktivität gegen das HI-Virus getestete Nucleosidanaloga und
cycloSal-Nucleosidmonophosphate

Dabei zeigte keine der getesteten Verbindungen Aktivität gegen das HIV-1. Auch wiesen die synthetisierten *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate keinerlei Aktivität gegen das HI-Virus in den Thymidinkinase-defizienten Zellen auf.

Obwohl die cyclischen Nucleosidanaloga in der 3'-Position Substituenten tragen, die der Azidgruppe in AZT 1 strukturell eng verwandt oder sogar isoelektronisch zu ihr sind, entwickeln sie keinerlei Aktivität gegen das HI-Virus. Die entsprechenden *cyclo*Sal-Phosphattriester setzen zwar die Nucleosidmonophosphate frei, jedoch zeigen auch diese Verbindungen keine antivirale Aktivität. Die fehlende Aktivität der Nucleosidanaloga ist

demnach nicht auf eine eventuell gehemmte Phosphorylierung zum Monophosphat zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine Limitierung in den weiteren Phosphorylierungsschritten (vgl. Kapitel 4.3) und/oder auf eine mangelnde Aktivität der entsprechenden Triphosphate.

Auch die Nucleosidanaloga sowie die *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate mit acyclischem Nucleosidrückgrat besitzen keinerlei Aktivität gegenüber dem HI-Virus. Für den Fall des 3-Methyl-*cyclo*Sal-T-Ganciclovirmonophosphats **38a** ist dies auf die intrazelluläre Bildung des Cyclophosphates (vgl. Kapitel 4.2.1, S. 63) zurückzuführen, jedoch besitzt auch das Nucleosidanalogon T-Ganciclovir **30** selbst keine antivirale Aktivität.

Ersetzt man das 2'-Desoxyriboserückgrat von AZT 1 durch das acyclische Rückgrat der Verbindung 41a, der gegenüber AZT 1 lediglich das 2'-Kohlenstoffatom des Riboseringes fehlt, so verliert die Verbindung ihre antivirale Aktivität vollständig. Dies gilt auch für den entsprechenden *cyclo*Sal-Phosphattriester **38b**, die strukturell eng verwandten Verbindungen 42a-d sowie deren *cyclo*Sal-Phosphattriester **39a,c,d**. Auch in diesen Fällen muß offen bleiben, ob die fehlende Aktivität auf einer mangelnden Phosphorylierung des Mono- bzw. Diphosphates und/oder einer Inaktivität des Triphosphates beruht.

4.3 Eigenschaften der Nucleosidmonophosphate

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Nucleosidanaloga wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Roger S. Goody und Dr. Joachim Reinstein vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund auf ihre Substrateigenschaften gegenüber humaner Thymidylatkinase hin untersucht.

Dazu wurden detaillierte steady-state Untersuchungen der Vorwärtsreaktion der Thymidylatkinase durchgeführt (vgl. Kapitel 2.7, S. 16). Alle steady-state Messungen wurden bei 25 °C an humaner Thymidylatkinase vom Wildtyp (hsTmpK_{wt}) durchgeführt. Als Phosphoryldonor diente jeweils MgATP. Die Konzentration des Phosphoryldonors wurde bei den kinetischen Untersuchungen konstant gehalten, da dies zur Anwendung der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung auf ein Enzym, welches zwei Substrate simultan bindet (vgl. Abb. 16, S. 17), notwendig ist.^[91] Aufgrund dieser Versuchsdurchführung konnten für die untersuchten Nucleotide die katalytische Ratenkonstante k_{cat}, die Michaelis-Konstante K_M (Bindungskonstante im ternären Komplex) sowie die daraus ermittelte katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) bestimmt werden. Die für die dargestellten Nucleotide erhaltenen Ergebnisse sollten mit denen für das natürliche Substrat dTMP 111 sowie mit denn der Monophosphate der antiviral aktiven Nucleosidanaloga AZT 1 und d4T 2 verglichen werden.

hsTmpK _{wt}		Vorwärtsreaktion			
		$k_{cat}[s^{-1}]$	$K_{M}\left[\mu M\right]$	$k_{cat}/K_{M} [M^{-1}s^{-1}10^{-3}]$	
dTMP	111	0.73 ± 0.05	6 ± 1	122 ± 22	
d4TMP	118	0.0757 ± 0.0003	13 ± 1	5.8 ± 0.4	
AZTMP	26	0.0122 ± 0.0002	12 ± 3	1.0 ± 0.2	
3'-Isothiocyanato-dTMP	33 a	< 0.02	n. d. ^{a)}	n. d. ^{a)}	
3'-Allyl-dTMP	33c	< 0.02	n. d. ^{a)}	n. d. ^{a)}	
3'-Propargyl-dTMP	33d	< 0.02	n. d. ^{a)}	n. d. ^{a)}	

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen

^{a)} n. d.: nicht detektierbar

Tabelle 2Enzymkinetische Daten für die Nucleotidanaloga 33a,c,d undReferenzverbindungen

Das natürliche Substrat des Enzyms, dTMP **111** wird mit einer Rate von 0.73 s^{-1} phosphoryliert. Dabei zeigt das Nucleotid eine Bindungskonstante an das Enzym von 6 μ M. Daraus resultiert eine Enzymeffizienz von 122 M⁻¹s⁻¹10⁻³. Die Phosphorylierungsrate von d4TMP **118** ist demgegenüber um den Faktor zehn geringer. Zudem sinkt die Affinität des Nucleotids gegenüber dem Enzym um den Faktor zwei, so daß sich die katalytische Effizienz um den Faktor 20 erniedrigt. AZTMP **26** besitzt zwar eine vergleichbare Affinität gegenüber der Thymidylatkinase wie d4TMP **118**, jedoch sinkt die Phosphorylierungsrate weiter um den Faktor sechs. Dementsprechend sinkt auch die Enzymeffizienz um den Faktor sechs.

Bei der Untersuchung der Nucleotidanaloga **33a,c,d** konnte überraschenderweise nahezu keine Phosphorylierung dieser Verbindungen beobachtet werden. Auch besitzen die Verbindungen keinerlei Affinität gegenüber der Thymidylatkinase. Diese Beobachtungen sind umso erstaunlicher, als diese Verbindungen 3'-Substituenten tragen, die der Azidgruppe in AZTMP **26** strukturell eng verwandt oder sogar im Falle der Isothiocyanatgruppe isoelektronisch zu dieser sind. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte in der zwitterionischen Struktur der Azidgruppe in AZTMP **26** liegen. Zwar verursacht der sterische Anspruch dieser Gruppe eine Repulsion des P-Loop (vgl. Abb. 17, S. 18), jedoch könnte diese

Repulsion bei einer Interaktion eines Substituenten mit ähnlichem sterischem Anspruch ohne die zwitterionische Struktur noch verstärkt werden. Daraus resultiert vermutlich die äußerst geringe Phosphorylierung der Nucleotidanaloga **33a,c,d**.

Ein weiterer Hinweis in diese Richtung lieferte die enzymkinetische Untersuchung der Nucleotidanaloga **33a,c,d** gegenüber HSV-codierter Thymidinkinase, welche auch Thymidylatkinase-Aktivität besitzt.^[23] In diesem Experiment wurde das Nucleotidanalogon mit dem Enzym in Gegenwart von MgATP und dTMP **111** inkubiert. Bei diesem Konkurrenzexperiment stellt die Erniedrigung der Phosphorylierungsrate von dTMP **111** ein Maß für den Grad der Phosphorylierung des Nucleotidanalogons dar. In diesem Experiment konnte für keines der Nucleotidanaloga **33a,c,d** eine Verringerung der Phosphorylierung von dTMP **111** beobachtet werden. Dieser Befund zeigt, daß diese Nucleotidanaloga auch von der HSV-codierten Thymidinkinase nicht als Substrat akzeptiert werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die modifizierten Nucleosidanaloga **33a,c,d** selbst bei hoher antiviraler Aktivität ihrer Triphosphate in *in-vitro* Tests diese Aktivität nicht zeigen könnten, da die entsprechenden Monophosphate nicht in die Diphosphate überführt werden. Daher führt in diesen Fällen auch die Applikation eines Pro-Nucleotids nicht zum Erfolg. Ein abschließender Befund über die potentielle antivirale Aktivität dieser Verbindungen könnte nur über eine Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften der Triphosphate gegenüber viraler Reverser Transkriptase erfolgen.

Auch die acyclischen Nucleotidanaloga **31a,b** und **32a** wurden auf ihre Substrateigenschaften gegenüber humaner Thymidylatkinase von Wildtyp (hsTmpK_{wt}) untersucht. Tabelle 3, S. 79 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Zwar werden auch die acyclischen Nucleotidanaloga **31a,b** und **32a** von dem Enzym nur unzureichend phosphoryliert, jedoch lassen sich aus den enzymkinetischen Daten wertvolle Hinweise auf den Mechanismus der Phosphorylierung ableiten.

$hsTmpK_{wt}$		Vorwärtsreaktion			
		$k_{cat}[s^{-1}]$	$K_M \left[\mu M \right]$	$k_{cat}/K_M [M^{-1}s^{-1}10^{-3}]$	
dTMP 1	111	0.73 ± 0.05	6 ± 1	122 ± 22	
d4TMP	118	0.0757 ± 0.0003	13 ± 1	5.8 ± 0.4	
AZTMP	26	0.0122 ± 0.0002	12 ± 3	1.0 ± 0.2	
T-GCVMP ^[93]	32a	≈ 0.008	≈ 1300	≈ 0.006	
T-PCVMP ^[94]	31a	≈ 0.0014	≈ 20	≈ 0.07	
N ₃ -T-PCVMP	31b	n. d. ^{a)}	n. d. ^{a)}	n. d. ^{a)}	

^{a)} n. d.: nicht detektierbar

Tabelle 3 Enzymkinetische Daten für die acyclischen Nucleosidanaloga 31a,b und 32a sowie Referenzverbindungen

T-Ganciclovirmonophosphat **32a**^[93], welches noch zwei strukturelle Merkmale des natürlichen Substrates, dTMP 111, die freie Hydroxylgruppe sowie den Aminalsauerstoff, trägt, besitzt von den getesteten acyclischen Nucleotidanaloga die höchste Phosphorylierungsrate. Jedoch ist auch diese selbst gegenüber AZTMP 26 um den Faktor 1.5 erniedrigt. Ferner besitzt T-GCVMP 32a eine äußerst geringe Affinität gegenüber dem Enzym, so daß auch die Enzymeffizienz sehr gering ist. T-Penciclovirmonophophat **31a**^[94], welches nur noch ein strukturelles Merkmal, die freie Hydroxylgruppe, trägt, wird deutlich weniger gut phosphoryliert. Allerdings besitzt dieses Nucleotidanalogon eine bessere Affinität gegenüber dem Enzym als T-GCVMP 32a. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Aminalsauerstoff, doch in die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms involviert ist (vgl. Abb. 17, S. 18). Jedoch ist nicht auszuschließen, daß Konformationsunterschiede der Nucleotidanaloga für den beobachteten Effekt verantwortlich sind.

Azido-T-Penciclovir **31b**, welches keines der beiden strukturellen Merkmale des natürlichen Substrats mehr aufweist, wird nicht mehr phosphoryliert.

Diese Befunde konnten einen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Thymidylatkinasereaktion liefern. Es wurde vermutet, daß der ratenlimitierende Schritt in der Aktivierung von AZTMP 26 durch hsTmpK_{wt} der Phosphoryltransfer, also der chemische Schritt, sein könnte. Sollten die α -Phosphatgruppe von AZTMP **26** und die γ -Phosphatgruppe von ATP infolge der durch den P-Loop-Shift ausgelösten Verzerrung der Enzymstruktur nicht optimal zueinander positioniert sein, hätte dieser Effekt durch eine flexiblere Struktur des Nucleosidrückgrates, die sich der Verzerrung anpassen kann, ausgeglichen werden können.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß tatsächlich die als *induced fit* bezeichnete Konformationsänderung von der offenen in die geschlossene Form, die durch die Substratbindung induziert wird, den ratenlimitierenden Schritt der Thymidylatkinasereaktion darstellt.

4.4 Synthese der potentiell antiviral aktiven *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate

Zunächst sollte versucht werden, daß *cyclo*Sal-Konzept auf das antiviral aktive Nucleosidphosphonat 9-[2-Phosphonylmethoxyethyl]adenin (PMEA) **11** zu übertragen. Dazu mußte zuerst der Diethylester von PMEA **11** dargestellt werden.

4.4.1 Synthese von 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124



Abb. 82 Synthese von 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124

9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124** konnte analog zu einer bekannten Syntheseroute dargestellt werden (Abb. 82). Der erste Schritt besteht in der Ringöffnung von 1,3-Dioxolan **119** mit Acetylchlorid in Gegenwart von Zinkchlorid bei Raumtemperatur zu Acetoxy-2-(chlormethoxy)ethan **120**, das in einer Ausbeute von 93% isoliert werden konnte.^[103] Die Einführung der Phosphonatgruppe zu **121** erfolgte durch eine Michaelis-Arbuzov-Reaktion mit Triethylphosphit zu Diethyl-(2-acetoxymethyl)phosphonat **121**.^[142] Anschließend wurde die Acetylgruppe in Verbindung **121** durch Behandlung mit saurem Ionentauscher in Ethanol zu Diethyl-(2-hydroxyethoxymethyl)phosphonat **122** abgespalten, welches nach Abfiltrieren vom Ionentauscher und Koevaporieren mit Toluol in einer Ausbeute von 99% erhalten wurde.^[143] Um die Hydroxylgruppe in Verbindung **122** in ein

gutes Nucleofug zu überführen, wurde das Mesylat **123** durch Reaktion des Alkohols **122** mit Methansulfonsäurechlorid (MsCl) dargestellt.^[142] Das Mesylat wurde in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung für die folgende Umsetzung verwandt. Zur Einführung der Nucleobase wurde das Mesylat **123** mit dem Natriumsalz von Adenin in N,N-Dimethylformamid bei 100 °C zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt, 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124**, konnte in einer Ausbeute von 52% isoliert werden.

Es ist auch möglich, Verbindung **124** aus dem Natriumsalz von Adenin und dem dem Mesylat **123** analogen Tosylat zu erhalten. Bei dieser Reaktionsführung entstehen jedoch signifikante Mengen des *N*-7 alkylierten Produktes, das von der Zielverbindung **124** abgetrennt werden muß.^[76] Die Struktur von Verbindung **124** konnte durch Aufnahme eines HMBC-Spektrums bewiesen werden.

4.4.2 Synthesestrategie zur Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester

Die Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von PMEA **11** sollte über das entsprechende Phosphonsäuredichlorid **125** durch Kondensation mit Salicylalkohol erfolgen (Abb. 83). Da in vorangegangenen Arbeiten^[76] der Versuch der Darstellung der Zielverbindung **34a** ohne Schutzgruppen nicht erfolgreich war, sollte zuvor die exocyclische Aminogruppe der Nucleobase geschützt werden.



Abb. 83 *Retrosynthese von 9-[2-cycloSal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin* **34a**

Aufgrund der Basenlabilität der Zielverbindung **34a** kamen als Schutzgruppen nur solche in Frage, die sich wie z.B. die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (BOC) oder die Monomethoxytritylgruppe (MMTr) unter sauren Bedingungen abspalten lassen. ^[144] Alternativ sind Schutzgruppen denkbar, die sich wie die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) mit nicht nucleophilen Basen in einer β -Eliminierung abspalten lassen.^[144]

Die Darstellung des Phosphonsäuredichlorides **125** aus dem Phosphonatdiethylester **126** sollte durch intermediäre Überführung in den Bis(trimethylsilyl)ester und anschließende Chlorierung erfolgen. Für diese Chlorierung sind einige Methoden bekannt. So ist es möglich, Trimethylsilylester durch Behandlung mit Chlormethylen-dimethylammoniumchlorid (*Vilsmeier Reagenz*) in die entsprechenden Säurechloride zu überführen. Das *Vilsmeier-Reagenz* kann *in situ* aus Phosphorylchlorid bzw. Oxalylchlorid mit einer katalytischen Menge an *N*,*N*-Dimethylformamid dargestellt werden.^[145] Mit dieser Methode konnten Konjugate aus dem antiviral aktiven Phosphonat Foscarnet und AZT **1** dargestellt werden.

Weiterhin ist es möglich, Säurechloride aus den Trimethylsilylestern durch Reaktion mit Phosphorpentachlorid in Dichlormethan/Tetrachlormethan zu erhalten.^[146] Mit Hilfe dieser Methode konnten Alkyl- und Arylester von PMEA **11** als potentielle Prodrugs erhalten werden.^[147]

Geht man bei der Synthese der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester nicht vom Diethylphosphonat **124** aus, sondern von PMEA **11** selbst, so ist es möglich, das Phosphonsäuredichlorid **125** durch Reaktion des Phosphonates **127** mit Phosphorpentachlorid in Phosphorylchlorid als Lösungsmittel zu erhalten.^[148] Auf diese Weise konnten *cyclo*Sal-Phosphonatdiester **128** von unfunktionalisierten Alkylphosphonaten erhalten werden (Abb. 84).



Abb. 84 Synthese von cycloSal-Phosphonatalkylestern 128

Die Reaktionsbedingungen für die Chlorierung sind jedoch sehr harsch. So muß die Reaktionsmischung auf 120 °C erhitzt werden, was die Methode ungeeignet für die Synthese von *cyclo*Sal-Phosphatdiestern von PMEA **11** macht. Da zudem zwei Äquivalente Chlorwasserstoff freigesetzt werden, ist diese Synthesemöglichkeit mit säurelabilen Schutzgruppen mit kompatibel.

Ausgehend vom Phosphonat ist eine weitere Syntheseroute denkbar. So könnte versucht werden, das freie Phosphonat direkt mit dem Salicylalkohol zu kondensieren. Dazu ist ein

geeigneter Aktivator notwendig. IMBACH et al. gelang 1996 auf diese Weise die Synthese der in Kapitel 2.4 erwähnten SATE-Prodrugs von PMEA **11** in Ausbeuten von 24-71%.^[57]



Abb. 85 Synthese der Bis-(SATE)-PMEA-Prodrugs 17

Als Aktivator fungierte Mesitylensufonyl-3-nitrotriazol (MSNT), das auch in der Synthese von Phosphattriestern Anwendung findet.

Es sollte zunächst versucht werden, ausgehend vom Diethylphosphonat **124** eine BOC-Schutzgruppe einzuführen, um anschließend die *cyclo*Sal-Einheit aufzubauen.

4.4.3 Versuche der Einführung einer BOC-Schutzgruppe

Die BOC-Schutzgruppe wird üblicherweise nicht in der Nucleosidchemie zum Schützen der exocyclischen Aminogruppe von Adenosinderivaten verwandt, da sie unter stark sauren Bedingungen abgespalten werden muß und diese Bedingungen bei 2'-Desoxyadenosinderivaten zum Bruch der glycosidischen Bindung führen können. Eine Ausnahme bilden acyclische Nucleosid- und Nucleotidanaloga wie PMEA 11, die keine glycosidische Bindung besitzen.

Es wurde zunächst versucht die BOC-Schutzgruppe mit Di-*tert*-Butyldicarbonat in Gegenwart einer Base einzuführen (Abb. 86). Jedoch konnte bei Verwendung von Pyridin sowie von Natriumhydroxid in Wasser keine Reaktion beobachtet werden. Auch bei Verwendung von Natriumhexamethyldisilazid in Tetrahydrofuran konnte das gewünschte Produkt **130** nicht isoliert werden.



Abb. 86 *Versuch der Einführung der BOC-Schutzgruppe mit Di-tert-Butyldicarbonat*

Es wurde vermutet, daß Di-*tert*-Butyldicarbonat nicht reaktiv genug sein könnte, um eine Reaktion mit der exocyclischen Aminogruppe zu bewirken. Daher wurde im Anschluß versucht, die BOC-Schutzgruppe durch Verwendung eines *tert*-Butyloxycarbonylaktivesters, 2-(*tert*-Butyloxycarbonyl-oxyimin)-2-phenylacetonitril (BOC-ON) einzuführen (Abb. 87).



Abb. 87 Versuch der Einführung der BOC-Schutzgruppe mit BOC-ON

Jedoch konnte auch bei der Verwendung von BOC-ON in Gegenwart von Triethylamin oder Lithiumhexamethyldisilazid keine Reaktion beobachtet werden.

Die exocyclische Aminogruppe des Adeninderivates **124** ist vermutlich aufgrund der Elektronenarmut der Nucleobase nicht nucleophil genug, um unter den untersuchten Bedingungen zu reagieren.

Nach Abschluß dieser Versuche veröffentlichten NORTH et al. eine Methode zur Schützung der Aminogruppe von Adenin. Hierzu waren 4 Moläquivalente Natriumhydrid als Base sowie 4 Moläquivalente Di-*tert*-Butyldicarbonat notwendig.^[149]

4.4.4 Synthese von 9-[2-*cyclo*Sal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** über eine Fmoc-Schutzgruppenstrategie

Die Fmoc-Schutzgruppe konnte über eine bekannte Synthesemethode^[76] eingeführt werden (Abb. 88).





Bei der Reaktion von 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124** mit Chlorameisensäurefluorenylmethoxycarbonylester (FmocCl) konnte das gewünschte, zweifach geschützte Produkt **131a** in einer Ausbeute von 78% isoliert werden. Daneben konnten auch 18% der einfach geschützten Verbindung **131b** erhalten werden.

Die letztere Verbindung wurde erfolgreich zum *cyclo*Sal-Phosphonatdiester **132b** umgesetzt. Zunächst wurde mit Bromtrimethylsilan (TMSBr) in Acetonitril das Diethylphosphonat in das Bis(trimethylsilyl)phosphonat überführt. Nach Abkondensieren der flüchtigen Anteile wurde das Bis(trimethylsilyl)phosphonat ohne weitere Aufreinigung und Charakterisierung nach Aufnahme in Dichlormethan mit Oxalylchlorid in Gegenwart einer katalytischen Menge an *N,N*-Dimethylformamid in das Phosphonsäuredichlorid überführt. Dieses wurde nach Abkondensieren der flüchtigen Anteile sofort mit 1.2 Moläquivalenten Salicylalkohol in Gegenwart von 3 Moläquivalenten Pyridin und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) zur Reaktion gebracht.^[148] Nach einer Reaktionszeit von drei Tagen konnte das gewünschte Produkt **132b** in einer Ausbeute von 5% isoliert werden. In einer analogen Reaktion gelang es, das zweifach geschützte Produkt **132a** in einer Ausbeute von 12% zu isolieren (Abb. 89).



Abb. 89 Erste Darstellung eines cycloSal-Phosphonatdiesters von PMEA 11

Es wurde vermutet, daß die geringe Ausbeute zum einen auf der zu langen Reaktionszeit und zum anderen auf einem zu großen Überschuß an Base beruhte. Daher wurde in einem Folgeexperiment das Phosphonsäuredichlorid mit 4 Moläquivalenten Salicylalkohol sowie 7 Moläquivalenten Triethylamin zur Reaktion gebracht. Da die Base bezogen auf die beiden Hydroxylgruppen des Salicylalkohols im Unterschuß eingesetzt wurde, zeigte das Reaktionsgemisch eine schwach saure Reaktion. Durch diese Reaktionsführung konnte das Produkt **132a** in einer Ausbeute von 35% isoliert werden. Bei dem Versuch, die Reaktion in Gegenwart von 1 Moleäquivalent Salicylalkohol sowie 1.9 Äquivalenten Base durchzuführen, konnten dünnschichtchromatographisch nur Spuren des Produktes detektiert werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß nach der Generierung des Säurechlorides noch Reste von Oxalylchlorid zurückbleiben, die dann mit dem Salicylalkohol reagierten.
Bei die dem Versuch, Fmoc-Schutzgruppe zum ungeschützten cvcloSal-Phosphonatdiester 34a abzuspalten, trat eine Reihe von Problemen auf. Während es mit einer Reagenzien, die Abspaltung von Fmoc-Schutzgruppen Vielzahl von zur aus Aminosäurederivaten verwandt werden,^[144] zwar zur Abspaltung der Schutzgruppen, jedoch auch zur Spaltung der cycloSal-Maske kam, konnte bei der Verwendung von Triethylamin in Acetonitril keine Reaktion beobachtet werden. Wie sich bei späteren Untersuchungen (vgl. Kapitel 4.5.1) herausstellte, sind cycloSal-Phosphonatdiester deutlich labiler als die entsprechenden cycloSal-Phosphattriester. Vermutlich hätte die Verwendung eines Donorsubstituierten Salicylalkohols an dieser Stelle zu besseren Resultaten führen können.



Abb. 90 Versuch der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Dennoch gelang die Darstellung von 9-[2-*cyclo*Sal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** durch Reaktion mit Triethylamin in Pyridin anstelle von Acetonitril als Lösungsmittel (Abb. 91).



Abb. 91 Synthese von 9-[2-cycloSal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a**

Die Zielverbindung **34a** konnte in einer Ausbeute von 20% isoliert werden. Jedoch konnte auch bei dieser Reaktion dünnschichtchromatographisch neben der Abspaltung der Schutzgruppe auch die Spaltung der *cyclo*Sal-Maske beobachtet werden. Der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester **34a** konnte in einer Gesamtausbeute von 5% aus dem Diethylphosphonat **124** dargestellt werden. Aufgrund der unzureichenden Ausbeute mußte eine alternative Syntheseroute gefunden werden.

4.4.5 Synthese von 9-[2-*cyclo*Sal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** über eine MMTr-Schutzgruppenstrategie

4.4.5.1 Synthese über das Phosphonsäuredichlorid

Nach dem Scheitern der BOC-Schutzgruppenstrategie und der unzureichenden Ausbeute der Fmoc-Schutzgruppenstrategie wurde nun versucht, die Zielverbindung **34a** mit Hilfe einer MMTr-Schutzgruppe darzustellen. Die Monomethoxytrityl-geschützte Verbindung **133** wurde durch Umsetzen des Diethylphosphonates **124** mit 4-Monomethoxytritylchlorid (MMTrCl) in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und Triethylamin in 89%iger Ausbeute erhalten (Abb. 92).^[150]



Abb. 92 Versuch der Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-cycloSalphosphonylmethoxyethyl]adenin **134a**

Bei dem Versuch, den aus Verbindung **133** intermediär erzeugten Bis(trimethylsilyl)ester mit Oxalylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid zu chlorieren, konnte eine Zersetzung der Verbindung beobachtet werden. Offenbar erfolgte zunächst eine Abspaltung der Schutzgruppe und anschließend eine Reihe von Folgereaktionen, was sich durch einen Farbverlauf der Reaktionsmischung von farblos über orange hin zu schwarz zeigte. Auch der Versuch, das *Vilsmeier-Reagenz* nicht *in situ* zu erzeugen, sondern zuvor darzustellen, um reaktives Oxalylchlorid in Gegenwart der MMTr-geschützten Verbindung zu vermeiden, scheiterte. Die Reaktion zeigte den gleichen Farbverlauf wie zuvor. Da die MMTrSchutzgruppe durch die Methoxygruppe einen elektronenreichen Aromaten enthält, läßt sie sich, im Gegensatz zur nicht aktivierten Fmoc-Gruppe, durch das *Vilsmeier-Reagenz* formylieren, was zunächst zur Abspaltung der Schutzgruppe und dann zu weiteren Folgereaktionen führte.

Da die Tritylschutzgruppe keinen aktivierten Aromaten enthält, sollte sie prinzipiell die Reaktion mit dem Vilsmeier-Reagenz tolerieren. Die Synthese von N-Trityl-9-[2diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 135 gelang in einer Ausbeute von mäßigen 65%. Bei Reaktionsdurchführung die Verwendung 3 Moläquivalenten der war von Chlortriphenylmethan (TrCl) und insbesondere das Verhältnis von Pyridin zu *N*,*N*-Dimethylformamid von 1.1:1.5 von großer Bedeutung.^[151] In reinem Pyridin als Lösungsmittel konnte ebensowenig eine Reaktion beobachtet werden wie bei *N*,*N*-Dimethylformamid als Lösungsmittel und Zugabe von Pyridin als Reagenz.



Abb. 93 Darstellung von N-Trityl-9-[2-cycloSal-phosphonylmethoxyethyl]adenin 136

Bei der anschließenden Umsetzung der Trityl-geschützten Verbindung **135** in einer analogen zu der in Kapitel 4.4.4 beschriebenen Reaktionsführung konnte das gewünschte Produkt **136** in einer Ausbeute von lediglich 9% isoliert werden (Abb. 93). Dünnschichtchromatographisch ließ sich auch hier eine partielle Abspaltung der Schutzgruppe beobachten.

Zwar gelang auf diesem Weg die Einführung der *cyclo*Sal-Maske, jedoch war die Ausbeute mit 9% enttäuschend, so daß die entschützte Zielverbindung **34a** auch auf diesem Wege nur in unzureichenden Ausbeuten zugänglich gewesen wäre. Aus diesem Grunde wurde an dieser Stelle nicht weiter versucht, die Trityl-Schutzgruppe abzuspalten. Es wurde vielmehr nach einer alternativen Chlorierungsmethode gesucht.

Mit Phosphorpentachlorid Phosphonate, lassen sich nicht nur sondern auch Phosphonatbis(trimethylsilyl)ester in die entsprechenden Phosphonsäuredichloride überführen. Zudem sind Reaktionsbedingungen bei Chlorierung die der von Phosphonatbis(trimethylsilyl)estern deutlich milder. Während für die Chlorierung von Phosphonaten Phosphorylchlorid als Lösungsmittel sowie eine Reaktionstemperatur von 120 °C benötigt werden, gelingt die Chlorierung von Trimethylsilylestern in halogenierten Kohlenwasserstoffen bei Raumtemperatur.^[147] Zudem entstehen mit Phosphorylchlorid und Chlortrimethylsilan keine Brönstedt-Säuren als Nebenprodukte, was die Verwendung von säurelabilen Schutzgruppen ermöglicht.

Zur Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134a** auf diesem Weg wurde zunächst *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **133** mit Bromtrimethylsilan in Acetonitril in das Bis(trimethylsilyl)phosphonat **137** überführt (Abb. 94).





Der Silylester **137** wurde nach Abkondensieren der flüchtigen Anteile sowie Koevaporieren mit Toluol in Dichlormethan aufgenommen und mit 2.1 Moläquivalenten Phosphorpentachlorid versetzt. Zwar färbte sich das Reaktionsgemisch nach Zugabe von Phosphorpentachlorid orange, dünnschichtchromatographisch konnten aber nur Spuren der abgespaltenen MMTr-Schutzgruppe detektiert werden. Nach einer Reaktionszeit von 2.5 Stunden bei Raumtemperatur wurden erneut die flüchtigen Anteile abkondensiert. Das Phosphonsäuredichlorid **138** wurde in Dichlormethan aufgenommen und bei 0 °C eine Lösung von 2 Moläquivalenten Salicylalkohol und 3.9 Moläquivalenten Triethylamin in Dichlormethan zugetropft. In diesem Fall führte eine Verwendung von 4 Moläquivalenten Salicylalkohol zu keiner Verbesserung der Ausbeute. Die isolierte Ausbeute des Produktes **134a** war sogar geringer. Vermutlich bleiben bei der Verwendung von Phosphorpentachlorid geringere Mengen an Chlorierungsmittel zurück, so daß ein großer Überschuß an Salicylalkohol nicht notwendig ist. Dünnschichtchromatographisch konnte neben der Bildung des Produktes mit fortschreitender Reaktionsdauer sogar eine Zersetzung des Produktes beobachtet werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß der überschüssige Salicylalkohol die *cyclo*Sal-Maske nucleophil angreift.

Bei Verwendung von nur 1 Moläquivalent Salicylalkohol konnten wie schon in vorhergehenden Experimenten nur Spuren des Produktes detektiert werden, was darauf schließen läßt, daß doch Reste des Chlorierungsmittel beim Abkondensieren und Koevaporieren zurückbleiben.

Es hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen, die Reaktion nicht durch Zugabe von Essigsäure abzubrechen und anschließend das Lösungsmittel abzudestillieren, sondern das Reaktionsgemisch direkt auf eine Kieselgelsäule aufzutragen und das Produkt mit angesäuerten Lösungsmittelgemischen zu eluieren. Bei der Entfernung des Lösungsmittels konnte wiederum eine partielle Zersetzung des Produktes beobachtet werden, was vermutlich erneut auf den nucleophilen Angriff überschüssigen Salicylalkohols zurückzuführen ist.

Nach weiterer chromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt **134a** in einer Ausbeute von 46% isoliert werden.

Nach diesem Verfahren konnten ebenso die 3-Methyl-, 3-*tert*-Butyl- und die 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-Phosphonatdiester **134b-d** in Ausbeuten zwischen 31 und 48% dargestellt werden (Abb. 96, S. 92).



Abb. 95 Darstellung von 3,5-Di-tert-Butylsalicylalkohol 140

Die letztere Verbindung wurde synthetisiert, da sich die übrigen *cyclo*Sal-Phosphonatdiester als überraschend labil erwiesen (vgl. Kapitel 4.5.1). Dazu wurde zuvor 3,5-Di-*tert*-

Butylsalicylalkohol **140** aus 2,4-Di-*tert*-Butylphenol **139** durch Hydroxymethylierung mit wäßriger Paraformaldehydlösung in Methanol dargestellt.^[152]



Abb. 96 Darstellung der cycloSal-Phosphonatdiester 134a-d

Nach der Synthese der geschützten *cyclo*Sal-Phosphonatdiester mußte nun die MMTr-Schutzgruppe abgespalten werden. Bei dem Versuch, die Schutzgruppe mit einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol abzuspalten, konnte neben der Abspaltung der Schutzgruppe auch eine Zersetzung des Produktes beobachtet werden. Aus diesem Grund und weil befürchtet wurde, daß eine chromatographische Abtrennung der Benzolsulfonsäure aufgrund der ebenfalls hohen Polarität der Produkte problematisch sein könnte, wurde die Abspaltung der MMTr-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure durchgeführt (Abb. 97).



Abb. 97 Synthese der entschützten cycloSal-Phosphonatdiester **34a-d**

Dazu wurden die Phosphonatdiester **134a-d** in Acetonitril oder Dichlormethan aufgenommen und 20 Volumenprozent Trifluoressigsäure zugegeben. Nach einstündigem Rühren wurde entweder (Acetonitril als Lösungsmittel) mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet und anschließend chromatographisch gereinigt, oder (Dichlormethan als Lösungsmittel) die Reaktionslösung direkt am Chromatotron gereinigt. Dichlormethan war im Fall des unsubstituierten Derivates **134a** sowie von 3-Methyl-*cyclo*Sal-Phosphonatdiesters **134b** notwendig, da sich die Verbindungen nur unzureichend in Acetonitril lösten. Die hohe Menge an Trifluoressigsäure war notwendig, da bei der Verwendung einer 5% igen Lösung die Reaktionszeit deutlich länger war. Neben dem Fortschritt der Entschützung konnte in diesen Fällen auch eine partielle Zersetzung des Produktes beobachtet werden. Die *cyclo*Sal-Phosphonatdiester **34a-d** konnten als Trifluoracetate isoliert und eindeutig charakterisiert werden.

4.4.5.2 Darstellung durch direkte Kondensation des Phosphonates mit Salicylalkohol

Neben der Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester über die Phosphonsäuredichloride wurde auch versucht, die *cyclo*Sal-Maske durch direkte Kondensation des Phosphonates **129** mit Salicylalkohol in Gegenwart des Aktivators MSNT darzustellen (Abb. 98).



Abb. 98Darstellung von Verbindung 134a durch Kondensation des Phosphonats 129mit Salicylalkohol

Dazu wurde zunächst das Phosphonat **129** aus dem Phosphonatdiester **133** durch intermediäre Überführung in den Bis(trimethylsilyl)ester und dessen anschließende Hydrolyse mit Triethylammoniumbicarbonatpufferlösung dargestellt.^[57]

Zur Einführung der *cyclo*Sal-Maske wurde das Phosphonat **129** in Pyridin gelöst und mit drei Moläquivalenten Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) aktiviert. Anschließend wurden 1.2 Moläquivalente Salicylalkohol zugegeben. Nach einer sechzehnstündigen Reaktionszeit konnte das Produkt **134a** in einer Ausbeute von 23% isoliert werden. Da bei dieser Reaktion der Salicylalkohol nicht durch etwaige Reste eines Chlorierungsmittels abgefangen werden kann, mißlang ein Versuch, die Reaktion mit 2 Moläquivalenten des Salicylalkohols durchzuführen. Es konnte lediglich die Zersetzung des Produktes beobachtet werden. Da die Ausbeute auf diesem Reaktionsweg deutlich unter der der Route über das Phosphonsäuredichlorid lag und zudem die Aufreinigung des Phosphonates **129** recht aufwendig war, wurde dieser Reaktionsweg zur Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von PMEA **11** nicht weiter verfolgt.

4.4.6 Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von PMPA **12**

Die Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von PMPA **12** sollte direkt aus dem Phosphonat selbst erfolgen, welches von Gilead Sciences Inc. zur Verfügung gestellt wurde. Eine Synthese des Nucleotidanalogons selbst wurde nicht durchgeführt, da die Einführung des stereogenen Zentrums eine aufwendige Synthese notwendig macht.

Zur Synthese der *cyclo*Sal-PMPA-Derivate gab es zwei Möglichkeiten. Es könnte versucht werden, das Nucleotidanalogon an der exocyclischen Aminogruppe zu schützen, um es dann in den Diethylester zu überführen. Ferner könnte versucht werden, daß Phosphonat direkt mit Salicylalkohol zu kondensieren. Dies könnte mit oder ohne Schutzgruppe an der exocyclischen Aminogruppe geschehen. Aufgrund der Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials fiel die Entscheidung für die letztgenannte Variante. Aus Hydrolyseuntersuchungen der PMEA-Derivate war bekannt, daß die *cyclo*Sal-Phosphonatdiester deutlich labiler sind als die entsprechenden Phosphattriester (vgl. Kapitel 4.5.1). Daher wurde nur versucht, die stabilsten Derivate, d.h. die 3-*tert*-Butyl- sowie die 3,5-Di-*tert*-Butyl-Verbindung darzustellen. Da die geringe Ausbeute bei der Darstellung des unsubsituierten PMEA-Derivates **134a** durch direkte Kondensation vermutlich auf die hohe Labilität des Produktes zurückzuführen war, wurde vermutet, daß bei der Verwendung substituierter Salicylalkohole höhere Ausbeuten zu erzielen wären.

Die beiden Verbindungen **35a** und **35b** wurden nach der in Kapitel 4.4.5.2 vorgestellten Synthesemethode dargestellt (Abb. 99).



Abb. 99 Darstellung der cycloSal-PMPA-Derivate 35a,b

Die erzielten Ausbeuten sind mit 41 bzw. 35% zwar allenfalls als mäßig zu bezeichnen, vergleicht man sie jedoch mit den Gesamtausbeuten bei der Darstellung der PMEA-Derivate, so könnte auch durch Einführung von Schutzgruppen und Einführung des *cyclo*Sal-Restes vermutlich keine höhere Ausbeute erzielt werden. Zudem spricht der geringe Aufwand für diese Synthesemethode.

4.4.7 Darstellung von (*S*)-9-[3-Hydroxy-2-(3,5-di-*tert*-butyl-*cyclo*Salphosphonylmethoxypropyl]cytosin **36**

Ermutigt durch die guten Resultate bei der Darstellung der *cyclo*Sal-PMPA-Derivate **35a,b** wurde versucht, die *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von HPMPC **13** auf einem analogen Weg darzustellen.

Bei dem Versuch, HPMPC **13** direkt mit 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol in Gegenwart von MSNT zu kondensieren, konnte jedoch lediglich 3-Nitrotriazol isoliert werden (Abb. 100)



Abb. 100 Versuch der Darstellung von Verbindung 36 durch direkte Kondensation

Die Tatsache, daß 3-Nitrotriazol entstanden war, läßt darauf schließen, daß das Phosphonat zwar sulfoniert und damit aktiviert wurde, jedoch ist entweder die Folgeraktion, die Kondensation mit dem Salicylalkohol, nicht abgelaufen oder das gebildete Produkt war unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil genug. Zwar wurden nur 1.1 Moläquivalente des Alkohols eingesetzt, jedoch ist unter den basischen Reaktionsbedingungen ein Angriff der freien Hydroxylgruppe auf das Phosphoratom möglich. Daher wurde die Reaktion mit Dichlormethan als Lösungsmittel und Pyridin als Reagenz wiederholt. Es konnte jedoch erneut nur 3-Nitrotriazol isoliert werden.

Aus diesem Grund wurde nun versucht die freie Hydroxylgruppe mit einer säurelabilen Schutzgruppe zu schützen.

Dazu wurde HPMPC **13** mit Tri-*n*-butylamin in das Ammoniumsalz überführt und anschließend mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) zur Reaktion gebracht.^[153] Nach

Aufarbeitung und Umkristallisation konnte das gewünschte Produkt, *O*-DMTr-HPMPC **135** in einer sehr guten Ausbeute von 91% isoliert werden (Abb. 101). Dabei wurde überraschenderweise nicht das Ammoniumsalz sondern das freie Phosphonat isoliert.



Abb. 101 Darstellung von O-DMTr-HPMPC 135

Es war jedoch nicht möglich, *O*-DMTr-HPMPC **135** in Gegenwart von MSNT mit 3-*tert*-Butylsalicylalkohol zu kondensieren. Zunächst wurde versucht, die Reaktion in Pyridin durchzuführen, jedoch konnte das Produkt **136** nicht isoliert werden. Auch ein Versuch, die Reaktion in Acetonitril als Lösungsmittel und Triethylamin als Base durchzuführen, scheiterte (Abb. 102).



Abb. 102 Versuch der Darstellung von O-DMTr-3-tert-Butyl-cycloSal-HPMPC 136

Zwei Gründe könnten für die vergeblichen Versuche, die direkte Kondensation durchzuführen, verantwortlich sein. So ist es möglich, daß der sterische Anspruch des 3-*tert*-Butylsalicylalkohols zu groß ist, um mit dem aktivierten Phosphonat, welches selbst zwei sperrige Mesitylengruppen und zusätzlich die DMTr-Gruppe in räumlicher Nähe trägt, zu reagieren. Außerdem könnte es möglich sein, daß die exocyclische Aminogruppe des Cytosinrestes nucleophiler ist, als die des Adeninrestes und damit die Kondensation verhindert.

Es wurde nun versucht, *O*-DMTr-HPMPC **135** mit Phosphorpentachlorid in das Phosphonsäuredichlorid zu überführen, um dieses mit 3-*tert*-Butylsalicylalkohol zu kondensieren (Abb. 103, S. 97). Zum Abfangen des entstehenden Chlorwasserstoffs wurden 2.1 Moläquivalente Pyridin zugegeben. Dünnschichtchromatographisch konnte jedoch nur die

vollständige Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe beobachtet werden. Die Reaktionsbedingungen waren demnach noch zu sauer, um eine Abspaltung der Schutzgruppe zu verhindern.



Abb. 103 Versuch der Darstellung von Verbindung 136 mit Phosphorpentachlorid

Um einen etwaigen Einfluß der exocyclischen Aminogruppe auf die Kondensationsreaktion auszuschließen, sollte nun versucht werden, diese mit einer Schutzgruppe zu versehen. Dabei waren jedoch Hindernisse zu beachten. HOLÝ et al. beobachteten beim Versuch der Synthese von *N*,*O*-DMTr-HPMPC **137**, daß die Acidität des Phosphonsäurerestes ausreichte, um beim Versuch, Verbindung **137** zu isolieren, die *O*-DMTr-Schutzgruppe abzuspalten.^[153] Aus diesem Grund wurde versucht, die DMTr-Gruppe intermediär einzuführen und die zweifach geschützte Verbindung in einer Eintopf-Reaktion weiter mit 3-*tert*-Butylsalicylalkohol zur Reaktion zu bringen (Abb. 104).



Abb. 104 Versuch der Darstellung von Verbindung **138** *durch intermediäre Schützung der Aminogruppe*

Zwar konnte bei der Umsetzung von *O*-DMTr-HPMPC **135** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) dünnschichtchromatographisch ein vollständiger Umsatz des Ausgangsmaterials und die Bildung eines lipophileren DMTr-haltigen Produktes beobachtet werden, beim anschließenden Versuch das Phosphonat **137** mit dem Salicylalkohol zu kondensieren konnte jedoch das Produkt **138** nicht isoliert werden. Es wird vermutet, daß tatsächlich der sterische Einfluß der DMTr-Schutzgruppe in Verbindung mit dem sperrigen Aktivator dafür verantwortlich ist, daß die Einführung der *cyclo*Sal-Maske auf diesem Weg nicht erfolgreich war.

Aufgrund dieses Befundes sollte versucht werden, die *cyclo*Sal-Einheit ausgehend von einem geschützten HPMPC-Diethylester über das Phosphonsäuredichlorid einzuführen. Da säurelabile Schutzgruppen nicht vor einer etwaigen Veresterung der Phosphonsäure eingeführt werden konnten, und zudem ein störender Einfluß der Amino- sowie der Hydroxylgruppe bei einer Veresterung befürchtet wurde, konnte diese Synthese nicht von HPMPC **13** ausgehen.

Die Synthese sollte von *N*-Benzoyl-*O*-Trityl-HPMPC **139**, welches von Gilead Sciences Inc. zur Verfügung gestellt wurde, ausgehen. Da die Benzoylschutzgruppe, die unter basischen Bedingungen abgespalten wird, nicht mit der elektrophilen Natur der *cyclo*Sal-Einheit kompatibel ist, mußte zunächst eine Schutzgruppenmanipulation durchgeführt werden (Abb. 105).



Abb. 105 Schützung der exocyclischen Aminogruppe mit einer säurelabilen Gruppe

Die Benzoylschutzgruppe wurde mit Natriummethanolat in Methanol abgespalten und anschließend die MMTr-Schutzgruppe durch Reaktion des freien Amins **140** mit 4-Monomethoxytritylchlorid (MMTrCl) in Gegenwart von Triethylamin und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) in Dichlormethan eingeführt. Die Ausbeute über beide Stufen betrug 58%.

Für den Schutz der Aminogruppe fiel die Wahl auf die MMTr-Schutzgruppe und nicht auf die im Molekül schon vorhandene Tritylschutzgruppe, da die erstere stabiler ist als die DMTrSchutzgruppe, sich jedoch unter milderen Bedingungen abspalten läßt, als die Tritylschutzgruppe. Es kommt hinzu, daß Tritylschutzgruppen an Aminofunktionen stabiler sind als an Hydroxylgruppen.^[144] Die MMTr-Gruppe sollte einen guten Kompromiß aus hinreichender Stabilität für die Chlorierung und notwendiger Labilität bei der Abspaltung ermöglichen.

Überführung Bei der anschließenden des Diethylesters entsprechende in das Phosphonsäuredichlorid mit Phosphorpentachlorid konnte nur eine geringe Abspaltung der werden. Die anschließende Schutzgruppen beobachtet Reaktion mit 3.5-*tert*-Butylsalicylalkohol wurde unter analogen Bedingungen zu den Synthesen der PMEA-Derivate durchgeführt, d.h. mit 2 Moläquivalenten des Salicylalkohols und 3.9 Moläquivalenten Triethylamin als Base. Unter diesen Bedingungen konnte in diesem Fall dünnschichtchromatographisch zwar die Bildung des Produktes, jedoch auch dessen rasche Zersetzung beobachtet werden. Eine Messung des pH-Wertes des Reaktionsgemisches zeigte, daß dieses nicht wie im Fall der PMEA-Derivate schwach sauer, sondern vielmehr basisch reagierte, was vermutlich zu einem Angriff überschüssigen Alkohols auf die cycloSal-Maske und deren Spaltung führte.

Die Wiederholung des Versuches wurde daher mit lediglich 1.1 Moläquivalenten des Salicylalkohols und 1.5 Moläquivalenten Triethylamin durchgeführt. Das Reaktionsgemisch zeigte in diesem Fall eine schwach saure Reaktion. Obwohl die Verwendung von lediglich 1.1 Moläquivalenten Salicylalkohol bei der Synthese der *cyclo*Sal-PMEA-Verbindungen keinen Erfolg brachte, konnte in diesem Fall das gewünschte Produkt **142** in einer Ausbeute von 44% isoliert werden (Abb. 106).





Das Produkt wurde, wie schon die *cyclo*Sal-PMPA-Verbindungen **35a,b**, als Gemisch zweier Diastereomere erhalten. Während das Diastereomerenverhältnis bei den letzteren, wie auch bei den *cyclo*Sal-Phosphattriestern, keine bevorzugte Bildung eines der beiden Diastereomere zeigte, konnte die Verbindung **142** als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1.5 isoliert werden. Dieses Diastereomerenverhältnis, das auch im Rohprodukt gefunden wurde, ist wahrscheinlich auf den sterischen Anspruch der Trityl-Schutzgruppe an der Hydroxylgruppe in Verbindung mit der *tert*-Butylgruppe an C3 des aromatischen Ringes zurückzuführen. Dieser Befund liefert auch einen guten Hinweis darauf, daß die direkte Kondensation des freien Phosphonates **135** mit 3-*tert*-Butylsalicylalkohol aus sterischen Gründen scheiterte.

Die abschließende Abspaltung beider Schutzgruppen wurde wie schon im Fall von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-Methyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134b** in Dichlormethan als Lösungsmittel durchgeführt, da sich Verbindung **142** nur unzureichend in Acetonitril löste. Zum Abspalten wurden erneut 20 Volumenprozent Trifluoressigsäure verwandt. Allerdings mußte in diesem Fall die Reaktionslösung für 30 Minuten auf 40 °C erwärmt werden, da bei Raumtemperatur keine vollständige Abspaltung der *N*-MMTr-Schutzgruppe erzielt werden konnte. Aus dieser Hinsicht wäre die DMTr-Gruppe zum Schutz der Aminofunktion besser geeignet gewesen als die MMTr-Gruppe. Jedoch konnte bei der vorherigen Reaktion eine partielle Abspaltung eben dieser Schutzgruppe beobachtet werden, so daß die DMTr-Schutzgruppe für diesen Reaktionsschritt möglicherweise zu labil gewesen wäre.



Abb. 107 Darstellung von 3,5-Di-tert-butyl-cycloSal-HPMPC 36

3,5-Di-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-HPMPC **36** konnte als Trifluoracetat in einer Ausbeute von 78% isoliert werden (Abb. 107). Bei der Aufreinigung der Verbindung kam es jedoch sehr leicht zu einer Zersetzung des Produktes. So konnte bei einer wiederholten chromatographischen Aufreinigung am Chromatotron die quantitative Zersetzung des Produktes beobachtet werden. Auch in organischen Lösungsmitteln gelöst ist das Produkt nur sehr eingeschränkt stabil. Offenbar reicht die Nucleophilie der freien Hydroxylgruppe bereits in organischen Lösungsmitteln aus, um nucleophil am Phosphoratom anzugreifen und die *cyclo*Sal-Maske abzuspalten (siehe dazu auch Kapitel 4.5.1).

Dennoch konnte die Verbindung **36** ¹H-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch identifiziert und eindeutig charakterisiert werden.

4.5 Eigenschaften der *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate

In diesem Kapitel sollen zunächst die Hydrolyseeigenschaften der synthetisierten *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate in wäßrigem Phosphatpuffer sowie in biologischen Medien dargestellt und diskutiert werden. Ferner soll ihr Verhalten gegenüber Serumcholinesterase sowie ihre Aktivität gegenüber dem HI-Virus vorgestellt und diskutiert werden.

4.5.1 Hydrolysekinetiken der *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate

Auch von den dargestellten *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonaten sollten zunächst die Halbwertszeiten in wäßrigem Phosphatpuffer (pH 7.3) bei 37 °C bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte dabei analog zu der in Kapitel 4.2.1 vorgestellten Methode.

Die Hydrolysehalbwertszeiten der cycloSal-PMEA-Verbindungen sind in Abb. 108 dargestellt.



Abb. 108 Hydrolysehalbwertszeiten der cycloSal-PMEA-Verbindungen 34a-d

Die unsubstituierte Verbindung **34a** hat wie erwartet mit 0.09 Stunden die kürzeste Halbwertszeit. Diese wächst an wenn der aromatische Ring der *cyclo*Sal-Maske mit elektronenliefernden Gruppen substituiert wird. Die Halbwertszeit der 3-Methyl-Verbindung **34b** beträgt bereits 0.56 Stunden und die der 3-*tert*-Butyl-Verbindung **34c** 4.05 Stunden. Vermutlich verursacht auch in diesem Fall die hohe Lipophilie der *tert*-Butylgruppe den signifikanten Anstieg der Hydrolysehalbwertszeit (vgl. Kapitel 4.2.1, S. 63). Interessanterweise besitzt die disubstituierte Verbindung **34d**, die mit dem Ziel synthetisiert worden war, die Halbwertszeit zu erhöhen, mit 3.05 Stunden eine geringere Halbwertszeit als die monosubstituierte Verbindung **34c**.



Ein Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten mit denen von *cyclo*Sal-d4T-Monophosphaten^[154, 33] (Abb. 109) zeigt, daß die *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate **34a-d** 24bis 50-fach schneller hydrolysieren als die entsprechenden *cyclo*Sal-d4TMP-Verbindungen.

Abb. 109 Hydrolysehalbwertszeiten von cycloSal-d4TMPs

Phosphonatdiester unterscheiden sich von Phosphattriestern formal durch den Austausch eines Sauerstoffatoms durch eine Methylengruppe. Offenbar ist dieser Austausch für eine massive Beschleunigung der Hydrolyse von Phosphonatdiestern verantwortlich. Da das Nucleophil in beiden Fällen identisch ist, muß also das Phosphoratom deutlich elektrophiler, d.h. elektronenärmer sein. In Phosphattriestern kommt es zwischen den drei Sauerstoffatomen der Estergruppen und dem Phosphoratom zu $d\pi$ -p π -Wechselwirkungen der freien d-Orbitale des Phosphoratoms und den freien Elektronenpaaren am Sauerstoffatom. Dies führt zu einer Erhöhung der Elektronendichte am Phosphoratom. Eine Methylengruppe kann eine analoge Wechselwirkung nicht ausbilden. Allenfalls eine Hyperkonjugation der Kohlenstoff-Wasserstoffbindung mit den d-Orbitalen des Phosphoratoms ist denkbar. Offensichtlich reicht also bereits der Austausch eines Sauerstoffatoms durch eine Methylengruppe aus, um die Elektrophilie des Phosphoratoms so zu erhöhen, daß Phosphonatdiester deutlich schneller hydrolysieren als analoge Phosphattriester.

Dieser Effekt konnte auch bei Alkylphosphonatdiestern und Alkylphosphattriestern werden ^[155, 156, 157] So beobachtet besitzt die Hydrolysereaktion von Dimethylmethylphosphonat Medium ca. 20-fach in alkalischem eine höhere Geschwindigkeitskonstante als die Hydrolyse von Trimethylphosphat. Die Aktivierungsenergie für die Hydrolyse des Phosphates ist 2.7 kcal/mol höher als die Aktivierungsenergie für die Hydrolyse des Phosphonates.^[157] Außer für die unsubstituierte Verbindung 34a ist die beobachtete Beschleunigung der Hydrolyse der cycloSal-Phosphonate 34b-d ebenfalls ca. 20- bis 25-fach. Die erhöhte Labilität der cycloSal-Phosphonatdiester im Vergleich zu den cycloSal-Phosphattriestern ist demnach vermutlich auf eine Erhöhung der Elektrophilie des Phosphoratoms zurückzuführen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß, insbesondere aufgrund der cyclischen Struktur der *cyclo*Sal-Verbindungen, auch weitere Effekte, wie z.B. eine erhöhte Ringspannung der Phosphonatdiester, eine Rolle spielen.

Die sehr hohe Labilität insbesondere von Verbindung **34a** ist auch als Grund dafür zu betrachten, daß bei der Synthese dieser Verbindung deutliche Schwierigkeiten auftraten. Speziell die Empfindlichkeit gegenüber Überschüssen an Salicylalkohol bei der Synthese des *cyclo*Sal-Phosphonatdiesters (vgl. Kap. 4.4.5.1, S. 88) als auch die Probleme bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (vgl. Kap. 4.4.4, S. 85) sind auf die hohe Elektrophilie des Phosphoratoms zurückzuführen.

Normalerweise ist der erste Schritt der Hydrolyse von *cyclo*Sal-Monophosphaten, die Spaltung der Phenylesterbindung, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion (vgl. Abb. 12, S. 13). Nur bei sehr labilen, akzeptorsubstituierten *cyclo*Sal-d4T-Monophosphaten ist der zweite Schritt, die Spaltung der Benzylkohlenstoff-Sauerstoff-Bindung, geschwindigkeitsbestimmend und das Intermediat, der Benzylphosphatdiester **21** kann HPLC-chromatographisch detektiert werden.^[138] Da eine erhöhte Elektrophilie des Phosphoratoms der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester nur den ersten Schritt der Hydrolyse beschleunigen sollte, müßte es auch bei sehr labilen *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonaten möglich sein, das Intermediat der Hydrolyse, den Benzylphosphonatmonoester **146** zu beobachten (Abb. 110).



Abb. 110 Hydrolyseweg von cycloSal-Phosphonatdiestern

Tatsächlich konnte bei der Hydrolyse der Verbindungen **34a** und **34b** HPLCchromatographisch ein Intermediat der Reaktion, bei dem es sich aller Voraussicht nach um den Benzylphosphonatmonoester handelt, detektiert werden. Die Halbwertszeit des Intermediates konnte in beiden Fällen auf ca. 0.8 Stunden bestimmt werden (Abb. 111).

Die Tatsache, daß die Halbwertszeit des Benzylphosphonatmonoesters **146** unabhängig vom Substitutionsmuster am aromatischen Ring ist, liefert einen weiteren Hinweis dafür, daß die Abhängigkeit der Hydrolysehalbwertszeit von *cyclo*Sal-Verbindungen von diesem Substitutionsmuster tatsächlich nur auf der Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Phenylesterbindung durch den jeweiligen Substituenten in der Ausgangverbindung beruht.



Abb. 111Verlauf der Konzentrationen von Ausgangsmaterial und Intermediat bei derHydrolyse von Verbindung 34a

Auch in einer ³¹P-NMR-Studie der Hydrolyse von Verbindung **34b** konnte wiederum ein Intermediat beobachtet werden (Abb. 112, S. 105).

Zu Beginn der Hydrolyse (t_0) konnte lediglich das Signal des Ausgangsmaterials **34b** bei 18.4 ppm detektiert werden. Im Verlauf der Hydrolyse (t_1) erschienen zwei neue Signale. Ein schwächeres Signal bei 15.8 ppm sowie ein stärkeres Signal bei 22.0 ppm. Das letztere verschwand im weiteren Verlauf der Hydrolyse zugunsten des Signals bei 15.8 ppm, dem Produkt der Hydrolyse, PMEA **11**. Da der möglicherweise intermediär auftretende Phenylphosphonatmonoester **147** chemisch nicht weiter hydrolysieren könnte, handelt es sich bei dem beobachteten Intermediat sehr wahrscheinlich um den Benzylphosphonatmonoester **146** (vgl. Abb. 110, S. 103). Alle vorliegenden Daten weisen darauf hin, daß *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate wie die Verbindungen **34a-d** einen analogen Hydrolyseweg durchlaufen wie *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate.



Abb. 112 ³¹*P*-*NMR*-*Hydrolysestudie von 3-Methyl-cycloSal-PMEA* **34b**

Die Tatsache, daß 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-d4TMP **145** mit einer geringeren Halbwertszeit hydrolysiert wird, als 3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-d4TMP **144** (vgl. Abb. 109, S. 102) konnte mit Hilfe einer ³¹P-NMR-Hydrolysestudie darauf zurückgeführt werden, daß bei der Hydrolyse dieser Verbindungen ca. 35% des Phenylphosphatdiesters **22** (vgl. Abb. 12, S. 13) als Konkurrenzreaktion zur Bildung des Benzylphosphatdiesters **21** und nachfolgender Fragmentierung zum Nucleosidmonophosphat **23** und dem Salicylalkohol **24** entstehen.^[158] Es war zu befürchten daß auch im Fall von 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-PMEA **34d** signifikante Mengen des Phenylphosphonatmonoesters **147** (Abb. 110, S. 103) entstehen könnten. Eine ³¹P-NMR-Hydrolysestudie konnte jedoch zeigen, daß keinerlei Phenylphosphonatmonoester **147** entstand (Abb. 113, S. 106).

Zu Beginn der Hydrolyse (t_0) konnte lediglich der Phosphonatdiester **34d** bei 19.8 ppm detektiert werden. Dieses Signal verschwand im Laufe der Reaktion (t_1 , t_2) zugunsten eines einzigen Signals bei 15.4 ppm, dem Produkt der Hydrolyse, PMEA **11**. Es konnten keine weiteren Signale detektiert werden. Angesichts der Tatsache, daß die Hydrolyse nur das gewünschte Produkt liefert, ist unklar, warum die disubstituierte Verbindung **34d** schneller hydrolysiert wird als die monosubstituierte Verbindung **34c**.



Abb. 113 ³¹P-NMR-Hydrolysestudie von 3,5-Di-tert-Butyl-cycloSal-PMEA 34d

Das Hydrolyseverhalten von Verbindung **34c** ist umso erstaunlicher, wenn man die Hydrolysehalbwertszeit mit der der analogen PMPA-Verbindung **35b** vergleicht (Abb. 114)



Abb. 114Hydrolysehalbwertszeiten der cycloSal-PMPA-Verbindungen 35a,b imVergleich zu den PMEA-Verbindungen 34c,d

Während die 3-*tert*-Butyl-substituierten Verbindungen **34c** und **35a** Halbwertszeiten der gleichen Größenordnung (4.05 bzw. 3.39 Stunden) haben, so besitzt die disubstituierte PMPA-Verbindung **35b** mit 5.91 Stunden eine nahezu doppelt so hohe Halbwertszeit wie Verbindung **34d**. Eine ³¹P-NMR-Hydrolysestudie von Verbindung **35b** zeigte auch lediglich PMPA **12** als einziges Produkt. Im Fall der PMPA-Verbindung **35b** konnte also die Hydrolysehalbwertszeit durch einen zweiten *tert*-Butyl-Substituenten erhöht werden.

Es wurde zunächst vermutet, daß die Tatsache, daß die PMEA-Verbindungen **34** als Trifluoracetate isoliert werden konnten, für die verkürzte Halbwertszeit von Verbindung **34d** eine Rolle spielen könnte. Zur Verifizierung wurde die Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeit der salzfreien Verbindung **35b** in Gegenwart von 1 Moläquivalent Natriumtrifluoracetat wiederholt. Die Halbwertszeit von ca. 6 Stunden konnte jedoch bestätigt werden, so daß ein Salzeffekt keine Rolle zu spielen scheint. Die genauen Gründe für die Differenz der Halbwertszeiten bleiben daher unklar.

Es wurden weiterhin die Halbwertszeiten der 3-*tert*-Butyl-substituierten Verbindungen **34c** und **35a** in CEM/0-Zellextrakt sowie in 20%igen humanem Serum bestimmt, um zu überprüfen, ob bei der Hydrolyse der *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate auch enzymatische Reaktionen eine Rolle spielen. Die Verbindungen wurden sechs Stunden in CEM/0-Zellextrakt bzw. in einer 20%igen Lösung von humanem Serum in Phosphatpufferlösung (pH 6.8) bei 37 °C inkubiert und anschließend die Hydrolyse mit essigsaurer Methanollösung gestoppt. Nach Zentrifugieren und Filtration wurde das Filtrat mittels reversed-phase HPLC analysiert.



Abb. 115 Hydrolysehalbwertszeiten von ausgewählten Nucleosidphosphonaten in CEM/0-Zellextrakt

Sowohl in CEM/0-Zellextrakt (Abb. 115) als auch in 20% igem humanem Serum (Abb. 116, S. 108) konnten Halbwertszeiten bestimmt werden, die mit denen in wäßrigem Phosphatpuffer bei pH 7.3 nahezu identisch waren (vgl. Abb. 114, S. 106). Ferner konnten neben den Ausgangsmaterialen und den Phosphonaten PMEA **11** bzw. PMPA **12** keine weiteren Produkte detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, daß auch in biologischen Medien allein die chemische Hydrolyse der *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate abläuft und keine enzymatischen Reaktionen bei der Hydrolyse beteiligt sind. Dies konnte für die cycloSal-Nucleosidmonophosphate bereits gezeigt werden.^[33]



Abb. 116 Hydrolysehalbwertszeiten von ausgewählten Nucleosidphosphonaten in 20%igem humanem Serum

Bereits bei der Synthese und Isolierung von 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-HPMPC **36** konnte beobachtet werden, daß es sich um eine gegenüber Basen sehr labile Verbindung handelt. Bereits in hexadeuteriertem Dimethylsulfoxid konnte ein Abbau der Verbindung beobachtet werden (Abb. 117).



Abb. 117 ³¹*P*-*NMR*-*Hydrolysestudie von* 3,5-*Di-tert-Butyl-cycloSal-HPMPC* 36

Zu Beginn der Reaktion (t_0) konnten lediglich die Signale der beiden Diastereomere von Verbindung **36** bei 16.9 bzw. 17.6 ppm detektiert werden. Diese verschwanden im Laufe der Reaktion zugunsten zweier Signale bei 8.8 bzw. 9.1 ppm. Durch Vergleich mit einer authentischen Probe konnte bewiesen werden, daß es sich bei dem Produkt tatsächlich um 1-[((S)-2-Hydroxy-2-oxo-1,4,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl]cytosin (cyclisches HPMPC, cHPMPC) **149** handelt (Abb. 118, S. 109).



Abb. 118 postulierter Hydrolyseweg von 3,5-Di-tert-Butyl-cycloSal-HPMPC 36

Ähnlich wie schon bei anderen *cyclo*Sal-Phosphattriestern mit einer freien primären Hydroxygruppe beobachtet (vgl. Kap. 4.2.1, S. 63), kommt es vermutlich zu einem Angriff der nucleophilen freien Hydroxylgruppe in Verbindung **36** auf das Phosphoratom unter Bildung des Benzylphosphonatdiesters **148**, welcher dann zu cHPMPC **149** und, nach Reaktion mit Wasserspuren im Dimethylsulfoxid, dem Salicylalkohol zerfällt. Die hohe Elektrophilie des Phosphoratoms in *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonaten unterstützt den Angriff der Hydroxylgruppe deutlich, so daß in diesem Fall im Gegensatz zu den *cyclo*Sal-Phosphattriestern mit freier Hydroxylgruppe ein nucleophiler Angriff bereits in organischen Lösungsmitteln erfolgt.

cHPMPC **149** selbst zeigt eine antivirale Aktivität gegen HSV-2 vergleichbar der von HPMPC **13**. Jedoch entwickelt es eine signifikant geringere nierenschädigende Wirkung bei wiederholter intravenöser Gabe an Ratten, Hasen und Affen. Es wird intrazellulär in HPMPC **13** metabolisiert.^[159] Das bedeutet, daß Verbindung **36** trotz der Hydrolyse zu cHPMPC **149** eine potentiell antiviral aktive Substanz darstellt. Jedoch wird aller Voraussicht nach Verbindung **36** bereits extrazellulär zu cHPMPC **149** zerfallen. Eine Maskierung der freien Hydroxylgruppe sollte jedoch die Stabilität der Verbindung drastisch erhöhen und damit einen Zugang zu potentiell antiviral aktiven Prodrugs von HPMPC **13** ermöglichen.

4.5.2 Verhalten der *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate gegenüber Serumcholinesterase

Von den *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonaten sollten, wie bereits von den synthetisierten *cyclo*Sal-Phosphattriestern, ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Butyrylcholinesterase bestimmt werden.

Die Bestimmung dieser Eigenschaften erfolgt in einer auf pH 7.8 gepufferten *m*-Nitrophenollösung. Die Inhibition der Butyrylcholinesterasereaktion sollte nach einer Reaktionszeit von 5 bzw. 15 Minuten bestimmt werden. Da die unsubstituierte Verbindung **34a** sowie 3-Methyl-*cyclo*Sal-PMEA **34b** bereits in einer Phosphatpufferlösung bei pH 7.3 eine Halbwertszeit von deutlich unter einer Stunde aufwiesen, war zu befürchten, daß bei pH 7.8 innerhalb von 15 Minuten eine signifikante Spaltung der *cyclo*Sal-Einheit als Konkurrenzreaktion zur enzymatischen Reaktion auftritt. Verbindungen, mit einer Halbwertszeit von weniger als einer Stunde wurden daher nicht in dem Cholinesterase-Assay untersucht. Dies gilt auch für die sehr labile HPMPC-Verbindung **36**.

Die 3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-Verbindungen von PMEA sowie von PMPA wurden, da ihre Hydrolysehalbwertszeit größer als eine Stunde war, auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Serumcholinesterase hin untersucht (Tabelle 4, S. 111).

Erste Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften von *cyclo*Sal-Phosphattriestern wiesen darauf hin, das der Grad der Inhibition stark von der Nucleobase der Nucleosideinheit abhängt.^[160] So inhibieren generell Adenosin-haltige Verbindungen stärker als entsprechende Thymin-haltige Verbindungen. Wie schon in Kapitel 4.2.2 gezeigt, hängt der Grad der Inhibition auch merklich vom Nucleosid- bzw. Nucleotidrückgrat ab.

Wie in Tabelle 4, Seite 111 dargestellt, zeigen die *cyclo*Sal-Phosphonate nach Inkubationszeiten von 5 und 15 Minuten bis zu einer Konzentration von 50 μ M keinerlei inhibitorische Aktivität gegen Serumcholinesterase. Vergleicht man diese Daten mit denen der d4T-Verbindungen 144, 145 und 150, so ist zu erkennen, daß sich die mangelnde Inhibition partiell mit dem Substitutionsmuster am aromatischen Ring der *cyclo*Sal-Einheit erklären läßt. Die disubstituierten *cyclo*Sal-Phosphonatdiester 34d und 35b zeigten ebensowenig eine Inhibition der Butyrylcholinesterase wie die disubstituierte d4T-Verbindung 145.

<i>cyclo</i> Sal-Nucleosidphosphonat bzwmonophosphat			IC ₅₀ [μM] 5 Minuten	IC ₅₀ [μM] 15 Minuten
3-tert-Butyl	PMEA	34c	> 50	> 50
3,5-Di- <i>tert</i> -Butyl	PMEA	34d	> 50	> 50
3-tert-Butyl	PMPA	35a	> 50	> 50
3,5-Di- <i>tert</i> -Butyl	PMPA	35b	> 50	> 50
3,5-Di- <i>tert</i> -Butyl	d4T	145	> 50	> 50
3- <i>tert</i> -Butyl	d4T	144	4.2	2.2
5-tert-Butyl	d4T	150	5.6	0.79

Tabelle 4Inhibitorische Eigenschaften verschiedener cycloSal-Phosphonatdiester bzw.cycloSal-Phosphattriester

Betrachtet man die beiden monosubstituierten d4T-Verbindungen 144 und 150, so fällt auf, daß beide Verbindungen eine deutliche Inhibierung der enzymatischen Reaktion bewirken. Der Grad der Inhibition liegt für beide Verbindungen in der gleichen Größenordnung. Im Fall der d4T-Verbindungen sorgt allein die Kombination beider Substituenten in der 3- sowie in der 5-Position für eine Abnahme der Inhibition. Dagegen zeigen bereits die beiden 3-*tert*-Butyl-substituierten *cyclo*Sal-Phosphonate 34c und 35a keine Inhibierung der Serumcholinesterase mehr.

Da bei anderen Testsubstanzen Adenin-haltige Verbindungen stärker inhibierten als analoge Thymin-haltige, könnte in diesem Fall das acyclische Rückgrat der Nucleotide **34c** und **35b** für den Mangel an inhibitorischer Aktivität verantwortlich sein. So müssen bei acyclischen Verbindungen bei der Bindung an das aktive Zentrum eines Enzyms mehr Freiheitsgrade eingeschränkt werden als bei cyclischen. Die Bindung an das Enzym wird daher aus entropischer Sicht ungünstiger. Allerdings konnte in Kapitel 4.2.2 gezeigt werden, daß die dort untersuchten acyclischen Verbindungen eine Inhibition in der gleichen Größenordnung zeigten wie analoge cyclische Verbindungen.

Neben der Möglichkeit, daß eine beschleunigte Hydrolyse der Verbindungen **34c** und **35b** als Konkurrenz zur Enzymreaktion für die mangelnde Inhibition verantwortlich ist, ist es auch möglich, daß eine Kombination aller strukturellen Parameter (acyclisches Nucleotidrückgrat, Phosphonateinheit statt Phosphattriester, Nucleobase) die Inhibierung des Enzyms verhindert. Die Untersuchung dieser Parameter wird Gegenstand nachfolgender Arbeiten sein.

4.5.3 Antivirale *in-vitro*-Aktivität der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester

Auch die synthetisierten *cyclo*Sal-Phosphonate wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, *in-vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen unterzogen (Tabelle 5). Als Testsysteme kamen HIV-1- bzw. HIV-2-infizierte humane T-Lymphozyten (CEM/0) ebenso zum Einsatz wie HIV-2-infizierte Thymidinkinase-defiziente Zellen (CEM/TK⁻).

		CC ₅₀ ^{b)} [µM]		
Verbindung	CEM/0	CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
PMEA 11	10.5 ± 6.4	10.0	10.0	50.0 ±12.9
3- <i>tert</i> -Butyl 34c	3.0 ± 1.4	4.5 ± 0.7	4.0 ± 1.4	29.3 ± 6.5
3,5-Di- <i>tert</i> -Butyl 34b	5.5 ± 0.7	5 - ≥ 10	4.5 ± 0.7	16.8 ± 0.6
PMPA 12	4.0	3.5 ± 0.7	3.5 ± 0.7	≥ 250
3- <i>tert</i> -Butyl 35a	2.1 ± 1.3	1.6 ± 0.6	1.65 ± 0.49	116 ± 11.3
3,5-Di- <i>tert</i> -Butyl 35b	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.57	0.85 ± 0.21	97.9 ± 5.8
Bis-(POM)-PMEA 14	0.18 ± 0.11	0.075 ± 0.007	0.18 ± 0.03	0.74 ± 0.11
Bis-(POC)-PMPA 15	0.025 ± 0.013	0.015 ± 0.015	0.24 ± 0.012	27.4 ± 3.1

a) $EC_{50} = Effektive Konzentration, bei der 50% der Virusreplikation unterdrückt wird; b) <math>CC_{50} = Cytotoxische Konzentration, bei der 50% der Zellen sterben$

 Tabelle 5
 Anti-HIV-Aktivität und Cytotoxizität der untersuchten cycloSal-Phosphonate

Die unsubstituierte Verbindung **34a** sowie 3-Methyl-*cyclo*Sal-PMEA **34b** wurden aufgrund ihrer zu hohen Hydrolyselabilität nicht untersucht.

Betrachtet man die antivirale Aktivität der beiden PMEA-Derivate **34c** und **34d** im Vergleich zur Stammverbindung PMEA **11**, zeigt sich eine Verbesserung der Aktivität und den Faktor drei bzw. zwei. Die Verbesserung der antiviralen Aktivität konnte in allen untersuchten Systemen beobachtet werden. Auch in den Thymidinkinase-defizienten Zellen konnte die antivirale Aktivität um den gleichen Faktor verbessert werden. Eine stärkere Verbesserung in den Thymidinkinase defizienten Zellen konnte nicht erwartet werden, da PMEA **11** selbst ein Nucleotidanalogon ist und nicht mehr von der Thymidinkinase phosphoryliert werden muß.

Es ließ sich eine gute Korrelation zwischen der Hydrolysehalbwertszeit und der antiviralen Aktivität feststellen. So zeigt die überraschend labilere 3,5-Di-*tert*-Butyl-Verbindung **34d** eine geringere antivirale Aktivität als die 3-*tert*-Butyl-Verbindung **34c**, die eine höhere Hydrolysehalbwertszeit aufweist.

Vergleicht man die antiviralen Aktivitäten mit denen der bekannten Prodrugverbindung, Bis-(POM)-PMEA 14, so ist die letztere ca. 15- bis 25-fach aktiver als die untersuchten *cyclo*Sal-Verbindungen 34c und 34d.

In Bezug auf die Cytotoxizität läßt sich feststellen, daß die *cyclo*Sal-Phosphonate eine etwas höhere Cytotoxizität aufweisen als die Stammverbindung. Jedoch liegt die cytotoxische Konzentration über der effektiven Konzentration. Im Gegensatz dazu zeigt Bis-(POM)-PMEA 14 eine cytotoxische Konzentration, die deutlich niedriger und in der gleichen Größenordnung wie ihre effektive Konzentration liegt.

Die beiden PMPA-Verbindungen **35a** und **35b** zeigen eine antivirale Aktivität, die um den Faktor zwei bzw. vier über der der Stammverbindung PMPA **12** liegt. Auch in diesem Fall konnte die antivirale Aktivität wieder mit der Hydrolysehalbwertszeit korreliert werden. Die in diesem Fall stabilere 3,5-Di-*tert*-Butyl-Verbindung **35b** zeigte eine bessere antivirale Aktivität als 3-*tert*-Butyl-PMPA **35a**. Der Vergleich mit der im Oktober 2001 als anti-HIV-Medikament zugelassenen Prodrug-Verbindung Bis-(POC)-PMPA **15** zeigt jedoch, daß die letztere eine mindestens 40-fach höhere antivirale Aktivität aufweist.

Mit den dargestellten *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonaten konnte die antivirale Aktivität von etablierten Nucleosidphosphonaten verbessert werden. Die Verbesserung fiel allerdings nicht so deutlich aus, wie das beispielsweise bei d4T **2** in Thymidinkinase-defizienten Zellen beobachtet werden konnte.^[64] Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß bei den *cyclo*Sal-Phosphattriestern von d4T **2** die Umgehung eines limitierten enzymatischen Schrittes erreicht werden konnte. Da die Nucleosidphosphonate bereits Nucleotidanaloga darstellen, die nicht durch die Thymidinkinase phosphoryliert werden müssen, sollten die *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate die antivirale Aktivität allein durch eine Verbesserung der Zellaufnahme steigern. Dies konnte, wie die antiviralen Daten belegen, erreicht werden. Auch muß berücksichtigt werden, daß die *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate deutlich labiler sind als analoge *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die untersuchten Verbindungen teilweise bereits extrazellulär hydrolysieren, was zu einer Abnahme der antiviralen Aktivität führt.

5. Zusammenfassung

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von neuartigen Nucleotidanaloga und die Untersuchung ihrer Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase (TmpK). Die dargestellten Nucleosidmonophosphate stellen dabei Analoga des ersten Metaboliten des antiviral aktiven Nucleosidanalogons AZT 1, AZTMP 26, dar. In Abbildung 119 sind die dargestellten Nucleotidanaloga zusammengefaßt.



Abb. 119 Dargestellte Nucleotidanaloga 31, 32 und 33

Zur Darstellung der Nucleotidanaloga **31-33** sollten zunächst die korrespondierenden Nucleosidanaloga **30**, **40**, **41a,b** sowie **42a-d** dargestellt werden (Kap. 4.1, S. 22).

Die bereits in der Diplomarbeit^[93] beschriebene Synthese des acyclischen Nucleosidanalogons T-Penciclovir **40** konnte dabei entscheidend verbessert werden (Kap. 4.1.1.2, S. 24). Einerseits gelang es, die Gesamtausbeute über drei isolierte Stufen auf 24% verglichen mit 13% über fünf Stufen^[93] zu verbessern.

Die entscheidende Verbesserung der Synthese lag jedoch in der Verwendung des Kaliumsalzes von Thymin **49** in Dimethylsulfoxid in der Substitutionsreaktion mit dem Bromid **48**. Dadurch konnte die zuvor beobachtete Verunreinigung des Nucleosidanalogons **40** mit dem unerwünschten *N*-3-alkylierten Produkt (Abb. 25, S. 26) vermieden werden.

Die Synthese des Nucleosidanalogons T-Ganciclovir **30** gelang in einer Ausbeute von 23% über fünf Stufen (Kap. 4.1.2, S. 26). Zwar gelang die Synthese des Nucleosids **30** in früheren Arbeiten^[93] in einer Gesamtausbeute von 43% über vier Stufen, jedoch konnte in der neu entwickelten Syntheseroute die Darstellung des potentiell cancerogenen Chlormethylethers **51** und damit die Verwendung des krebserregenden Lösungsmittels 1,2-Dichlorethan sowie der Einsatz von korrosivem Chlorwasserstoffgas vermieden werden.

Bei der Synthese des Intermediates 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan **56a** konnte lediglich ein 3:1 Gemisch des gewünschten Isomers **56a** und 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan **56b** isoliert werden. Zwar konnte in der letzten Synthesestufe das Nucleosidanalogon **30** durch Umkristallisation aus Ethanol isomerenrein erhalten werden, die Gesamtausbeute der Syntheseroute wurde jedoch durch das Auftreten des durch herkömmliche chromatographische Methoden nicht trennbaren Isomerengemisches deutlich erniedrigt. Da das zweifach Acetyl-geschützte Nucleosidanalogon **58a** ebenfalls nicht in isomerenreiner Form erhalten werden konnte, konnte der Versuch einer stereoselektiven Abspaltung einer der beiden Acetylgruppen nicht unternommen werden.

Die bei der Einführung einer säurelabilen Tritylschutzgruppe an eine der beiden primären Hydroxylgruppen der acyclischen Nucleosidanaloga **30** und **40** beobachtete Reaktion beider Hydroxylgruppen konnte durch selektive Einführung einer Acetyl-Schutzgruppe und anschließende Schutzgruppenmanipulation vermieden werden (Abb. 35, S. 34). Die Ausbeute an 4'-*O*-Trityl-T-Ganciclovir **66** ließ sich damit von 40% auf 66% steigern.



Abb. 120 Darstellung der acyclischen AZT-Analoga 41a,b

Aus Verbindung 66 ließen sich in drei Stufen Azido-T-Ganciclovir 41a sowie erstmals Thiocyanato-T-Ganciclovir 41b darstellen (Abb. 120, S. 115). Verbindung 41a ließ sich ebenfalls mit einer Acetyl-Schutzgruppe darstellen (Abb. 38, S. 37).

Der Versuch einer Racematspaltung von Azido-T-Ganciclovir **41a** durch Veresterung mit (1*S*)-(–)-Camphansäure bzw. (+)-Campher-10-sulfochlorid und anschließende Trennung der Diastereomere mißlang jedoch, da weder säulenchromatographisch noch mittels HPLC eine Trennung der beiden Diastereomere beobachtet werden konnte (Kap. 4.1.3.3, S. 38). Auch der Versuch der Trennung durch fraktionierte Kristallisation scheiterte.

Die Nucleosidanaloga **42a-d** ließen sich in Analogie zu literaturbekannten Synthesewegen aus 2'-Desoxythymidin darstellen (Kap. 4.1.4, S. 41 sowie Kap. 4.1.5, S. 49). Da die Gesamtausbeute von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b** lediglich 4% betrug, wurde

die Verbindung auf einer anderen Syntheseroute in einer Gesamtausbeute von 62% aus AZT 1 dargestellt (Abb. 48, S. 46).

Es gelang, das Nucleosidanalogon **42b** aus Dichlormethan/Methanol zu kristallisieren und röntgenographisch zu untersuchen (Abb. 50, S. 47). Dabei konnte eine sehr gute strukturelle Übereinstimmung in bezug auf die 2'-Deoxyriboseeinheit sowie die Nucleobase mit einem der beiden im Kristall gefundenen Konformere von AZT **1** beobachtet werden. Unterschiede zeigen sich jedoch am Substituenten in der 3'-Position. Während die Azidgruppe in AZT **1** am ersten Stickstoffatom gewinkelt ist, ist die Isothiocyanatgruppe in Verbindung **42b** von C3' bis zum Schwefel nahezu gestreckt.

Nach Synthese der Nucleosidanaloga **30**, **40**, **41a,b** sowie **42a-d** wurden diese durch Reaktion mit den Phosphitylierungsreagenzien **96** bzw. **97** (Kap. 4.1.6.1, S. 55) unter Basen- bzw. Säurekatalyse und Oxidation der intermediären Phosphor(III)-Addukte mit *tert*-Butylhydroperoxid in die korrespondierenden *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate **37**, **38b-d** und **39a-d** überführt (Kap. 4.1.6.2, S. 56).



Abb. 121Synthese der modifizierten Nucleotidanaloga durch Hydrolyse der
korrespondierenden cycloSal-Phosphattriester

Zur Synthese der Nucleotidanaloga **31**, **32** und **33** wurden die korrespondierenden *cyclo*Sal-Phosphattriester mit wäßrigem Triethylamin in Acetonitril hydrolysiert (Kap. 4.1.7, S. 59). Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie über eine Reversed-Phase C_{18} - Kieselgelsäule mit Wasser/Acetonitril als Eluent. Nach Gefriertrocknung wurden die Nucleotide mit einer Ionentauschersäule in das Dinatrium- bzw. Dikaliumsalz überführt.

Die Nucleotidanaloga konnten dabei in guten bis sehr guten Ausbeuten isoliert werden (Abb. 121, S. 116). Der Vorteil dieser Synthesemethode von Nucleosidmonophosphaten besteht in der einfachen Aufreinigung der Produkte, da im Gegensatz zu anderen Ansätzen (vgl. Kap. 4.1.7, S. 59) keine Salze als Nebenprodukte entstehen, die nur mühsam von den geladenen Nucleotiden abgetrennt werden können.

Bei der Hydrolyse von 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **39b** konnte neben der Hydrolyse der *cyclo*Sal-Maske auch die Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe beobachtet werden. Es konnte lediglich 3'-Amino-2'desoxythymidinmonophosphat **106** isoliert werden (Abb. 70, S. 62).

Bei der Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten der Phosphattriester 39a,c,d sowie von Referenzverbindungen in Phosphatpuffer bei pH 7.3 konnte eine starke Abhängigkeit der Hydrolysehalbwertszeit vom Substituenten in der 3'-Position des 2'-Desoxyriboseringes beobachtet werden (Kap. 4.2.1, S. 63). Die beobachtete Stabilisierung von Verbindungen mit unpolaren Substituenten relativ zu Verbindungen ohne Substituent konnte dabei auf eine sterische Abschirmung des Phosphoratoms sowie lipophile Wechselwirkungen zurückgeführt werden (Abb. 76, S. 69). Die Destabilisierung von Verbindungen mit polarem Substituenten wurden mit einem assistierenden Effekt des Substituenten erklärt. In ³¹P-NMR-Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, daß keine Bildung des cyclischen Phosphatdiesters 112 auftrat (Abb. 75, S. 68).

Die niedrigen Hydrolysehalbwertszeiten der acyclischen *cyclo*Sal-Phosphattriester **37a** und **38a** konnten dagegen mit Hilfe von ³¹P-NMR-Hydrolysestudien auf die überwiegende Bildung der korrespondierenden cyclischen Phosphatdiester zurückgeführt werden (Abb. 78, S. 70).

Bei Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften der *cyclo*Sal-Phosphattriester **37a** und **38a** gegenüber Serumcholinesterase wurde beobachtet, daß diese Verbindungen stärker inhibieren aus vergleichbare *cyclo*Sal-Phosphattriester cyclischer Nucleoside (Kap. 4.2.2, S. 72). Die korrespondierenden Phosphattriester von PCV **8** sowie GCV **9** zeigten jedoch eine deutlich geringere inhibitorische Aktivität. Der Grad der Inhibition der Serumcholinesterase ist demnach sowohl vom Nucleosidrückgrat als auch von der Nucleobase abhängig.

Die synthetisierten Nucleosidanaloga sowie deren *cyclo*Sal-Phosphattriester wurden auf ihre Aktivität gegen das HI-Virus untersucht (Kap. 4.2.3, S. 75). Dabei zeigte keine der untersuchten Verbindungen eine Aktivität gegen das Virus.

Bei der Untersuchung der Substrateigenschaften der dargestellten Nucleotidanaloga gegenüber Thymidylatkinase konnte überraschenderweise nahezu keine Phosphorylierung der Nucleotide **33a,c,d** beobachtet werden (Kap. 4.3, S. 76). Die schlechten Substrateigenschaften von Verbindungen, die AZTMP **26** strukturell eng verwandt oder sogar isoelektronisch zu AZTMP **26** sind, läßt sich möglicherweise mit der zwitterionischen Struktur der Azidgruppe erklären, die die auftretenden sterischen Repulsionen möglicherweise zum Teil kompensiert.

Aus den enzymkinetischen Daten der acyclischen Nucleotidanaloga **31a,b** und **32a** lassen sich wertvolle Hinweise auf den Mechanismus der Phosphorylierung ableiten (Tabelle 3, S. 79). Mit abnehmender struktureller Ähnlichkeit der Nucleotidanaloga zum natürlichen Substrat fällt auch die Phosphorylierungsrate dieser Verbindungen. Jedoch werden alle untersuchten acyclischen Nucleotidanaloga nur sehr unzureichend phosphoryliert. Die Tatsache daß die acyclischen Nucleotidanaloga schlecht phosphoryliert werden, liefert einen guten Hinweis darauf, daß nicht der chemische Schritt der Thymidylatkinasereaktion, der Phosphoryltransfer, sondern tatsächlich die als induced fit bezeichnete Konformationsänderung von der offenen in die geschlossene Form, die durch die Substratbindung induziert wird, den ratenlimitierenden Schritt der Thymidylatkinasereaktion darstellt.

Zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war die Übertragung des *cyclo*Sal-Konzeptes auf die Substanzklasse der acyclischen Nucleosidphosphonate. Aufgrund der Kohlenstoff-Phosphorbindung dieser Verbindungen konnte nicht die etablierte Synthesemethode über die Phosphitylierungsreagenzien **96** und **97** angewandt werden, sondern es mußte eine neuartige Syntheseroute entwickelt werden.

Als Stammverbindung sollte zunächst 9-[2-*cyclo*Sal-Phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** dargestellt werden. Nach Synthese des Diethylesters von PMEA **11** (Kap. 4.4.1, S. 81) in einer fünfstufigen Synthese wurde zunächst erfolglos versucht, die exocyclische Aminogruppe mit einer BOC-Schutzgruppe zu schützen (Kap. 4.4.3, S. 84). Nach dem Scheitern dieser Versuche gelang es, die Aminogruppe mit der Fmoc-Schutzgruppe zu versehen. Ausgehend von dem Fmoc-geschützten Diethylphosphonat **131** gelang die Einführung der *cyclo*Sal-Maske durch Überführen des Diethylphosphonates **131** in das korrespondierende Phosphonsäuredichlorid und anschießende Reaktion mit Salicylalkohol in Ausbeuten von 5-35% (Kap. 4.4.4, S. 85). Bei der nachfolgenden Abspaltung der

Schutzgruppe traten jedoch massive Probleme auf. Nachdem eine Reihe von Standardmethoden zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gescheitert waren (Abb. 90, S. 87), gelang schließlich die Abspaltung der Schutzgruppe mit Triethylamin in Pyridin in einer unbefriedigenden Ausbeute von 20%. Die unbefriedigenden Ausbeuten sowohl bei der Einführung der cycloSal-Maske als auch bei der Abspaltung der Schutzgruppe sind auf die hohe Labilität der Zielverbindung unter basischen Bedingungen zurückzuführen (vgl. Kap. 4.5.1, S. 101). Aufgrund der unzureichenden Ausbeuten wurde eine Synthesestrategie mit einer säurelabilen MMTr-Schutzgruppe unternommen (Kap. 4.4.5, S. 88). Bei der Überführung des Diethylphosphonates 133 in das korrespondierende Säurechlorid 138 mit Oxalylchlorid in Gegenwart katalytischer Mengen an N,N-Dimethylformamid kam es zur Reaktion des in situ erzeugten Vilsmeier-Reagenz mit der Schutzgruppe (Abb. 92, S. 88). Erst die Verwendung von Phosphorpentachlorid als Chlorierungsmittel erlaubte die Darstellung des Säurechlorids 138 und dessen Reaktion mit Salicylalkoholen (Abb. 122).



Abb. 122 Synthese der cycloSal-Phosphonatdiester **34a-d**

Die abschließende Abspaltung der MMTr-Schutzgruppe gelang mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan bzw. Acetonitril in Ausbeuten zwischen 53 und 82%.

Es gelang außerdem, Verbindung **134a** durch Kondensation des freien Phosphonates **129** mit Salicylalkohol in Gegenwart des Aktivators Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) darzustellen (Abb. 98, S. 93). Diese Synthesestrategie konnte auch erfolgreich auf die Synthese der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von PMPA **12** angewandt werden (Kap. 4.4.6, S. 94). Dabei konnten die Zielverbindungen **35a,b** durch direkte Kondensation von PMPA **12** mit Salicylalkoholen in Ausbeuten von 41 bzw. 35% dargestellt werden.

Ausgehend von diesen positiven Ergebnissen wurde versucht, auch den cycloSal-Phosphonatdiester von HPMPC 13 durch direkte Kondensation des ungeschützten Phosphonats 13 mit 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol darzustellen. Es ließen sich jedoch weder bei der Reaktion von HPMPC 13 noch bei der Reaktion von O-DMTr-HPMPC 135 mit 3-tert-Butylsalicylalkohol in Gegenwart von MSNT die gewünschten Produkte 36 bzw. 136 isolieren. Da es aufgrund der Acidität der Phosphonsäure nicht möglich war, die zweifach DMTr-geschützte Verbindung 137 zu isolieren und mit einem Salicylalkohol zu kondensieren, wurde die Zielverbindung 36 auf einem alternativen Syntheseweg über den Phosphonatdiester 141 zweifach geschützten dargestellt. Dieser wurde durch Schutzgruppenmanipulation in zwei Stufen aus N-Benzoyl-O-trityl-HPMPC 139 mit einer Ausbeute von 58% synthetisiert (Abb. 106, S. 99).

Die Einführung der *cyclo*Sal-Maske gelang durch Überführung des Diethylphosphonates **141** in das Phosphonsäuredichlorid und anschließende Reaktion mit 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol (Abb. 106, S. 99). Die abschließende Abspaltung beider Schutzgruppen gelang mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Die Zielverbindung **36** konnte in einer Ausbeute von 78% als Trifluoracetat isoliert werden (Abb. 107, S. 100).

Bei der Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten der *cyclo*Sal-PMEA-Verbindungen **34a-d** konnte eine 24- bis 50-fache Beschleunigung der Hydrolyse dieser Verbindungen im Vergleich zu Phosphattriestern von d4T **2** festgestellt werden (Kap. 4.5.1, S. 101). Diese Beschleunigung der Hydrolyse kann durch eine fehlende $d\pi$ -p π -Wechselwirkung der freien d-Orbitale des Phosphoratoms und den freien Elektronenpaaren eines Sauerstoffatoms im Phosphonat verglichen mit einem Phosphat erklärt werden. Durch diese fehlende Wechselwirkung nimmt die Elektronendichte am Phosphoratom ab und dessen Elektrophilie damit zu.

Bei der Hydrolyse der Verbindungen **34a,b** konnte HPLC-chromatographisch und ³¹P-NMRspektroskopisch ein Intermediat der Hydrolyse detektiert werden (Abb. 112, S. 105). Das Produkt beider Hydrolysen war PMEA **11**. Da der Phenylphosphonatmonoester **147** unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse nicht weiter gespalten werden konnte, handelt es sich bei dem Intermediat vermutlich um den Benzylphosphonatmonoester **146**, der weiter in das Phosphonat und, nach Reaktion mit Wasser, den entsprechenden Salicylalkohol zerfallen kann. Die *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate hydrolysieren daher nach einem analogen Mechanismus wie die *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate (Abb. 110, S. 103). Es wurde ein paralleler Einfluß der Substituenten am aromatischen Ring der *cyclo*Sal-Maske der PMEA-Verbindungen **34a-d** auf die Hydrolysehalbwertszeit verglichen mit den analogen d4T-Verbindungen gefunden. Es konnte mit einer ³¹P-NMR-Studie gezeigt werden, daß bei der Hydrolyse von 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-PMEA **34d** im Gegensatz zu 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal-d4TMP **145** keine Konkurrenzreaktion zum Phenylphosphonatmonoester **147** auftritt. Die Gründe der schnelleren Hydrolyse von Verbindung **34d** verglichen mit Verbindung **34c** bleiben unklar, zumal die korrespondierende PMPA-Verbindung **35b** eine höhere Halbwertszeit relativ zur monosubstituierten Verbindung **35a** aufweist (Abb. 114, S. 106).

Für die Verbindungen **34c** und **35a** konnten in CEM/0-Zellextrakt (Abb. 115, S. 107) sowie in 20% igem humanem Serum (Abb. 116, S. 108) Halbwertszeiten beobachtet werden, die sich nicht wesentlich von denen in wäßrigem Phosphatpuffer bei pH 7.3 unterschieden. Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß auch in den untersuchten biologischen Medien ein enzymatischer Abbau der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester **34c** und **35a** keine Rolle spielt und die Verbindungen durch eine chemische Hydrolyse abgebaut werden.

3,5-Di-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-HPMPC **36** erwies sich bereits in organischen Lösungsmitteln als so labil, daß in Dimethylsulfoxid ³¹P-NMR-spektroskopisch ein Zerfall der Verbindung beobachtet werden konnte (Abb. 117, S. 108). Vermutlich kommt es auch in diesem Fall zu einem nucleophilen Angriff der freien Hydroxylgruppe auf das Phosphoratom. Bei dem Produkt des Zerfalls handelt es sich aller Voraussicht nach um cHPMPC **149** (Abb. 118, S. 109).

Die stabilsten *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate wurden wiederum auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Butyrylcholinesterase hin untersucht (Kap. 4.5.2, S. 110).

Diese Untersuchungen ergaben, daß die *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate **34c,d** sowie **35a,b** das Enzym bis zu einer Konzentration von 50 μ M nicht inhibieren (Tabelle 4, S. 111). Die fehlende Inhibition läßt sich für den Fall der disubstituierten Verbindungen **34d** und **35b** mit dem Substitutionsmuster am aromatischen Ring der *cyclo*Sal-Maske erklären. Die mangelnde Inhibition der monosubstituierten Verbindungen **34c** und **35a** läßt sich nicht mit dem Substitutionsmuster erklären, da die korrespondierende d4T-Verbindung **144** das Enzym signifikant inhibiert. Die genauen Einflüsse des Rückgrates, der Nucleobase sowie der Einfluß der Phosphonateinheit müssen in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

Die *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate **34c,d** sowie **35a,b** wurden *in-vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen unterzogen (Kap. 4.5.3, S. 112). Die untersuchten Verbindungen zeigten dabei

sowohl in den Wildtypzellinien als auch in den Thymidinkinase-defizienten Zellen eine zweibis vierfach höhere antivirale Aktivität als die Stammverbindungen PMEA 11 bzw. PMPA 12.

Es konnte dabei eine gute Korrelation der antiviralen Aktivität einer Verbindung und ihrer Hydrolysehalbwertszeit hergestellt werden. So zeigen die labileren Verbindungen **34d** und **35a** eine geringere antivirale Aktivität als die stabileren Derivate.

Die untersuchten *cyclo*Sal-Nucleosidphosphonate zeigen eine 15- bis 40-fach geringere antivirale Aktivität als die beiden auf dem Markt befindlichen Prodrugs Bis-(POM)-PMEA **14** und Bis-(POC)-PMPA **15**. Insbesondere die beiden PMEA-Verbindungen **34c,d** sind jedoch deutlich weniger cytotoxisch als Bis-(POM)-PMEA **14**. Ihre cytotoxische Konzentration (CC_{50}) liegt weit über der effektiven Konzentration (EC_{50}).

Das *cyclo*Sal-Konzept konnte demnach erfolgreich auf die Substanzklasse der Nucleosidphosphonate angewandt werden und die antivirale Aktivität gesteigert werden.
6. Summary

The limiting step in the bioactivation of the antivirally active nucleoside analogue AZT **1** is, in contrast to other nucleoside analogues like d4T **2**, the second phosphorylation from AZTMP **26** to AZTDP **27** catalysed by the enzyme thymidylate kinase (TmpK). Therefore, the first aim of this work was the synthesis of AZTMP analogues and the evaluation of their substrate properties towards TmpK.

After synthesis of the corresponding nucleoside analogues **30**, **40**, **41a,b** and **42a-d** (see chapters 4.1.1 - 4.1.5), these compounds were converted into their *cyclo*Sal-phosphotriesters (chapter 4.1.6) by subsequent treatment with a cyclic chlorophosphite and oxidation with *tert*-butylhydroperoxide. Since the *cyclo*Sal-prodrug approach is based on the degradation of these compounds by means of chemical hydrolysis instead of enzymatic reactions (see chapter 2.5), it is possible to use these compounds as synthons in the preparation of nucleosidemonophosphates. The nucleotide analogues **31b**, **32b**,**c** and **33,a,c,d** could be obtained in very good yields (chapter 4.1.7). Main advantage of this procedure compared to others is the very simple work-up of the nucleotides since no other negatively charged by-products, which have to be separated from the nucleotides, are formed.

Hydrolysis studies of the synthesised *cyclo*Sal-phosphotriesters revealed a strong dependence of the half-lifes on the nature of the 3'-substituent on the 2'-deoxyribose moiety (chapter 4.2.1). Additionally, it could be shown that phosphotriesters of acyclic nucleoside analogues bearing a free hydroxyl group do not hydrolyse to the nucleoside monophosphates. Instead, a predominant formation of the corresponding cyclic phosphodiesters could be observed in ³¹P-nmr hydrolysis studies.

The investigation of the inhibitory properties of *cyclo*Sal-phosphotriesters towards butyrylcholinesterase revealed that the prepared acyclic compounds showed a stronger inhibition of the enzyme as compared to corresponding cyclic compounds. It could also be observed that not only the nucleoside backbone but also the nature of the nucleobase influence the inhibitory properties towards this enzyme (chapter 4.2.2).

The investigation of the prepared nucleotide analogues **33,a,c,d** towards TmpK revealed a total loss of phosphorylation of these compounds as compared to AZTMP **26** although they are structurally close related to the latter (chapter 4.3). This might be due to the zwitterionic structure of the azido group in AZTMP **26**.

It could be deduced from the enzyme-kinetical data obtained for the acyclic compounds **31a,b** and **32a** that most likely the limitation of the thymidylate kinase reaction is not the chemical

step, i.e. the phosphoryl transfer, but the conformational change of the enzyme-substrate complex, also called the *induced-fit*.

Second aim of this work was the application of the *cyclo*Sal-prodrug approach to antivirally active nucleosidephosphonates. Since the *cyclo*Sal moiety could not be introduced by phosphitylating reagents, a new synthetic approach had to be developed. It was possible to prepare *cyclo*Sal-phosphonate diesters of the antivirally active nucleosidephosphonates PMEA **11**, PMPA **12** and HPMPC **13** either via the corresponding phosphonic acid dichlorides or by direct condensation of the free phosphonate with a suitable salicylic alcohol (chapter 4.4).

Hydrolysis studies of the prepared *cyclo*Sal-phosphonate diesters showed a 24- to 50-fold increase in the rate of hydrolysis of these compounds as compared to corresponding *cyclo*Sal-phosphotriesters (chapter 4.5.1). This is most probably due to the fact that in phosphonate diesters one of the three $d\pi$ -p π -interactions between the phosphorous atom and an oxygen atom in phosphotriesters is missing, resulting in a decrease of electron density on the phosphorous atom and leading to an increase of the electrophilicity of the atom. The degradation pathway of the *cyclo*Sal-phosphonate diesters was studied by means of HPLC and ³¹P-nmr-hydrolysis studies. All PMEA- and PMPA compounds **34a-d** and **35a,b** were hydrolysed to the corresponding nucleosidephosphonate, while the HPMPC-compound **36** was degraded most likely to cHPMPC **149** even in organic solvents. In this case a nucleophilic attack of the free hydroxyl group on the elektrophilic phosphorous atom took place.

In case of the most labile compounds **34a,b** an intermediate of the hydrolysis reaction could be observed. The appearance of this intermediate, the benzylphosphonate monoester **146**, points to the conclusion that the hydrolysis of *cyclo*Sal-phosphonate diesters follows a similar pathway as observed for *cyclo*Sal-phosphotriesters.

The compounds **34c,d** and **35a,b** exhibited no inhibition of butyrylcholinesterase, which can partly be explained by the substitution pattern of the aromatic ring. But effects of the nucleobase as well as the backbone are also involved (chapter 4.5.2).

The evaluation of the anti-HIV activity of the compounds **34c,d** and **35a,b** showed a 2- to 4fold increase in the antiviral activity as compared to the free phosphonates **11** and **12** (chapter 4.5.3). The cytotoxic concentrations (CC_{50}) of the investigated compounds were well above the effective concentrations (EC_{50}). Hence, the *cyclo*Sal-prodrug approach could be successfully applied to antivirally active nucleosidephosphonates.

7. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe von Nucleotidanaloga mit cyclischem sowie acyclischem Nucleosidrückgrat synthetisiert und auf ihre Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse lassen keine eindeutige Präferenz des Enzyms für acyclische oder cyclische Nucleotidanaloga erkennen.



Abb. 123 mögliche acyclische Substrate für die TmpK

Da 2'-Desoxy-3'-fluorthymidinmonophosphat **153** ein hinreichend gutes Substrat für die Thymidylatkinase ist,^[91] sollte die Untersuchung der acyclischen Nucleotidanaloga **151** und **152** einen genaueren Hinweis auf die Substratspezifität der TmpK in bezug auf acyclische Nucleotide erlauben (Abb. 123).

Ferner könnten 3'-modifizierte, carbocyclische Nucleotide möglicherweise einen guten Kompromiß zwischen Nucleotiden mit dem relativ rigiden 2'-Desoxyriboserückgrat und den acyclischen Nucleotiden mit ihrem sehr flexiblen Rückgrat darstellen. Das Cyclopentanrückgrat dieser Verbindungen könnte möglicherweise zu verbesserten Substrateigenschaften der Thymidylatkinase führen.

Um die antivirale Aktivität von Nucleosidanaloga wie AZT 1 voll ausschöpfen zu können, muß auch an die Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Prodrugs gedacht werden.



Abb. 124 mögliche Syntheseroute zu cycloSal-Nucleosiddiphosphaten 155

Es könnte möglich sein, ein cyclisches Chlorphosphit mit einem Ammoniumsalz eines Nucleosidmonophosphates **154** umzusetzen. Die abschließende Oxidation könnte das *cyclo*Sal-Nucleosiddiphosphat **155** liefern, das als Prodrug des Nucleosiddiphosphates

fungieren könnte (Abb. 124, S. 125). Die negative Ladung am α -Phosphat könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen. Zum einen wird durch sie die Entstehung eines weiteren stereogenen Zentrums vermieden, was die Anzahl der Diastereomere um zwei verringert. Zum anderen könnte sie den nucleophilen Angriff von Wasser auf das α -Phosphoratom verhindern. Durch einen solchen Angriff wäre die Spaltung der Anhydridbindung unter Freisetzung des Monophosphates möglich.

Das erste Ziel von weiterführenden Arbeiten auf dem Gebiet der *cyclo*Sal-Prodrugs von Nucleosidphosphonaten muß die Erhöhung der Stabilität dieser Verbindungen sein. Da die *cyclo*Sal-Verbindungen ca. 30-fach labiler sind als entsprechende Phosphattriester, könnte in diesem Fall die Synthese von *cycloAminobenzyl- (cycloAmb)*-Nucleosidphosphonamidaten **156** zum Erfolg führen (Abb. 125).



Abb. 125 allgemeine Struktur von cycloAmb-Nucleosidphosphonamidaten **156**

Dieses Konzept wurde bereits für d4T 2 umgesetzt.^[138] Die *cyclo*Amb-d4TMP-Verbindungen zeichnen sich durch eine sehr hohe Stabilität aus. Dies gilt insbesondere für die N-Methyl-Verbindung. Es konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden. daß das Nucleosidmonophosphat aus diesen Verbindungen tatsächlich freigesetzt wird. Es wäre jedoch möglich, daß die mangelnde Freisetzung auf die extrem hohen Halbwertszeiten zurückzuführen ist. Die entsprechenden Phosphonamidate sollten nach den Erfahrungen mit den Phosphonatdiestern deutlich labiler sein und möglicherweise das antiviral aktive Phosphonat freisetzen können.

Die *cyclo*Sal-HPMPC-Verbindung **36** zerfällt in sehr kurzer Zeit bereits in organischen Lösungsmitteln. Da sie dabei vermutlich das ebenfalls antiviral aktive cHPMPC **149** liefert, ist es möglich sich diesen schnellen Zerfall zunutze zu machen. Dazu könnte man die Hydroxylgruppe mit einer enzymatisch abspaltbaren Gruppe wie einer Säure, einer Aminosäure oder einem Peptid maskieren. Diese Gruppe könnte intrazellulär abgespalten werden, und es würde sehr schnell cHPMPC **149** freigesetzt.

8. Experimentalteil

8.1 Allgemeines

8.1.1. Lösungsmittel

Acetonitril; C₂H₃N [41.05]; Sdp.: 81-82 °C; d = 0.78

- a) puriss. absolut, über Molsieb, $H_2O \le 0.001$ %; Fluka Nr. 0069.
- b) zur Synthese; Merck Nr. 800015.
- c) technische Qualität; über di-Phosphorpentoxid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert

Benzol; C₆H₆ [78.11]; Sdp.: 79-81 °C; d = 0.879; min. 99.7 %; Riedel-de-Haën Nr. 32212. Dichlormethan; CH₂Cl₂ [84.93]; Sdp.: 39-40 °C; d =1.325

- a) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.
- b) puriss. absolut, über Molsieb, $H_2O \le 50$ ppm; Fluka Nr. 66749.

Diethylether; C₄H₁₀O [74.12]; technische Qualität; Sdp.: 35 °C;

- a) bei Normaldruck destilliert und über Kaliumhydroxid aufbewahrt.
- b) über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
- *N,N*-Dimethylformamid (DMF); C₃H₇NO [73.10]; Sdp.: 190-191°C; puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 40248
- Dimethylsulfoxid, C₂H₆OS [78.13]; Sdp.: 190-191°C, d = 1.100; puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 41648
- Essigsäureethylester; C₄H₈O₂ [88.11]; technische Qualität; Sdp.: 77 °C; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.
- Ethanol; C₂H₆O [46.07]; Sdp.: 78 °C; über Natrium und Phthalsäurediethylester getrocknet und bei unter Inertgas destilliert.

Methanol; CH₄O [32.04]; Sdp.: 64 °C; d = 0.791

- a) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert.
- b) puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 65542.

Petrolether (45-60); technische Qualität; Sdp.: 45-60 °C; bei Normaldruck destilliert.

Tetrachlormethan; CCl₄ [153.82]; puriss., Fluka Nr. 87037.

Tetrahydrofuran; C₄H₈O [72.11];

a) puriss. absolut über Molsieb, $H_2O \le 50$ ppm; Fluka Nr. 87371.

b) technische Qualität; über Kalium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
 Pyridin; C₅H₅N [79.10];

- a) puriss. absolut über Molsieb, $H_2O \le 50$ ppm; Fluka Nr. 82704.
- b) technische Qualität; über Natriumhydriddispersion getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Toluol; C₇H₈ [92.14]; technische Qualität; Sdp.: 110 °C; bei Normaldruck destilliert.

8.1.2. Verwendete Puffer und Reagenzien

Ammoniak-gesättigte Methanollösung

In einem 1000 mL Rundkolben wurde Ammoniakgas in ca. 800 mL wasserfreies Methanol bei -15 °C für etwa 27 Minuten eingeleitet. Das Ammoniakgas wurde dabei durch zwei mit Kaliumhydroxid-Plätzchen gefüllte Gaswaschflaschen vorgetrocknet, die Kühlung der Methanollösung erfolgte durch eine Eis-Kochsalz-Kältemischung. Die fertige Ammoniakgesättigte Methanollösung wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

Ionenpaarungspuffer für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurden 1000 mL Wasser und 6.6 ml Tetrabutylammoniumhydroxid gemischt und mit konzentrierter Phosphorsäure der pH-Wert auf 3.8 eingestellt (Puffer I). Zu 60 mL der Puffer I-Lösung wurden wiederum 1000 mL Wasser gegeben, um den eigentlichen Ionenpaarungspuffer zu erhalten (Puffer II).

50 mM Phosphatpuffer (PBS, pH 6.8) für die Hydrolysekinetiken

In 1000 mL Wasser wurden 8.00 g (137 mmol) Natriumchlorid, 0.20 g (2.68 mmol) Kaliumchlorid, 7.20 g (41.5 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na₂HPO₄*2H₂O) und 1.40 g (8.8 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) gelöst und falls nötig der pH-Wert mittels verdünnter Salzsäure oder verdünnter Natronlauge auf 6.8 eingestellt.

50 mM Phosphatpuffer (pH 7.3) für die Hydrolysekinetiken

In 1000 ml Wasser wurden 6.85 g (38.5 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na₂HPO₄*2H₂O) und 1.55 g (11.4 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) gelöst und falls nötig der pH-Wert mittels verdünnter Phosphorsäure oder verdünnter Natronlauge auf 7.3 eingestellt.

Lösungen und Reagenzien für den Cholinesterase Assay

Folgende Lösungen wurden gebrauchsfertig von der Fa. Sigma bezogen:

- Natriumchlorid-Lösung in Wasser, 0.15 M, versetzt mit Chloroform
- *m*-Nitrophenol-Lösung in Phosphatpuffer (pH = 7.8), 0.75 g/L
- Essigsäure-Lösung in Wasser, 0.02 N

Acetylcholinchlorid wurde in Aliquoten zu je 750 mg von der Fa. Sigma bezogen. Die gebrauchsfertige Lösung wurde durch Versetzen eines Aliquots mit 5 mL Wasser erhalten.

Sämtliche Lösungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und erst kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Die Acetylcholinchlorid-Lösung war unter diesen Bedingungen zwei Wochen lagerfähig. Das feste Acetylcholinchlorid wurde bei -20 °C gelagert.

Humanes Blutserum wurde von der transfusionsmedizinischen Abteilung des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg bezogen und sofort nach Erhalt aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Es wurden nur die gerade benötigten Mengen frisch aufgetaut.

8.1.3. Chromatographie

8.1.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von 2 - 4 x 10 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 8 - 9 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

8.1.3.2. Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)

Mittels eines Chromatotrons der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4 g getrennt. Als Trennmaterial diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF_{254} (Merck Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm.

8.1.3.3. Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)

Substanzgemische mit mehr als 4 g Rohausbeute wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck aufgereinigt.^[161] Als Trennmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 63-200 μ m (Baker Nr. 0253) verwendet.

8.1.3.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an zwei Merck-Hitachi-Anlagen durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software
	HPLC-Manager Version 2
Interface:	Model D 6000
Pumpe:	Model L 6200 A Intelligent Pump
Automatischer Probenwechsler:	Model AS 2000 A
Detektion	UV, 260 nm
Analytische Säule:	LiChroCART 250-3 mit Lichrospher 100-3 RP 18
	(5 µm) Füllmaterial
Software:	Chromatography Data Station Software
	HPLC System Manager Version 3.1.1.
Interface:	Model L-7000
Pumpe:	Model L-7100
Automatischer Probenwechsler:	Model L-7200
Dioden Array Detektor	Model L-7455
Analytische Säule:	LiChroCART 250-3 mit Lichrospher 100-3 RP 18
	(5 µm) Füllmaterial
	LiChroCART 250-4 Merck ArtNr. 50830 für
	Gradient E und Gradient F

HPLC-Methoden:

Analytische Reinheitskontrollen

Gradient A:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 5 -80 % in 20 Minuten, dann Acetonitril-Gradient in Wasser von 80 - 100 % in 5 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 5 % Acetonitril mit einer Flußrate von 0.5 ml/min.

Gradient B:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 0 - 30% in 20 Minuten, dann 2.5 Minuten isokratisch 50% Acetonitril, gefolgt von Acetonitril-Gradient in Wasser von 50 bis 100% in 5 Minuten, dann 2.5 Minuten 100% Acetonitril, abschließend 5 Minuten 100% Wasser mit einer Flußrate von 0.5 ml/min.

Gradient C:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 12 bis 80 % Acetonitril in 20 Minuten, dann 15 Minuten isokratisch 12% Acetonitril mit einer Flußrate von 0.6 ml/min.

Gradient D:

Acetonitril-Gradient in Ionenpaarungspuffer von 8-100 % Acetonitril in 22 min, 5 min 100 % Acetonitril, dann 6 min isokratisch 8 % Acetonitril mit einer Flußrate von 0.6 ml/min. Gradient E:

Methanol-Gradient in Dichlormethan von 2 bis 6% in 25 Minuten, dann 5 Minuten 100% Methanol, gefolgt von Methanol-Gradient in Dichlormethan von 100 bis 2% in 2 Minuten. Abschließend 5 Minuten isokratisch 2% Methanol in Dichlormethan.

Gradient F:

Methanol-Gradient in Dichlormethan von 2 bis 6% in 25 Minuten, dann 5 Minuten 100% Methanol, gefolgt von Methanol-Gradient in Dichlormethan von 100 bis 2% in 2 Minuten. Abschließend 5 Minuten isokratisch 2% Methanol in Dichlormethan.

8.1.4. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in den spektroskopischen Abteilungen der Universität Würzburg und der Universität Hamburg aufgenommen. Es standen folgende Geräte zur Verfügung: ¹H-NMR:

Bruker AC 250 (250 MHz), Bruker WM 400 (400 MHz), Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz), Bruker DMX 600 (600 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl₃ (δ = 7.27 ppm), DMSO-d₆ (δ = 2.49 ppm) und D₂O (δ = 4.65 ppm).

¹³C-NMR:

Bruker AC 250 (63 MHz), Bruker WM 400 (101 MHz), Bruker AMX 400 (101 MHz), Bruker DMX 500 (123 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl₃ (δ = 77.0 ppm) und DMSO-d₆ (δ = 39.7 ppm).

¹⁹F-NMR:

Bruker DMX 500 (471 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (CFCl₃).

 31 P-NMR:

Bruker AC 250 (81 MHz), Bruker AMX 400 (162 MHz), Bruker DMX 500 (202 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (85% Phosphorsäure).

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den ¹H-, ¹³C- ¹⁹F- und ³¹P-NMR-Spektren finden folgende Abkürzungen Verwendung:

br. = breit, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, quin = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett, ar. = aromatisch.

8.1.5. Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg mit einem Elektrospray-Gerät (Finnegan MAT 95 Trap XL) gemessen und mit der Software ISIS 8.1 nachbearbeitet. Als Fließmittel wurde Acetonitril mit 0.1 % Essigsäure benutzt.

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg mit einem doppelfokusierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Matrix wurde *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Bilflex-III-Gerät im Positiv-Modus unter Verwendung eines Stickstoff-Lasers ($\lambda = 337$ nm) gemessen (Matrix *nor*-Haman).

8.1.6. Ultraviolettspektroskopie (UV)

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (CARY 1E) der Firma Varian aufgenommen.

8.1.7. Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden auf einem ATI Mattson Genesis Series FTIR aufgenommen.

8.2. Geräte

8.2.1. Gefriertrocknung

Wäßrige Lösungen wurden an einer Amsco/Finn-Aqua Lyovac GT2 Gefriertrocknungsanlage bzw. an einer Christ/Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

8.2.2. Thermomixer

Die Hydrolysestudien wurden bei 37 °C in einem Eppendorf Thermomixer 5436 durchgeführt.

- 8.3. Darstellungen
- 8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)
- 8.3.1.1 Darstellung der 3-Methyl-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate nach der Chlorphosphit-Methode (AAV 1)



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1.00 Äquivalente des Nucleosides wurden in wasserfreiem Acetonitril gelöst, Di-*iso*-propylethylamin zugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde 3-Methyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphit **96** langsam zugetropft. Man ließ auf Raumtemperatur erwärmen und bei dieser Temperatur rühren. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Sofern das Nucleosid nicht vollständig umgesetzt war, wurde bei 0 °C weiteres 3-Methyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphit zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung erneut auf 0 °C gekühlt und *tert*-Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan) zugetropft. Man ließ die Reaktionslösung erneut auf Raumtemperatur erwärmen und bei dieser Temperatur nachrühren. Die Reaktion wurde erneut dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Oxidation

(ca. 30 Minuten) wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Aus den so erhaltenen gelblichen Rohprodukten wurden in einer ersten Aufreinigung am Chromatotron Phosphat- bzw. Ammoniumsalze entfernt (Essigsäureethylester/Methanol 9:1 v/v + 0.1% Essigsäure). Durch weitere Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient) konnten die *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate zunächst in Form farbloser Öle bzw. Schäume isoliert werden. Diese gingen durch Gefriertrocknung in farblose Watten über.

8.3.1.2 Darstellung der 3-Methyl-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate nach der Phosphoramidit-Methode (AAV 2)



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung von 1.00 Äquivalenten des Nucleosids in Acetonitril wurden bei 0 °C 4.00 Äquivalente Pyridiniumchlorid gegeben und 2.50 Äquivalente 3-MethylcycloSalphosphoramidit 97, gelöst in wenig Acetonitril, zugetropft. Man ließ die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmen und bei dieser Temperatur nachrühren. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Sofern das Nucleosid nicht vollständig verbraucht war, wurde bei 0 °C weiteres 3-Methyl-cycloSaligenylphosphoramidit zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung erneut auf 0 °C gekühlt und tert-Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in n-Decan) zugetropft. Man ließ die Reaktionslösung erneut auf Raumtemperatur erwärmen und bei dieser Temperatur nachrühren. Die Reaktion wurde erneut dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Oxidation (ca. 30 Minuten) wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der resultierende Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wurde dreimal mit Wasser gewaschen. die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren vom Trockenmittel wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Rückstand wurde zunächst am Chromatotron mit Essigsäureethylester/Methanol 9:1 v/v + 0.1% Essigsäure aufgereinigt. Durch weitere Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient) konnten die cycloSalNucleosidmonophosphate zunächst in Form farbloser Öle bzw. Schäume isoliert werden. Diese gingen durch Gefriertrocknung in farblose Watten über.

8.3.1.3 Darstellung der Nucleosidmonophosphate durch Hydrolyse der 3-Methyl*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate (AAV 3)



Das 3-Methyl-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphat wurde in 3 mL Acetonitril gelöst und 500 μ L Wasser zugegeben. Unter Rühren wurden 10 Tropfen Triethylamin zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei 37 °C gelagert und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde mit je 5 mL Acetonitril und Wasser verdünnt und die Lösung gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und über eine Reversed-Phase-Säule (C₁₈) mit Wasser mit Acetonitril-Gradient als Eluent gereinigt. Die wäßrige Lösung wurde lyophilisiert und der Rückstand auf eine Ionentauschersäule (Dowex 50X8, Na⁺- oder K⁺-Form) aufgetragen. Das Produkt wurde mit Wasser eluiert und die wäßrige Lösung abschließend erneut gefriergetrocknet.

8.3.1.4 Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester durch direkte Kondensation des Phosphonates mit Salicylalkoholen (AAV 4)



1 Äquivalent des Phosphonates wurde in einer Inertgasatmosphäre in wasserfreiem Pyridin gelöst bzw. suspendiert, 2.5 oder 3 Äquivalente Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.1 Äquivalente bzw. 1.2 Äquivalente des entsprechenden und 16 Stunden Raumtemperatur Salicylalkohols zugegeben bei gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 15 mL Dichlormethan verdünnt, durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 15 mL Toluol koevaporiert und anschließend am Chromatotron gereinigt (1. Essigsäureethylester/Methanol 9:1 v/v + 0.1% Essigsäure; 2. Dichlormethan mit Methanolgradient).

8.3.1.5 Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester aus den Phosphonatdiethylestern (AAV 5)



1 Äquivalent des Diethylphosphonates wurde zweimal mit wasserfreiem Acetonitril koevaporiert und anschließend unter Inertgasatmosphäre in wasserfreiem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 5 Tropfen Pyridin wurden 2.5 Äquivalente Bromtrimethylsilan (TMSBr) zugetropft und die Reaktionslösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Anteile wurden im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol koevaporiert. Der resultierende farblose Schaum wurde in trockenem Dichlormethan aufgenommen und 2.1 Äquivalente Phosphorpentachlorid zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die flüchtigen Anteile im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der resultierende gelbe Schaum wurde mit Toluol koevaporiert, in wasserfreiem Dichlormethan aufgenommen und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 15 Minuten wurde eine Lösung von 2 Äquivalenten des entsprechenden Salicylalkohols sowie 3.8 Äquivalenten trockenen Triethylamins in wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Anschließend wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Als Eluent diente eine Mischung aus Dichlormethan/Methanol (9:1, v/v), dem 0.1% Essigsäure beigemischt wurde. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient).

8.3.1.6 Abspaltung der Monomethoxytrityl- und Tritylschutzgruppen aus *cyclo*Sal-Phosphonatdiestern (AAV 6)



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Das Trityl-geschützte *cyclo*Sal-Phosphonat wurde in trockenem Acetonitril bzw. trockenem Dichlormethan gelöst und 20 Volumenprozent Trifluoressigsäure hinzugetropft. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur bzw. 40 °C wurde, wenn Acetonitril als Lösungsmittel verwendet wurde, mit Wasser und Acetonitril verdünnt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan, dem 0.1% Essigsäure beigemischt wurde mit einem Methanolgradienten. Bei Verwendung von Dichlormethan wurde die Reaktionsmischung direkt am Chromatotron aufgereinigt. Die *cyclo*Sal-Phosphonatdiester wurden als Trifluoressigsäuresalze erhalten.

8.3.2 Darstellung von T-Penciclovir

8.3.2.1 Darstellung von 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäuretriethylester **48**^[97]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 11.5 mL (12.7 g, 54.7 mmol) Methantricarbonsäuretriethylester **47** wurden in 40 mL wasserfreiem Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 18 mL einer Lösung von 1.50 g Natrium (65.2 mmol) in 20 mL absolutem Ethanol zugetropft. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit absolutem Diethylether nachgespült. Nach dem Trocknen des Niederschlages im Ölpumpenvakuum für 15 Minuten wurde dieser in 30 mL *N*,*N*-Dimethylformamid sowie 30 mL Benzol gelöst. Zu der Reaktionslösung wurden 8.30 mL (18.1 g, 90.8 mmol) 1,2-Dibromethan getropft und die

Reaktionslösung 14 Stunden auf 95 °C erhitzt, wobei ein farbloser Niederschlag entstand. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit etwas Benzol verdünnt und vom Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde einmal mit 25 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren vom Trockenmittel wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum mittels einer Kugelrohrdestille destilliert.

Ausbeute:	14.5 g (42.8 mmol, 78%) einer farblosen Flüssigkeit
Sdp.:	140 °C (0.4 mbar)
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, CDCl ₃): 4.27 (q, 6H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, H2'), 3.60 – 3.54 (m, 2H, H1); 2.73 – 2.67 (m, 2H, H2); 1.30 (t, 9H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, H3')
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (100 MHz, CDCl ₃): 166.0 (3xC1'), 65.6 (C1), 62.4 (3xC2'), 36.3 (C1), 26.9 (C2), 13.8 (3xC3').

8.3.2.2 Darstellung von 2-Ethoxycarbonyl-2-[2-(1-thyminyl)ethyl]malonsäurediethylester **50** mit Natriumhydrid



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 3.00 g (23.8 mmol) Thymin **49** wurden in 40 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert, 425 mg (17.7 mmol) gewaschenes Natriumhydrid zugesetzt und eine Stunde bei 70 °C gerührt, anschließend wurden 4.00 g (11.8 mmol) 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäure-triethylester **48** zugetropft und 43 Stunden bei 70-100 °C gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 50 mL Wasser gewaschen. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 30 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten von 1 bis 10 % gereinigt.

Ausbeute: 1.71 g (4.45 mmol, 38%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.88

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.59 (br. s, 1H, NH), 7.10 (q, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 4.28 (q, 6H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3xCH₂), 4.00 – 3.96 (m, 2H, H1^{\circ}), 2.50 – 2.47 (m, 2H, H2^{\circ}), 1.92 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7), 1.31 (t, 9H, J_{HH} = 7.1 Hz, 3xCH₃).
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 166.4 (C4'), 164.0 (C4), 150.5 (C2), 140.6 (C6), 110.7 (C5), 63.9 (C3'), 62.7 (CH₂), 44.9 (C1'), 31.9 (C2'), 13.8 (CH₃), 12.2 (C7)
- 8.3.2.3 Darstellung von 2-Ethoxycarbonyl-2-[2-(1-thyminyl)ethyl]malonsäurediethylester **50** mit Lithiumhydrid



Die Reaktion wurde analog zu der unter 8.3.3.2 beschriebenen durchgeführt. Jedoch wurden statt 425 mg (17.7 mmol) Natriumhydrid 141 mg (17.7 mmol) gewaschenes Lithiumhydrid verwandt.

Ausbeute: 1.59 g (4.13 mmol, 35%) eines farblosen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.2.2.

8.3.2.4 Darstellung von 2-[2-(1-Thyminyl)ethyl]malonsäuredimethylester 46



1.71 g (4.42 mmol) Ethoxycarbonyl-2-[2-(1-thyminyl)ethyl]malonsäurediethylester **50** wurden in 5 mL trockenem Methanol gelöst und unter Inertgasatmosphäre mit 162 mg (3.00 mmol) Natriummethanolat versetzt. Die Reaktionslösung wurde sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Zur Neutralisation wurde Dowex (50x8, H⁺-Form) zugegeben und zehn Minuten gerührt. Es wurde vom Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt, wobei als Eluent Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 1 bis 8% verwendet wurde.

Ausbeute: 980 mg (3.45 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.67

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.40 (br. s, 1H, NH), 7.02 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 1.3$ Hz, H6), 3.80 (t, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, H1°), 3.77 (s, 6H, 2xCH₃), 3.46 (t, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, H3°), 2.28 (dt, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, H2°), 1.93 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.3$ Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 1689 (C4'), 163.8 (C4), 150.7 (C2), 140.2 (C6), 111.1 (C5), 52.9 (CH₃), 48.5 (C3'), 46.1 (C1'), 30.0 (C2'), 12.3 (C7)

8.3.2.5 Darstellung von 2-[2-(1-Thyminyl)ethyl]malonsäuredimethylester **46** aus dem Bromid **48**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1.30 g (10.3 mmol) Thymin **49** wurden in 10 mL wasserfreiem Dimethylsulfoxid suspendiert und 1.22 g (8.84 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 1.00 g (2.95 mmol) 3-Brompropan-1,1,1-tricarbonsäure-triethylester 48 zugetropft und das Reaktionsgemisch 16 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit 100 mL Wasser verdünnt und dreimal mit je 40 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 40 mL Wasser sowie einmal 40 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende braune Öl wurde in 4 mL Methanol gelöst und 81 mg (1.49 mmol) Natriummethanolat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Zur Neutralisation wurde Dowex (50x8, H⁺-Form) zugegeben und zehn Minuten gerührt. Es wurde vom Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt, wobei als Eluent Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 1 bis 8% verwendet wurde.

Ausbeute: 323 mg (1.14 mmol, 39%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.67

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.2.4.



Zu einer Suspension aus 320 mg (1.13 mmol) 2-[2-(1-Thyminyl)ethyl]malonsäuredimethylester **46** und 128 mg (3.38 mmol) Natriumborhydrid in 1.8 mL trockenem Dichlormethan wurden langsam 1.2 mL Methanol zugetropft. Nach Rühren der Reaktionsmischung für 72 Stunden bei Raumtemperatur zeigte die dünnschichtchromatographische Kontrolle einen nicht vollständigen Umsatz an. Es wurden weitere 100 mg (2.65 mmol) Natriumborhydrid sowie 2 mL Methanol zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere sechs Stunden auf 50 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 mL Wasser und einige Tropfen konzentrierter Salzsäure, bis zur Neutralisation, zugegeben. Nach Abdestillieren des Lösungsmittel wurde der Rückstand mit 30 ml heißem Ethanol extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der resultierende Rückstand über Flash-Chromatographie mit Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v aufgereinigt.

Ausbeute: 200 mg (876 µmol, 78%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.10

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 8:2 v/v): 0.45

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 11.14 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H6), 4.39 (dd, 2x1H, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, OH), 3.66 (t, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, H1'), 3.40 (ddd, 2x1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, H4'-a), 3.33 (ddd, 2x1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, H4'-b), 1.74 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7), 1.53 (dt, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.2$ Hz, H2'), 1.49 - 1.42 (m, 1H, H3')

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 164.6 (C4), 151.2 (C2), 141.7 (C6), 108.8 (C5), 61.8 (OCH₃), 61.8 (C4⁴), 46.0 (C1⁴), 41.1 (C3⁴), 28.1 (C2⁴), 12.3 (C7) UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 269.0, 192.0

λ_{min} [nm]: 236.0

HPLC: $t_R = 9.57 \min(97\%, \text{Gradient B})$

MS (ESI; m/z): ber.: 228.11

```
gef.: 229.23 (M+H<sup>+</sup>), 252.23 (M+Na<sup>+</sup>)
```

8.3.3 Darstellung von T-Ganciclovir und Derivaten

8.3.3.1 Darstellung von 4-(Chlormethyl)-1,3-dioxolan **54**^[103]



16.5 g (550 mmol) Paraformaldehyd sowie 55.3 g (500 mmol) 3-Chlor-1,2-propandiol **55** wurden in einem Dreihalskolben mit aufgesetztem Claisenkühler in 37.5 mL Wasser suspendiert und 7 mL konzentrierter Schwefelsäure zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 120 °C erhitzt, wobei ein farbloses, azeotropes Destillat überging. Das Destillat wurde bis zu einer Übergangstemperatur von 100 °C gesammelt. Das Destillat wurde mit Kaliumcarbonat gesättigt und die wäßrige Phase zweimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Kaliumcarbonat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel vom Lösungsmittel befreit. Abschließend wurde der resultierende ölige Rückstand fraktionierend destilliert.

Ausbeute: 38.0 g (311 mmol, 62%) einer farblosen Flüssigkeit

Sdp.: 142 °C (860 mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 5.08 (s, 1H, H2-a), 4.91 (s, 1H, H2-a), 4.28 (dddd, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 6.6$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.9$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.1$ Hz, H4), 4.01 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 8.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 6.6$ Hz, H5-a), 3.86 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 8.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.9$ Hz, H5-b), 3.60 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.1$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.9$ Hz, H6-a); 3.48 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.9$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.4$ Hz, H6-b) δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 96.2 (C2), 75.3 (C4), 68.6 (C5), 44.4 (C6)

8.3.3.2 Darstellung von 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan **56a**^[104]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 31.5 g (257 mmol) 4-(Chlormethyl)-1,3-dioxolan 54 wurden in 77.0 mL (815 mmol) frisch destilliertem Essigsäureanhydrid gelöst und 8.70 mL (152 mmol) Essigsäure zugetropft. Anschließend wurden 2.60 g (19.0 mmol) Zinkchlorid zugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt. Unmittelbar nach Zugabe des Zinkchlorids stieg die Temperatur der leicht gelblichen Lösung auf 55 °C an. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung zwei Stunden gerührt. Anschließend wurden Essigsäureanhydrid und Essigsäure unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in und mit 100 mL Diethylether aufgenommen einmal je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie Wasser gewaschen. Die etherische Lösung wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende Öl wurde fraktionierend destilliert.

Ausbeute:53.8 g (240 mmol, 92%) eines farblosen Öls, das als 3:1 Isomerengemisch
aus 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan 56a und 1-Chlor-2-
acetoxy-3-acetoxymethoxypropan 56b charakterisiert werden konnte

Sdp.: 97 - 101 °C (0.4 mbar)

Spektroskopische Daten zu 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan 56a:

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 5.38 (d, 1H, ²J_{HH} = 6.6 Hz, H4-a), 5.34 (d, 1H, ²J_{HH} = 6.6 Hz, H4-b), 4.27 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 4.7 Hz, H1-a), 4.19 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, H1-b), 4.09 - 4.03 (m, 1H, H2), 3.72 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.7 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H3-a), 3.58 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.7 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H3-b), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 170.8 (C=O), 88.7 (C4), 77.9 (C2), 63.9 (C1), 43.7 (C3), 21.4 (CH₃), 21.4 (CH₃)

Spektroskopische Daten zu 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan 56b:

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 5.29 (d, 1H, ²J_{HH} = 6.3 Hz, H4-a), 5.26 (d, 1H, ²J_{HH} = 6.3 Hz, H4-b), 5.16 - 5.11 (m, 1H, H2), 3.87 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz,

$${}^{3}J_{\rm HH} = 5.7 \text{ Hz}, \text{ H1-a}), 3.83 \text{ (dd, 1H, } {}^{2}J_{\rm HH} = 10.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 5.7 \text{ Hz}, \text{ H1-b}),$$

3.72 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.7 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 5.5 \text{ Hz}, \text{ H3-a}), 3.64 \text{ (dd, 1H,}$
 ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.7 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 5.7 \text{ Hz}, \text{H3-b}), 2.12 \text{ (s, 3H, CH_3)}, 2.11 \text{ (s, 3H, CH_3)}$
 ${}^{13}\text{C-NMR}:$ $\delta \text{ [ppm] (100 MHz, CDCl_3): 170.9 (C = O), 89.3 (C4), 71.7 (C2), 68.5 (C1),$
 ${}^{42.6 (C3), 21.3 (CH_3), 21.14 (CH_3)}$

8.3.3.3 Darstellung von 1,3-Diacetoxy-2-(acetoxymethoxy)propan **52a**^[104]



11.4 g (116 mmol) wasserfreies Kaliumacetat wurden zu einer Lösung von 11.4 g (51.0 mmol) 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan **56a** und 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan **56b** in 80 mL wasserfreiem *N,N*-Dimethylformamid gegeben und zwei Stunden auf 150 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 300 ml Wasser verdünnt und dreimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde zunächst mit 30 mL Wasser und dann mit 30 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für die folgende Umsetzung verwandt.

Ausbeute:9.50 g (38.4 mmol, 76%) eines gelben Öls, das als 3:1 Isomerengemisch aus1,3-Diacetoxy-2-acetoxymethoxypropan 52aund1,2-Diacetoxy-3-acetoxymethoxypropan 52b charakterisiert werden konnte

Spektroskopische Daten zu 1,3-Diacetoxy-2-acetoxymethoxypropan 52a

¹H-NMR: δ[ppm] (400 MHz, CDCl₃): 5.34 (s, 2H, H4), 4,24 – 4,06 (m, 5H, H1, H2, H3), 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 6H, 2CH₃).

Spektroskopische Daten zu 1,2-Diacetoxy-3-acetoxymethoxypropan 52b

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 5.28 (d, 1H, ²J_{HH} = 6.6 Hz, H4-a), 5.25(d, 1H, ²J_{HH} = 6.6 Hz, H4-b), 4.33 (dd, 1H, ³J_{HH} = 10.2 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H1-a), 4.30 (dd, 1H, ³J_{HH} = 10.2 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H1-b), 4.24 - 4.06 (m, 1H, H2), 3.80-3.78 (m, 2H, H3), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃).

8.3.3.4 Darstellung von 1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin 58a



2.52 g (20.0 mmol) Thymin **49** wurden in 75 mL (35.5 mmol) Hexamethyldisilazan suspendiert, 0.95 g (7.20 mmol) Ammoniumsulfat hinzugegeben und 90 Minuten unter Rückfluß erhitzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Ölpumpenvakuum bis zur Trockene eingeengt.

Das erhaltene silylierte Thymin wurde in 30 mL absolutem Dichlormethan aufgenommen, 7.45 g (30.0 mmol) 1,3-Diacetoxy-2-(acetoxymethoxy)propan **52a** und 1,2-Diacetoxy-3acetoxymethoxypropan **52b** sowie eine katalytische Menge Tetrabutylammoniumiodid zugegeben. Anschließend wurden 5.36 g (24.0 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat innerhalb von 10 Minuten zugetropft und die Reaktionslösung 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wurde die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt.

Nach vollendeter Reaktion wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 40 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit 40 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zweimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%.

Ausbeute:5.58 g (17.8 mmol; 89%) eines blaßgelben Öls, das als 3:1 Isomerengemisch
aus 1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin 58a und 1-[2,3-
Diacetoxypropyloxymethyl]thymin 58b vorlag.

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.70

Spektroskopische Daten zu 1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin 58a

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.64 (s, 1H, -NH), 7.15 (q, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.24 (s, 2H, H1'), 4.23 (m, 2H, H4'-a), 4.10-4.05 (m, 3H, H3', H4'-b), 2.06(s, 6H, 2xCH₃), 1.95 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 170.5 (2x C=O), 163.9 (C4), 151.2 (C2), 139.1 (C6), 111.7 (C5), 75.8 (C1'), 74.8 (C3'), 63.1 (C4'), 20.7 (2xCH₃), 12.3 (C7)

Spektroskopische Daten zu 1-[2,3-Diacetoxypropyloxymethyl]thymin 58b

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.62 (s, 1H, NH), 7.11 (q, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.18 (d, 1H, ²*J*_{HH} = 10.6 Hz, H1'-a), 5.12 (d, 1H, ²*J*_{HH} = 10.6 Hz, H1'b), 4.29 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.9 Hz, ³*J*_{HH} = 4.1 Hz, H5'-a), 4.26 - 4.20 (m, 1H, H5'-b), 4.15 - 4.05 (m, 1H, H4'), 3.72 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 5.2 Hz, H3'), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.95 (d, 3H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 170.5 (C=O), 170.1 (C=O), 163.9 (C4), 151.2 (C2), 138.7 (C6), 111.9 (C5), 76.6 (C1'), 69.7 (C4'), 67.6 (C3'), 62.2 (C5'), 20.9 (CH₃), 20.6 (CH₃), 11.3 (C7)
- 8.3.3.5 Darstellung von 1-[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]thymin (T-Ganciclovir) **30**



5.58 g (17.7 mmol) 1-[2-Acetoxy-1-(acetoxymethyl)ethoxymethyl]thymin **58a** und 1-[2,3-Diacetoxypropyloxymethyl]thymin **58b** wurden in 20 mL Methanol gelöst und mit 800 mg Natriummethanolat versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei 40 °C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zugabe von Methanol in Lösung gebracht. Es wurden 2.00g Dowex 50 W X 8 [H⁺-Form] hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde vom Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Rückstand wurde zweimal aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2.15 g (10.6 mmol; 60%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.10

¹H- MR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.26 (s, 1H, NH), 7.54 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 5.13 (s, 2H, H1'), 4.60 (t, 2H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, 2xOH), 3.50 (tt, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ³J_{HH} = 4.7 Hz, H3'), 3.42 (ddd, 2H, ²J_{HH} = 11 3 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 4.7 Hz, H4'-a), 3.32 (ddd, 2H, ²J_{HH} = 11.3 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 6.0 Hz, H4'-b), 1.75 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1 Hz, H7)

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.7 (C4), 151.4 (C2), 141.0 (C6), 109.3 (C5), 80.8 (C3'), 76.0 (C1'), 61.3 (C4'), 12.3 (C7)
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 205.2, 263.4

 λ_{min} [nm]: 231.8

- HPLC: $t_R = 2.67 \min(98\%, \text{Gradient A})$
- MS (ESI; m/z): ber.: 230.09

gef.: 231.21 (M+H⁺), 253.20 (M+Na⁺)

8.3.3.6 Darstellung von 5'-O-Trityl-T-Ganciclovir 66 aus T-Ganciclovir 30



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 400 mg (1.74 mmol) T-Ganciclovir **30** wurden in 5 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und 533 mg (1.97 mmol) Chlortriphenylmethan zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 10 mL Toluol koevaporiert und anschließend am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%.

Ausbeute: 327 mg (0.69 mmol; 40%) eines blaßgelben Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.70

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.36 (s, 1H, NH), 7.64 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.34 - 7.28 (m, 12H, H(B), H(C)), 7.25 - 7.21 (m, 3H, H(D)), 5.25 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-a), 5.18 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-b), 4.69 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.3 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, OH), 3.84 - 3.79 (m, 1H, H3'), 3.44 - 3.22 (m, 2H, H4'), 2.96 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.5 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H5'-a), 2.93 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.5 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, H5'-b), 1.71 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.5 (C4), 151.5 (C2), 143.9 (C(A)), 140.9 (C6), 128.4 (C(C)), 128.0 (C(B)), 127.1 (C(D)), 109.3 (C5), 86.0 (C_q-*O*-Tr), 79.1 (C3'), 76.1 (C1'), 64.3 (C5'), 61.1 (C4'), 12.1 (C7)
- 8.3.3.7 Darstellung von 4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir 67



1.50 g (6.52 mmol) T-Ganciclovir **30** wurden in 15 mL wasserfreiem *N*,*N*-Dimethylformamid gelöst und 1.57 g (1.64 mL, 13.0 mmol) Trimethylorthoacetat zugegeben. Innerhalb von 30 Minuten wurden 568 μ L (817 mg, 7.17 mmol) Trifluoressigsäure (TFA) bei Raumtemperatur zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 2 mL Wasser wurde die Reaktionslösung erneut zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der resultierende Rückstand dreimal mit je 40 mL einer Mischung aus Ethanol und Toluol (1:1, v/v) koevaporiert. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 12%).

Ausbeute: 1.58 g (5.78 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffs

	V): 0.62
--	----------

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.29 (s, 1H, NH), 7.52 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.14 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.5 Hz, H1'-a), 5.05 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.5 Hz, H1'-b), 4.79 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, OH), 4.08 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.7 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, H4'-a), 3.87 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.7 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H4'-b), 3.76 (dddd, 1H, ³J_{HH} = 7.12 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, H3'), 3.38 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H5'), 1.89 (s, 3H, CH₃), 1.73 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 170.4 (C=O), 164.5 (C4), 151.4 (C2), 140.9 (C6), 109.3 (C5), 77.4 (C3'), 75.8 (C1'), 63.8 (C4'), 60.7 (C5'), 20.7 (CH₃), 12.1 (C7)
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 264.6

λ_{min} [nm]: 232.9

- HPLC: $t_R = 7.01 \text{ min (99\%, Gradient A)}$
- MS (ESI; m/z): ber.: 272.10

gef.: 295.28 (M+Na⁺)

8.3.3.8 Darstellung von 4'-O-Acetyl-5'-O-trityl-T-Ganciclovir 68



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1.53 g (5.63 mmol) 4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir 67 wurden in 50 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und 3.14 g (11.3 mmol) Chlortriphenylmethan zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 90 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit je 30 mL Toluol koevaporiert. Der resultierende Rückstand wurde in 70 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je

40 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 10%.

Ausbeute: 2.20 g (4.28 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.42

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.35 (s, 1H, NH), 7.61 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.36 - 7.30 (m, 12H, H(B), H(C)), 7.27 - 7.23 (m, 3H, H(D)), 5.19 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, H1'-a), 5.16 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, H1'-b), 4.09 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.0 Hz, ³J_{HH} = 2.2 Hz, H4'-a), 4.03 - 3.95 (m, 2H, H4'-b, H3'), 3.02 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H5'-a), 2.99 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H5'-b), 1.89 (s, 3H, CH₃), 1.73 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- 8.3.3.9 Darstellung von 5'-O-Trityl-T-Ganciclovir 66



2.17 g (4.21 mmol) 4'-O-Acetyl-5'-O-trityl-T-Ganciclovir **68** wurden in 45 mL wasserfreiem Methanol suspendiert und 400 mg (7.37 mmol) Natriumethanolat zugegeben, worauf eine klare Lösung entstand. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei 40 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 25%).

Ausbeute: 1.91 g (4.03 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.3.6.





Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 925 mg (1.96 mmol) 4'-O-Trityl-T-Ganciclovir **66** wurden zweimal mit je 10 mL wasserfreiem Pyridin koevaporiert und anschließend in 15 mL Pyridin aufgenommen. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und innerhalb von 15 Minuten 305 µL (449 mg, 3.92 mmol) Methansulfonsäurechlorid (MsCl) hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde 14 Stunden bei 4 °C gelagert. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde 1 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 10 mL Toluol und anschließend zweimal mit je 10 mL Dichlormethan koevaporiert. Der resultierende Rückstand wurde in 30 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 15 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 4%.

Ausbeute: 900 mg (1.63 mmol, 83%) eines blaßgelben Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.79

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.99 (s, 1H, NH), 7.41 7.38 (m, 6H, H(B)), 7.32 - 7.22 (m, 9H, H(C), H(D)), 7.10 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.19 (s, 2H, H1'), 4.32 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.1 Hz, ³*J*_{HH} = 3.2 Hz, H4'-a), 4.25 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.1 Hz, ³*J*_{HH} = 6.5 Hz, H4'-b), 3.99 (ddt, 1H, ³*J*_{HH} = 3.2 Hz, ³*J*_{HH} = 6.5 Hz, ³*J*_{HH} = 5.2 Hz, H3'), 3.24 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 5.2 Hz, H5'), 2.94 (s, 3H, SO₂CH₃), 1.88 (d, 3H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.9 (C4), 151.1 (C2), 143.3 (C(A)), 139.0 (C6), 128.5 (C(C)), 127.9 (C(B)), 127.3 (C(D)), 111.8 (C5), 87.2 (C_q-*O*-Tr), 76.1 (C3'), 76.1 (C1'), 69.0 (C4'), 62.6 (C5'), 37.5 (SO₂CH₃), 12.2 (C7)

8.3.3.11 Darstellung von 4'-Azido-5'-O-trityl-T-Ganciclovir 71

500 mg (908 µmol) 5'-O-Mesyl-4'-O-trityl-T-Ganciclovir **70** wurden in 15 mL wasserfreiem *N,N*-Dimethylformamid gelöst. 885 mg (13.6 mmol) Natriumazid zugegeben und das Reaktionsgemisch zwei Stunden auf 105 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und einmal mit je 50 mL Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Natriumchloridlösung und wiederum Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%).

Ausbeute: 434 mg (872 µmol, 96%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.82

¹H- NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.62 (s, 1H, NH), 7.42 - 7.39 (m, 6H, H(B)), 7.32 - 7.22 (m, 9H, H(C), H(D)), 7.13 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H6), 5.27 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-a), 5.15 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-b), 3.88 (dddd, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, ³J_{HH} = 3.7 Hz, H3'), 3.39 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H4'-a), 3.34 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 3.7 Hz, H4'-b), 3.19 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H5'), 1.89 (d, 3H, ³J_{HH} = 1.3 Hz, H7)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.6 (C4), 150.9 (C2), 143.5 (C(A)), 139.0 (C6), 128.6 (C(C)), 127.9 (C(B)), 127.2 (C(D)), 111.7 (C5), 87.1 (C_q-*O*-Tr), 77.7 (C3'), 75.9 (C1'), 63.4 (C5'), 52.3 (C4'), 12.2 (C7)





400 mg (804 µmol) 5'-Azido-4'-O-trityl-T-Ganciclovir **71** wurden in 1 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 3 mL einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol 7:3 v/v (2% BSA) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei 40 °C gerührt und dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde durch Zugabe von ammoniakalischer Methanollösung neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 12%.

Ausbeute: $182 \text{ mg} (0.71 \text{ } \mu \text{mol}, 89\%)$ eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.50

- ¹H- NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.3 (s, 1H, NH), 7.6 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.18 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-a), 5.13 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-b), 4.86 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, OH), 3.73 (ddt, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H3'), 3.39 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H5'), 3.37 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H4'-a), 3.27 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H4'-b), 1.75 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.4 (C4), 151.3 (C2), 140.7 (C6), 109.4 (C5), 78..8 (C3'), 75.9 (C1'), 61.2 (C5'), 51.5 (C4'), 12.2 (C7)

IR: $\tilde{v} \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ (KBr): 3402, 2102 (N₃), 1685, 1673, 1469, 1343, 1287, 1068, 862, 714, 600, 492, 437

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 232.3

 λ_{min} [nm]: 264.5

HPLC: $t_R = 7.97 \min(98\%, \text{Gradient A})$

MS (ESI^+ , m/z): ber.: 255.10

gef.: 278.25 (M+Na⁺)

8.3.3.13 Darstellung von 5'-O-Acetyl-4'-azido-T-Ganciclovir 72



212 mg (779 µmol) 4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir 67 wurden in 3 mL Pyridin gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 15 Minuten wurden 121 µL (177 mg, 1.56 mmol) Methansulfonsäurechlorid (MsCl) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei 4 °C gelagert. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde 1 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan koevaporiert. Der Rückstand wurde in 25 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 25 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde in 5 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid gelöst. 548 mg (9.21 mmol) Natriumazid zugegeben und das Reaktionsgemisch zwei Stunden auf 105 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 25 mL Dichlormethan verdünnt und einmal mit je 25 mL Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Natriumchloridlösung und wiederum Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: 141 mg (474 µmol, 61%) eines farblosen Öls

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

¹H- NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.51 (s, 1H, NH), 7.16 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.31 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, H1'-a), 5.20 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, H1'b), 4.24 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.6 Hz, ³J_{HH} = 3.9 Hz, H5'-a), 4.08 – 3.96 (m, 2H, H5'-b, H3'), 3.37 (d, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, H4'), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.95 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7) 13 C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 165.9 (C4), 151.1 (C2), 138.9 (C6), 111.9 (C5), 76.1 (C3'), 75.8 (C1'), 63.3 (C5'), 51.8 (C4'), 20.7 (CH₃), 12.3 (C7) IR: \tilde{v} [cm⁻¹] (KBr): 3467, 2103 (N₃), 1679, 1619, 1385, 1224, 1121, 913, 857, 742, 622, 552, 519 UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 262.0, 208.0 λ_{min} [nm]: 232.0

8.3.3.14 Darstellung von Azido-T-Ganciclovir **41a** aus Verbindung **72**



121 mg (0.41 mmol) 4'-O-Acetyl-5'-azido-T-Ganciclovir **72** wurden in 2 mL wasserfreiem Methanol gelöst und mit 200 mg Natriummethanolat versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei 40 °C gerührt. Es wurden 800 mg Dowex 50 W X 8 [H⁺-Form] hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde vom Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 12%.

Ausbeute:90.0 mg (0.35 mmol, 86%) eines farblosen Öls, welches durchLyophilisieren in einen farblosen Feststoff überging.

Die Spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.3.12.



8.3.3.15 Darstellung von 5'-O-((1S)-(-)-Camphanoyl)-Azido-T-Ganciclovir 73

93.0 mg (0.36 mmol) Azido-T-Ganciclovir **41a** wurden in 3 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 49.0 mg (0.40 mmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie 79.0 mg (0.40 mmol) (1S)-(-)-Camphansäure zugegeben. Danach wurden 83.0 mg (0.40 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimd, gelöst in 0.5 mL Dichlormethan zugetropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur war kein Edukt mehr detektierbar. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 3%).

Ausbeute:135 mg (0.31 mmol, 85%) eines farblosen Öls als Gemisch von 2Diastereomeren im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

¹H- NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 9.30 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH), 7.17 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H6), 7.17 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H6), 5.38 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, H1'-a), 5.38 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, H1'-a), 5.14 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, 2xH1'-b), 4.51 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H5'-a), 4.49 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H5'-a), 4.18 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, H5'-b), 4.16 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, H5'-b), 4.11 - 4.05 (m, 1H, H3'), 3.41 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H4'), 3.41 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H4'), 2.46 - 2-38 (m, 1H, H6''-a), 2.07 -1.99 (m, 1H, H6''-b), 1.97 - 1.89 (m, 1H, H5''-a), 1.94 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H7), 1.73 - 1.66 (m, 1H, H5''-b), 1.11 (s, 3H, 4''-CH₃), 1.06 (s, 3H, 7''-CH₃), 1.05 (s, 3H, 7''-CH₃), 0.97 (s, 3H, 7''-CH₃), 0.96 (s, 3H, 7''-CH₃) ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 177.9 (C3^{''}), 177.8 (C3^{''}), 167.1 (C10^{''}), 167.1 (C10^{''}), 163.9 (C4), 151.3 (C2), 151.3 (C2), 139.1 (C6), 138.8 (C6), 112.0 (C5), 112.0 (C5), 90.9 (C1^{''}), 76.0 (C1[']), 75.9 (C1[']), 75.7 (C3[']), 75.4 (C3[']), 64.1 (C5[']), 63.9 (C5[']), 54.7 (C4^{''}), 54.7 (C4^{''}), 51.6 (C4[']), 51.5 (C4[']), 33.5 (C7^{''}), 30.7 (C5^{''}), 28.8 (C6^{''}), 16.7 (7^{''}-CH₃), 16.6 (2x7^{''}-CH₃), 16.6 (7^{''}-CH₃), 12.2 (C7), 9.6 (4^{''}-CH₃)

HPLC: $t_R = 14.21 \text{ min (Gradient E)}$

8.3.3.16 Darstellung von 5'-O-(Campher-10-sulfonyl)-Azido-T-Ganciclovir 74



70.0 mg (0.27 mmol) Azido-T-Ganciclovir **41a** wurden zweimal mit je 5 mL wasserfreiem Pyridin koevaporiert, in 2 mL Pyridin aufgenommen und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 138 mg (0.55 mmol) (+)-Campher-10-sulfonylchlorid, gelöst in 2 mL Pyridin, zugetropft. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand dreimal mit je 5 mL Toluol koevaporiert. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron aufgereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 4%.

Ausbeute:110 mg (0.23 mmol, 86%) eines farblosen Öls als Gemisch von 2Diastereomeren im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.85

¹H- NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 9.3 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH), 7.21 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.19 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.31 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, H1'-a), 5.30 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, H1'-a), 5.26 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, H1'-b), 5.25 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, H1'-b), 4.42 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 3.5 Hz, H5'-a), 4.39 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H5'-a), 4.31 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H5'-b),
4.28 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.9$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.8$ Hz, H5'-b), 4.12 - 4.07 (m, 1H, H3'), 3.60 (d, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 15.2$ Hz, H10''-a), 3.58 (d, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 15.2$ Hz, H10''-a), 3.44 (d, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 4.8$ Hz, H4'), 3.02 (d, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 15.2$ Hz, H10''-b), 3.01 (d, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 15.2$ Hz, H10''-b), 2.45 - 2.35 (m, 2H, H3''), 2.14 - 1.99 (m, 3H, H4'', H6''), 1.94 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7), 1.66 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.1$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 9.4$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.7$ Hz, H5''-a), 1.65 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.1$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 9.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.6$ Hz, H5''-a), 1.49 - 1.42 (m, 1H, H5''-b), 1.09 (s, 3H, 7''-CH₃), 1.09 (s, 3H, 7''-CH₃), 0.88 (s, 3H, 7''-CH₃), 0.87 (s, 3H, 7''-CH₃)

HPLC: $t_R = 7.39 \min (\text{Gradient F})$

8.3.3.17 Darstellung von 5'-Thiocyanato-4'-O-trityl-T-Ganciclovir 75



1.00 g (2.12 mmol) 4'-O-Trityl-T-Ganciclovir 66 wurden in 15 mL Pyridin gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 15 Minuten wurden 490 µL (727 mg, 6.35 mmol) Methansulfonsäurechlorid zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 1 Stunde bei 0 °C und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurden 3 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit je 25 mL Toluol und zweimal mit je 25 mL Dichlormethan koevaporiert. Der Rückstand wurde in 25 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 25 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 15 mL wasserfreiem vom N,N-Dimethylformamid gelöst. 1.62 g (19.9 mmol) Natriumrhodanid zugegeben und das Reaktionsgemisch 16 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 50 mL Wasser und einmal mit 30 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die wäßrige Phase wurde mit 30 mL Dichlormethan

reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: 720 mg (1.40 mmol, 66%) eines farblosen Feststoffs

- ¹H- NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.38 (s, 1H, NH), 7.62 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H6), 7.37 - 7.30 (m, 12H, H(B), H(C)), 7.27 - 7.23 (m, 3H, H(D)), 5.22 (s, 2H, H1'), 4.11 - 4.05 (m, 1H, H3'), 3.34 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.9 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H5'-a), 3.20 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.9 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H5'-b), 3.09 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.1 Hz, ³J_{HH} = 4.0 Hz, H4'-a), 3.06 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.1 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H4'-b), 1.73 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.4 (C4), 151.5 (C2), 143.6 (C(A)), 140.7 (C6), 128.3 (C(C)), 128.1 (C(B)), 127.3 (C(D)), 113.2 (SCN), 109.5 (C5), 86.4 (C_q-*O*-Tr), 76.4 (C3'), 75.8 (C1'), 64.5 (C5'), 35.4 (C4'), 12.0 (C7)
- 8.3.3.18 Darstellung von 1-(2-Thiocyanato-1-hydroxymethyl-ethoxymethyl)thymin (Thiocyanato-T-Ganciclovir) **41b**



700 mg (1.36 mmol) 5'-Thiocyanato-4'-*O*-trityl-T-Ganciclovir **75** wurden in 1 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 10 mL einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol 7:3 v/v (2% BSA) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde durch Zugabe von ammoniakalischer Methanollösung neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand

wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 10%.

Ausbeute: 297 mg (1.10 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.50

- ¹H-NMR δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.31 (s, 1H; NH), 7.56 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7), 5.21 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-a), 5.13 (d, 1H, ²J_{HH} = 10.7 Hz, H1'-b), 4.98 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, OH), 3.84 - 3.80 (m, 1H, H3'), 3.48 (ddd, 1H; ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H5'-a), 3.45 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H5'-b), 3.35 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H4'-a), 3.11 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.6 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H4'-b), 1.76 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.4 (C4), 151.3 (C2), 140.8 (C6), 113.4 (SCN), 109.4 (C5), 77.6 (C3'), 75.5 (C1'), 61.7 (C5'), 35.4 (C4'), 12.1 (C7)
- IR: \tilde{v} [cm⁻¹] (KBr): 3459, 3162, 3039, 2152 (SCN), 1668, 1471, 1327, 1275, 1104, 1073, 1005, 859, 765, 715, 585, 551, 460, 439, 422
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 262.5

λ_{min} [nm]: 233.6

- HPLC: $t_{R} = 7.79 \min(97\%, \text{Gradient A})$
- MS (ESI⁺, m/z): ber.: 271.06

gef.: 272.23 (M+H⁺), 294.24 (M+Na⁺)

8.3.4 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanato- und2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin

8.3.4.1 Darstellung von 2'-Desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **80**^[116]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 3.63 g (15.0 mmol) 2'-Desoxythymidin 81 wurden in 75 mL wasserfreiem Pyridin gelöst, 5.02 g (18.0 mmol) Chlortriphenylmethan (TrCl) zugegeben und die 110 °C erhitzt. Reaktionslösung 90 Minuten auf Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in 600 mL Eiswasser eingetragen, worauf ein farbloser Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und anschließend aus Benzol/Aceton umkristallisiert. Die Mutterlauge der ersten Umkristallisation wurde zur Trockene eingeengt und erneut umkristallisiert.

Ausbeute: 6.14 g (12.7 mmol, 84%) eines blaßgelben Feststoffs

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.87 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.35 - 7.31 (m, 6H, H(B)), 7.26 - 7.16 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.35 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, ³*J*_{HH} = 5.8 Hz, H1'), 4.51 - 4.48 (m, 1H, H3'), 3.99 (dt, ³*J*_{HH} = 3.1 Hz, ³*J*_{HH} = 3.1 Hz, H4'), 3.39 (dd, ²*J*_{HH} = 10.5 Hz, ³*J*_{HH} = 3.1 Hz, H5'-a), 3.30 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 10.5 Hz, ³*J*_{HH} = 3.1 Hz, H5'-b), 2.95 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 4.1 Hz, OH), 2.35 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.7 Hz, ³*J*_{HH} = 5.8 Hz, ³*J*_{HH} = 6.1 Hz, H2'-a), 2.24 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.7 Hz, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, ³*J*_{HH} = 6.1 Hz, H2'-b), 1.40 (d, 3H, ⁴*J*_{HH} = 1.0 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.7 (C4), 150.4 (C2), 143.3 (C(A)), 135.6 (C6), 128.6 (C(C)), 128.3 (C(B)), 127.4 (C(D)), 111.3 (C5), 87.5 (C_q-*O*-Tr), 86.1 (C1'), 84.7 (C4'), 72.4 (C3'), 63.7 (C5'), 40.9 (C2'), 11.8 (C7)

8.3.4.2 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-O-mesyl-5'-O-tritylthymidin **79**^[117]



5.99 g (12.4 mmol) 2'-Desoxy-5'-*O*-tritylthymidin **80** wurden in 60 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 2.90 mL (4.25 g, 57.1 mmol) Methansulfonsäurechlorid (MsCl) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend 16 Stunden bei 4 °C gelagert. Die Reaktionslösung wurde erneut auf 0 °C gekühlt, 2 mL Wasser zugegeben und eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter starkem Rühren in 500 mL Eiswasser eingetragen. Der entstehende, farblose Niederschlag wurde zunächst abfiltriert, anschließend in 250 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 100 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung für die folgenden Umsetzungen verwandt.

Ausbeute: 6.45g (11.5 mmol, 92%) eines blaßgelben Feststoffs

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.76 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H6), 7.33 - 7.30 (m, 6H, H(B)), 7.27 - 7.19 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.35 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H1'), 5.33 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ³J_{HH} = 2.0 Hz, ³J_{HH} = 1.5 Hz, H3'), 4.25 (dt, ³J_{HH} = 2.6 Hz, ³J_{HH} = 2.0 Hz, H4'), 3.47 (dd, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 2.6 Hz, H5'-a), 3.30 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 2.6 Hz, H5'-b), 2.95 (s, 3H, SO₂CH₃), 2.61 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 1.5 Hz, H2'-a), 2.40 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H2'-b), 1.41 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.4 (C4), 150.3 (C2), 143.1 (C(A)), 135.2 (C6), 128.6 (C(C)), 128.1 (C(B)), 127.5 (C(D)), 111.2 (C5), 87.5 (C_q-*O*-Tr), 83.6 (C1'), 81.0 (C4'), 78.6 (C3'), 60.9 (C5'), 39.5 (C2'), 38.4 (SO₂CH₃), 12.5 (C7)

8.3.4.3 Darstellung von 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-*O*-tritylthymindin **82**^[115]



1.87 g (3.32 mmol) 2'-Desoxy-3'-O-mesyl-5'-O-tritylthymidin **79** wurden zu einer Lösung von 3.08 g (16.6 mmol) Kaliumphthalimid in 46 mL *N*,*N*-Dimethylformamid und 13 mL Wasser gegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in 250 mL Eiswasser eingetragen. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Eiswasser nachgewaschen und abschließend im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 1.53 g (3.28 mmol, 99%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.40

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.33 (s, 1H, NH), 7.61 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.37 - 7.34 (m, 6H, H(B)), 7.30 - 7.21 (m, 9H, H(C), H(D)), 5.88 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H1'), 5.32 - 5.29 (m, 1H, H3'), 4.42 (ddd, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 4.9 Hz, ³J_{HH} = 2.5 Hz, H4'), 3.11 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.7 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H5'-a), 3.07 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.7 Hz, ³J_{HH} = 4.9 Hz, H5'-b), 2.56 (d, 1H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, H2'-a), 2.45 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, ³J_{HH} = 3.4 Hz, H2'-b), 1.76 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7)



8.3.4.4 Versuch der Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83a

1.30 g (2.79 mmol) 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-O-tritylthymindin **82** wurden in 15 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und 2.26 g (27.9 mmol) Natriumrhodanid zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 12 Stunden auf 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 75 mL Wasser und einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die wäßrige Phase wurde mit 30 mL Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%). Es konnte kein eindeutiges Produkt isoliert werden.

8.3.4.5 Darstellung von 1-(2'-Desoxy-5'-O-trityl-β-D-threo-pentosyl)thymin **78**



6.40 g (11.4 mmol) 2'-Desoxy-3'-O-mesyl-5'-O-tritylthymidin **79** wurden in 150 mL Ethanol gelöst und 43 mL 1N Natriumhydroxidlösung sowie 110 mL Wasser hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde vier Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung im Vakuum auf ca. 150 mL konzentriert. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und mit 2N Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Der amorphe, farblose Niederschlag wurde abfiltriert, in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 10%.

Ausbeute: 4.75 g (9.80 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.66 (s, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.40 - 7.37 (m, 6H, H(B)), 7.27 - 7.18 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.12 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HH} = 2.4 Hz, H1'), 4.39 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, ³J_{HH} = 2.6 Hz, H3'), 3.96 (ddd, ³J_{HH} = 5.3 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H4'), 3.57 (dd, ²J_{HH} = 10.2 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, H5'-a), 3.42 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.2 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, H5'-b), 2.94 (d, 1H, ³J_{HH} = 2.6 Hz, OH), 2.51 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.9 Hz, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H2'-a), 2.06 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.9 Hz, ³J_{HH} = 2.4 Hz, H2'-b), 1.72 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7)

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.7 (C4), 150.4 (C2), 143.3 (C(A)), 135.6 (C6), 128.6 (C(C)), 128.3 (C(B)), 127.4 (C(D)), 111.3 (C5), 87.5 (C_q-*O*-Tr), 86.1 (C1'), 84.7 (C4'), 72.4 (C3'), 63.7 (C5'), 40.9 (C2'), 11.8 (C7)
- 8.3.4.6 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-*O*-tritylthymidin **83a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-*O*-tritylthymidin **83b**^[113]



1.00 g (2.06 mmol) 1-(2'-Desoxy-5'*O*-trityl-β-D-*threo*-pentosyl)thymin **78** wurden zweimal mit je 10 mL wasserfreiem Pyridin koevaporiert und anschließend in 40 mL wasserfreiem Dichlormethan aufgenommen. Es wurden 672 μL (652 mg, 8.24 mmol) wasserfreies Pyridin zugetropft und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 30 Minuten wurden 676 μL (1.16 g, 4.12 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Triflatanhydrid, Tf₂O) bei dieser Temperatur zugetropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Es wurden 1.67 g (20.6 mmol) Natriumrhodanid zugegeben. Anschließend wurde wasserfreies *N*,*N*-Dimethylformamid (15 mL) zugegeben, bis eine klare Lösung erhalten

wurde. Die Reaktionslösung wurde vier Stunden bei 0 °C und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der resultierende Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 50 mL Wasser sowie einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%).

Ausbeute: 919 mg (1.75 mmol) eines sandfarbenen Feststoffs, der als 10:1 Gemisch aus 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-O-tritylthymidin **83a** und 2'-Desoxy-3'isothiocyanato-5'-O-tritylthymidin **83b** vorlag.

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.86

Spektroskopische Daten zu 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83a

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.66 (s, 1H, NH), 7.47 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.35 - 7.31 (m, 6H, H(B)), 7.28 - 7.19 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.13 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, ³J_{HH} = 4.5 Hz, H1'), 4.02 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H4'), 3.85 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H3'), 3.62 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H5'-a), 3.37 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H5'-b), 2.71 - 2.57 (m, 2H, H2'), 1.50 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7)

Spektroskopische Daten zu 2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83b

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.55 (s, 1H, NH), 7.52 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.35 - 7.31 (m, 6H, H(B)), 7.28 - 7.19 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.36 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H1'), 4.11 - 4.07 (m, 1H, H4'), 3.86 - 3.81 (m, 1H, H3'), 3.47 (dd, 1H, ²J_{HH} = 8.4 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H5'-a), 3.42 (dd, 1H, ²J_{HH} = 8.4 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H5'-b), 2.71 - 2.57 (m, 2H, H2'), 1.36 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7)

8.3.4.7 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a** und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b**



900 mg (1.71 mmol) eines 10:1 Gemisches aus 2'-Desoxy-3'-thiocyanato-5'-Otritylthymidin 83a und 2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83b wurde in 2 mL Dichlormethan gelöst und 15 mL einer 2% igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol 7:3 v/v (2% BSA) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand viermal am Chromatotron gereinigt. Die erste Trennung erfolgte mit Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%. Zur Trennung der Isomere wurde bei weiteren Trennungen Dichlormethan mit einem Methanolgradient von 0 bis 3.75% als Eluent verwandt.

Ausbeute: 313 mg (1.11 mmol, 65%) eines farblosen Feststoffs, der als 2'-Desoxy-3'- thiocyanatothymidin 42a charakterisiert werden konnte.
34 mg (0.12 mmol, 7%) eines farblosen Feststoffs, der als 2'-Desoxy-3'- isothiocyanatothymidin 42b charakterisiert werden konnte

Die Ausbeuten sind bezogen auf die eingesetzte Mischung aus 83a und 83b.

Spektroskopische Daten zu 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin 42a

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.52

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.28 (s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 6.08 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HH} = 4.5 Hz, H1'), 5.24

	(t, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 5.5$ Hz, OH), 3.99 (ddd, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.6$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 8.0$ Hz,
	${}^{3}J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}, \text{ H3'}$), 3.91 (dt, 1H, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 3.6 \text{ Hz}, \text{ H4'}$), 3.70
	(ddd, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 12.3 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 5.5 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 3.6 \text{ Hz}$, H5'-a), 3.58 (ddd, 1H,
	$^{2}J_{\text{HH}} = 12.3 \text{ Hz}, \ ^{3}J_{\text{HH}} = 5.5 \text{ Hz}, \ ^{3}J_{\text{HH}} = 3.6 \text{ Hz}, \text{ H5'-b}, 2.58 \text{ (ddd, 1H,}$
	${}^{2}J_{\text{HH}} = 13.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 8.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 4.5 \text{ Hz}, \text{ H2'-a}), 2.46 - 2.38 \text{ (m, 1H,}$
	H2'-b), 1.71 (d, 3H, ${}^{3}J_{\rm HH} = 1.0$ Hz, H7)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d ₆): 163.9 (C4), 150.5 (C2), 136.5 (C6), 111.5
	(SCN), 109.6 (C5), 85.1 (C1'), 83.5 (C4'), 60.1 (C5'), 42.8 (C3'), 37.9
	(C2'), 12.4 (C7)
IR:	$\widetilde{\nu}~[\text{cm}^{\text{-1}}]$ (KBr): 3425, 3054, 2926, 2156 (SCN), 1697, 1472, 1371, 1273,
	1107, 1053, 956, 884, 765, 692, 559, 491
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 264.5
	λ_{\min} [nm]: 232.3

HPLC: $t_R = 16.13 \text{ min (99\%, Gradient B)}$

Spektroskopische Daten zu 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin 42b

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.58

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.35 (s, 1H, NH), 7.61 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 6.16 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H1'), 5.25 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, OH), 4.61 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H3'), 4.01 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H4'), 3.65 (ddd, ²J_{HH} = 12.3 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H5'-a), 3.59 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 12.3 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H5'-b), 2.55 - 2.49 (m, 1H, H2'-a), 2.45 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.6 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H2'-b), 1.71 (d, 3H, ³J_{HH} = 1.0 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 163.9 (C4), 150.5 (C2), 136.3 (C6), 130.9 (NCS), 109.8 (C5), 84.4 (C1'), 83.5 (C4'), 60.5 (C5'), 55.3 (C3'), 37.4 (C2'), 12.4 (C7)

IR: \tilde{v} [cm⁻¹] (KBr): 3321, 3014, 2843, 2136 (NCS), 1661, 1483, 1432, 1288, 1226, 1199, 1140, 1098, 1058, 982, 874, 751, 671, 625, 587, 555, 496, 441

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 262.5

λ_{min} [nm]: 232.3

HPLC: $t_R = 20.81 \text{ min } (97\%, \text{ Gradient B})$

8.3.4.8 Darstellung von 3'-Azido-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 84



1.65 g (3.41 mmol) 1-(2'-Desoxy-5'O-trityl-β-D-threo-pentosyl)thymin 78 wurden zweimal mit je 10 mL wasserfreiem Pyridin koevaporiert und anschließend in 40 mL wasserfreiem Dichlormethan aufgenommen. Es wurden 1.11 mL (1.08 g, 13.7 mmol) wasserfreies Pyridin zugetropft und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 30 Minuten wurden 1.12 µL (1.93 g, 6.82 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Triflatanhydrid, Tf₂O) bei dieser Temperatur zugetropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Es wurden 2.22 g (34.1 mmol) Natriumazid zugegeben. Anschließend wurde wasserfreies N,N-Dimethylformamid (15 mL) zugegeben, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Die Reaktionslösung wurde vier Stunden bei 0 °C und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 50 mL Wasser sowie einmal mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%).

Ausbeute: 1.10 g (2.16 mmol, 63%) eines sandfarbenen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.83

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.40 (s, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.42 - 7.39 (m, 6H, H(B)), 7.35 - 7.26 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.26 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H1'), 4.35 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 4.8 Hz, ³J_{HH} = 4.7 Hz, H3'), 3.98 (dt, 1H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, ³J_{HH} = 2.9 Hz, H4'), 3.56 (dd, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 2.9 Hz, H5'-a), 3.34 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 2.9 Hz, H5'-b), 2.48 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 13.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 6.5 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 4.8 \text{ Hz}, \text{ H2'-a}), 2.42 \text{ (ddd, 1H,}$ ${}^{2}J_{\text{HH}} = 13.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 6.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 6.5 \text{ Hz}, \text{ H2'-b}), 1.51 \text{ (d, 3H,}$ ${}^{3}J_{\text{HH}} = 1.0 \text{ Hz}, \text{H7})$

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.4 (C4), 150.0 (C2), 143.1 (C(A)), 135.2 (C6), 128.6 (C(C)), 128.1 (C(B)), 127.5 (C(D)), 111.3 (C5), 87.6 (C_q-*O*-Tr), 84.5 (C1'), 83.4 (C4'), 63.0 (C5'), 60.5 (C3'), 37.9 (C2'), 11.9 (C7)
- 8.3.4.9 Darstellung von 3'-Azido-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 84 aus AZT 1



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1.00 g (3.74 mmol) 3'-Azido-2'-desoxythymidin **1** wurden in 20 mL wasserfreiem Pyridin gelöst, 1.25 g (4.49 mmol) Chlortriphenylmethan (TrCl) zugegeben und die Reaktionslösung 90 Minuten auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan koevaporiert. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%).

Ausbeute: 1.71 g (2.74 mmol, 89%) eines blaßgelben Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.83

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.4.8.





1.68 g (3.29 mmol) 3'-Azido-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin **84** wurden in 10 mL Pyridin gelöst und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Nun wurden bei dieser Temperatur zunächst 1.73 g (6.57 mmol) Triphenylphosphin zugegeben und anschließend 2 mL 25%ige Ammoniumhydroxidlösung innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Man ließ die Reaktionslösung innerhalb von 90 Minuten auf Raumtemperatur erwärmen und ließ weitere 14 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 35 mL Pyridin, zweimal mit je 35 mL Toluol sowie zweimal mit je 35 mL Dichlormethan koevaporiert. Der resultierende Rückstand wurde chromatographisch am Chromatotron aufgereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradient von 0 bis 15%.

Ausbeute: 1.50 g (3.10 mmol, 94%) eines blaßgelben Feststoffs

- ¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 7.49 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.41 7.36 (m, 6H, H(B)), 7.35 7.23 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.13 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H1'), 3.70 3.66 (m, 1H, H4'), 3.49 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 6.7 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H3'), 3.23 (dd, ²J_{HH} = 10.3 Hz, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H5'-a), 3.34 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.3 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H5'-b), 2.19 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H2'-a), 2.03 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H2'-b), 1.47 (d, 3H, ³J_{HH} = 1.0 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.3 (C4), 150.8 (C2), 144.0 (C(A)), 136.4 (C6), 128.7 (C(C)), 128.4 (C(B)), 127.7 (C(D)), 109.8 (C5), 86.7 (C_q-*O*-Tr), 85.8 (C1'), 84.2 (C4'), 64.2 (C5'), 51.7 (C3'), 40.8 (C2'), 12.3 (C7)



8.3.4.11 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-O-tritylthymidin 83b

Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 506 mg (1.05 mmol) 3'-Amino-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin **85** wurden in 10 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und die Reaktionslösung auf -10 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden nacheinander 2.50 mL (3.19 g, 41.9 mmol) Schwefelkohlenstoff sowie 217 mg (1.05 mmol) *N*,*N'*-Dicyclohexylcarbodiimd (DCC) zugegeben. Man ließ die Reaktionslösung innerhalb von 3 Stunden auf Raumtemperatur erwärmen und anschließend weitere 11 Stunden bei dieser Temperatur rühren. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der resultierende Rückstand mit Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 4% am Chromatotron gereinigt.

Ausbeute: 535 mg (1.02 mmol, 97%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.90

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.43 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.41 - 7.38 (m, 6H, H(B)), 7.36 - 7.26 (m, 9H, H(C), H(D)), 6.28 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H1'), 4.59 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H3'), 4.12 (dt, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 2.8 Hz, H4'), 3.56 (dd, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 2.8 Hz, H5'-a), 3.40 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.9 Hz, ³J_{HH} = 2.8 Hz, H5'-b), 2.61 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H2'-a), 2.52 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H2'-b), 1.53 (d, 3H, ³J_{HH} = 1.0 Hz, H7)





200 mg (0.38 mmol) 2'-Desoxy-3'-isothiocyanato-5'-*O*-tritylthymidin **83b** wurden in 1 mL Dichlormethan gelöst und 3 mL einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol 7:3 v/v (2% BSA) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 4%. Beim Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck fiel das Produkt als farbloser, kristalliner Feststoff aus. Nach vollständigem Entfernen des Lösungsmittel wurde das Produkt daher aus Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v umkristallisiert.

Ausbeute:82.0 mg (0.29 mmol, 76%) eines farblosen, kristallinen FeststoffsDC:Rf-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.58

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.4.7.

8.3.5 Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin 42c und2'-Desoxy-3'-propargylthymidin 42d

8.3.5.1 Versuch der Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxy-5'-O-tritylthymidin 89



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Zunächst wurde eine Lösung von Allylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran hergestellt. Dazu wurden 800 mg (30 mmol) Magnesiumspäne mit 8 mL absolutem Tetrahydrofuran überschichtet und einige Tropfen einer Lösung aus 1.50 mL (2.15 g, 18 mmol) Allylbromid in 2 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Die Grignard-Reaktion wurde durch Zugabe von zwei Tropfen 1,2-Dibromethan gestartet. Anschließend wurde die Allylbromidlösung so zugetropft, daß die Reaktionslösung schwach siedete. Nach beendeter Reaktion wurden zum Lösen der entstandenen Salze weitere 2 mL Tetrahydrofuran zugegeben.

100 mg (214 µmol) 2,3'-Anhydro-2'-desoxy-5'-O-tritylthymindin 82 wurden in 1 mL Tetrahydrofuran gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Nun wurden 500 µL der Grignard-Lösung (dies entspricht 900 µmol Allylmagnesiumbromid) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung 90 Minuten Rückfluß erhitzt. unter Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte zu diesem Zeitpunkt eine unvollständige Reaktion an. Daher wurden weitere 2 mL (3.6 mmol) der Allylmagnesiumbromidlösung zugetropft und das Reaktionsgemisch 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 2 mL Methanol wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 30 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 30 mL Wasser sowie 30 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%). Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

8.3.5.2 Darstellung von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin 91



2.00 g (8.26 mmol) 2'-Desoxythymidin 81 wurden zweimal mit je 10 mL Pyridin koevaporiert und anschließend in 40 mL wasserfreiem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 1.24 g (18.2 mmol) Imidazol sowie 1.68 g (10.7 mmol) tert-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurden 5 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 35 mL Toluol und zweimal mit je 25 mL Dichlormethan koevaporiert. Der Rückstand wurde abschließend säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%.

Ausbeute: 2.45 g (6.80 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffs

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.59 (s, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 6.38 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H1'), 4.49 - 4.44 (m, 1H, H3'), 4.05 (dt, 1H, ³J_{HH} = 2.5 Hz, ³J_{HH} = 2.5 Hz, H4'), 3.90 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 2.5 Hz, H5'-a), 3.85 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 2.5 Hz, H5'-b), 2.37 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.5 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 2.4 Hz, H2'-a), 2.29 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, OH), 2.11 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.5 Hz, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H2'-b), 1.93 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7), 0.93 (s, 9H, 3xCH₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.5 (C4), 150.2 (C2), 135.4 (C6), 110.9 (C5), 87.1 (C1'), 84.9 (C4'), 72.6 (C3'), 63.6 (C5'), 41.1 (C2'), 25.9 (3xCH₃), 18.4 (C_q-tert-Butyl), 12.5 (C7), -5.4 (SiCH₃), -5.5 (SiCH₃)

8.3.5.3 Darstellung von 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxy-3'-*O*-(methoxythiocarbonyl)thymidin **92**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 460 mg (1.29 mmol) 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **91** wurden in 5 mL absolutem *N*,*N*-Dimethylformamid gelöst und 349 mg (1.96 mmol) Thiocarbonyldiimidazol zugegeben. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 5 mL wasserfreiem Methanol aufgenommen und drei Stunden auf 60 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 30 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 15%.

Ausbeute: 408 mg (0.95 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.61 (s, 1H, NH), 7.58 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H6), 6.40 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 9.3 Hz, ³*J*_{HH} = 5.3 Hz, H1'), 5.70 - 5.67 (m, 1H, H3'), 4.29 (ddd, 1H, ³*J*_{HH} = 1.8 Hz, ³*J*_{HH} = 2.0 Hz, ³*J*_{HH} = 1.5 Hz, H4'), 4.04 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.3 Hz, ³*J*_{HH} = 2.0 Hz, H5'-a), 3.96 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.3 Hz, ³*J*_{HH} = 1.8 Hz, H5'-b), 2.58 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.0 Hz, ³*J*_{HH} = 5.3 Hz, H2'-a), 2.19 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.0 Hz, ³*J*_{HH} = 9.3 Hz, ³*J*_{HH} = 6.0 Hz, H2'-b), 1.93 (d, 3H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H7), 0.95 (s, 9H, 3xCH₃), 0.16 (s, 6H, 2xSiCH₃)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 195.5 (C=S), 163.6 (C4), 150.2 (C2), 135.0 (C6), 111.2 (C5), 85.1 (C1'), 84.8 (C4'), 83.5 (C3'), 64.1 (C5'), 59.8

(OCH₃), 38.1 (C2'), 25.9 (3xCH₃), 18.3 (C_q-*tert*-Butyl), 12.5 (C7), -5.4 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃)

8.3.5.4 Versuch der Darstellung von 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'desoxythymidin **88**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit und Sauerstoff in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 400 mg (0.93 mmol) 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2'- desoxy-3'-*O*-(methoxythiocarbonyl)thymidin **92** wurden in 5 mL absolutem Toluol gelöst und 2.0 mL (2.14 g, 6.46 mmol) Allyltri-*n*-butylstannan sowie 37.0 mg (227 µmol) α,α' -Azoisobutyronitril zugegeben. Die Reaktionslösung wurde wiederholt entgast und 24 Stunden auf 80 °C erhitzt. Es wurden weitere 40.0 mg (0.24 µmol) α,α' -Azoisobutyronitril zugegeben und die Reaktionslösung weitere 48 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der resultierende Rückstand durch Säulenchromatographie (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%) gereinigt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.

8.3.5.5 Darstellung von 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxy-3'-*O*-(phenoxythiocarbonyl)thymidin **90**^[128]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 3.20 g (8.98 mmol) 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **91** wurden in 25 mL absolutem Dichlormethan gelöst und 6 mL wasserfreies Pyridin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 2.84 mL (4.49 g, 26.0 mmol) Phenoxythiocarbonylchlorid (PTC-Cl) innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Die Lösung wurde 1 Stunde bei 0 °C gerührt und weitere 18 h bei 4 °C gelagert. Die flüchtigen Anteile wurden im Vakuum abkondensiert und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen. Anschließend wurden die vereinigten wäßrigen Phasen mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v).

Ausbeute: 3.87 g (7.85 mmol, 87%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.62

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 9.58 (s, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.42 - 7.34 (m, 1H, H(C)), 7.29 - 7.22 (m, 1H, H(D)), 7.10 - 7.05 (m, 2H, H(B)), 6.46 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.2 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, H1'), 5.58 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H3'), 4.36 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, H4'), 3.89 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, H5'-a), 3.83 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, H5'-b), 2.65 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.1 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, H2'-a), 2.09 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.1 Hz, ³J_{HH} = 9.2 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H2'-b), 1.90 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7), 0.90 (s, 9H, 3xCH₃), 0.11 (s, 6H, 2xSiCH₃) ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 194.2 (C=S), 163.9 (C4), 153.2 (C(A)), 150.5 (C2), 134.9 (C6), 129.5 (C(B)), 126.7 (C(D)), 121.7 (C(C)), 111.2 (C5), 84.9 (C1'), 84.7 (C4'), 84.4 (C3'), 63.9 (C5'), 38.1 (C2'), 25.8 (3xCH₃), 18.2 (C_q-tert-Butyl), 12.5 (C7), -5.4 (SiCH₃), -5.5 (SiCH₃)

8.3.5.6 Darstellung von 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88**^[128]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit und Sauerstoff in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 3.94 g (8.00 mmol) 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'desoxy-3'-O-(phenoxythiocarbonyl)thymidin **90** wurden in 25 mL absolutem Toluol gelöst und 14.3 mL (15.3 g, 46.1 mmol) Allyltri-*n*-butylstannan sowie 263 mg (1.60 mmol) α,α' -Azoisobutyronitril zugegeben. Die Reaktionslösung wurde wiederholt entgast und 24 Stunden auf 80 °C erhitzt. Es wurden weitere 263 mg (1.60 mmol) α,α' -Azoisobutyronitril zugegeben und die Reaktionslösung weitere 48 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand zunächst durch Säulenchromatographie (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%) gereinigt. Abschließend wurde noch einmal am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%) gereinigt.

Ausbeute: 1.91 g (5.02 mmol, 63%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.30

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 9.38 (s, 1H, NH), 7.59 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H6), 6.09 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 5.5 Hz, ³*J*_{HH} = 5.5 Hz, H1'), 5.74 (dddd, 1H, ³*J*_{HH} = 17.0 Hz, ³*J*_{HH} = 10.0 Hz, ³*J*_{HH} = 6.9 Hz, ³*J*_{HH} = 6.9 Hz, H7'), 5.08 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 17.0 Hz, ²*J*_{HH} = 1.5 Hz, H8'-*E*), 5.05 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 10.0 Hz, ²*J*_{HH} = 1.5 Hz, H8'-*Z*), 3.99 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 12.0 Hz, ³*J*_{HH} = 3.2 Hz, H5'-a), 3.78 - 3.73 (m, 1H, H4'), 3.72 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 12.0 Hz, ³*J*_{HH} = 2.7 Hz, H5'-b), 2.40 - 2.20 (m, 2H, H6'), 2.16 - 2.04 (m, 3H, H2', H3'), 1.91 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7), 0.93 (s, 9H, 3xCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 164.1 (C4), 150.5 (C2), 135.7 (C6), 135.3 (C7'), 117.1 (C8'), 110.1 (C5), 85.7 (C1'), 84.8 (C4'), 63.1 (C5'), 38.8 (C2'), 36.8 (C3'), 36.4 (C6'), 25.9 (3xCH₃), 18.5 (C_q-tert-Butyl), 12.6 (C7), -5.3 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃)

Neben dem gewünschten Produkt konnten auch 191 mg (560 µmol) 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-didesoxythymidin **93** isoliert werden.



DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.25

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.82 (s, 1H, NH), 7.59 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.0 Hz, H6), 6.08 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 6.4 Hz, ³*J*_{HH} = 4.8 Hz, H1'), 4.19 - 4.12 (m, 1H, H4'), 3.99 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.4 Hz, ³*J*_{HH} = 2.8 Hz, H5'-a), 3.71 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.4 Hz, ³*J*_{HH} = 2.8 Hz, H5'-b), 2.41 - 2.32 (m, 1H, H2'-a), 2.03 -1.95 (m, 3H, H2'-b, H3'), 1.93 (d, 3H, ⁴*J*_{HH} = 1.0 Hz, H7), 0.94 (s, 9H, 3xCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃)

8.3.5.7 Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidin 42c



400 mg (1.05 mmol) 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** wurden in 15 mL Methanol gelöst und 389 mg (10.5 mmol) Ammoniumfluorid zugegeben. Die Reaktion wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt und dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung zur Trockene eingedampft und der Rückstand zweimal mit je 5 mL Methanol extrahiert. Der nach Entfernen des Lösungsmittels resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute:253 mg (0.95 mmol, 91%) eines farblosen FeststoffsDC:Rf-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.63

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.21 (s, 1H, NH), 7.87 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 5.94 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 3.5 Hz, H1'), 5.78 (dddd, ³J_{HH} = 17.1 Hz, ³J_{HH} = 10.2 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H7'), 5.08 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.1 Hz, OH), 5.07 (dd, 1H, ³J_{HH} = 17.2 Hz, ²J_{HH} = 1.9 Hz, H8'-*E*), 4.99 (dd, 1H, ³J_{HH} = 10.2 Hz, H8'-*Z*), 3.71 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.9 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H5'-a), 3.62 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H4'), 3.55 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.9 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, ³J_{HH} = 3.4 Hz, H5'-b), 2-34 - 2.18 (m, 2H, H6'), 2.07 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.2 Hz, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ³J_{HH} = 3.5 Hz, H2'-a), 2.04 - 1.95 (m, 2H, H2'-b, H3'), 1.75 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)

- ¹³C-NMR: δ[ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 164.0 (C4), 150.5 (C2), 136.6 (C6), 136.5 (C7'), 116.5 (C8'), 108.7 (C5), 85.9 (C1'), 84.0 (C4'), 60.9 (C5'), 38.1 (C2'), 36.3 (C3'), 35.8 (C6'), 12.4 (C7)
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 268.8

λ_{min} [nm]: 234.5

HPLC: $t_R = 19.09 \min(99\%, \text{Gradient B})$

8.3.5.8 Darstellung von 3'-(2,3-Dibrompropyl)-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **87a**^[127]



400 mg (1.05 mmol) 3'-Allyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **88** wurden in 5 mL Tetrachlormethan gelöst und unter Lichtausschluß auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 1.05 mL (1.05 mmol) einer 1M Lösung von Brom in Tetrachlormethan innerhalb von 45 Minuten zugetropft. Die Lösung wurde weitere 10 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend flüchtige Anteile im Vakuum entfernt. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 8%.

Ausbeute:351 mg (0.65 mmol, 62%) eines farblosen Öls als Gemisch zweierDiastereomere im Verhältnis 1:1

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 9.44 (s, 1H, NH), 7.78 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.53 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 6.15 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H1'), 6.11 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HH} = 3.4 Hz, H1'), 4.21 - 5.54 (m, 6H, H4', H5', H7', H8'), 2.74 - 2.06 (m, 4H, H2'-a, H3', H6'), 1.93 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7), 1.92 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7), 1.89 - 1.81 (m, 1H, H2'-b), 0.94 (s, 9H, 3xCH₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.1 (C4), 163.9 (C4), 150.5 (C2), 135.4 (C6), 135.3 (C6), 110.6 (C5), 110.4 (C5), 85.8 (C1'), 85.2 (C1'), 84.7 (C4'), 84.7 (C4'), 63.6 (C5'), 62.2 (C5'), 50.5 (C7'), 50.3 (C7'), 39.4 (C8'), 39.3 (C8'), 38.7 (C6'), 38.3 (C6'), 36.5 (C3'), 36.3 (C2'), 36.1 (C2'), 35.6 (C3'), 25.9 (3xCH₃), 25.9 (3xCH₃), 18.4 (C_q-tert-Butyl), 18.4 (C_q-tert-Butyl), 12.6 (C7), 12.5 (C7), -5.3 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃),

Als Nebenprodukt konnte 3'-(2,3-Dibrompropyl)-2'-desoxythymidin 87b isoliert werden.



Ausbeute: 130 mg (0.31 mmol, 29%) eines farblosen Öls als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.13

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 9.07 (s, 1H, NH), 7.58 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.57 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 6.16 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H1'), 6.14 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, H1'), 4.21 - 5.58 (m, 6H, H4', H5', H7', H8'), 2.75 - 2.07 (m, 4H, H2'-a, H3', H6'), 1.99 - 1.87 (m, 1H, H2'-b), 1.92 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7), 1.91 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7), 0.94 (s, 9H, 3xCH₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃)

8.3.5.9 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d** aus Verbindung **87a**^[127]



171 mg (316 μmol) 3'-(2,3-Dibrompropyl)-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin **87a** wurden in 2.5 mL Ethanol gelöst und eine Lösung von 89 mg (1.58 mmol) Kaliumhydroxid in 2.5 mL Wasser zugegeben. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung im Vakuum auf die

Hälfte konzentriert und mit Hilfe von 2N Salzsäure neutralisiert, worauf ein farbloser Niederschlag entstand. Die wäßrige Lösung wurde mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit je 10 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute:30.0 mg (0.11 mmol, 36%) eines sehr hygroskopischen farblosen FeststoffsDC:Rf-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.56

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.99 (s, 1H, NH), 7.57 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H6), 6.14 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.2 Hz, ³*J*_{HH} = 3.7 Hz, H1'), 4.05 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 12.3 Hz, ³*J*_{HH} = 2.5 Hz, H5'-a), 3.92 (ddd, 1H, ³*J*_{HH} = 8.4 Hz, ³*J*_{HH} = 3.0 Hz, ³*J*_{HH} = 2.5 Hz, H4'), 3.81 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 12.3 Hz, ³*J*_{HH} = 3.0 Hz, H5'-b), 2.66 - 2.57 (m, 1H, H3'), 2.45 - 2.31 (m, 4H, H2'-a, H6', OH), 2.26 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.9 Hz, ³*J*_{HH} = 8.5 Hz, ³*J*_{HH} = 3.7 Hz, H2'b), 2.06 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 2.7 Hz, ³*J*_{HH} = 2.7 Hz, H8'), 1.90 (d, 3H, ⁴*J*_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃): 163.0 (C4), 150.3 (C2), 136.4 (C6), 110.6 (C5), 85.1 (C1'), 84.9 (C4'), 80.5 (C7'), 70.8 (C8'), 61.9 (C5'), 37.8 (C2'), 36.7 (C3'), 20.5 (C6'), 12.5 (C7)
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 264.5 λ_{min} [nm]: 233.6 HPLC: $t_{R} = 16.50 \text{ min (97\%, Gradient B)}$

8.3.5.10 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin 42d aus Verbindung 87b



165 mg (387 μmol) 3'-(2,3-Dibrompropyl)-2'-desoxythymidin **87d** wurden in 4 mL Ethanol gelöst und eine Lösung von 434 mg (7.74 mmol) Kaliumhydroxid in 10 mL Wasser zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung im Vakuum auf die Hälfte konzentriert und mit Hilfe von 2N Salzsäure neutralisiert, worauf ein farbloser Niederschlag entstand. Die wäßrige Lösung wurde mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit je 25 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute:52.0 mg (0.20 mmol, 51%) eines sehr hygroskopischen farblosen FeststoffsDC:Rf-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.56

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.5.9.

8.3.6 Darstellung der Salicylalkohole und cyclischen Chlorphosphite bzw. -amidite

8.3.6.1 Darstellung von 3-Methylsalicylalkohol 95



6.20 g (164 mmol) Lithiumaluminiumhydrid wurden in 150 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und eine Lösung von 20.0 g (131 mmol) 3-Methylsalicylsäure **94** in 50 mL trockenem Tetrahydrofuran so zugetropft, daß die Lösung schwach siedete. Nach beendeter Zugabe

wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt sowie eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zum Hydrolysieren überschüssigen Nach Lithiumaluminiumhydrids vorsichtig Wasser zugegeben und der pH-Wert der Reaktionslösung mit 10% iger Schwefelsäure auf pH 3 eingestellt. Die Lösung wurde dreimal mit je 100 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 15.2 g (110 mmol, 83%) eines farblosen kristallinen Feststoffs

- ¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆): 8.38 (s, 1H, phenol. OH), 7.04 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H6), 6.95 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H4), 6.71 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H5), 5.27 (s, 1H, benzyl. OH), 4.56 (s, 2H, H-Benzyl), 2.15 (s, 3H, CH₃)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (63 MHz, DMSO-d₆): 152.6 (C2), 129.0 (C5), 127.9 (C4), 125.0 (C6), 124.1 (C1), 118.9 (C3), 59.9 (C-Benzyl), 16.1 (CH₃)
- 8.3.6.2 Darstellung von 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol **140**^[152]



5.00 g (24.2 mmol) 2,4-Di-*tert*-Butylphenol **139** wurden in 15 mL Methanol gelöst, 1.07 g (26.7 mmol) Natriumhydroxid-Plätzchen zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 6.25 mL einer 37% igen wäßrigen Formaldehydlösung wurde die Reaktionslösung 44 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung in 80 mL Wasser eingetragen und der pH-Wert der Lösung mittels konzentrierter Salzsäure auf pH 3 eingestellt. Die wäßrige Lösung wurde dreimal mit je 35 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente *n*-Hexan/Dichlormethan 1:1 v/v. Der nach Entfernen des Lösungsmittels resultierende Rückstand wurde aus *n*-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 4.66 g (19.7 mmol, 81%) eines farblosen, kristallinen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.76

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.51 (br. s, 1H, phenol. OH), 7.28 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, H4), 6.89 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, H6), 4.84 (s, 2H, H-Benzyl), 1.91 (br. s, 1H, benzyl. OH), 1.43 (s, 9H, 3xCH₃- C3), 1.28 (s, 9H, 3xCH₃-C5)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 153.1 (C2), 141.6 (C5), 136.5 (C3), 124.1 (C6), 123.9 (C1), 122.6 (C4), 65.9 (C-Benzyl), 34.9 (C_q-*tert*-Butyl-C3), 34.2 (C_q-*tert*-Butyl-C5), 31.6 (3xCH₃-C3), 29.7 (3xCH₃-C5)
- 8.3.6.3 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit 96



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 2.00 g (14.4 mmol) 3-Methylsalicylalkohol **95** wurden in 10 mL absolutem Diethylether gelöst und eine Lösung von 2.30 g (1.45 mL, 16.6 mmol) Phosphortrichlorid in 5 mL absolutem Diethylether zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die flüchtigen Anteile im Vakuum entfernt. Das Öl wurde mittels einer Kugelrohrdestille destilliert.

Ausbeute: 1.16 g (5.73 mmol, 40%) eines farblosen Öls

- ¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃): 7.14 (d, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.4$ Hz, H4), 7.00 (dd, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.4$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.4$ Hz, H5), 6.81 (d, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.4$ Hz, H6), 5.23 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.6$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 11.6$ Hz, H-Benzyl), 2.26 (s, 3H, CH₃)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (63 MHz, CDCl₃): 144.6 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.7$ Hz, C2), 130.5 (d, ${}^{4}J_{CP} = 5.7$ Hz, C4), 128.4 (d, ${}^{3}J_{CP} = 1.9$ Hz, C1), 123.3 (d, ${}^{5}J_{HH} = 17.2$ Hz, 123.1 (d, ${}^{4}J_{CP} = 19.1$ Hz, C6), 121.2 (d, ${}^{3}J_{CP} = 12.4$ Hz, C3), 61.2 (d, ${}^{2}J_{CP} = 1.9$ Hz, C-Benzyl), 15.6 (CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 140.9

8.3.6.4 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-*N*,*N*-di-*iso*-propylphosphoramidit 97



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1.00 g (4.90 mmol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** wurden in 5 mL absolutem Diethylether gelöst und eine Lösung von 1.39 mL (0.99 g, 9.80 mmol) Di-*iso*-propylamin in 2 mL absolutem Diethylether zugetropft. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Vom entstandenen farblosen Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1.20 g (4.50 mmol, 92%) eines blaßgelben Öls

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 135.8

8.3.7 Darstellung der modifizierten 3-Methyl-*cyclo*Sal-nucleosidmonophosphate

8.3.7.1 Darstellung von 4'-O-Dimethoxytrityl-T-Penciclovir 98



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 403 mg (1.77 mmol) T-Penciclovir **30** wurden in 10 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und 718 mg (2.12 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) sowie 23.0 mg (0.19 mmol) 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 1 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit je

30 mL Toluol und zweimal mit je 30 mL Dichlormethan koevaporiert und abschließend am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 20%).

Ausbeute: 280 mg (0.53 mmol, 30%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

- ¹H-NMR: ⁶ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.16 (s, 1H, NH), 7.40 (d, 1H, ⁴ $J_{HH} = 1.0$ Hz, H6), 7.37 - 7.18 (m, 9H, H(B), H(C), H(D), H(F)), 6.86 (d, 4H, ³ $J_{HH} = 8.9$ Hz, H(G)), 4.44 (t, 1H, ³ $J_{HH} = 5.1$ Hz, OH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.62 (ddd, 1H; ² $J_{HH} = 13.5$ Hz, ³ $J_{HH} = 7.2$ Hz, ³ $J_{HH} = 7.2$ Hz, H1'-a), 3.56 (ddd, 1H, ² $J_{HH} = 13.5$ Hz, ³ $J_{HH} = 6.8$ Hz, ³ $J_{HH} = 6.8$ Hz, H1'-b), 3.44 (ddd, 1H, ² $J_{HH} = 10.6$ Hz, ³ $J_{HH} = 5.3$ Hz, ³ $J_{HH} = 5.1$ Hz, H5'-a), 3.38 (ddd, 1H, ² $J_{HH} = 10.6$ Hz, ³ $J_{HH} = 5.3$ Hz, ³ $J_{HH} = 5.1$ Hz, H5'-b), 3.01 (dd, 1H, ² $J_{HH} = 9.0$ Hz, ³ $J_{HH} = 5.1$ Hz, H4'-a), 2.92 (dd, 1H, ² $J_{HH} = 9.0$ Hz, ³ $J_{HH} = 5.6$ Hz, H4'-b), 1.72 (d, 3H, ⁴ $J_{HH} = 1.0$ Hz, H7), 1.67 - 1.52 (m, 3H, H2', H3')
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.5 (C4), 158.2 (C(H)), 151.1 (C2), 145.4 (C(A)), 141.4 (C6), 136.2 (C(E)), 129.9 (C(F)), 128.0 (C(C)), 127.9 (C(B)), 126.7 (C(D)), 113.3 (C(G)), 108.7 (C5), 85.4 (C_q-O-DMTr), 63.5 (C4'), 61.7 (C5'), 55.2 (OCH₃), 45.8 (C1'), 35.1 (C3'), 28.2 (C2'), 12.1 (C7)
- 8.3.7.2 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-T-Penciclovirmonophosphat **37a**



Die Reaktion wurde zunächst nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.23 mmol) 4'-O-Dimethoxytrityl-T-Penciclovir **98**, 58.0 mg (77.0 μ L, 0.45 mmol) Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA), 92.0 mg (42.0 μ mol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** in 2.5 mL wasserfreiem Acetonitril umgesetzt. Zur Oxidation wurden 200 μ L (1.00 mmol) einer *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Vakuum wurde der Rückstand in 4 mL einer 2%igen Lösung von Benzolsulfonsäure in Dichlormethan/Methanol 7:3 v/v (2% BSA) aufgenommen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand am Chromatotron gereinigt (1. Essigsäureethylester/Methanol 9:1 v/v + 0.1% Essigsäure), 2. Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: 31.0 mg (0.08 mmol, 35%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier diastereomerer Enantiomerenpaare im Verhältnis 1:1.

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.39

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 11.16 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H6), 7.42 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H6), 7.25 - 7.19 (m, 1H, Aryl-H5), 7.09 - 7.03 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 5.45 (dd, 2x1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 16.6 Hz, 2xH-Benzyl-a), 5.38 (dd, 2x1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 10.6 Hz, H-Benzyl-b), 4.63 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, OH), 4.61 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.3 Hz, OH), 4.19 - 4.05 (m, 2H, H5'), 3.67 - 3.51 (m, 2H, H1'), 3.36 - 3.23 (m, 2H, H4'), 2.21 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.20 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.72 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H7), 1.72 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H7), 1.71 - 1.60 (m, 1H, H3'), 1.58 - 1.43 (m, 2H, H2')

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.96, -8.02

8.3.7.3 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-Azido-T-Ganciclovirmonophosphat **38b**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 44.0 mg (172 μ mol) Azido-T-Ganciclovir **41a**, 3 mL Acetonitril, 59 μ L (45.0 mg, 345 μ mol) Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA), 70.0 mg (345 mol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit sowie 150 μ L (750 μ mol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt.

Ausbeute: 45.0 mg (103 µmol, 60%) eines farblosen Öls, das nach Gefriertrocknung in einen farblosen Feststoff überging, als Gemisch zweier diastereomerer Enantiomerenpaare im Verhältnis 1:1

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.32 (s, 1H, NH), 7.53 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.2$ Hz, H6), 7.52 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.2$ Hz, H6), 7.27 - 7.22 (m, 1H, Aryl-H5), 7.11 - 7.06 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 5.45 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 15.4 \text{ Hz}, \text{ H5'-a}, 5.44 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\rm HP} = 19.4$ Hz, H5'-a), 5.38 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 10.2$ Hz, H5'b), 5.36 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 10.1$ Hz, H5'-b), 5.15 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-a), 5.14 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-a), 5.11 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-b), 5.09 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-b), 4.24 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HP} = 6.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 3.8 \text{ Hz}, \text{ H5'-a}, 4.18 \text{ (ddd, 1H,})$ ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HP} = 6.7 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 3.8 \text{ Hz}, \text{ H5'-a}, 4.09 \text{ (ddd, 1H,})$ ${}^{2}J_{\text{HH}} = 10.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 7.6 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 5.7 \text{ Hz}, \text{ H5'-b}, 4.05 \text{ (ddd, 1H,}$ ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.8$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 7.6$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 5.7$ Hz, H5'-b), 4.02 - 3.95 (m, 1H, H3'), 3.43 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.6$ Hz, H4'-a), 3.39 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 3.9 \text{ Hz}, \text{H4'-a}, 3.32 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\rm HH} = 7.4$ Hz, H4'-b), 3.31 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 5.8$ Hz, H4'-b), 2.22 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.21 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.72 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7), 1.71 (d, 3H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.2$ Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.3 (C4), 151.4 (C2), 148.1 (Aryl-C2), 148.0 (Aryl-C2), 140.5 (C6), 131.1 (Aryl-C4), 127.1 (Aryl-C3), 127.0 (Aryl-C3), 124.1 (Aryl-C5), 123.7 (Aryl-C6), 121.1 (d, ³*J*_{CP} = 3.5 Hz, Aryl-C1), 121.0 (d, ³*J*_{CP} = 3.5 Hz, Aryl-C1), 109.6 (C5), 76.0 (d, ³*J*_{CP} = 7.6 Hz, C3'), 75.9 (d, ³*J*_{CP} = 7.6 Hz, C3'), 75.7 (C1'), 68.1 (d, ²*J*_{CP} = 7.0 Hz, C-Benzyl), 68.1 (d, ²*J*_{CP} = 7.0 Hz, C-Benzyl), 67.2 (d, ²*J*_{CP} = 3.7 Hz, C5'), 67.1 (d, ²*J*_{CP} = 3.7 Hz, C5'), 50.5 (C4'), 15.1 (Aryl-CH₃), 15.0 (Aryl-CH₃), 11.9 (C7)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.93, -7.99

IR: \tilde{v} [cm⁻¹] (KBr): 3442, 3067, 2925, 2854, 2105 (N₃), 1686, 1471, 1347, 1294, 1191, 1025, 941, 872, 824, 773, 718, 650, 573, 476, 437, 421

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 262.5

λ_{min} [nm]: 232.3

HPLC: $t_R = 14.19 \text{ min}, 14.32 \text{ min} (98\%, \text{Gradient A})$

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 437.11

```
gef.: 438.38 (M+H<sup>+</sup>), 460.32 (M+Na<sup>+</sup>)
```





Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 92.0 mg (0m.34 mmol) Thiocyanato-T-Ganciclovir **41b**, 4 mL Acetonitril, 115 μ L (88.0 mg, 0.68 mmol) Di*-iso*-propylethylamin (DIPEA), 137 mg (0.68 mol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit sowie 237 μ L (1.19 mmol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt.

Ausbeute:95.0 mg (0.21 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier
diastereomerer Enantiomerenpaare im Verhältnis 1:1

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.35 (s, 1H, NH), 11.34 (s, 1H, NH), 7.53 (d, 2x1H, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H6), 7.29 - 7.24 (m, 1H, Aryl-H5), 7.12 -7.09 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 5.47 (dd, 2x1H, $^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, $^{3}J_{HP} = 17.7$ Hz, 2xH-Benzyl-a), 5.44 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 10.1$ Hz, H-Benzyl-b), 5.40 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 10.2$ Hz, H-Benzyl-b), 5.20 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-a), 5.18 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-a), 5.13 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-b), 5.11 (d, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 10.7$ Hz, H1'-b), 4.38 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.0$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.7$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 3.1$ Hz, H5'-a), 4.29 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.0$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.5$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 3.5$ Hz, H5'-a), 4.18 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.0$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 7.3$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 5.4$ Hz, H5'-b), 4.13 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 11.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 5.0 \text{ Hz}, \text{ H5'-b}, 4.12 - 4.06 \text{ (m, 1H, 1H)}$ H3'), 3.38 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.9$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.1$ Hz, H4'-a), 3.36 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 13.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 3.5 \text{ Hz}, \text{H4'-a}, 3.16 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{2}J_{\text{HH}} = 13.9 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\rm HH} = 7.6$ Hz, H4'-b), 3.15 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 13.9$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 7.6$ Hz, H4'-b), 2.24 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.74 (d, 3H, ${}^{2}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7), 1.73 (d, 3H, $^{2}J_{\rm HH} = 1.2$ Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.3 (C4), 151.4 (C2), 148.1 (Aryl-C2), 148.0 (Aryl-C2), 140.5 (C6), 131.1 (Aryl-C4), 127.1 (Aryl-C3), 127.0 (Aryl-C3), 124.1 (Aryl-C5), 123.7 (Aryl-C6), 121.1 (d, ³J_{CP} = 3.5 Hz, Aryl-

C1), 121.0 (d, ${}^{3}J_{CP} = 3.5$ Hz, Aryl-C1), 109.6 (C5), 76.0 (d, ${}^{3}J_{CP} = 7.6$ Hz, C3'), 75.9 (d, ${}^{3}J_{CP} = 7.6$ Hz, C3'), 75.7 (C1'), 68.1 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.0$ Hz, C-Benzyl), 68.1 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.0$ Hz, C-Benzyl), 67.2 (d, ${}^{2}J_{CP} = 3.7$ Hz, C5'), 67.1 (d, ${}^{2}J_{CP} = 3.7$ Hz, C5'), 50.5 (C4'), 15.1 (Aryl-CH₃), 15.0 (Aryl-CH₃), 11.9 (C7)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.87, -7.97

IR: \tilde{v} [cm⁻¹] (KBr): 3418, 3197, 3065, 2925, 2852, 2155 (SCN), 1685, 1471, 1348, 1296, 1191, 1115, 1087, 1021, 941, 889, 822, 776, 719, 651, 573, 469

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 262.5

λ_{min} [nm]: 232.3

HPLC: $t_R = 13.76 \text{ min}, 13.87 \text{ min} (99\%, \text{Gradient A})$

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 453.08

gef.: 476.29 (M+Na⁺)





Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 75.0 mg (0.28 mmol) 4'-O-Acetyl-T-Ganciclovir **67**, 3 mL Acetonitril, 94.0 μ L (71.0 mg, 0.55 mmol) Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA), 112 mg (0.55 mmol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** sowie 200 μ L (1.00 mmol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt.

Ausbeute:100 mg (0.22 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier
diastereomerer Enantiomerenpaare im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.64

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.32 (s, 1H, NH), 11.31 (s, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.50 (d, 1H, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.27 - 7.22 (m, 1H, Aryl-H5), 7.10 - 7.00 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 5.44 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.3 Hz, ³J_{HP} = 14.7 Hz, H-Benzyl-a), 5.44 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.3 Hz,
${}^{3}J_{\text{HP}} = 14.7 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-a}), 5.37 (dd, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 9.8 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-b}), 5.35 (dd, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 9.9 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-b}), 5.12 (d, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 10.7 \text{ Hz}, \text{H1'-a}), 5.11 (d, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 10.7 \text{ Hz}, \text{H1'-a}), 5.07 (d, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 10.7 \text{ Hz}, \text{H1'-b}), 5.04 (d, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 10.7 \text{ Hz}, \text{H1'-b}), 4.26 (ddd, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 11.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 7.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 3.5 \text{ Hz}, \text{H5'-a}), 4.19 (ddd, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 11.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 6.8 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 3.9 \text{ Hz}, \text{H5'-a}), 4.13 (ddd, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 11.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 7.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 6.1 \text{ Hz}, \text{H5'-b}), 4.09 (ddd, 1H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 11.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 6.8 \text{ Hz}, \text{H5'-b}), 4.07 - 3.99 (m, 2H, H3', H4'-a), 3.98 - 3.91 (m, 1H, H4'-b), 2.21 (s, 3H, Aryl-CH_3), 2.20 (s, 3H, Aryl-CH_3), 1.93 (s, 3H, Acetyl-CH_3), 1.92 (s, 3H, Acetyl-CH_3), 1.72 (d, 3H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 1.2 \text{ Hz}, \text{H7}), 1.71 (d, 3H, {}^{2}J_{\text{HH}} = 1.2 \text{ Hz}, \text{H7})$

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 170.1 (Acetyl-C=O), 164.3 (C4), 151.3 (C2), 148.1 (Aryl-C2), 148.0 (Aryl-C2), 140.6 (C6), 131.0 (Aryl-C4), 127.1 (Aryl-C3), 127.0 (Aryl-C3), 124.1 (Aryl-C5), 123.7 (Aryl-C6), 121.1 (d, ${}^{3}J_{CP} = 4.6$ Hz, Aryl-C1), 121.0 (d, ${}^{3}J_{CP} = 6.0$ Hz, Aryl-C1), 109.5 (C5), 75.7 (C1'), 74.7 (d, ${}^{3}J_{CP} = 7.6$ Hz, C3'), 74.6 (d, ${}^{3}J_{CP} = 7.6$ Hz, C3'), 68.6 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.0$ Hz, C-Benzyl), 68.5 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.0$ Hz, C-Benzyl), 66.9 (d, ${}^{2}J_{CP} = 5.5$ Hz, C5'), 62.5 (C4'), 20.5 (Acetyl-CH₃), 20.5 (Acetyl-CH₃), 15.1 (Aryl-CH₃), 15.0 (Aryl-CH₃), 11.9 (C7)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.94, -7.98
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 262.5

λ_{min} [nm]: 232.3

- HPLC: $t_R = 13.04 \text{ min}, 13.17 \text{ min} (98\%, \text{Gradient A})$
- MS (ESI⁺, m/z): ber.: 454.11

gef.: 477.35 (M+Na⁺)

8.3.7.6 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **39b**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 86.0 mg (0.30 mmol) 2'-Desoxy-3'-isothiocyanatothymidin **42b**, 3 mL Acetonitril, 103 μ L (79.0 mg, 0.61 mmol) Di-*iso*propylethylamin (DIPEA), 123 mg (0.61 mmol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** sowie 150 μ L (0.75 mmol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt.

Ausbeute:47.0 mg (0.10 mmol, 33%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweierDiastereomere im Verhältnis 1:1

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.34 (s, 1H, NH), 11.32 (s, 1H, NH), 7.40 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.39 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 7.25 - 7.20 (m, 1H, Aryl-H5), 7.10 - 7.04 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 6.16 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H1'), 6.15 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H1'), 5.47 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 16.9 Hz, H-Benzyl-a), 5.46 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 17.3 Hz, H-Benzyl-a), 5.42 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 10.4 Hz, H-Benzyl-b), 5.41 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 10.4 Hz, H-Benzyl-b), 4.71 - 4.64 (m, 1H, H3'), 4.40 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HP} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H5'-a), 4.36 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HP} = 7.9 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H5'-b), 4.29 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HP} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H5'-b), 4.22 - 4.18 (m, 1H, H4'), 2.58 - 2.46 (m, 2H, H2'), 2.20 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.19 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.71 (d, 2x3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 2xH7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 163.4 (C4), 150.4 (C2), 148.1 (Aryl-C2), 148.0 (Aryl-C2), 136.2 (C6), 131.8 (NCS), 131.0 (Aryl-C4), 127.0 (Aryl-C3), 126.9 (Aryl-C3), 124.2 (Aryl-C5), 124.1 (Aryl-C5), 123.7 (Aryl-C6), 121.0 (d, ³*J*_{CP} = 9.7 Hz, Aryl-C1), 110.2 (C5), 83.9 (C1'), 83.8 (C1'), 81.2

	(d, ${}^{3}J_{CP} = 7.3$ Hz, C4'), 81.1 (d, ${}^{3}J_{CP} = 7.3$ Hz, C4'), 68.7 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.9$ Hz,
	C-Benzyl), 68.6 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 6.6 Hz, C-Benzyl), 66.7 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 4.3 Hz, C5'),
	66.6 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 3.6 Hz, C5'), 54.9 (C3'), 54.8 (C3'), 36.9 (C2'), 36.8 (C2'),
	15.0 (Aryl-CH ₃), 15.0 (Aryl-CH ₃), 12.1 (C7), 12.1 (C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d ₆): -7.87, -7.93
IR:	$\widetilde{\nu}~[\text{cm}^{-1}]$ (KBr): 3435, 2923, 2853, 2081 (NCS), 1691, 1469, 1384, 1270,
	1190, 1090, 1021, 953, 776, 721, 551, 443, 417
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 264.5
	$\lambda_{\min} [nm]: 231.1$
HPLC:	$t_R = 16.06 \text{ min}, 16.32 \text{ min} (99\%, \text{Gradient A})$
MS (ESI ^{$+$} , m/z):	ber.: 465.08

gef.: 488.38 (M+Na⁺)

8.3.7.7 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-3'-allyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **39c**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 68.0 mg (0.26 mmol) 3'-Allyl-2'desoxythymidin **42c**, 3 mL Acetonitril, 87.0 μ L (66.0 mg, 0.51 mmol) Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA), 104 mg (0.51 mmol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** sowie 150 μ L (0.75 mmol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt.

Ausbeute: 57.0 mg (0.13 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.78

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.24 (s, 1H, NH), 11.23 (s, 1H, NH), 7.42 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.41 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 7.25 - 7.21 (m, 1H, Aryl-H5), 7.21 - 7.05 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 5.99 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H1'), 5.98 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.4 Hz,

 ${}^{3}J_{\text{HH}} = 4.3 \text{ Hz}, \text{H1'}), 5.75 \text{ (dddd, 1H, } {}^{3}J_{\text{HH}} = 17.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 10.4 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.9$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.9$ Hz, H7'), 5.66 (dddd, 1H, ${}^{3}J_{\rm HH} = 17.3$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 10.4 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 6.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 6.9 \text{ Hz}, \text{ H7'}), 5.48 \text{ (dd, 1H,}$ ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 8.8 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-a}, 5.45 \text{ (dd, 1H, } {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\text{HP}} = 8.5 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-a}), 5.39 \text{ (dd, 1H, } {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 8.7 \text{ Hz}, \text{ H-}$ Benzyl-b), 5.37 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 9.1$ Hz, H-Benzyl-b), 5.07 1H, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 17.3 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 0.9 \text{ Hz}$, H8'-*E*), 5.03 (dd, 1H, (dd. ${}^{3}J_{\text{HH}} = 17.3 \text{ Hz}, {}^{2}J_{\text{HH}} = 0.9 \text{ Hz}, \text{ H8}^{2}-E), 5.00 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 10.4 \text{ Hz},$ $^{2}J_{\rm HH} = 0.9$ Hz, H8'-Z), 4.96 (dd, 1H, $^{3}J_{\rm HH} = 10.4$ Hz, $^{2}J_{\rm HH} = 0.9$ Hz, H8'-Z), 4.38 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{HP} = 6.5 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{HH} = 2.4 \text{ Hz}$, H5'-a), 4.33 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 11.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{HP}} = 6.9 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 2.9 \text{ Hz}$, H5'-a), 4.28 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 11.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{HP}} = 7.5 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 5.6 \text{ Hz}$, H5'-b), 4.23 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.6$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 7.3$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 4.8$ Hz, H5'-b), 3.84 - 3.78 (m, 1H, H4'), 2.31 - 1.99 (m, 5H, H2', H3', H6'), 2.20 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.19 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.71 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7), 1.69 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7)

¹³C-NMR: δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 163.9 (C4), 150.5 (C2), 145.6 (Aryl-C2), 136.2 (C7'), 136.1 (C7'), 135.8 (C6), 130.9 (Aryl-C4), 127.0 (Aryl-C3), 126.9 (Aryl-C3), 124.1 (Aryl-C5), 123.7 (Aryl-C6), 121.1 (Aryl-C1), 121.0 (Aryl-C1), 116.9 (C8'), 116.8 (C8'), 109.8 (C5), 84.1 (C4'), 84.0 (C4'), 82.5 (C1'), 82.4 (C1'), 68.7 (C-Benzyl), 68.6 (C-Benzyl), 68.5 (C5'), 68.4 (C5'), 37.3 (C3'), 37.1 (C3'), 36.9 (C6'), 36.7 C6'), 35.8 (C2'), 35.7 (C2'), 15.0 (Aryl-CH₃), 14.9 (Aryl-CH₃), 12.2 C7), 12.1 (C7)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.67, -7.96

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 264.5

λ_{min} [nm]: 233.6

HPLC: $t_R = 15.23 \text{ min}, 15.49 \text{ min} (98\%, \text{Gradient A})$

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 448.14

gef.: 471.43 (M+Na⁺)

8.3.7.8 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'propargylthymidinmonophosphat **39d**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 81.0 mg (0.31 mmol) 2'-Desoxy-3'-propargylthymidin **42d**, 3 mL Acetonitril, 115 μ L (87.0 mg, 0.68 mmol) Di-*iso*propylethylamin (DIPEA), 112 mg (0.55 mmol) 3-Methyl-*cyclo*Salchlorphosphit **96** sowie 185 μ L (0.92 mmol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan eingesetzt.

Ausbeute:78.0 mg (0.18 mmol, 57%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweierDiastereomere im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.80

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.25 (s, 1H, NH), 7.43 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.0$ Hz, H6), 7.42 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.0$ Hz, H6), 7.26 - 7.19 (m, 1H, Aryl-H5), 7.10 - 7.03 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 6.03 (dd, 1H, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 5.7 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 4.7 \text{ Hz}, \text{H1'}), 6.02 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 6.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\text{HH}} = 5.7 \text{ Hz}, \text{H1'}), 5.46 \text{ (dd, 1H, } {}^{3}J_{\text{HP}} = 17.2 \text{ Hz}, {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}, \text{H-}$ Benzyl-a), 5.45 (dd, 1H, ${}^{3}J_{HP} = 16.7$ Hz, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, H-Benzyl-a), 5.39 (dd ,1H, ${}^{3}J_{\text{HP}} = 16.4 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}$, H-Benzyl-b), 5.38 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 11.0 \text{ Hz}, \text{H-Benzyl-b}), 4.44 \text{ (ddd, 1H, } {}^{2}J_{\text{HH}} = 11.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\text{HP}} = 6.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 2.3 \text{ Hz}, \text{ H5'-a}, 4.40 \text{ (ddd, 1H, }{}^{2}J_{\text{HH}} = 11.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\text{HP}} = 6.7 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 2.3 \text{ Hz}, \text{ H5'-a}, 4.32 \text{ (ddd, 1H, }{}^{2}J_{\text{HH}} = 11.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\text{HP}} = 6.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 6.5 \text{ Hz}, \text{ H5'-b}, 4.29 \text{ (ddd, 1H, }{}^{2}J_{\text{HH}} = 11.3 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{HP} = 7.3 \text{ Hz}, {}^{3}J_{HH} = 5.5 \text{ Hz}, \text{ H5'-b}, 3.93 - 3.85 (m, 1H, H4'), 2.91 - 2.84$ (m, 1H, H3'), 2.45 - 2.32 (m, 3H, H2', H8'), 2,23 - 2.12 (m, 2H, H6'), 2.19 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.18 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.71 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.0$ Hz, H7), 1.69 (d, 3H, ${}^{4}J_{\rm HH}$ = 1.0 Hz, H7)

¹³C-NMR: δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 163.9 (C4), 163.8 (C4), 150.5 (C2), 150.4 (C2), 148.1 (d, ²J_{CP} = 6.1 Hz, Aryl-C2), 148.0 (d, ²J_{CP} = 7.3 Hz, Aryl-C2),

136.0 (C6), 135.9 (C6), 131.1 (Aryl-C4), 131.0 (Aryl-C4), 127.0 (Aryl-C3), 126.9 (Aryl-C3), 124.1 (Aryl-C5), 123.7 (Aryl-C6), 121.2 (d, ${}^{3}J_{CP} = 9.7$ Hz, Aryl-C1), 121.1 (d, ${}^{3}J_{CP} = 8.5$ Hz, Aryl-C1), 109.7 (C5), 84.1 (C1'), 84.0 (C1'), 82.0 (C4'), 81.9 (C4'), 81.8 (C7'), 73.0 (C8'), 72.9 (C8'), 68.6 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.3$ Hz, C-Benzyl), 68.5 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.3$ Hz, C-Benzyl), 68.3 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.1$ Hz, C5'), 68.2 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.1$ Hz, C5'), 36.8 (C3'), 36.7 (C3'), 36.4 (C2'), 36.3 (C2'), 20.1 (C6'), 20.1 (C6'), 15.0 (Aryl-CH₃), 14.9 (Aryl-CH₃), 12.2 C7), 12.1 (C7)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.69, -7.84

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 254.5

λ_{min} [nm]: 233.6

HPLC: $t_R = 14.35 \text{ min } (99\%, \text{ Gradient A})$

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 446.12

gef.: 469.34 (M+Na⁺)

8.3.7.9 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-thiocyanatothymidinmonophosphat **39a**



42a

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.35 mmol) 2'-Desoxy-3'-thiocyanatothymidin **42a**, 5 mL Acetonitril, 193 mg (1.41 mmol) Pyridiniumchlorid (PyH⁺Cl⁻) sowie 245 mg (0.92 mmol) 3-Methyl-*cyclo*Sal-*N*,*N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **97** eingesetzt. Zur Oxidation wurden 400 μ L (2.00 mmol) *tert*-Butylhydroperoxidlösung in *n*-Decan verwandt.

Ausbeute:99 mg (0.21 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweierDiastereomere im Verhältnis 1:1

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.33 (s, 1H, NH), 11.31 (s, 1H, NH), 7.44 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.0$ Hz, H6), 7.42 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 1.0$ Hz, H6), 7.24 - 7.20 (m, 1H, Aryl-H5), 7.08 - 7.05 (m 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 6.11 (dd, 1H, ${}^{3}J_{\rm HH} = 7.7 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 4.9 \text{ Hz}, \text{H1}^{\circ}), 6.10 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{3}J_{\rm HH} = 7.7 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\rm HH} = 4.9$ Hz, H1'), 5.46 (dd, 2x1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 17.0$ Hz, 2xH-Benzyl-a), 5.42 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 10.7$ Hz, H-Benzyl-b), 5.41 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 10.6$ Hz, H-Benzyl-b), 4.45 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.9$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 7.2$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 2.6$ Hz, H5'-a), 4.41 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.9$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 7.2$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 2.6$ Hz, H5'-a), 4.34 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\rm HH} = 11.9$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HP} = 7.0$ Hz, ${}^{3}J_{\rm HH} = 4.7$ Hz, H5'-b), 4.31 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 11.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 7.5 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 5.1 \text{ Hz}, \text{ H5'-b}, 4.17 - 4.05 (m, 2H, 2H)$ H3', H4'), 2.67 (ddd, 2x1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 8.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.9$ Hz, 2xH2'-a), 2.52 - 2.46 (m, 2x1H, H2'-b), 2.20 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.19 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.72 (d, 3H, ${}^{4}J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, H7), 1.70 (d, 3H, ${}^{4}J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 161.8 (C4), 148.4 (C2), 146.1 (Aryl-C2), 146.0 (Aryl-C2), 134.5 (C6), 129.1 (Aryl-C4), 129.0 (Aryl-C4), 125.0 (d, ³*J*_{CP} = 3.6 Hz, Aryl-C3), 124.9 (d, ³*J*_{CP} = 2.4 Hz, Aryl-C3), 122.1 (Aryl-C5), 121.7 (Aryl-C6), 119.1 (d, ³*J*_{CP} = 9.7 Hz, Aryl-C1), 119.0 1 (d, ³*J*_{CP} = 9.7 Hz, Aryl-C1), 109.4 (SCN), 108.3 (C5), 82.1 (C1'), 82.0 (C1'), 80.2 (d, ³*J*_{CP} = 7.3 Hz, C4'), 80.1 (d, ³*J*_{CP} = 4.8 Hz, C4'), 66.7 (d, ²*J*_{CP} = 6.1 Hz, C-Benzyl), 66.6 (d, ²*J*_{CP} = 7.3 Hz, C-Benzyl), 64.6 (d, ²*J*_{CP} = 9.7 Hz, C5'), 64.5 (d, ²*J*_{CP} = 7.3 Hz, C5'), 40.8 (C3'), 40.7 (C3'), 35.0 (C2'), 34.9 (C2'), 13.0 (Aryl-CH₃), 10.1 (C7)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.83, -7.96
- IR: \tilde{v} [cm⁻¹] (KBr): 3442, 2925, 2853, 2156 (SCN), 1693, 1471, 1384, 1273, 1191, 1115, 1021, 943, 864, 775, 558
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 264.5

λ_{min} [nm]: 232.3

- HPLC: $t_R = 14.03 \text{ min}, 14.19 \text{ min} (99\%, \text{Gradient A})$
- MS (ESI⁺, m/z): ber.: 465.08

gef.: 488.32 (M+Na⁺)

8.3.8 Darstellung der modifizierten Nucleosidmonophosphate



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 25.0 mg (57.5 μ mol) 3-Methyl*cyclo*Sal-Azido-T-Penciclovir **37b**^[93] eingesetzt.

Ausbeute: $16.0 \text{ mg} (42.4 \mu \text{mol}, 74\%)$ eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (*iso*-Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.50

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, D₂O): 7.47 (s, 1H, H6), 3.74 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H1'), 3.65 - 3.59 (m, 2H, H5'), 3.41 (dd, 1H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H4'a), 3.27 (dd, 1H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H4'-b), 1.82 - 1.75 (m, 1H, H3'), 1.76 (s, 3H, H7), 1.70 - 1.63 (m 2H, H2')
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (150 MHz, D₂O): 168.6 (C4), 153.9 (C2), 135.0 (C6), 112.3 (C5), 66.0 (d, ²*J*_{CP} = 4.6 Hz, C5'), 53.8 (C4'), 48.3 (C1'), 38.2 (d, ³*J*_{CP} = 8.0 Hz, C3'), 29.6 (C2'), 13.1 (C7)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, D₂O): 3.64
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 272.0, 203.0 λ_{min} [nm]: 238.0

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 337.05

gef.: 338.10 (M+H⁺)



8.3.8.2 Darstellung von Azido-T-Ganciclovirmonophosphat **32b**

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 35.0 mg (80.0 µmol) 3-Methyl*cyclo*Sal-Azido-T-Ganciclovir **38b** eingesetzt.

Ausbeute:	19.4 mg (55.0 µmol, 68%) eines farblosen Feststoffs
DC:	R _f -Wert (<i>iso</i> -Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.50
¹ H-NMR:	δ [ppm] (500 MHz, D ₂ O): 7.57 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H6), 5.27 (s, 2H, H1'), 3.93 (ddd, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.9$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.7$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.9$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.1$ Hz, H3'), 3.76 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.5$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 5.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.9$ Hz, H5'-a), 3.70 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.7$ Hz, H5'-b), 3.37 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.6$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.7$ Hz, H4'-a), 3.29 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.6$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.9$ Hz, H4'-a), 1.76 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (125 MHz, D ₂ O): 176.7 (C4), 152.7 (C2), 142.5 (C6), 111.9 (C5), 78.3 (C3'), 77.6 (C1'), 64.2 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 9.2 Hz, C5'), 51.8 (C4'), 13.1 (C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, D ₂ O): 4.48
IR:	$\widetilde{\nu}~[\text{cm}^{-1}]$ (KBr): 3429, 2927, 2103, 1697, 1471, 1445, 1350, 1271, 1091, 978, 769, 713, 653, 515, 429
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 265.0, 207.0
	λ _{min} [nm]: 234.0
MS (ESI $^+$, m/z):	ber.: 410.97

gef.: 412.26 (M+H⁺)





Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 50.0 mg (0.11 mmol) 3-MethylcycloSal-Thiocyanato-T-Ganciclovir **38c** eingesetzt.

Ausbeute:	33.2 mg (77.2 μmol, 70%) eines farblosen Feststoffs
DC:	R _f -Wert (<i>iso</i> -Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.50
¹ H-NMR:	δ [ppm] (500 MHz, D ₂ O): 7.54 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H6), 5.31 (d, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.1$ Hz, H1'-a), 5.24 (d, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.1$ Hz, H1'-b), 4.05 4.00 (m, 1H, H3'), 3.97 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.2$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 5.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.9$ Hz, H5'-a), 3.85 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.2$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 6.2$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.3$ Hz, H5'-b), 3.26 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.2$ Hz, H4'-a), 2.99 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 9.1$ Hz, H4'-b), 1.79 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (125 MHz, D ₂ O): 167.2 (C4), 152.6 (C2), 142.5 (C6), 114.8 (SCN), 111.9 (C5), 77.2 (C1'), 76.8 (d, ³ <i>J</i> _{CP} = 8.1 Hz, C3'), 65.7 (d, ² <i>J</i> _{CP} = 5.1 Hz, C5'), 35.1 (C4'), 11.7 (C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, D ₂ O): 1.36
IR:	$\widetilde{\nu}~[\text{cm}^{-1}]$ (KBr): 3423, 2927, 2156 (SCN), 1685, 1469, 1384, 1350, 1269, 1207, 1053, 960, 780, 714, 576, 491, 416
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 265.0, 203.0
	$\lambda_{min} \ [nm]: 234.0$
MS (ESI $^+$, m/z):	ber.: 426.94
	gef.: 428.24 (M+H ⁺)





Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 55.0 mg (0.12 mmol) 3-Methyl*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-thiocyanatothymidinmonophosphat **39a** eingesetzt.

Ausbeute:	33.0 mg (0.07 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffs
DC:	R _f -Wert (<i>iso</i> -Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.53
¹ H-NMR:	$δ$ [ppm] (500 MHz, D ₂ O): 7.70 (s, 1H, H6), 6.20 (dd, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.6$ Hz, H1'), 4.28 4.23 (m, 1H, H3'), 4.08 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.9$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 3.6$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.3$ Hz, H5'-a), 4.04 -3.96 (m, 2H, H4', H5'-b), 2.71 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 8.4$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.6$ Hz, H2'-a), 2.63 (ddd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.3$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.3$ Hz, H2'-b), 1.79 (d, 3H, ${}^{4}J_{HH} = 1.2$ Hz, H7)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (125 MHz, D ₂ O): 166.9 (C4), 151.9 (C2), 137.9 (C6), 112.7 (SCN), 111.9 (C5), 85.2 (C1'), 84.3 (d, ${}^{3}J_{CP}$ = 8.5 Hz, C4'), 63.4 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 3.6 Hz, C5'), 43.1 (C3'), 38.4 (C2'), 12.0 (C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, D ₂ O): 2.86
UV (H ₂ O):	λ _{max} [nm]: 264.5, 205.8
	$\lambda_{\min} [nm]: 232.3$
HPLC:	$t_R = 9.68 \text{ min (98\%, Gradient D)}$
MS (ESI $^+$, m/z):	ber.: 406.99
	gef.: 408.0 (M+H ⁺)

8.3.8.5 Darstellung von 3'-Allyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **33c**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 38.0 mg (85.0 µmol) 3-Methyl*cyclo*Sal-3'-allyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **39c** eingesetzt.

Ausbeute: 23.2 mg (59.5 µmol, 70%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (*iso*-Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.51

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, D₂O): 7.71 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H6), 6.02 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H1'), 5.77 (dddd, 1H, ³J_{HH} = 17.0 Hz, ³J_{HH} = 10.1 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H7'), 5.06 (dd, 1H, ³J_{HH} = 17.0 Hz, ²J_{HH} = 1.3 Hz, H8'-*E*), 4.99 (dd, 1H, ³J_{HH} = 10.3 Hz, ²J_{HH} = 1.3 Hz, H8'-*Z*), 4.08 - 4.03 (m, 1H, H4'), 3.93 - 3.86 (m, 2H, H5'), 2.30 - 2.27 (m, 1H, H3'), 2.27 -2.02 (m 4H, H2', H6'), 1.79 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (125 MHz, D₂O): 167.0 (C4), 152.0 (C2), 138.1 (C6), 136.5 (C7'), 117.2 (C8'), 111.4 (C5), 85.6 (C1'), 85.1 (d, ³*J*_{CP} = 8.6 Hz, C4'), 65.1 (d, ²*J*_{CP} = 4.9 Hz, C5'), 37.6 (C2'), 37.2 (C3'), 35.8 (C6'), 12.0 (C7)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, D₂O): 2.17
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 266.6, 202.9

λ_{min} [nm]: 233.6

HPLC: $t_R = 9.81 \text{ min } (98\%, \text{ Gradient D})$

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 390.06

gef.: 391.1 (M+H⁺)

8.3.8.6 Darstellung von 2'-Desoxy-3'-propargylthymidinmonophosphat **33d**



39d

33d

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 38.0 mg (85.1 µmol) 3-Methyl*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-propargylthymidinmonophosphat **39d** eingesetzt.

22.0 mg (57.0 µmol, 67%) eines farblosen Feststoffs Ausbeute: DC: Rf-Wert (iso-Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/): 0.50 δ [ppm] (500 MHz, D₂O): 7.64 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH}$ = 1.0 Hz, H6), 6.04 (dd, 1H, ¹H-NMR: ${}^{3}J_{\text{HH}} = 9.9 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HH}} = 5.5 \text{ Hz}, \text{H1'}), 4.17 - 4.11 (m, 1H, H4'), 4.04 - 3.98 (m, 1H, H4'))$ 2H, H5'), 2.53 - 2.45 (m, 1H, H3'), 2.39 - 2.17 (m, 5H, H2', H6', H8'), 1.78 $(d, 3H, {}^{4}J_{HH} = 1.0 \text{ Hz}, H7)$ ¹³C-NMR: δ [ppm] (125 MHz, D₂O): 166.9 (C4), 151.9 (C2), 137.9 (C6), 111.4 (C5), 85.5 (C1'), 83.9 (d, ${}^{3}J_{CP} = 8.5$ Hz, C4'), 82.3 (C7'), 71.5 (C8'), 65.4 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.0 \text{ Hz}, \text{C5'}$, 37.0 (C2'), 36.2 (C3'), 20.1 (C6'), 11.9 (C7) ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, D₂O): 1.93 λ_{max} [nm]: 266.6 UV (CH₃CN): λ_{min} [nm]: 233.6 HPLC: $t_{\rm R} = 9.49 \text{ min } (99\%, \text{Gradient D})$ MS (ESI⁺, m/z): ber.: 388.04 gef.: 389.0 (M+H⁺)





Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 30.0 mg (64.0 µmol) 3-Methyl*cyclo*Sal-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **39b** eingesetzt. Statt des gewünschten Produktes konnte nur 3'-Amino-2'-desoxythymidinmonophosphat **106** isoliert werden.

DC: R_f-Wert (*iso*-Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.20

15.7 mg (43.0 µmol, 67%) eines farblosen Feststoffs

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, D₂O): 7.62 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H6), 6.26 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H1'), 4.32 - 4.28 (m, 1H, H3'), 4.09 (dt, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H4'), 4.03 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H5'-a), 4.02 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H5'-b), 2.57 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 15.0 Hz, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H2'-a), 2.52 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 15.0 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H2'-b), 1.82 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (125 MHz, D₂O): 166.7 (C4), 151.7 (C2), 137.5 (C6), 111.9 (C5), 85.1 (C1'), 51.5 (d, ³J_{CP} = 10.1 Hz, C4'), 64.3 (d, ²J_{CP} = 3.8 Hz, C5'), 50.9 (C3'), 35.2 (C2'), 11.7 (C7)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, D₂O): 2.22

MS (ESI⁺, m/z): ber.: 321.07

gef.: 322.07 (M+H⁺), 344.07 (M+Na⁺)

Ausbeute:

8.3.9 Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von 9-[2-(Phosphonylmethoxy)ethyl]-adenin (PMEA) **11**

8.3.9.1 Darstellung von Acetoxy-2-(chlormethoxy)ethan **120**^[142]



21.0 g (19.6 mL, 283 mmol) 1,3-Dioxolan **119** wurden in 100 ml *n*-Pentan gelöst und eine katalytische Menge Zinkchlorid hinzugegeben. Innerhalb von 40 min wurden bei Raumtemperatur 22.9 g (20.8 mL, 292 mmol) frisch destilliertes Essigsäurechlorid hinzugetropft. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde zunächst das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde anschließend im Ölpumpenvakuum destilliert.

Ausbeute: 40.2 g (263 mmol, 93%) einer farblosen Flüssigkeit

Sdp.: 50°C (0.5 mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 5.51 (s, 2H, H3), 4.28 (t, 2H, ³J_{HH} = 4.58 Hz, H2), 3.89 (t, 2H, ³J_{HH} = 4.58 Hz, H1), 2.09 (s, 3H, H2')

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 170.8 (C1'), 82.6 (C3), 68.0 (C2), 62.2 (C1), 20.8 (C2')

8.3.9.2 Darstellung von Diethyl-[2-acetoxyethoxymethyl)phosphonat **121**^[142]



In einer Inertgasatmosphäre wurden 40.2 g (263 mmol) Acetoxy-2-(chlormethoxy)ethan **120** zu 43.5 mL (41.4 g; 249 mmol) Triethylphosphit getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten auf 120°C erhitzt. Anschließend wurden zunächst die Edukte abdestilliert und zuletzt das Produkt im Ölpumpenvakuum destilliert.

Ausbeute:30.1 g (118 mmol, 45%) einer farblosen FlüssigkeitSdp.:114 °C (0.6 mbar)

¹H-NMR:
$$\delta$$
 [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.24 (t, 2H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, H2), 4.18 (m, 4H, 2xCH₂), 3.84 (d, 2H, ²J_{HP} = 5.1 Hz, H3), 3.81 (t, 2H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, H1), 2.07 (s, 3H, H2'), 1.35 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2xCH₃)
¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 170.3 (C1'), 70.60 (d, ³J_{CP} = 10.7 Hz, C1), 64.9 (d, ¹J_{CP} = 167 Hz, C3), 62.8 (C2), 62.03 (d, ²J_{CP} = 6.6 Hz, 2xCH₂), 20.41 (C2'), 16.04 (d, ³J_{CP} = 5.6 Hz, 2xCH₃)
³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 21.86

8.3.9.3 Darstellung von Diethyl-[2-hydroxyethoxymethyl)phosphonat **122**^[142]



30.1 g (118 mmol) Diethyl-[2-acetoxyethoxymethyl)phosphonat **121** wurden mit Dowex 50x8 in etwa 400 mL abs. Ethanol 67 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Es wurde vom Ionentauscher abfiltriert und dreimal mit Ethanol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingeengt und dreimal mit jeweils 50 mL Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde im Exsikkator über Phosphor(V)oxid getrocknet.

Ausbeute: 24.8 g (117 mmol, 99%) einer farblosen Flüssigkeit

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.39 (s, 1H, OH), 4.18 (dq, 4H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ³J_{HP} = 7.1 Hz, 2xCH₂), 3.86 (d, 2H, ²J_{HP} = 8.13 Hz, H3), 3.68-3.76 (m, 4H, H1, H2), 1.34 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H5)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 75.1 (d, ${}^{3}J_{CP} = 10.2$ Hz, C1), 65.3 (d, ${}^{1}J_{CP} = 67.3$ Hz, C3), 62.6 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.6$ Hz, 2xCH₂), 61.6 (C2), 16.40 (d, ${}^{3}J_{CP} = 5.6$ Hz, 2xCH₃)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 23.14

8.3.9.4 Darstellung von Diethyl-[2-methansulfonyloxyethoxymethyl)phosphonat **123**^[142]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Eine Lösung von 9.80 g (46.2 mmol) Diethyl-[2-hydroxyethoxymethyl)phosphonat **122** in 130 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde auf 0°C gekühlt. Unter Rühren wurden 4.31 mL (6.35 g, 55.4 mmol) Methansulfonsäurechlorid (MsCl) zugegeben. Anschließend wurden innerhalb von 15 Minuten 9.66 mL (7.01g, 69.3 mmol) Triethylamin hinzugetropft. Man ließ auf Raumtemperatur erwärmen und anschließend 16 Stunden bei dieser Temperatur rühren. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 mL Wasser gewaschen und die wäßrige Phase mit 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren vom Trockenmittel wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die folgende Umsetzung verwandt.

Ausbeute: 13.3 g (45.8 mmol, 99%) eines farblosen Öls

8.3.9.5 Darstellung von 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124**^[142]



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Eine Suspension von 6.24 g (46.2 mmol) Adenin und 1.22 g (50.8 mmol) Natriumhydrid in 160 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid wurde 1 Stunde auf 80°C erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 50°C wurden 13.3 g (45.8 mmol) Diethyl-[2-methansulfonyloxy-ethoxymethyl)phosphonat **123**, gelöst in 10 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid, hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension 20 Stunden auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit je 200 mL heißem Dichlormethan extrahiert. Nach Abdekantieren und Filtration über Celite wurden die vereinigten Filtrate unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 20%) und abschließend aus einer Mischung von Essigsäureethylester und Petrolether (8:2, v/v) umkristallisiert.

Ausbeute:	7.87 g (23.9 mmol, 52%) eines farblosen Feststoffs
DC:	R _f -Wert (Dichlormethan/Methanol 8:2 v/v): 0.49
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d ₆): 8.12 (s, 1H, H2), 8.07 (s, 1H, H8), 7.19 (s, 2H, NH ₂), 4.32 (t, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H1'), 3.9 (dq, 4H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 7.6$ Hz, 2xCH ₂), 3.88 (t, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'), 3.83 (d, 2H, ${}^{2}J_{HP} = 8.4$ Hz, H3'), 1.12 (t, 6H, ${}^{3}J_{HH} = 7.1$ Hz, 2xCH ₃)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d ₆): 156.1 (C6), 152.5 (C2), 149.7 (C4), 141.2 (C8), 118.8 (C5), 70.5 (d, ${}^{3}J_{CP}$ = 11.7 Hz, C2'), 63.9 (d, ${}^{1}J_{CP}$ = 162 Hz, C3'), 61.8 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 7.3 Hz, 2xCH ₂), 42.6 (C1'), 16.3 (d, ${}^{3}J_{CP}$ = 5.6 Hz, 2xCH ₃)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, CDCl ₃): 22.07
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 260.5
	λ _{min} [nm]: 227.5

- HPLC: $t_R = 5.60 \text{ min (99\%, Gradient C)}$
- 8.3.9.6 Versuch der Darstellung von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-9-[2diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **130** mit Di-*tert*-Butyldicarbonat



 a) 50.0 mg (0.15 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124 wurden in 5 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und 50 mg (0.23 mmol) Di-*tert*-Butyldicarbonat (BOC₂O) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dünnschichtchromatographisch konnten nur die Edukte detektiert werden.

- b) 100 mg (0.30 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124 wurden in 2 mL Wasser gelöst und 80 mg (0.36 mmol) Di-*tert*-Butyldicarbonat (BOC₂O) hinzugegeben. Zur Reaktionslösung wurden 2 mL 1M Natriumhydroxidlösung getropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Auch nach 20 Stunden zeigte die dünnschichtchromatographische Kontrolle keine Reaktion an.
- c) 50 mg (0.15 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124 wurden unter einer Inertgasatmosphäre in 5 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und 230 μL einer 1M Lösung von Natriumhexamethyldisilazid hinzugetropft. Anschließend wurden 50.0 mg (0.23 mmol) Di-*tert*-Butyldicarbonat (BOC₂O) hinzugegeben und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 mL Methanol wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der resultierende Rückstand am Chromatotron gereinigt (Essigsäureethylester mit Methanolgradient von 5 bis 10%). Neben dem Ausgangsmaterial konnte jedoch kein Produkt isoliert werden.
- 8.3.9.7 Versuch der Darstellung von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **130** mit 2-(*tert*-Butyloxycarbonyl-oxyimin)-2phenylacetonitril



 a) 500 mg (1.52 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124 wurden in 4 mL wasserfreiem *N*,*N*-Dimethylformamid gelöst und 449 mg (1.82 mmol) 2-(*tert*-Butyloxycarbonyl-oxyimin)-2-phenylacetonitril (BOC-ON) sowie 254 μL (184 mg, 1.82 mmol) wasserfreies Triethylamin hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden auf 55 °C erhitzt. Dünnschichtchromatographisch konnten lediglich die Ausgangsmaterialien detektiert werden.

- b) Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung von 1.00 g (3.40 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124 in 30 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran wurden 6.08 mL einer 1M Lösung von Lithiumhexamethyldisilazid getropft. Nach fünfzehnminütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 1.87 g (7.59 mmol) 2-(*tert*-Butyloxycarbonyloxyimin)-2-phenylacetonitril (BOC-ON) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 5 mL Methanol wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 20%. Es konnten lediglich 530 mg (1.80 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 124 reisoliert werden.
- 8.3.9.8 Darstellung von *N*,*N*-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **131a**^[76]



Zu einer Lösung von 1.00 g (3.04 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124** in 15 mL wasserfreiem Pyridin wurden 3.14 g (12.2 mmol) Chlorameisensäurefluorenylmethoxycarbonylester gegeben und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der resultierende Rückstand zweimal mit je 40 mL Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und sukzessive mit zweimal je 50 mL Wasser und einmal 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: 1.84 g (2.38 mmol, 78%) eines farblosen Schaums

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.84 (s, 1H, H2), 8.34 (s, 1H, H8), 7.65 (d, 4H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H(D)), 7.36 - 7.32 (m, 8H, H(A), H(C)), 7.20 (dd, 4H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H(B)), 4.60 - 4.50 (m, 2H, H1'), 4.54 (d, 4H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H(H)), 4.15 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H(G)), 4.07 (dq, 4H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ³J_{HP} = 7.3 Hz, 2xCH₂), 4.04 - 3.95 (m, 2H, H2'), 3.74 (d, 2H, ²J_{HP} = 7.9 Hz, H3'), 1.26 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 2xCH₃)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 153.1 (C2), 151.0 (C4), 150.9 (C(I)), 148.9 (C6), 143.5 (C(F)), 143.2 (C8), 141.3 (C(E)), 127.8 (C(A)), 127.2 (C(D)), 125.2 (C(B)), 120.0 (C5), 119.9 (C(C)), 70.7 (d, ${}^{3}J_{CP} = 9.6$ Hz, C2'), 68.0 (C(H)), 65.3 (d, ${}^{1}J_{CP} = 167$ Hz, C3'), 62.5 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.6$ Hz, CH₂), 46.8 (C(G)), 44.0 (C1'), 16.4 (CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 21.04

Neben dem gewünschten Produkt **131a** konnten auch 300 mg (0.54 mmol, 18%) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **131b** als farbloser Schaum isoliert werden.



- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.81 (s, 1H, H2), 8.44 (s, 1H, H8), 7.77 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H(D)), 7.70 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H(A)), 7.40 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H(C)), 7.32 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H(B)), 4.61 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H(H)), 4.56 - 4.48 (m, 2H, H1³), 4.35 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H(G)), 4.11 (dq, 4H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ³J_{HP} = 7.4 Hz, 2xCH₂), 4.04 - 3.94 (m, 2H, H2²), 3.79 (d, 2H, ²J_{HP} = 8.0 Hz, H3³), 1.30 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 2xCH₃)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃): 153.4 (C(I)), 153.2 (C2), 151.0 (C4), 148.3 (C6), 146.5 (C8), 143.1 (C(F)), 141.1 (C(E)), 128.6 (C5), 127.6 (C(A)), 127.0 (C(D)), 125.0 (C(B)), 119.8 (C(C)), 70.7 (d, ${}^{3}J_{CP} = 9.3$ Hz, C2'), 69.3 (C(H)), 65.3 (d, ${}^{1}J_{CP} = 166$ Hz, C3'), 62.5 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.9$ Hz, CH₂), 46.4 (C(G)), 44.0 (C1'), 16.5 (CH₃), 16.4 (CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 20.95

8.3.9.9 Darstellung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **132b**



In einer Inertgasatmosphäre wurden 300 mg (544 µmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 131b in 3 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst und unter Rühren 176 µL (208 mg, 1.36 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) hinzugetropft. Nach achtzehnstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden flüchtige Bestandteile im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Der resultierende farblose Feststoff wurde in 3 mL trockenem Dichlormethan suspendiert, 5 Tropfen wasserfreies N,N-Dimethylformamid hinzugesetzt und auf 0°C gekühlt. Nun wurden 140 µL (207 mg, 1.63 mmol) Oxalylchlorid vorsichtig hinzugetropft, wobei das Reaktionsgemisch stark schäumte. Nach beendeter Zugabe wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde der resultierende orange Schaum in 5 mL wasserfreiem THF aufgenommen und eine Lösung von 81.0 mg (0.65 mmol) Salicylalkohol, 133 µL (129 mg, 1.63 mmol) Pyridin sowie 1 Tropfen N,N-Di-iso-proypethylamin (DIPEA) in 2.5 mL trockenem THF hinzugetropft, wobei eine Trübung des Reaktionsgemisches auftrat. Nach Zugabe von 2.5 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid klärte sich das Reaktionsgemisch und wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 10 Tropfen Essigsäure wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in 40 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 30 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: $17 \text{ mg} (29 \mu \text{mol}, 5\%)$ eines farblosen Öls

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 10.8 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, H2), 8.16 (s, 1H, H8), 7.90 (d, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, H(D)), 7.85 (d, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, H(A)), 7.43 (dd, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, H(C)), 7.34 (dd, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, Aryl-H4), 7.16 (dd, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{4}J_{HH} = 1.4$ Hz, Aryl-H6), 7.07 (dt, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 1.4$ Hz, Aryl-H5), 6.98 (d, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.5$ Hz, Aryl-H3), 5.30 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.8$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 13.4$ Hz, H-Benzyl-a), 5.24 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.8$ Hz ${}^{3}J_{HP} = 13.4$ Hz, H-Benzyl-b), 4.42 (d, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 7.2$ Hz, H(H)), 4.35 4.29 (m, 3H, H(G), H1'), 4.20 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HP} = 7.6$ Hz, H3'-b), 3.90 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.2$ Hz, H2'-a), 3.85 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.1$ Hz, H2'-b)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 153.4 (C(I)), 151.5 (C2), 149.6 (C4), 149.5 (Aryl-C2), 144.3 (C8), 143.9 (C(F)), 140.9 (C(E)), 132.9 (C5), 129.8 (Aryl-C5), 127.9 (C(A)), 127.3 (C(D)), 126.2 (Aryl-C4), 125.7 (C(B)), 124.1 (Aryl-C6), 120-29 (C(C)), 118.0 (Aryl-C1), 117.8 (Aryl-C3), 70.4 (d, ³J_{CP} = 12 Hz, C2'), 67.7 (d, ²J_{CP} = 7.1 Hz, C-Benzyl), 66.8 (C(H)), 64.0 (d, ¹J_{CP} = 161 Hz, C3'), 46.5 (C(G)), 42.8 (C1')

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.61

8.3.9.10 Darstellung von *N*,*N*-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSalphosphonylmethoxyethyl]adenin **132a** Variante 1



In einer Inertgasatmosphäre wurden 545 mg (0.70 mmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **131a** in 4 ml trockenem Acetonitril gelöst und unter Rühren 228 μ L (270 mg, 1.76 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) hinzugetropft. Nach fünfzehnstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden flüchtige Bestandteile im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Der resultierende farblose Feststoff wurde in 4 mL wasserfreiem Dichlormethan suspendiert, 10 Tropfen trockenes N,N-Dimethylformamid hinzugesetzt und auf 0°C gekühlt. Nun wurden 181 µL (268 mg, 2.11 mmol) Oxalylchlorid vorsichtig hinzugetropft, wobei das Reaktionsgemisch stark schäumte. Nach beendeter Zugabe wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde der resultierende orange Schaum in 5 mL trockenem THF aufgenommen und eine Lösung von 105 mg (845 µmol) Salicylalkohol, 379 µL (368 mg, 2.11 mmol) wasserfreiem Pyridin sowie 7.00 mg (56.0 µmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) in 2.5 mL trockenem THF hinzugetropft, wobei eine Trübung des Reaktionsgemisches auftrat. Nach Zugabe von 2.5 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid klärte sich das Reaktionsgemisch und wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 10 Tropfen Essigsäure wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt, der resultierende Rückstand in 40 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit 20 mL 30 mL Wasser Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: 70 mg (87 µmol, 12 %) eines farblosen Öls

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.84

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.59 (s, 1H, H2), 8.14 (s, 1H H8), 7.69 (d, 4H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H(A)), 7.32 - 7.25 (m, 9H, H(C), H(D), Aryl-H4), 7.18 -7.13 (m, 5H, H(B), Aryl-H6), 7.09 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, Aryl-H5), 7.01 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, Aryl-H3), 5.29 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HP} = 14.0 Hz, H-Benzyl-a), 5.26 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HP} = 13.4 Hz, H-Benzyl-b), 4.47 (d, 4H, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H(H)), 4.45 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H1'-a), 4.40 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H1'-b), 4.22 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.7 Hz, ²J_{HP} = 8.0 Hz, H3'-a), 4.17 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.7 Hz, ²J_{HP} = 7.9 Hz, H3'-b), 4.04 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H(G)), 3.96 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H2'-a), 3.92 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H2'-b)

¹³C-NMR: δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 153.4 (C2), 151.5 (C4), 150.4 (C(I)), 147.5 (Aryl-C2), 146.9 (C6), 143.0 (C(F)), 140.6 (C(E)), 129.9 (Aryl-C5), 127.7 (C(A)), 126.9 (C(D)), 126.3 (Aryl-C4), 124.7 (C(B)), 124.2 (Aryl-C6), 122.7 (Aryl-C1), 122.3 (Aryl-C3), 120.0 (C(C)), 119.5 (C5), 70.3 (d, ${}^{3}J_{CP} = 9.6 \text{ Hz}, \text{ C2'}), 70.2 \text{ (C-Benzyl)}, 68.6 \text{ (C(H))}, 64.0 \text{ (d, } {}^{1}J_{CP} = 161 \text{ Hz}, \text{ C3'}), 45.9 \text{ (C(G))}, 43.1 \text{ (C1')}$

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.57

8.3.9.11 Darstellung von *N*,*N*-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-*cyclo*Salphosphonylmethoxyethyl]adenin **132a** Variante 2



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 550 mg (0.71 mmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 131a wurden zweimal mit je 5 mL wasserfreiem Acetonitril koevaporiert und anschießend in einer Inertgasatmosphäre in 5 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst. Unter Rühren wurden 230 µL (273 mg, 1.78 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) hinzugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren der flüchtigen Anteil wurde der resultierende farblose Rückstand in 5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen, 10 Tropfen wasserfreies N,N-Dimethylformamid hinzugetropft und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden 183 µL (271 mg, 2.13 mmol) Oxalylchlorid hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der resultierende gelbe Schaum in 5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und auf 0 °C abgekühlt. Es wurde eine Lösung von 353 mg (2.84 mmol) Salicylalkohol und 694 µL (504 mg, 4.98 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2.5 mL trockenem Dichlormethan innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Man ließ auf Raumtemperatur erwärmen und 90 Minuten bei dieser Temperatur rühren. Das Reaktionsgemisch wurde über Kieselgel filtriert. Als Eluent diente eine Mischung aus Dichlormethan/Methanol (9:1, v/v), dem 0.1% Essigsäure beigemischt wurde. Nach Abdestillieren des Lösungsmittel wurde der Rückstand am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%).

Ausbeute: 200 mg (248 µmol, 35%) eines farblosen Schaums

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.9.10.

8.3.9.12 Versuche der Darstellung von 9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** durch Abspaltung der Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe



- a) 60.0 mg (75.0 μmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSal-phosphonyl-methoxyethyl]adenin 132a wurden zweimal mit je 2 mL trockenem Acetonitril koevaporiert, in einer Inertgasatmosphäre in 2 mL trockenem Acetonitril gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es wurden 6.00 μL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) hinzugetropft und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Die dünnschicht-chromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte aufgrund der Fluoreszenz die Bildung von 9-Methylen-9*H*-fluoren an. Neben der abgespaltenen Schutzgruppe konnte nur der Startfleck detektiert werden.
- b) 80.0 mg (99.0 μmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin 132a wurden zweimal mit je 2.5 mL wasserfreiem Acetonitril koevaporiert, in einer Inertgasatmosphäre in 2.5 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es wurden 138 μL (100 mg, 0.99 mmol) trockenes Triethylamin hinzugetropft und bei 0 °C gerührt. Da sich dünnschichtchromatographisch nur die Ausgangsverbindung nachweisen ließ, wurde die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Es ließ sich jedoch weiterhin nur die Ausgangsverbindung nachweisen.
- c) 70.0 mg (87.0 μmol) *N*,*N*-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **132a** wurden in 1 mL einer 5%igen Lösung von Piperidin in wasserfreiem *N*,*N*-Dimethylformamid aufgenommen und 2 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μL Essigsäure abgebrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 35%). Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.
- d) Eine Lösung von 70.0 mg (87.0 μmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2cycloSal-phosphonylmethoxyethyl]adenin 132a in 1 mL trockenem Acetonitril wurde auf 0 °C gekühlt und 75.0 μL (75.0 mg, 0.87 mmol) Morpholin hinzugetropft. Man ließ die Reaktionslösung unter Rühren innerhalb von 30 Minuten auf Raumtemperatur

erwärmen. Dünnschichtchromatographisch konnte neben Methylen-9*H*-fluoren nur der Startfleck detektiert werden.

- 60.0 mg (74.0 μmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-cycloSal-phosphonyle) methoxyethyl]adenin 132a wurden in einer Inertgasatmosphäre in 2.5 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und die Lösung auf -20 °C gekühlt. Nun wurden 150 µL einer 1M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran innerhalb von 10 Minuten zugetropft. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung unmittelbar Beendigung zeigte bereits nach der Zugabe von Tetrabutylammoniumfluorid lediglich den Startfleck an.
- f) Eine Lösung von 15 mg (19 μmol) N,N-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-*cyclo*Salphosphonylmethoxyethyl]adenin 132a in 1 mL trockenem Tetrahydrofuran wurde bei 0 °C mit 30 μL (30.0 mg, 186 μmol) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt und 10 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Dünnschichtchromatographisch konnte neben Methylen-9*H*-fluoren nur der Startfleck detektiert werden.
- 8.3.9.13 Darstellung von 9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** durch Abspaltung der Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 67.0 mg (83.0 μ mol) *N*,*N*-Bis-fluorenylmethoxycarbonyl-9-[2-*cyclo*Salphosphonyl-methoxyethyl]adenin **132a** wurden in 1 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Nun wurden 116 μ L (84.2 mg, 832 μ mol) trockenes Triethylamin innerhalb von 15 Minuten hinzugetropft. Man ließ die Reaktionslösung unter Rühren innerhalb von 1 Stunde auf Raumtemperatur erwärmen. Nach Zugabe von 10 mL Toluol wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde noch zweimal mit je 10 mL Toluol koevaporiert. Der farblose Rückstand wurde am Chromatotron mit Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 15% sowie 0.1% Essigsäure gereinigt.

Ausbeute: 6.00 mg (17.0 µmol, 20%) eines farblosen Öls

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.29

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen unter 8.3.9.22.

8.3.9.14 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **133**^[150]



Eine Lösung von 1.31 g (3.98 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124** und 49.0 mg (0.40 mmol) 4-Dimethylaminopyridin in 12 mL trockenem Dichlormethan wurde mit 2.46 g (7.95 mmol) 4-Monomethoxytritylchlorid (MMTrCl) und 1.11 mL (805 mg, 7.95 mmol) wasserfreiem Triethylamin versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung wurden die Phasen getrennt und die wäßrige Phase zweimal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit je 15 mL Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanol-Gradient von 0 bis 20%).

Ausbeute: 2.13 g (3.54 mmol, 89%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.66

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.17 (s, 1H, H2), 7.90 (s, 1H, H8), 7.31 -7.18 (m, 13H, H(B), H(C), H(D), H(F), NH), 6.85 - 6.81 (m, 2H, H(G)), 4.32 (t, 2H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H1'), 3.89 (dq, 4H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2xCH2), 3.86 (t, 2H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H2'), 3.83 (d, 2H, ²J_{HP} = 8.4 Hz, H3'), 3.70 (s, 3H, OCH3), 1.10 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2xCH₃)

¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 157.9 (C(H)), 153.6 (C6), 151.2 (C2), 148.9 (C(A)), 145.4 (C4), 141.9 (C8), 137.3 (C(E)), 129.9 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.7 (C(D)), 120.4 (C5), 113.2 (C(G)), 70.4 (d,

223

 ${}^{3}J_{CP} = 11.6 \text{ Hz}, \text{ C2'}), 63.9 \text{ (d, } {}^{1}J_{CP} = 162 \text{ Hz}, \text{ C3'}), 61.8 \text{ (d, } {}^{2}J_{CP} = 6.2 \text{ Hz}, 2x\text{CH}_{2}), 55.2 \text{ (OCH}_{3}), 42.6 \text{ (C1'}), 16.4 \text{ (CH}_{3}), 16.3 \text{ (CH}_{3})$ ${}^{31}\text{P-NMR} \qquad \delta \text{ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_{6}): 22.06}$ $UV \text{ (CH}_{3}\text{CN}): \qquad \lambda_{max} \text{ [nm]: 273.0, 196.0}$ $\lambda_{min} \text{ [nm]: 247.0}$ MS (FAB; m/z): ber.: 601.25

gef.: 601.4 (M+H⁺)

8.3.9.15 Versuch der Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-*cyclo*Salphosphonylmethoxyethyl]adenin **134a**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 200 mg (0.33 mmol) N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 133 wurden in 5 mL trockenem Acetonitril gelöst, 5 Tropfen wasserfreies Pyridin hinzugegeben und 113 µL (134 mg, 0.88 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) zugetropft. Nach sechzehnstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die flüchtigen Anteile im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde in 5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und auf 0 °C gekühlt. Nun wurden 10 Tropfen wasserfreies N,N-Dimethylformamid zugegen. Anschließend tropfte man 90.0 µL (60.8 mg, 1.05 mmol) Oxalylchlorid vorsichtig zu. Unmittelbar nach Zugabe des ersten Tropfens Oxalylchlorid nahm das Reaktionsgemisch unter starkem Schäumen eine orange Farbe an. Bei weiterer Zugabe entstand ein schwarzer Niederschlag. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in 5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 174 mg (1.40 mmol) Salicylalkohol und 340 µL (247 mg, 2.45 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2 mL trockenem Dichlormethan zugetropft. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%). Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.

Bei der erneuten Durchführung des Versuchs wurde im zweiten Reaktionsschritt eine 1M Lösung von Chlormethylen-dimethylammoniumchlorid (*Vilsmeier Reagenz*), darstellt durch Zutropfen von 257 μ L (380 mg, 3.00 mmol) Oxalylchlorid zu einer Lösung von 247 μ L (3.20 mmol) wasserfreiem *N*,*N*-Dimethylformamid in 3 mL trockenem Dichlormethan, zu der Lösung des Bis-Trimethylsilylphosphonates hinzugetropft. Es bildete sich jedoch erneut der schwarze Niederschlag, so daß wiederum das gewünschte Produkt nicht isoliert werden konnte.

8.3.9.16 Darstellung von *N*-Trityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 135



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 200 mg (0.61 mmol) 9-[2-Diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **124** wurden in 1.5 mL wasserfreiem *N*,*N*-Dimethylformamid gelöst und 1.1 mL trockenes Pyridin hinzugegeben. Anschließend wurden 542 mg (1.94 mmol) Chlortriphenylmethan sowie 8.00 mg (31.0 µmol) 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 19 Stunden auf 40°C erhitzt. Nach Zugabe von 1 mL Methanol wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand zweimal mit je 25 mL Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in 20 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 15 mL Wasser sowie 15 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde abschließend am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 4%).

Ausbeute: 225 mg (0.39 mmol, 65%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.6

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.17 (s, 1H, H2), 7.89 (s, 1H, H8), 7.32 -7.19 (m, 16H, H(B)), H(C)), HD)), NH), 4.32 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H1'), 3.89 (dq, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HP} = 7.3 Hz, 2xCH₂), 3.87 (t, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H2'), 3.83 (d, ²J_{HP} = 8.5 Hz, H3'), 1.10 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2xCH₃) ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 153.6 (C6), 151.2 (C2), 148.9 (C(A)), 145.1 (C4), 141.9 (C8), 128.7 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.7 (C(D)), 120.4 (C5), 70.4 (C_q-*N*-Tr), 63.9 (d, ¹*J*_{CP} = 161 Hz, C3'), 61.8 (d, ³*J*_{CP} = 6.2 Hz, C2'), 42.7 (C1'), 16.3 (CH₃), 16.2 (CH₃)

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 22.05

8.3.9.17 Darstellung von *N*-Trityl-9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **136**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 200 mg (0.35 mmol) N-Trityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 135 wurden in 5 mL trockenem Acetonitril gelöst, 5 Tropfen wasserfreies Pyridin hinzugegeben 113 µL (134 mg, 0.88 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) zugetropft. Nach und sechzehnstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die flüchtigen Anteile im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde in 5 mL trockenem Dichlormethan 0 °C aufgenommen und auf gekühlt. Nun wurden 10 Tropfen wasserfreies N,N-Dimethylformamid zugegen. Anschließend tropfte man 90.0 µL (133 mg, 1.05 mmol) Oxalylchlorid vorsichtig zu. Unmittelbar nach Zugabe des ersten Tropfens Oxalylchlorid nahm das Reaktionsgemisch unter starkem Schäumen eine orange Farbe an. Bei weiterer Zugabe entstand ein grünlicher Niederschlag. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in 5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 174 mg (1.40 mmol) Salicylalkohol und 340 µL (247 mg, 2.45 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2 mL trockenem Dichlormethan zugetropft. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 5%).

Ausbeute: 20.0 mg (33.0 µmol, 9%) eines farblosen Öls

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.7

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.90 (s, 1H, H2), 7.82 (s, 1H, H8), 7.34 - 7.19 (m, 17H, H(B), H(C), H(D), Aryl-C4, NH), 7.14 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.4 Hz

Aryl-H6), 7.01 (dd, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.6$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.6$ Hz, Aryl-H5), 7.01 (d, ${}^{3}J_{HH} = 7.9$ Hz, Aryl-C3), 5.27 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.7$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 14.0$ Hz, H-Benzyl-a), 5.23 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.7$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 13.4$ Hz, H-Benzyl-b), 4.18 (dd, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H1'), 4.17 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 7.7$ Hz, H3'-a), 4.13 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 7.9$ Hz, H-Benzyl-b), 3.83 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.4$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-a), 3.79 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.4$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-b)

- ¹³C-NMR δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 153.5 (C6), 151.1 (C2), 149.6 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, Aryl-C2), 149.5 (C(A)), 145.2 (C4), 141.6 (C8), 129.9 (Aryl-C6), 128.8 (C(C)), 127.9 (C(B)), 126.8 (C(D)), 126.3 (Aryl-C4), 124.2 (Aryl-C5), 122.5 (Aryl-C1), 120.4 (C5), 117.9 (Aryl-C3), 70.7 (C_q-*N*-Tr), 70.2 (d ³J_{CP} = 12.2 Hz, C2'), 66.9 (d, ²J_{CP} = 7.1 Hz, C-Benzyl), 63.7 (d, ¹J_{CP} = 161 Hz, C3'), 42.5 (C1')
- ³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.55
- 8.3.9.18 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-*cyclo*Salphosphonylmethoxyethyl]adenin **134a** nach AAV 5



Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.83 mmol) N-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin 133, 269 µL (318 mg. 2.08 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) sowie 5 mL trockenes Acetonitril verwandt. Nach Koevaporieren mit 5 mL Toluol wurden 5 mL wasserfreies Dichlormethan und 364 mg (1.75 mmol) Phosphorpentachlorid eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 5 mL Toluol koevaporiert. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Rückstand in 2.5 mL wasserfreiem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 207 mg (1.66 mmol) Salicylalkohol und 440 µL (319 mg, 3.16 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2.5 mL trockenem Dichlormethan verwandt. Bei der abschließenden Aufreinigung Chromatotron wurde am ein Methanolgradient von 0 bis 4% in Dichlormethan verwandt.

Ausbeute: 244 mg (0.39 mmol, 46%) eines farblosen Schaumes

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.73

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.89 (s, 1H, H2), 7.3 (s, 1H, H8), 7.32 7.26 (m, 9H, H(B), H(C), Aryl-H4), 7.22 7.19 (m, 5H, H(D), H(F), NH), 7.14 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz Aryl-H6), 7.01 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, ³J_{HH} = 7.2 Hz, Aryl-H5), 7.01 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, Aryl-C3), 6.84 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.8 Hz, H(G)), 5.27 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HP} = 13.9 Hz, H-Benzyl-a), 5.23 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HP} = 13.2 Hz, H-Benzyl-b), 4.22 4.15 (m, 3H, H1', H3'-a), 4.13 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.2 Hz, ²J_{HP} = 7.9 Hz, H3'-b), 3.83 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.4 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H2'-b), 3.70 (s, 3H, OCH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 157.9 (C(H)), 153.6 (C6), 151.2 (C2), 149.6 (d, ²J_{CP} = 8.2 Hz, Aryl-C2), 148.8 (C(A)), 145.3 (C4), 141.6 (C8), 137.3 (C(E)), 130.0 (Aryl-C6), 129.9 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.7 (C(D)), 126.3 (Aryl-C4) 124.2 (Aryl-C5), 122.6 (³J_{CP} = 9.1 Hz, Aryl-C1), 120.4 (C5), 118.0 (d, ³J_{CP} = 13.6 Hz, Aryl-C3), 113.2 (C(G)), 70.5 (d, ³J_{CP} = 12.8 Hz, C2'), 70.1 (C_q-*N*-MMTr), 67.1 (d, ²J_{CP} = 7.0 Hz, C-Benzyl), 64.0 (d, ¹J_{CP} = 161 Hz, C3'), 55.2 (OCH₃), 42.5 (C1')
- ³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.56

MS (FAB; m/z): ber.: 633.21

gef.: 634.5 (M+H⁺)

8.3.9.19 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-Methyl-*cyclo*Sal)phosphonylmethoxyethyl]adenin **134b**



Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.50 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **133**, 161 μ L (191 mg, 1.25 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) sowie 3 mL wasserfreies Acetonitril verwandt. Nach Koevaporieren mit 5 mL Toluol wurden 4 mL trockenes Dichlormethan und 302 mg (1.05 mmol) Phosphorpentachlorid eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 5 mL Toluol koevaporiert. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Rückstand in 2 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 138 mg (0.99 mmol) 3-Methylsalicylalkohol und 264 μ L (192 mg, 1.89 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2 mL trockenem Dichlormethan verwandt. Bei der abschließenden Aufreinigung am Chromatotron wurde ein Methanolgradient von 0 bis 3% in Dichlormethan verwendet.

Ausbeute:102 mg (0.16 mmol, 32%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.75

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.85 (s, 1H, H2), 7.84 (s, 1H, H8), 7.31 7.19 (m, 13H, H(B), H(C), H(D), H(F), NH), 7.15 7.12 (m, 1H, Aryl-H4), 7.00 6.94 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 6.86 6.83 (m, 2H, H(G)), 5.25 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ³J_{HP} = 13.2 Hz, H-Benzyl-a), 5.26 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ³J_{HP} = 14.0 Hz, H-Benzyl-b), 4.20 4.13 (m, 3H, H1', H3'-a), 4.09 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ²J_{HP} = 7.6 Hz, H3'-b), 3.81 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H2'-a), 3.77 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H2'-b), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.09 (Aryl-CH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 157.9 (C(H)), 153.5 (C6), 151.2 (C2), 148.7 (C4), 148.1 (d, ²J_{CP} = 7.6 Hz, Aryl-C2), 145.4 (C(A)), 141.5 (C8), 137.3 (C(E)), 131.1 (Aryl-C4), 130.0 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.8 (Aryl-C3), 126.7 (C(D)), 123.8 (Aryl-C6), 123.7 (Aryl-C5), 122.8 (d, ³J_{CP} = 8.7 Hz, Aryl-C1), 120.4 (C5), 113.2 (C(G)), 70.5 (d, ³J_{CP} = 12.2 Hz, C2'), 70.0 (C_q-*N*-MMTr), 67.0 (d, ²J_{CP} = 8.2 Hz, C-Benzyl), 64.0 (d, ¹J_{CP} = 161 Hz, C3'), 55.1 (OCH₃), 42.5 (C1'), 15.0 (Aryl-CH₃)

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 17.46

MS (FAB; m/z): ber.: 647.23

gef.: 648.4 (M+H⁺)

8.3.9.20 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)phosphonylmethoxyethyl]adenin **134c**



Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.83 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **133**, 269 μ L (318 mg, 2.08 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) sowie 5 mL trockenes Acetonitril verwandt. Nach Koevaporieren mit 5 mL Toluol wurden 5 mL trockenes Dichlormethan und 364 mg (1.75 mmol) Phosphorpentachlorid eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 5 mL Toluol koevaporiert. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Rückstand in 2.5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 300 mg (1.66 mmol) 3-*tert*-Butylsalicylalkohol und 440 μ L (319 mg, 3.16 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2.5 mL trockenem wurde ein Methanolgradient von 0 bis 3% in Dichlormethan verwendet.

Ausbeute: 274 mg (0.40 mmol, 48%) eines farblosen Schaums

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.84 (s, 1H, H2), 7.81 (s, 1H, H8), 7.31 7.26 (m, 9H, H(B), H(C), Aryl-H4), 7.22 7.19 (m, 5H, H(D), H(F), NH), 7.07 7.02 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 6.84 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 8.8 Hz, H(G)), 5.24 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14 Hz, ³*J*_{HP} = 14 Hz, H-Benzyl-a), 5.20 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14 Hz, ³*J*_{HP} = 14 Hz, H-Benzyl-b), 4.19 (dd, 2H, ³*J*_{HH} = 5.0 Hz, ³*J*_{HH} = 5.0 Hz, H1'), 4.19 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.5 Hz, ²*J*_{HP} = 7.9 Hz, H3'-a), 4.13 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.5 Hz, ²*J*_{HP} = 8.2 Hz, H3'-b), 3.83 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.0 Hz, ³*J*_{HH} = 5.0 Hz, H2'-a), 3.80 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 11.0 Hz, ³*J*_{HH} = 5.0 Hz, H2'-b), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 1.26 (s, 9H, 3xCH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 157.9 (C(H)), 153.5 (C6), 151.2 (C2), 148.7 (Aryl-C2), 145.3 (C(A)), 141.6 (C8), 138.3 (C(E)), 137.3 (Aryl-C3), 129.9 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 127.3 (Aryl-C4), 126.6 (C(D)), 124.5 (Aryl-C6), 123.8 (Aryl-C5), 120.4 (C5), 120.3 (Aryl-C1), 113.2 (C(G)), 70.5 (d, ³*J*_{CP} = 13 Hz, C2'), 70.4 (C_q-*N*-MMTr), 67.0 (d, ²*J*_{CP} = 6 Hz, C-

Benzyl), 64.0 (d, ${}^{1}J_{CP} = 160 \text{ Hz}$, C3'), 55.1 (OCH₃), 42.7 (C1'), 34.4 (C_q-*tert*-Butyl), 29.7 (3xCH₃)

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.93

MS (FAB; m/z): ber.: 689.28

gef.: 690.5 (M+H⁺)

8.3.9.21 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)phosphonylmethoxyethyl]adenin **134d**



Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 500 mg (832 µmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **133**, 269 µL (318 mg, 2.08 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) sowie 5 mL wasserfreies Acetonitril verwandt. Nach Koevaporieren mit 5 mL Toluol wurden 5 mL trockenes Dichlormethan und 364 mg (1.75 mmol) Phosphorpentachlorid eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 5 mL Toluol koevaporiert. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Rückstand in 2.5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 392 mg (1.66 mmol) 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol und 440 µL (319 mg, 3.16 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2.5 mL trockenem Dichlormethan verwandt. Bei der abschließenden Aufreinigung am Chromatotron wurde ein Methanolgradient von 0 bis 3% in Dichlormethan verwandt.

Ausbeute: 193 mg (0.26 mmol, 31%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.84

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.85 (s, 1H, H2), 7.76 (s, 1H, H8), 7.30 - 7.26 (m, 9H, H(B), H(C), Aryl-H4), 7.22 - 7.19 (m, 4H, H(D), H(F)), 7.07 - 7.02 (m, 2H, Aryl-H6, NH), 6.84 (d, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 8.8$ Hz, H(G)), 5.27 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.7$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 13.6$ Hz, H-Benzyl-a), 5.22 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.7$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 13.9$ Hz, H-Benzyl-b), 4.19 (dd, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H1'), 4.17 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 6.9$ Hz, H3'-a), 4.10 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 8.8$ Hz, H3'-b), 3.83 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-a), 3.80 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 11.0$ Hz,
${}^{3}J_{\text{HH}} = 5-0$ Hz, H2'-b), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 1.26 (s, 9H, 3xCH₃-Aryl-C3), 1.26 (s, 9H, 3xCH₃-Aryl-C5)

¹³C-NMR δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 157.9 (C(H)), 153.5 (C6), 151.2 (C2), 148.7 (C4), 148.2 (C(A)), 145.9 (Aryl-C5), 145.3 (d, ²*J*_{CP} = 2.6 Hz, Aryl-C2), 141.6 (C8), 137.5 (C(E)), 137.3 (Aryl-C3), 129.9 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.7 (C(D)), 123.9 (Aryl-C4), 123.5 (d, ³*J*_{CP} = 8.5 Hz, Aryl-C1), 121.5 (Aryl-C6), 120.3 (C5), 113.1 (C(G)), 70.5 (d, ³*J*_{CP} = 13.2 Hz, C2'), 70.1 (C_q-*N*-MMTr), 67.3 (d, ²*J*_{CP} = 7.2 Hz, C-Benzyl), 63.9 (d, ¹*J*_{CP} = 162 Hz, C3'), 55.2 (OCH₃), 42.6 (C1'), 34.5 (C_q-Aryl-C3-*tert*-Butyl), 34.4 (C_q-Aryl-C5-*tert*-Butyl), 31.3 (3xCH₃-Aryl-C3), 29.7 (3xCH₃-Aryl-C5)

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.98

MS (FAB; m/z): ber.: 745.34

gef.: 746.2 (M+H⁺)





Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 71.0 mg (0.11 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134a** sowie 1 mL trockenes Dichlormethan und 250 μ L Trifluoressigsäure verwendet. Nach Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 8%) konnte das Produkt als Trifluoracetat isoliert werden.

Ausbeute: 28.4 mg (0.06 mmol, 53%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.25

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.47 (br. s, 1H, NH-Ha), 8.43 (br. s, 1H, NH-Hb), 8.39 (s, 1H, H2), 8.17 (s, 1H, H8), 7.45 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.5 Hz, ³*J*_{HH} = 7.5 Hz, Aryl-H4), 7.34 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.5 Hz, Aryl-H6), 7.27 (dd,

$$\begin{array}{ll} \mathrm{H,} \ {}^{3}J_{\mathrm{HH}}=7.5\ \mathrm{Hz},\ {}^{3}J_{\mathrm{HH}}=7.6\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{Aryl-H5}),\ 7.16\ (\mathrm{d,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{3}J_{\mathrm{HH}}=7.5\ \mathrm{Hz},\\ \mathrm{Aryl-H3}),\ 5.47\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=13.6\ \mathrm{Hz},\ {}^{3}J_{\mathrm{HP}}=14.0\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H-Benzyl-a}),\ 5.43\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=13.6\ \mathrm{Hz},\ {}^{3}J_{\mathrm{HP}}=14.0\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H-Benzyl-a}),\ 5.43\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=13.6\ \mathrm{Hz},\ {}^{3}J_{\mathrm{HP}}=12.9\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H-Benzyl-b}),\ 4.42\ -\ 4.39\ (\mathrm{m,}\ 1\mathrm{H},\\ \mathrm{H1}^{\,\,\mathrm{i}}),\ 4.32\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=14.9\ \mathrm{Hz},\ {}^{2}J_{\mathrm{HP}}=8.0\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H3}^{\,\,\mathrm{i}}\text{-a}),\ 4.29\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H},\\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=14.9\ \mathrm{Hz},\ {}^{2}J_{\mathrm{HP}}=6.9\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H3}^{\,\,\mathrm{i}}\text{-b}),\ 4.01\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=10.5\ \mathrm{Hz},\\ {}^{3}J_{\mathrm{HH}}=4.9\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H2}^{\,\,\mathrm{i}}\text{-a}),\ 3.97\ (\mathrm{dd,}\ 1\mathrm{H,}\ {}^{2}J_{\mathrm{HH}}=10.5\ \mathrm{Hz},\ {}^{3}J_{\mathrm{HH}}=5.4\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{H2}^{\,\,\mathrm{i}}\text{-b})\\ {}^{13}\text{C-NMR} \qquad \delta\ [\mathrm{ppm}]\ (100\ \mathrm{MHz},\ \mathrm{DMSO-d_{6}):\ 155.2\ (\mathrm{C6}),\ 152.8\ (\mathrm{C2}),\ 149.6\ (\mathrm{Aryl-C2}),\\ 148.0\ (\mathrm{C4}),\ 142.6\ (\mathrm{C8}),\ 129.9\ (\mathrm{Aryl-C6}),\ 126.2\ (\mathrm{Aryl-C4}),\ 124.2\ (\mathrm{Aryl-C5}),\\ 122.5\ (\mathrm{d,}\ {}^{3}J_{\mathrm{CP}}=9.2\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{Aryl-C1}),\ 120.5\ (\mathrm{C5}),\ 117.9\ (\mathrm{d,}\ {}^{3}J_{\mathrm{CP}}=6.6\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{Aryl-C3}),\ 70.4\ (\mathrm{d,}\ {}^{3}J_{\mathrm{CP}}=8.2\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{C2}^{\,\,\mathrm{i}}),\ 63.5\ (\mathrm{d,}\ {}^{1}J_{\mathrm{CP}}=161\ \mathrm{Hz},\ \mathrm{C3}^{\,\,\mathrm{i}})\\ {}^{31}\mathrm{P}-\mathrm{NMR} \qquad \delta\ [\mathrm{ppm}]\ (202\ \mathrm{MHz},\ \mathrm{DMSO-d_6}):\ 16.62\ \\\delta\ [\mathrm{ppm}]\ (471\ \mathrm{MHz},\ \mathrm{DMSO-d_6}):\ -74.40\ UV\ (\mathrm{CH}_3\mathrm{CN}):\ \lambda_{\mathrm{max}}\ [\mathrm{nm}]:\ 260.5\ \\\lambda_{\mathrm{max}}\ [\mathrm{nm}]:\ 228.5\ \end{tabular}$$

HPLC: $t_R = 9.41 \text{ min } (98.5\%, \text{ Gradient A})$

MS (ESI; m/z): ber.: 361.09

gef.: 362.26 (M+H⁺), 384, 28 (M+Na⁺)

8.3.9.23 Darstellung von 9-[2-(3-Methyl-cycloSal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin 34b



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 88.0 mg (0.14 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-Methyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134b** sowie 2 mL wasserfreies Dichlormethan und 500 μ L Trifluoressigsäure verwendet. Nach Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 8%) konnte das Produkt als Trifluoracetat isoliert werden.

Ausbeute: 44.6 mg (91.1 µmol, 67%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.34

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.31 (br. s, 1H, NH-Ha), 8.28 (br. s, 1H, NH-Hb), 8.24 (s, 1H, H2), 7.98 (s, 1H, H8), 7.17 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 6.3 Hz, Aryl-H4), 7.03 6.98 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 5.28 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.7 Hz, ³*J*_{HP} = 13.6 Hz, H-Benzyl-a), 5.23 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.7 Hz, ³*J*_{HP} = 13.9 Hz, H-Benzyl-b), 4.27 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.7 Hz, ³*J*_{HH} = 4.7 Hz, H1'-a), 4.22 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.7 Hz, ³*J*_{HH} = 4.7 Hz, H1'-b), 4.16 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.8 Hz, ²*J*_{HP} = 8.5 Hz, H3'-a), 4.12 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.8 Hz, ²*J*_{HP} = 7.3 Hz, H3'-b), 3.83 (t, 2H, ³*J*_{HH} = 4.7 Hz, H2'), 2.11 (s, 3H, Aryl-CH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d₆): 156.1 (C6), 152.5 (C2), 149.6 (C4), 148.2 (Aryl-C2), 140.9 (C8), 131.1 (Aryl-C4), 126.8 (d, ³J_{HH} = 5.6 Hz, Aryl-C3), 123.8 (Aryl-C6), 123.8 (Aryl-C5), 122.8 (d, ³J_{CP} = 9.1 Hz, Aryl-C1), 118.7 (C5), 70.6 (d, ³J_{CP} = 12.2 Hz, C2'), 67.0 (d, ²J_{CP} = 7.1 Hz, C-Benzyl), 64.1 (d, ¹J_{CP} = 161 Hz, C3'), 42.5 (C1'), 15.0 (Aryl-CH₃)
- ³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 17.49
- ¹⁹F-NMR δ [ppm] (471 MHz, DMSO-d₆): -74.46
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 273.0

λ_{min} [nm]: 240.0

- HPLC: $t_R = 11.47 \text{ min (98\%, Gradient A)}$
- MS (FAB; m/z): ber.: 375.11

gef.: 376.2 (M+H⁺)

8.3.9.24 Darstellung von 9-[2-(3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin **34c**



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 191 mg (0.28 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134c** sowie 2 mL wasserfreies Acetonitril und 750 μ L Trifluoressigsäure verwendet. Nach Lyophilisieren und Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 12%) konnte das Produkt als Trifluoracetat isoliert werden.

Ausbeute: 120 mg (227 µmol, 82%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.30

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.09 (s, 1H, H2), 7.81 (s, 1H, H8), 7.46 (s, 2H, NH₂), 7.28 (d, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 6.9$ Hz, Aryl-H4), 7.11 7.05 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 5.27 (dd, ${}^{2}J_{HH} = 13.8$ Hz,, ${}^{2}J_{HP} = 13.6$ Hz, H-Benzyl-a), 5.23 (dd, ${}^{2}J_{HH} = 13.8$ Hz,, ${}^{2}J_{HP} = 14.2$ Hz, H-Benzyl-b), 4.21 (dd, 2H, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H1'), 4.20 4.17 (m, 1H, H3'-a), 4.14 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.8$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 7.9$ Hz, H3'-b), 3.86 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 9.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-a), 3.82 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 9.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-a), 3.82 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 9.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-a), 3.82 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 9.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-a), 3.82 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 9.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.0$ Hz, H2'-b), 1.27 (s, 9H, 3xCH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 155.1 (C6), 151.3 (C2), 149.4 (C4), 148.6 (d, ²J_{CP} = 8.5 Hz, Aryl-C2), 141.4 (C8), 138.3 (d, ³J_{CP} = 5.2 Hz, Aryl-C3), 127.3 (Aryl-C4), 124.6 (Aryl-C5), 124.0 (d, ³J_{CP} = 8.5 Hz, Aryl-C1), 123.9 (Aryl-C6), 118.6 (C5), 70.6 (d, ³J_{CP} = 12.7 Hz, C2'), 67.0 (d, ²J_{CP} = 7.1 Hz, C-Benzyl), 64.0 (d, ¹J_{CP} = 162 Hz, C3'), 42.7 (C1'), 34.4 (C_q-tert-Butyl), 29.7 (3xCH₃)

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 17.06

¹⁹F-NMR δ [ppm] (471 MHz, DMSO-d₆): -74.32

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 259.0, 196.0

 λ_{max} [nm]: 231.0

HPLC: $t_{\rm R} = 12.08 \text{ min (99\%, Gradient A)}$

MS (FAB; m/z): ber.: 417.16

gef.: 418.3 (M+H⁺)

8.3.9.25 Darstellung von 9-[2-(3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin **34d**



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 145 mg (0.19 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-(3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134d** sowie 2 mL wasserfreies Acetonitril und 500 μ L Trifluoressigsäure verwendet. Nach Lyophilisieren und Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 10%) konnte das Produkt als Trifluoracetat isoliert werden.

Ausbeute: 75.0 mg (0.13 mmol, 66%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.42

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.07 (s, 1H, H2), 7.78 (s, 1H, H8), 7.29 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, Aryl-H4), 7.26 (s, 2H, NH₂), 7.16 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, Aryl-H6), 5.29 (dd, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ³J_{HP} = 13.4 Hz, H-Benzyl-a), 5.24 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ²J_{HP} = 14.2 Hz, H-Benzyl-b), 4.19 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H1'), 4.18 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.6 Hz, ²J_{HP} = 8.0 Hz, H3'-a), 4.11 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.6 Hz, ²J_{HP} = 8.2 Hz, H3'-b), 3.86 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.3 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H2'-a), 3.81 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.3 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, H2'-a), 1.26 (s, 9H, 3xCH₃-Aryl-C5)

¹³ C-NMR	δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d ₆): 155.7 (C6), 152.0 (C2), 149.5 (C4), 146.0		
	(d, ${}^{2}J_{CP} = 9.0$ Hz, Aryl-C2), 146.0 (Aryl-C5), 141.2 (C8), 137.6 (d,		
	${}^{3}J_{CP} = 5.0$ Hz, Aryl-C3), 123.9 (Aryl-C4), 123.6 (d, ${}^{2}J_{CP} = 8.6$ Hz, Aryl-C1),		
	121.5 (Aryl-C6), 118.7 (C5), 70.6 (d, ${}^{3}J_{CP} = 12.8$ Hz, C2'), 67.4 (d,		
	${}^{2}J_{CP}$ = 7.0 Hz, C-Benzyl), 64.0 (d, ${}^{1}J_{CP}$ = 161 Hz, C3'), 42.6 (C1'), 34.5 (C _q -		
	Aryl-C3-tert-Butyl), 34.4 (Cq-Aryl-C5-tert-Butyl), 31.3 (3xCH ₃ -Aryl-C3),		
	29.7 (3xCH ₃ -Aryl-C5)		
³¹ P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d ₆): 17.49			
¹⁹ F-NMR	δ [ppm] (471 MHz, DMSO-d ₆): -74.46		
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 259.0, 199.0		
	$\lambda_{\min} [nm]: 234.0$		
HPLC:	$t_{\rm R} = 16.43 \text{ min (99\%, Gradient A)}$		
MS (FAB; m/z):	ber.: 473.51		

gef.: 474.3 (M+H⁺)

8.3.9.26 Darstellung von Bis-(Triethylammonium)-*N*-4-monomethoxytrityl-2-(aden-9yl)ethoxymethylphosphonat **129**^[57]



400 mg (0.67 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-diethylphosphonylmethoxyethyl]adenin **133** wurden in 5 mL trockenem Acetonitril gelöst und 50 μ L wasserfreies Pyridin hinzugegeben. Unter Rühren wurden 215 μ L (255 mg, 1.66 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) hinzugetropft. Anschließend ließ man 12 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die orange Lösung wurde im Ölpumpenvakuum von flüchtigen Anteilen befreit und der Rückstand in 15 mL 1M wäßriger Triethylammoniumdihydrogencarbonatpufferlösung aufgenommen. Die Lösung wurde gefriergetrocknet und der resultierende Rückstand am Chromatotron aufgereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient von 10 bis 60%.

Ausbeute:312 mg (417 µmol, 63%) eines farblosen FeststoffsDC: R_{f} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.02

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.28 (s, 1H, H2), 7.88 (s, 1H, H8), 7.31 7.16 (m, 13H, H(B), H(C), H(D), H(F), NH), 6.83 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.9 Hz, H(G)), 4.27 (t, 2H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H1'), 3.80 (t, 2H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H2'), 3.70 (s, 3H, OCH3), 3.41 (d, 2H, ²J_{HP} = 8.5 Hz, H3'), 2.83 (br. s, 12H, 6xCH₂), 1.07 (br. s, 18H, 6xCH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 157.9 (C(H)), 153.6 (C6), 151.2 (C2), 148.8 (C(A)), 145.4 (C4), 142.3 (C8), 137.3 (C(E)), 130.0 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.7 (C(D)), 120.3 (C5), 113.2 (C(G)), 69.8 (d, ³J_{CP} = 10.5 Hz, C2'), 68.3 (d, ¹J_{CP} = 154 Hz, C3'), 55.2 (OCH₃), 45.2 (6xCH₂), 42.8 (C1'), 8.9 (6xCH₃)
- ³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 14.22
- 8.3.9.27 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-9-[2-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxyethyl]adenin **134a** nach AAV 4



Die Reaktion wurde analog zu AAV 4 durchgeführt. Es wurden 250 mg (0.39 mmol) Bis-(Triethylammonium)-*N*-4-monomethoxytrityl-2-(aden-9-yl)ethoxymethylphosphonat **129**, 350 mg (1.18 mmol) Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT), 59.0 mg (0.47 mmol) Salicylalkohol sowie 10 mL wasserfreies Pyridin eingesetzt.

Ausbeute: 58 mg (92.0 µmol, 23%) eines farblosen Schaums

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.73

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.89 (s, 1H, H2), 7.3 (s, 1H, H8), 7.32 - 7.26 (m, 9H, H(B), H(C), Aryl-H4), 7.22 - 7.19 (m, 5H, H(D), H(F), NH), 7.14 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz Aryl-H6), 7.01 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, $^{3}J_{HH} = 7.2$ Hz, Aryl-H5), 7.01 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, Aryl-C3), 6.84 (d, 2H, $^{3}J_{HH} = 8.8$ Hz, H(G)), 5.27 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HP} = 13.9 Hz, H-Benzyl-a), 5.23 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, ³J_{HP} = 13.2 Hz, H-Benzyl-b), 4.22 - 4.15 (m, 3H, H1', H3'-a), 4.13 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.2 Hz, ²J_{HP} = 7.9 Hz,

	H3'-b), 3.83 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.4$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 5.4$ Hz, H2'-a), 3.79 (dd, 1H,
	${}^{2}J_{\rm HH} = 10.4 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\rm HH} = 5.0 \text{ Hz}, \text{H2'-b}, 3.70 \text{ (s, 3H, OCH_3)}$
¹³ C-NMR	δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d ₆): 157.9 (C(H)), 153.6 (C6), 151.2 (C2), 149.6
	(d, ${}^{2}J_{CP} = 8.2$ Hz, Aryl-C2), 148.8 (C(A)), 145.3 (C4), 141.6 (C8), 137.3
	(C(E)), 130.0 (Aryl-C6), 129.9 (C(F)), 128.6 (C(C)), 127.8 (C(B)), 126.7
	(C(D)), 126.3 (Aryl-C4) 124.2 (Aryl-C5), 122.6 (${}^{3}J_{CP} = 9.1 \text{ Hz}$, Aryl-C1),
	120.4 (C5), 118.0 (d, ${}^{3}J_{CP} = 13.6 \text{ Hz}$, Aryl-C3), 113.2 (C(G)), 70.5 (d,
	${}^{3}J_{CP} = 12.8 \text{ Hz}, \text{ C2'}), 70.1 (C_{q}-N-MMTr), 67.1 (d, {}^{2}J_{CP} = 7.0 \text{ Hz}, \text{ C-Benzyl}),$
	64.0 (d, ${}^{1}J_{CP}$ = 161 Hz, C3'), 55.2 (OCH ₃), 42.5 (C1')

 δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.56

MS (FAB; m/z): ber.: 633.21

gef.: 634.5 (M+H⁺)

- 8.3.10 Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von (*R*)-9-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenin (PMPA) 12
- 8.3.10.1 Darstellung von (*R*)-9-[2-(3-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxypropyl]adenin **35a**



Die Reaktion wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.35 mmol) (R)-9-[2-Phosphonylmethoxypropyl]adenin (PMPA) **12**, 10 mL wasserfreies Pyridin, 309 mg (1.18 mmol) Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) sowie 69.0 mg (0.38 mmol) 3-*tert*-Butylsalicylalkohol eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 16 Stunden. Nach Aufarbeitung und Aufreinigung am Chromatotron mit Dichlormethan, dem 0.1% Essigsäure beigemischt wurde sowie einem Methanolgradienten von 0 bis 6%, konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden. Ausbeute:62.0 mg (0.14 mmol, 41%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch von 2Diastereomeren im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.32

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.09 (s, 1H, H2), 8.05 (s, 1H, H2), 7.79 (s, 1H, H8), 7.71 (s, 1H, H8), 7.33 7.29 (m, 2x1H, Aryl-H4), 7.25 (s, 2H, NH₂), 7.22 (s, 1H, NH₂), 7.12 7.07 (m, 4x1H, Aryl-H5, Aryl-H6), 5.32 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.2 Hz, ²*J*_{HP} = 13.0 Hz, H-Benzyl), 5.30 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 13.2 Hz, ²*J*_{HP} = 13.4 Hz, H-Benzyl), 5.25 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.2 Hz, ²*J*_{HP} = 14.0 Hz, H-Benzyl), 5.24 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.2 Hz, ²*J*_{HP} = 14.3 Hz, H-Benzyl), 4.21 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.2 Hz, ²*J*_{HP} = 9.1 Hz, H4'), 4.21 4.09 (m, 6x1H, 3xH1', 3xH4'), 4.04 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.5 Hz, ³*J*_{HH} = 6.0 Hz, H1'), 3.87 3.89, 2x1H, H2'), 1.32 (s, 9H, 3xCH₃), 1.29 (s, 9H, 3xCH₃), 0.95 (d, 3H, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, H3'), 0.94 (d, 3H, ³*J*_{HH} = 6.3 Hz, H3')
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 155.9 (C6), 155.8 (C6), 152.3 (C2), 152.2 (C2), 149.9 (C4), 149.5 (Aryl-C2), 141.3 (C8), 141.2 (C8), 138.3 (Aryl-C3), 138.2 (Aryl-C3), 127.3 (Aryl-C4), 127.3 (Aryl-C4), 124.6 (Aryl-C6), 124.5 (Aryl-C6), 124.2 (Aryl-C1), 124.2 (Aryl-C1), 123.9 (Aryl-C5), 123.8 (Aryl-C5), 121.0 (C5), 75.3 (d, ${}^{3}J_{CP} = 12.7$ Hz, C2'), 75.2 (d, ${}^{3}J_{CP} = 13.7$ Hz, C2'), 67.2 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.6$ Hz, C-Benzyl), 67.1 (d, ${}^{2}J_{CP} = 7.0$ Hz, C-Benzyl), 62.1 (d, ${}^{1}J_{CP} = 162$ Hz, C4'), 62.0 (d, ${}^{1}J_{CP} = 163$ Hz, C4'), 46.7 (C1'), 46.6 (C1'), 34.6 (Cq-Aryl-C3-*tert*-Butyl), 34.4 (Cq-Aryl-C5-*tert*-Butyl), 29.8 (3xCH₃), 16.7 (C3'), 16.6 (C3')
- ³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 17.48, 17.21 (2 Diastereomere im Verhältnis 1:1)
- UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 259.0, 196.0

λ_{min} [nm]: 233.0

HPLC: $t_R = 12.83 \text{ min}, 13.55 \text{ min} (99\%, \text{Gradient A})$

MS (FAB; m/z): ber.: 431.17

gef.: 432.2 (M+H⁺)

8.3.10.2 Darstellung von (*R*)-9-[2-(3,5-Di-*tert*-Butyl-*cyclo*Sal)-phosphonylmethoxypropyl]adenin **35b**



Die Reaktion wurde analog zu AAV 4 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.35 mmol) (*R*)-9-[2-Phosphonylmethoxypropyl]adenin (PMPA) **12** in 10 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und 309 mg (1.18 mmol) Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) zugegeben. Nach dreißigminütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 90.5 mg (0.38 mmol) 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol zugegeben und weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Aufreinigung am Chromatotron mit Dichlormethan, dem 0.1% Essigsäure beigemischt wurde sowie einem Methanolgradienten von 0 bis 5%, konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute:60 mg (0.12 mmol, 35%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch von 2Diastereomeren im Verhältnis 1:1

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.43

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.07 (s, 1H, H2), 8.04 (s, 1H, H2), 7.81 (s, 1H, H8), 7.71 (s, 1H, H8), 7.29 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 2.5$ Hz, Aryl-H4), 7.28 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 2.5$ Hz, Aryl-H4), 7.16 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 2.5$ Hz, Aryl-H6), 7.15 (s, 2H, NH2), 7.15 (d, 1H, ${}^{4}J_{HH} = 2.5$ Hz, Aryl-H6), 5.31 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.3$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 13.2$ Hz, H-Benzyl), 5.30 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.3$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 13.6$ Hz, H-Benzyl), 5.25 (dd, 2x1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.3$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 14.0$ Hz, 2xH-Benzyl), 4.18 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.2$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 8.8$ Hz, H4'), 4.17 4.07 (m, 6x1H, 3xH1', 3xH4'), 4.00 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 6.0$ Hz, H1'), 3.94 3.89 (m, 2x1H, H2'), 1.33 (s, 9H, $3xCH_3$ -Aryl-C3), 1.25 (s, 9H, $3xCH_3$ -Aryl-C5), 1.23 (s, 9H, $3xCH_3$ -Aryl-C5), 0.92 (d, 3H, ${}^{3}J_{HH} = 6.3$ Hz, H3'), 0.92 (d, 3H, ${}^{3}J_{HH} = 6.3$ Hz, H3')
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 156.0 (C6), 155.9 (C6), 152.5 (C2), 152.5 (C2), 150.0 (C4), 149.9 (C4), 149.6 (Aryl-C2), 149.5 (Aryl-C2), 146.0 (Aryl-C5), 145.9 (Aryl-C5), 141.2 (C8), 141.2 (C8), 137.7 (Aryl-C3), 137.6

	(Aryl-C3), 123.9 (Aryl-C4), 123.8 (Aryl-C4), 123.6 (Aryl-C1), 123.5 (Aryl-
	C1), 121.5 (Aryl-C6), 121.4 (Aryl-C6), 118.5 (C5), 118.4 (C5), 75.8 (d,
	${}^{3}J_{CP} = 12.7 \text{ Hz}, \text{ C2'}), 75.7 \text{ (d, } {}^{3}J_{CP} = 12.9 \text{ Hz}, \text{ C2'}), 67.6 \text{ (d, } {}^{2}J_{CP} = 6.1 \text{ Hz},$
	C-Benzyl), 67.5 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.5$ Hz, C-Benzyl), 62.2 (d, ${}^{1}J_{CP} = 163$ Hz, C4'),
	62.0 (d, ${}^{1}J_{CP} = 164$ Hz, C4'), 46.6 (C1'), 46.4 (C1'), 34.6 (C _q -Aryl-C3- <i>tert</i> -
	Butyl), 34.6 (C _q -Aryl-C3-tert-Butyl), 34.5 (C _q -Aryl-C5-tert-Butyl), 34.4
	$(C_q$ -Aryl-C5- <i>tert</i> -Butyl), 31.3 (3xCH ₃ -Aryl-C3), 31.3 (3xCH ₃ -Aryl-C3),
	29.8 (3xCH ₃ -Aryl-C5), 29.8 (3xCH ₃ -Aryl-C5), 16.7 (C3'), 16.6 (C3')
³¹ P-NMR	δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d ₆): 17.57, 17.31 (2 Diastereomere im
	Verhältnis 1:1)
UV (CH ₃ CN):	λ _{max} [nm]: 258.0, 199.0
	λ _{min} [nm]: 234.0
HPLC:	$t_R = 17.23 \text{ min}, 17.52 \text{ min} (99\%, \text{Gradient A})$
MS (FAB; m/z):	ber.: 431.17
	gef.: 432.2 (M+H ⁺)

- 8.3.11 Darstellung der *cyclo*Sal-Phosphonatdiester von (*S*)-9-[3-Hydroxy-2phosphonylmethoxypropyl]cytosin (HPMPC) **13**
- 8.3.11.1 Versuche der Darstellung von (*S*)-9-[3-Hydroxy-2-(3,5-di-*tert*-butyl-*cyclo*Salphosphonylmethoxypropyl]cytosin **36**



a) Die Reaktion wurde zunächst analog zu AAV 4 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.36 mmol) (S)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin (HPMPC) 13 mit 233 mg (0.79 mmol) Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) in 10 mL Pyridin aktiviert. Nach dreißigminütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 93.0 mg (0.39 mmol) 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol zugegeben und die Lösung 12 Stunden

bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung am Chromatotron konnte jedoch lediglich 3-Nitrotriazol isoliert werden.

- b) Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 100 mg (358 μmol) (S)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin (HPMPC) 13 wurden in 6 mL trockenem Dichlormethan suspendiert, 233 mg (0.79 mmol) Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde eine Lösung von 93.0 mg (0.39 mmol) 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol sowie 44.0 μL (42.7 mg, 0.54 mmol) wasserfreiem Pyridin in 1 mL trockenem Dichlormethan innerhalb von 1 Stunde zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 μL Essigsäure wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit je 5 mL Toluol koevaporiert. Nach chromatographischer Aufreinigung am Chromatotron mit Dichlormethan mit Methanolgradient konnte jedoch erneut nur 3-Nitrotriazol isoliert werden.
- 8.3.11.2 Darstellung von *O*-4,4'-Dimethoxytrityl-(*S*)-9-[3-Hydroxy-2phosphonylmethoxypropyl]cytosin **135**



Zu einer Suspension von 250 mg (0.79 µmol) (*S*)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin Dihydrat (HPMPC) **13** in 20 mL Methanol wurden 3.77 mL (2.94 g, 15.9 mmol) Tri-*n*-butylamin hinzugegeben, worauf eine klare Lösung entstand. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum abdestilliert und das resultierende Öl zweimal mit je 10 mL Acetonitril koevaporiert. Der Rückstand wurde in 7 mL wasserfreiem Dimethylsulfoxid aufgenommen und 805 mg (2.38 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) zugegeben. Die Reaktionslösung, welche sich langsam von rot nach gelb verfärbte, wurde 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in 60 mL Diethylether eingetragen. Aus der Lösung schied sich ein gelbes Öl ab. Die etherische Phase wurde abgetrennt und das Öl erneut mit 50 mL kaltem Diethylether behandelt. Es kristallisierte ein farbloser Festsoff aus. Die etherische Lösung wurde abdekantiert und der Feststoff mit 25 mL Essigsäureethylester gewaschen. Nach Abfiltrieren und Trocknen im Ölpumpenvakuum konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 420 mg (0.72 mmol, 91%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (*iso*-Propanol/Wasser/25%ige Ammoniaklösung 14:7:1 v/v/v): 0.47

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.75 (br. s, 1H, P-OH), 7.65 (br. s, 1H, P-OH), 7.52 (d, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.6$ Hz, H6), 7.40 7.07 (m, 11H, H(B), H(C), H(F), NH₂), 6.87 (d, 4H, ${}^{3}J_{HH} = 8.8$ Hz, H(G)), 5.62 (d, 1H, ${}^{3}J_{HH} = 7.6$ Hz, H5), 3.94 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.8$ Hz, H1'-a), 3.80 3.75 (m, 1H, H2'), 3.72 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.63 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 12.9$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 9.1$ Hz, H4'-a), 3.62 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.0$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.3$ Hz, H1'-b), 3.41 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 12.9$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 9.8$ Hz, H4'-b), 3.09 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.1$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.8$ Hz, H3'-a), 2.90 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.1$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 4.4$ Hz, H3'-b)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 164.5 (C4), 158.2 (C(D)), 152.9 (C2), 147.8 (C6), 144.9 (C(E)), 135.7 (C(A)), 135.6 (C(A)), 129.9 (C(B)), 128.0 (C(G)), 127.9 (C(F)), 126.8 (C(H)), 113.4 (C(C)), 93.1 (C5), 85.6 (C_q-*O*-DMTr), 78.6 (2, ³*J*_{CP} = 12.2 Hz, C2'), 66.7 (d, ¹*J*_{CP} = 160 Hz, C4'), 62.8 (C3'), 55.2 (2xOCH₃), 50.1 (C1')

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 16.95

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 277.0, 196.0

 λ_{min} [nm]: 253.0

Versuche der Darstellung von O-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-(3-tert-8.3.11.3 butyl-cycloSal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 136 nach AAV 4



- a)
- Die Reaktion wurde zunächst nach AAV4 durchgeführt. Es wurden 140 mg (0.24 mmol) *O*-4,4'-Dimethoxytrityl-(*S*)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 135, 7 mL wasserfreies Pyridin, 214 mg (0.72 mmol) Mesitylensulfonyl-3nitrotriazol (MSNT) sowie 48.0 mg (0.27 mmol) 3-tert-Butylsalicylalkohol verwandt. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung für 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden.
- b) In einem weiteren Versuch wurde eine Lösung von 140 mg (0.24 mmol) O-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 135 sowie 67 μL (48.6 mg, 0.48 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 4 mL trockenem Acetonitril unter einer Inertgasatmosphäre mit 157 mg (0.53 mmol)Mesitylensulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde eine Lösung von 48 mg (0.27 mmol) 3-*tert*-Butylsalicylalkohol sowie 67 µL (48.6 mg, 0.48 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2 mL trockenem Acetonitril innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde für weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden.

8.3.11.4 Versuch der Darstellung von *O*-4,4'-Dimethoxytrityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-(3-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin **136** mit Phosphorpentachlorid



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. 255 mg (439 μ mol) *O*-4,4'-Dimethoxytrityl-(*S*)-9-[3-Hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl]cytosin **135** wurden in 5 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zunächst wurde die Lösung mit 75 μ L (72.8 mg, 921 μ mol) wasserfreiem Pyridin versetzt und 5 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 266 mg (921 μ mol) Phosphorpentachlorid zugegeben. Die Reaktionslösung nahm unmittelbar nach der Zugabe von Phosphorpentachlorid eine orange Farbe an. Zunächst wurde 30 Minuten bei 0 °C und dann weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung des Reaktionsverlaufs zeigte jedoch lediglich eine vollständige Abspaltung der Schutzgruppe an.

8.3.11.5 Versuch der Darstellung von *N*,*O*-Bis-4,4'-Dimethoxytrityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-(3-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin **138**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Zunächst wurden 180 mg (0.31 mmol) O-4,4'-Dimethoxytrityl-(S)-9-[3hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 135 in 5 mL trockenem Acetonitril gelöst und nacheinander 173 µL (125.6 mg, 1.24 mmol) wasserfreies Triethylamin und 209 mg (0.62 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und der Verlauf der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 2.5 Stunden war das Ausgangsmaterial vollständig verbraucht und das Lösungsmittel wurde nach Zugabe von 1 mL Methanol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 4 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und mit einer Lösung von 61.0 mg (0.34 mmol) 3-tert-Butylsalicylalkohol sowie 86 µL (62.4 mg, 0.62 mmol) wasserfreiem $2 \, \text{mL}$ trockenem Dichlormethan Die Triethylamin in behandelt. dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion ließ jedoch keinerlei Produktbildung erkennen.

8.3.11.6 Darstellung von *O*-Trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin **140**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. *N*-Benzoyl-*O*-trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin **139** (2.00 g, 2.93 mmol) wurde in 5 mL wasserfreiem Methanol gelöst und mit 158 mg (2.93 mmol) Natriummethanolat versetzt. Zunächst ließ man die Reaktionslösung 6 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte jedoch nur geringen Umsatz an. Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C gerührt, bis dünnschichtchromatographisch ein vollständiger Umsatz detektiert werden konnte (12 h). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung zur Neutralisation mit 200 mg Dowex 50 X8 (H⁺-Form) versetzt und 5 Minuten gerührt. Anschließend wurde vom Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde am Chromatotron aufgereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 20%.

Ausbeute: 1.23 g (2.13 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.36

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 7.41 7.24 (m, 16H, H(B), H(C), H(D), H6), 7.05 (br. s, 1H, NH-Ha), 6.95 (br. s, 1H, NH-Hb), 5.55 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H5), 4.02 - 3.93 (m, 4H, 2xCH₂), 3.88 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.2 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H1'-a), 3.85 - 3.82 (m, 1H, H2'), 3.83 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ²J_{HP} = 8.7 Hz, H4'-a), 3.72 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ²J_{HP} = 9.1 Hz, H4'-b), 3.66 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.2 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H1'-b), 3.18 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.6 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, H3'-a), 2.91 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.5 Hz, ³J_{HH} = 4.7 Hz, H3'-b), 1.18 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 2xCH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 166.0 (C4), 155.7 (C2), 146.9 (C6), 143.6 (C(A)), 128.4 (C(C)), 128.1 (C(B)), 127.3 (C(D)), 93.0 (C5), 86.2 (C_q-*O*-Tr), 78.8 (d, ³J_{CP} = 12.2 Hz, C2'), 63.4 (d, ¹J_{CP} = 163 Hz, C4'), 62.9 (C3'),

61.9 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 6.7 Hz, CH₂), 61.8 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 6.6 Hz, CH₂), 50.1 (C1'), 16.4 (CH₃), 16.3 (CH₃) δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 21.93

8.3.11.7 Darstellung von *N*-4-Monomethoxytrityl-*O*-trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin **141**



Die Reaktion wurde zum Ausschluß von Feuchtigkeit in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Es wurden 1.23 g (2.13 mmol) O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin 140 in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und nacheinander 742 µL (539 mg, 5.32 mmol) wasserfreies Triethylamin, 26.0 mg (0.21 mmol)4-Dimethylaminopyridin sowie 1.64 g (5.32 mmol) 4-Monomethoxytritylchlorid zugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach sechzehnstündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte ein vollständiger Umsatz detektiert werden. Die Reaktionslösung wurde mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser sowie gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren vom Trockenmittel unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde abschließend am Chromatotron mit Dichlormethan mit einem Methanolgradienten von 0 bis 4% aufgereinigt.

Ausbeute: 1.45 g (1.71 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.77

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.22 (s, 1H, H2), 7.37 - 7.10 (m, 28H, 15xTr-H, 12xMMTr-H, H6), 6.81 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H(G)), 6.08 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H5), 3.95 (q, 4H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 2xCH₂), 3.90 - 3.72 (m, 3H, H1'-a, H4'), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.9 Hz, ³J_{HH} = 9.1 Hz, H1'-b), 3.09 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.5 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H3'-a),

³¹P-NMR

2.87 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 10.5$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 3.5$ Hz, H3'-b), 1.17 (t, 6H, ${}^{3}J_{HH} = 7.0$ Hz, 2xCH₃) ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 161.8 (C4), 152.1 (C2), 145.5 (C6), 143.6 (C(A)-Tr), 130.1, 128.8, 128.4, 128.1, 127.5, 127.3, 126.3 (C-Tr, C-MMTr), 112.9 (C(C)-MMTr), 95.4 (C5), 86.2 (C_q-O-Tr), 78.6 (d, ${}^{3}J_{CP} = 12.2$ Hz, C2'), 63.4 (d, ${}^{1}J_{CP} = 162$ Hz, C4'), 62.9 (C_q-N-MMTr), 62.0 (C3'), 61.9 (d, ${}^{2}J_{CP} = 6.2$ Hz, CH₂), 55.1 (OCH₃), 50.1 (C1'), 16.5 (CH₃), 16.4 (CH₃) δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 22.91

8.3.11.8 Versuch der Darstellung von N-4-Monomethoxytrityl-O-trityl-(S)-9-[3-hydroxy 2-(3-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin 142 nach AAV 5



Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.59 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-*O*-trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin **141**, 190 μ L (225 mg, 1.47 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr) sowie 5 mL wasserfreies Acetonitril verwandt. Nach Koevaporieren mit 5 mL Toluol wurden 5 mL trockenes Dichlormethan und 257 mg (1.24 mmol) Phosphorpentachlorid eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 5 mL Toluol koevaporiert. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Rückstand in 2.5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 278 mg (1.18 mmol) 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol und 312 μ L (226 mg, 3.16 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2 mL trockenem Dichlormethan verwandt. Dünnschichtchromatographisch konnten neben dem Startfleck und dem Salicylalkohol keine weiteren Produkte detektiert werden.





Die Reaktion wurde analog zu AAV 5 durchgeführt. Es wurden 700 mg (0.82 mmol) *N*-4-Monomethoxytrityl-*O*-trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]cytosin **141**, 260 μ L (315 mg, 2.06 mmol) Bromtrimethylsilan (TMSBr), sowie 6 mL wasserfreies Acetonitril verwandt. Nach Koevaporieren mit 5 mL Toluol wurden 5 mL trockenes Dichlormethan und 360 mg (1.73 mmol) Phosphorpentachlorid eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 5 mL Toluol koevaporiert. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Rückstand in 2.5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und eine Lösung von 214 mg (0.91 mmol) 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol und 172 μ L (125 mg, 1.24 mmol) wasserfreiem Triethylamin in 2 mL trockenem Dichlormethan verwandt. Bei der abschließenden Aufreinigung am Chromatotron wurde ein Methanolgradient von 0 bis 3% in Dichlormethan verwendet.

Ausbeute:360 mg (0.36 mmol, 44%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch von 2Diastereomeren im Verhältnis 1:1.5

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1 v/v): 0.29

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.23 (s, 1H, NH), 7.32 7.09 (m, 29H, 15xTr-H, 12xMMTr-H, Aryl-H4, Aryl-H6), 6.98 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 6.3 Hz, H6), 6.93 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 5.3 Hz, H6), 6.03 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 6.3 Hz, H5), 5.94 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 5.3 Hz, H5), 5.35 (dd, 2x1H, ²*J*_{HH} = 11.3 Hz, ³*J*_{HP} = 11.3 Hz, H-Benzyl), 5.24 (dd, 2x1H, ²*J*_{HH} = 14.8 Hz, ³*J*_{HP} = 14.8 Hz, H-Benzyl), 4.05 3.55 (m, 4H, H1'-a, H2', H4'), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.48 3.39 (m, 1H, H1'-b), 3.09 (dd, 1H, ²*J*_{HH} = 10.1 Hz, ³*J*_{HH} = 3.2 Hz, H3'-a), 2.85 2.75 (m, 1H, H3'-b), 1.34 (s, 9H, 3xCH₃), 1.29 (s, 9H, 3xCH₃), 1.25 (s, 18H, 6xCH₃)
- ¹³C-NMR δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d₆): 163.9 (C4), 151.3 (C2), 150.1 (Aryl-C2), 146.0 (Aryl-C5), 145.6 (C6), 143.5 (C(A)-Tr), 136.4 (Aryl-C3), 130.1,

128.8, 128.3, 128.0, 128.0, 127.5, 127.2, 127.2 (C-Tr, C-MMTr), 123.9
(Aryl-C4), 123.8 (Aryl-C4), 122.7 (Aryl-C1), 121.3 (Aryl-C6), 112.9 (C(C)-
MMTr), 112.8 (C(C)-MMTr), 97.6 (C5), 86.2 (C _q -O-Tr), 78.8 (d,
${}^{3}J_{CP} = 13.8 \text{ Hz}, \text{ C2'}), 67.7 \text{ (d, } {}^{2}J_{CP} = 8.4 \text{ Hz}, \text{ C-Benzyl}), 64.3 \text{ (C}_{q}\text{-}N\text{-}MM\text{Tr}),$
63.5 (d, ${}^{1}J_{CP}$ = 161 Hz, C4'), 62.7 (C3'), 55.1 (OCH ₃), 53.6 (C1'), 34.6 (C _q -
Aryl-C3-tert-Butyl), 34.6 (Cq-Aryl-C3-tert-Butyl), 34.5 (Cq-Aryl-C5-tert-
Butyl), 31.3 (3xCH ₃ -Aryl-C3), 29.8 (3xCH ₃ -Aryl-C5), 29.8 (3xCH ₃ -Aryl-
C5)

³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 17.07, 15.92 (2 Diastereomere im Verhältnis 1:1.5)

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 277.0, 211.0

λ_{min} [nm]: 258.0

MS (Maldi; m/z):ber.: 993.45

gef.: 1016.22 (M+Na⁺), 1032.41 (M+K⁺)

8.3.11.10 Darstellung von (S)-9-[3-Hydroxy-2-(3,5-Di-*tert*-butyl-*cyclo*Salphosphonylmethoxypropyl]cytosin **36**



Die Reaktion wurde analog zu AAV 6 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.12 mmol) von *N*-4-Monomethoxytrityl-*O*-trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-(3-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-phosphonylmethoxypropyl]cytosin **142**, 2 mL wasserfreies Dichlormethan sowie 500 μ L Trifluoressigsäure verwandt. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten auf 40 °C erwärmt. Anschließend wurde die Reaktionslösung direkt am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient von 0 bis 15% sowie 0.1% Essigsäure) aufgereinigt.

Ausbeute:56.0 mg (0.09 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch von 2Diastereomeren im Verhältnis 1:1.5

DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.21

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.96 (s, 2H, NH₂), 7.29 (d, 2x1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 2,5$ Hz, Aryl-H4), 7.25 (d, 1H, ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.4$ Hz, H6), 7.18 (d, 1H, ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.4$ Hz, h&9; 7.17 (d, 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 2.5$ Hz, Aryl-H6), 7.15 (d. 1H, ${}^{4}J_{\rm HH} = 2.5$ Hz, Aryl-H6), 5.67 (d, 1H, ${}^{3}J_{\rm HH} = 6.4$ Hz, H5), 5.53 (d, 1H, ${}^{3}J_{\text{HH}} = 6.4 \text{ Hz}, 5.44 \text{ (dd, 1H, } {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 10.7 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-a}),$ 5.36 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.6$ Hz, ${}^{3}J_{HP} = 13.4$ Hz, H-Benzyl-a), 5.26 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.0 \text{ Hz}, {}^{3}J_{\text{HP}} = 14.5 \text{ Hz}, \text{ H-Benzyl-b}, 5.25 \text{ (dd, 1H, } {}^{2}J_{\text{HH}} = 13.6 \text{ Hz},$ ${}^{3}J_{\text{HP}} = 16.4 \text{ Hz}$, H-Benzyl-b), 4.28 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{HP}} = 7.7 \text{ Hz}$, H4'-a), 4.20 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 14.5$ Hz, ${}^{2}J_{HP} = 8.2$ Hz, H4'-a), 4.13 (dd, 1H, ${}^{2}J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz}, {}^{2}J_{\text{HP}} = 8.5 \text{ Hz}, \text{H4}^{2}\text{-b}, 4.09 \text{ (dd, } 1\text{H}, {}^{2}J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz},$ $^{2}J_{\rm HP} = 8.5$ Hz, H4'-b), 3.86 - 3.78 (m, 4H, H3'), 3.67 - 3.61 (m, 2x1H, H2'), 3.58 (dd, 1H, ${}^{2}J_{HH} = 13.8$ Hz, ${}^{3}J_{HH} = 7.3$ Hz, H1'-a), 3.55 (dd, 1H, $^{2}J_{\text{HH}} = 13.8 \text{ Hz}, \,^{3}J_{\text{HH}} = 7.25 \text{ Hz}, \,\text{H1'-b}, \, 1.34 \text{ (s}, \,9\text{H}, \,3\text{xCH}_{3}\text{-Aryl-C3}), \, 1.33$ (s, 9H, 3xCH₃-Aryl-C3), 1.26 (s, 9H, 3xCH₃-Aryl-C5), 1.26 (s, 9H, 3xCH₃-Aryl-C5)
- ³¹P-NMR δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): 17.56, 16.86 (2 Diastereomere im Verhältnis 1:1.5)

¹⁹F-NMR δ [ppm] (471 MHz, DMSO-d₆): -74.17

UV (CH₃CN): λ_{max} [nm]: 277.0, 198.0

λ_{min} [nm]: 248.0

MS (FAB; m/z): ber.: 479.22

gef.: 480.3 (M+H⁺)

8.4 Hydrolyseexperimente

8.4.1 Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer

Die Hydrolysekinetiken wurden mit Hilfe einer 50.0 mM Phosphatpufferlösung bei pH 7.3 und pH 6.8 durchgeführt.

Von den Prodrug-Verbindungen wurden 1.9 mM Stammlösungen in Wasser angesetzt, indem man 11.4 µL einer 50 mM Stammlösung der Prodrugs in DMSO mit 300 µL Wasser mischte. 300 µL der Pufferlösung sowie 5 µL einer AZT-Lösung (10 mg/mL; interner Standard) wurden in einem Eppendorf-Cap vorgelegt und mit Hilfe eines Thermomixers auf 37 °C temperiert. Durch Hinzupipettieren von 300 µL der Stammlösungen und kurzes Durchmischen (Vortex) wurden die Hydrolysen gestartet (t₀). (Gesamtkonzentrationen der Hydrolyselösungen: c_{Puffer} = 24.8 mM, c_{Triester} = 0.94 mM). Unmittelbar nach Zugabe der Pufferlösung wurde ein erstes Aliquot (60 µL) entnommen zum Stoppen der Hydrolyse in ein Eppendorf-Cap zu einem Tropfen Essigsäure pipettiert und sofort auf -196 °C (flüssiger Stickstoff) abgekühlt. Zu verschiedenen Zeitabständen wurden weitere Aliquote entnommen die analog der Nullprobe behandelt wurden. Alle Proben wurden HPLC-analytisch untersucht. Die Auswertung erfolgte anschließend mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel® indem der Quotient der Peakflächen des Triesters und des internen Standards (AZT) (normierte Integrationseinheiten) gegen die Hydrolysezeit (h) graphisch aufgetragen wurde. Die Geschwindigkeitskonstante k der Hydrolyse der Phosphattriester konnte berechnet werden, indem eine exponentielle Ausgleichskurve durch die experimentell bestimmten Punkte gelegt wurde. Aus diesen Werten für k konnten anschließend nach der Gleichung für Geschwindigkeitsgesetze 1. Ordnung

$$\mathbf{t}_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet werden (wegen des Überschusses an Wasser kann die Hydrolyse als Reaktion *pseudo*-1. Ordnung angesehen werden).

8.4.2 Hydrolysekinetiken in Zellextrakt (CEM/0)

Das CEM/0 Zellhydrolysat wurde von Prof. J. Balzarini, Katholische Universität Leuven zur Verfügung gestellt. Die Studien wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C in einem Thermomixer durchgeführt. Von den Phosphattriestern wurde eine 1.5 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid angesetzt. 20 µL dieser Stammlösung wurden in ein Eppendorf-Cap zu

100 μ L Zellextrakt und 20 μ L einer 70 mM Magnesiumchloridlösung gegeben. Durch kurzes Durchmischen (Vortex) wurde die Hydrolyse gestartet (t₀). Für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt der Kinetik wurde ein separates Cap bereitet, um eine Kontamination des Mediums zu verhindern. Zum Stoppen der Hydrolyse wurden 300 μ L einer essigsauren Methanollösung zugegeben, durchmischt und 5 Minuten bei 0 °C gelagert. Anschließend wurde bei 13.000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten zentrifugiert, filtriert (Schleicher-Schuell Spartan 13/30, 0.2 μ m) und das Filtrat mittels reversed-phase HPLC analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Absolutflächen des Triester gegen die Hydrolysezeit (t). Die Geschwindigkeitskonstante *k* wurde durch eine exponentielle Ausgleichskurve bestimmt und aus ihr die Hydrolysehalbwertszeit t_{1/2} berechnet.

8.4.3 Hydrolysekinetiken in humanem Serum

Die Studien wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C in einem Thermomixer durchgeführt. Von den Phosphattriestern wurde eine 1.5 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid angesetzt. 20 µL dieser Stammlösung wurden in ein Eppendorf-Cap zu einer 20% igen Lösung von humanem Serum in Phosphatpuffer (pH 6.8) sowie 20 µL einer 70 mM Magnesiumchloridlösung gegeben. Durch kurzes Durchmischen (Vortex) wurde die Hydrolyse gestartet. Für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt der Kinetik wurde ein separates Cap bereitet, um eine Kontamination des Mediums zu verhindern. Zum Stoppen der Hydrolyse wurden 300 µL einer essigsauren Methanollösung zugegeben, durchmischt und 5 Minuten bei 0 °C gelagert. Anschließend wurde bei 13.000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten zentrifugiert, filtriert (Schleicher-Schuell Spartan 13/30, 0.2 µm) und das Filtrat mittels reversed-phase HPLC analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Absolutflächen des Triester gegen die Hydrolysezeit (t). Die Geschwindigkeitskonstante kwurde durch eine exponentielle Ausgleichskurve bestimmt und aus ihr die Hydrolysehalbwertszeit $t_{1/2}$ berechnet.

8.4.4 ³¹P-NMR-Hydrolysestudien

Es wurden 7 µmol des jeweiligen *cyclo*Sal-Nucleotids eingewogen, in 300 µL DMSO-d₆ gelöst und 700 µL eines 50 mM Imidazol-Salzsäure-Puffers (pH = 7.3) zugegeben. Die Kinetiklösung wurde sofort ³¹P-NMR-spektroskopisch (¹H-entkoppelt, 202 MHz) vermessen. Die Hydrolyselösung wurde bei Raumtemperatur gelagert und der zeitliche Verlauf der Hydrolyse ³¹P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Zur Identifizierung der Hydrolyseprodukte wurden teilweise auch ¹H-gekoppelte ³¹P-NMR-Spektren aufgenommen.

8.5 Cholinesterase-Assay

Es wurden nacheinander 40 μ L der Natrumchlorid-Lösung, 370 μ L *m*-Nitrophenol-Lösung, 40 μ L Acetylcholinchlorid-Lösung, 20 μ L einer Lösung des jeweiligen *cyclo*Sal-Phosphattriesters bzw. -Phosphonatdiesters in Dimethylsulfoxid sowie 430 μ L Wasser in eine Quarzküvette pipettiert. Die Konzentrationen der Prodrug-Lösungen wurden, falls notwendig, wie folgt variiert: 2.5 mM, 1.5 mM, 500 μ M, 250 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 5 μ M. Daraus resultierten folgende finale Inhibitor-Konzentrationen in der Gesamtmischung: 50 μ M, 30 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.1 μ M. Falls die Substanz keinerlei Inhibition bei einer Konzentration von 50 μ M zeigte, wurde auf weitere Verdünnungen verzichtet.

Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von $100 \,\mu$ L humanen Blutserums (Mix von fünf Probanden) und Durchmischen gestartet. Die Küvetten wurden sofort in das zuvor auf 25 °C temperierte UV-Spektrometer gestellt und die Extinktion bei 420 nm (Zweistrahlmodus gegen Wasser als Referenz) in Abständen von 1 Minute über einen Zeitraum von maximal 17 Minuten gemessen. Ein Reaktionsansatz mit reinem Dimethylsulfoxid lieferte als Referenzwerte eine Abnahme der Extinktion von 0.1329 nach 5 Minuten und von 0.2768 nach 15 Minuten Reaktionszeit.

Zur Auswertung wurde für jede getestete Substanz die Abnahme der Extinktion bei der jeweiligen Inhibitor-Konzentration nach 5 bzw. 15 Minuten ermittelt. Diese Werte wurden graphisch gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Die so erhaltenen empirischen Kurven zeigten einen pseudolinearen Bereich, in dem mit Hilfe eines Tabellenkakulationsprogrammes eine lineare Regression erfolgte. Aus der so erhaltenen Geraden ließ sich der entsprechende IC₅₀-Wert, repräsentiert durch eine Extinktionsabnahme von 0.0665 nach 5 Minuten bzw. 0.1384 nach 15 Minuten, ablesen.

9. Gefahrstoffe

Verbindung	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	11-23/24/25	16-27-45
Allylbromid	11-23/24/25-36/37/38	16-26-36/37/39-45
α, α' -Azoisobutyronitril	2-11-20/22-52/53	39-41-47.1-61
Benzol	20/21/22-40-52/53	36/37-61
Benzolsulfonsäure	22-34	26-36/37/39-45
Bromtrimethylsilan	10-34	26-36/37/39-45
2,4-Di-tert-butylphenol	36/38-51/53	26-61
(1S)-(–)-Camphansäure		22-24/25
(+)-Campher-10-sulfochlorid	34-	26-36/37/39-45
Chlorameisensäurefluorenyl- methoxycarbonylester	34	26-36/37/39-45
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37
Chlortriphenylmethan	38	22-25
Dichlormethan	40	23.2-24/25-36/37
1,3-Dichlor-2-propanol	21-25-45	45-53
Dicyclohexylcarbodiimid	22-24-41-43	24-26-37/39-45
Diethylether	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Di-iso-propylethylamin	11-22-34-52/53	16-26-36/37-39-45-61
4,4'-Dimethoxytritylchlorid		22-24/25
4-Dimethylaminopyridin	25-36/38	37-45
N,N-Dimethylformamid	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	36/38	26
Essigsäure	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Essigsäureethylester	11-36-66-67	16-26-33
Hexamethyldisilazan	11-21/22/24	16-26-36/37/39-45
Lithiumaluminiumhydrid	15	7/8-24/25-43.6
Mesitylensufonyl-3-nitrotriazol		22-24/25
Methanol	23/24/25-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Natrium	14/15-34	5.1-8-43.12-45
Natriumazid	28-32-50/53	28-45-60-61
Natriumhydrid	15-34	7/8-26-36/37/39-43.6-45

Verbindung	R-Sätze	S-Sätze
Natriummethanolat	11-14-34	8-16-26-43.6-45
Natriumrhodanid	20/21/22-32	13
Natronlauge	34	26-36/37/39-45
Oxalylchlorid	14-23-34-37	26-36/37/39-45
Phosphorpentachlorid	14-22-26-34-48/20	7/8-26-36/37/39-45
di-Phosphorpentoxid	35	22-26-45
Phosphorsäure	11-36/38-67	7-16-23.3-24-26-51
Phosphortrichlorid	14-26/28-35-48/20	7/8-26-36/37/39-45
Pyridin	25-26-36/37/38-50/53	26-28.1-36/37-45-61
Salzsäure	34-37	26-36/37/39-45
tert-Butyldimethylsilylchlorid	10-34	26-36/37/39-45
tert-Butylhydroperoxid	7-21/22-23-34-44-52/53	3/7-14.11-26-36/37/39-45
Tetrabutylammoniumfluorid	11-23/24/25-34	16-26-36/37/39-45
Tetrabutylammoniumhydroxid	34	26-36/37/39-45
Tetrabutylammoniumiodid	22-36/37/38	26-36
Tetrachlormethan	23/24/25-40-48/23-52/53-59	23.2-36/37-45-59-61
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	22-43-50/53	24-37-60-61
Tri- <i>n</i> -butylamin	24/25-34	36/37/39-45
Tri- <i>n</i> -butylstannan	21-25-36/38-48/23/25-50/53	35-36/37/39-45-60-61
Triethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Trifluormethansulfonsäure- anhydrid	35	26-36/37/39-45
Trimethylorthoacetat	11-38-43	9-16-24/25-37
Trimethylsilyltrifluormethan- sulfonat	10	

10. Literaturverzeichnis

- ^[1] M. Popovic, M. G. Sarngadharan, E. Reed. R. C. Gallo; Detection, isolation and continous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS; *Science* **1984**, *224*, 497 499.
- R. C. Gallo, F. Wong-Staal; A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome; *Ann. Intern. Med.* 1985, *103*, 679 689.
- ^[3] F. Barré-Sinoussi, J. C. Cherman, F. Rey, M. T. Nugeyere, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauget, C. Axler-Bhin, F. Yenizet, Brun, C. Rozioux, L. Montagnier; Isolation of a T-lymphocytic retrovirus from a patient at risk for AIDS; *Science* 1983, *220*, 868 871.
- ^[4] UNAIDS, *Report on the global HIV/AIDS epidemic*, UNAIDS, Barcelona, **2002**.
- K. E. Nye, J. M. Parkin; *HIV und AIDS Die molekularbiologischen Grundlagen*,
 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995.
- ^[6] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1999**.
- E. De Clercq; Strategies in the Design of Antiviral Drugs; *Nature Reviews* 2002, *11*, 13 25.
- ^[8] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq; Differential Patterns of intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidine and 3'-Azido-2',3'dideoxythymidine, Two Potent Anti-human Immunodeficiency Virus Compounds; *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 6127 – 6133.
- E. De Clercq, A. Holý, I. Rosenberg, T. Sakuma, J. Balzarini, P. C. Maudgal; A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent; *Nature* 1986, 323, 464 467.
- [10] E. De Clercq; Cidofovir in the treatment of poxvirus infections; *Antiviral Res.* 2002, 55, 1-13.
- ^[11] J. M. Whitcomp, S. H. Hughes; Retroviral Reverse Transcription and Integration: Progress and Problems; *Ann. Rev. Cell Biol.* **1992**, *8*, 275 – 306.
- ^[12] G. L. Kenyon; AZT monophosphate knocks thymidylate kinase for a loop.; *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 595 598.

- [13] J. Balzarini, Z. Hao, P. Herdewijn, D. G. Johns, E. De Clercq; Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 85 – 96.
- [14] X. Xiong, J. L. Smith, M. S. Chen; Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, *41*, 594 – 599.
- ^[15] N. Mourad, R. E. Parks; Erythrocytic nucleoside diphosphokinase. II. Isolation and kinetics; *J. Biol. Chem.* 1966, *241*, 271 278.
- ^[16] D. L. Earnshaw, T. H. Bacon, S. J. Darlison, K. Edmonds, R. M. Perkins, R. A. Vere Hodge; Mode of Antiviral Action of Penciclovir in MRC-5 Cells Infected with Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1), HSV-2, and Varicella-Zoster Virus; *Antimicrob. Agents. & Chemother.* **1992**, 2747 – 2757.
- ^[17] E. De Clercq; Antivirals for the treatment of herpesvirus infections; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Suppl. A* **1993**, *32*, 121 132.
- C. Meier; Pro-Nucleotides Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates; *Synlett* 1997, 233 – 242.
- H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furmann, M. H. St. Clair, S. Nusinoff-Lehrmann, R. C. Gallo, D. P. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, 3'-Azido-2'-deoxythymidine (BW A509U): An Antiviral Agent that Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-lymphotropic Virus Type III / Lymphadenopathy-Associated Virus *in vitro*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, *82*, 7096 7100.
- P. A. Furmann, J. A. Fyfe, M. H. St. Clair, K. J. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. Nusinoff-Lehrmann, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, D. W. Barry; Phosphorylation of 3'-Azido-3'-deoxythymidine and Selective Interaction of the 5'-Triphosphate with Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, *83*, 8333 8337.
- G. B. Elion; Mechanism of action and selectivity of acyclovir; *Am. J. Med.* 1982, *73*, 7 13.
- L. Naesens, E. De Clercq; Recent Developments in Herpesvirus Therapy; *Herpes* 2001, 8, 12 16.

- ^[23] E. De Clercq, R. T. Walker; Synthesis and antiviral properties of 5-vinyl-pyrimidine nucleoside analogs; *Pharmacol. Ther.* **1984**, *26*, 1 44.
- L. Naesens, R. Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini, J. Neyts, E. De Clercq; HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections; *Antiviral Chem. Chemother.* 1997, *8*, 1 23.
- ^[25] J. Balzarini, Z. Hao, P. Herdewijn, D. G. Johns, E. De Clercq; Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1499 – 1503.
- G. Antonelli, O. Turrizani, A. Verri, P. Narciso, F. Ferri, G. D'Offizi, F. Dianzini;
 Long-term exposure to zidovudine affects *in vitro* and *in vivo* the efficiency of
 thymidine kinase; *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1996; *12*; 223 228.
- C. R. Wagner, V. V. Iyerm E. J. McIntee; Pronucleotides: Toward the *in vivo* Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides; *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 417 451.
- M. R. Harnden, R. L. Harvest, M. R. Boyd, D. Sutton, R. A. Vere Hodge; Prodrugs of the selective antivirus agent 9-[4-(hydroxymethyl)but-1-yl]guanin (BRL 39123) with improved gastrointestinal absorption properties; *J. Med. Chem.* 1989, *32*, 1738 1743.
- J. Balzarini, E. De Clercq; Acyclic Purine Nucleoside Phosphonates as Retrovirus Inhibitors; *Antiviral Chemotherapy, Eds.: D.J. Jeffries, E. De Clercq*, 1995, S. 41 – S. 63.
- G. Palù, S. Stefanelli, M. Rassu, C. Parolin, J. Balzarini, E. De Clercq; Cellular uptake of phosphonylmethoxyalkylpurine derivatives; *Antiviral Res.* 1991, *16*, 115 119.
- ^[31] J. K. Sastry, P. N. Nehete, S. Khan, B. J. Nowak, W. Plunkett, R. B. Arlingshaus, D. Faquhar; Membrane-Permeable Dideoxyurindine 5'-Monophosphate Analogue
 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection; *Mol. Pharmacol.* 1992, *41*, 441 445.

- J. A. Montgomery, H. J. Thomas, H. J. Schaeffer; Synthesis of potential anticancer agents. XXVIII. Simple esters of 6-mercaptopurine ribonucleotide; *J. Org. Chem.* 1961, *26*, 1929 1933.
- ^[33] C. Meier; *cyclo*Sal-Pronucleotides Design of Chemical Trojan Horses ; *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2002**, *2*, 219 – 234.
- P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen; A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design; *J. Med. Chem.* 1981, 24, 479 480.
- ^[35] D. Farquhar, D. N. Srivastava, N. J. Kattesch, P. P. Saunders; Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups; *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 324 – 325.
- J. K. Sastry, P. N. Nehete, S. Khan, B. J. Nowak, W. Plunkett, R. B. Arlington, D.
 Faquhar; Membrane-Permeable Dideoxyuridine 5'-Monophosphate Analogue
 inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection; *Mol. Pharmacol.* 1992, *41*, 441 445.
- [^{37]} M. N. Arimilli, J. P. Dougherty, K. C. Cundy, N. Bischofberger; Orally Bioavailable Acyclic Nucleoside Phosphonate Prodrugs: Adefovir Dipivoxil and Bis(POC)PMPA; *Advances in Antiviral Drug Design*, JAI Press Inc., Stamford, Conneticut, **1999**, Vol. 3, S. 69 91.
- C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Minireview: From the Pronucleotide
 Concept to the SATE Phosphate Protecting Groups; *Curr. Topics in Med. Chem.* 1997, 2, 15 29.
- ^[39] I. Lefebvre, C. Périgaud, A. Pompom, A.-M. Aubertin, J.-L. Giradet, A. Kim, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Mononucleoside Phosphotriester Derivatives with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-Protecting Groups: Intracellular Delivery of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate; J. Med. Chem. 1995, 38, 3941 3950.
- ^[40] J.-L. Giradet, C. Périgaud, A.-M. Aubertin, G. Gosselin, A. Kim, J.-L. Imbach;
 Increase of the anti-HIV Activity of d4T in Human T-Cell Culture by the use of the SATE pronucleotide Approach; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, *5*, 2981 2984.
- C. Périgaud, A.-M. Aubertin, S. Benzaria, H. Pelicano, J.-L. Giradet, G. Maury, G. Gosselin, A. Kim, J.-L. Imbach; Equal inhibition of the Replication of Human Immunodeficiency Virus in Human T-Cell Culture by ddA

Bis(SATE)Phosphotriesters and 3'-Azido-2',3'-Dideoxythymidine; *Biochem*. *Pharmacol.* **1994**, *48*, 11 – 14.

- ^[42] N. Schlienger, C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Synthesis and Studies of Mononucleoside Glucosyl Phosphotriester Derivatives; *J. Org. Chem.* 1997, *62*, 7216 – 7221.
- [43] A. D. Briggs, M. Camplo, S. Freeman, J. Lundstrom, B. G. Pring; Acyloxymethyl and 4-acyloxybenzyl diester prodrugs of phosphonoformate; *Tetrahedron* 1996, *52*, 14937 14950.
- ^[44] S. Spruance, M. McKeough, I. Yanachkov, G. Wright, E. Kern, R. Sidwell, D. Smee,
 M. Yanachkova, A. Glazier; The Design, Chemistry, and Antiviral Activity of a
 Novel Group of Anti-Herpesvirus Prodrugs; *Antiviral Res.* 1996, *30*, A44.
- ^[45] C. McGuigan, D. Cahard, H. M. Sheeka, E. De Clercq; Aryl Phosphoramidate Derivatives of d4T Have Improved anti-HIV Efficiency in Tissue Culture and May Act by the Generation of a Novel Intracellular Metabolite; *J. Med. Chem.* 1996, *39*, 1748 – 1753.
- ^[46] C. McGuigan, R. N. Pathirana, J. Balzarini, E. De Clercq; Intracellular Delivery of Bioactive AZT Nucleotides by Aryl Phosphate Derivatives of AZT; *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048 1052.
- D. Saboulard, L. Naesens, D. Cahard, A. Salgado, R. Pathirana, S. Velazquez, C.
 McGuigan, E. De Clercq, J. Balzarini; Chracterization of the activation pathway of phosphoramidite triester prodrugs of stavudine and zidovudine; *J. Mol. Phamacol.* 1999, *56*, 693 704.
- [48] S.-L. Chang, G. W. Griesgraber, P. J. Southern, C. R. Wagner; Amino acid phosphoramidate monoesters of 3'-azido-3'-deoxythymidine: relationship between antiviral potency and intracellular metabolism; *J. Med. Chem.* 2001, 44, 223 – 231.
- ^[49] K. M. Fries, C. Joswig, R. F. Borch; Synthesis and biological evaluation of 5-fluoro 2'-deoxyuridine phosphoramidite analogs; *J. Med. Chem.* 1995, *38*, 2672 2680.
- ^[50] S. C. Tobias, R. F. Borch; Synthesis and Biological Studies of Novel Nucleoside Phosphoramidate Prodrugs; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4475 - 4480.

- ^[51] J. E. Starrett, Jr., D. R. Tortolani, M. J. M. Hitchcock, J. C. Martin, M. M. Mansuri;
 Synthesis and *in vitro* evaluation of a phosphonate prodrug: bis(pivaloyloxymethyl)
 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine; *Antiviral Res.* 1992, *19*, 267 273.
- R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y.-F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland; Metabolism and *in vitro* Antiretroviral Activities of Bis(Pivaloyloxymethyl)-Produrgs of Acyclic Nucleoside Phosphonates; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37, 2247 2250.
- ^[53] N. Tanaji, K. Tanaji, N. Kabham, G. S. Markowitz, A. Bell, V. D. D'Agati; Adefovir nephrotoxicity: possible role of mitochondrial DNA depletion; *Human Pathol.* 2001, 32, 734 – 740.
- ^[54] http://www.gilead.com/wt/sec/adefovir
- ^[55] B. L. Robbins, R. V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, A. Fridland; Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9-*R*-(2-Phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropyloxymethylcarbonyl)PMPA; *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998, 42, 612 – 617.
- [^{56]} A. Glazier, M. Yanachkova, I. Yanachkov, G.E. Wright, J. Palmer, C. Hartline, E.R.
 Kern; Potent Topical Anti-Herpes Activity of a Lipophilic Phosphorus Prodrug for the Antiviral Agent PMEA; *Antiviral Res.* 1995, *26*, A306.
- ^[57] S. Benzaria, H. Pélicano, R. Johnson, G. Maury, J.-L. Imbach, A.-M. Aubertin, G. Obert, G. Gosselin; Synthesis, *in vitro* Antiviral Evaluation, and Stability Studies of Bis(S-acyl-2-thioethyl) Ester Derivatives of 9-(2-Phosphonometoxy)ethyl]adenine (PMEA) as Potential PMEA Prodrugs with Improved oral Bioavailability; *J. Med. Chem.* 1996, *39*, 4958 4965.
- ^[58] C. Ballatore, C. Mc Guigan, E. De Clercq, J. Balzarini; Synthesis and Evaluation of Novel Amidate prodrugs of PMEA and PMPA; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, *11*, 1053 – 1056.
- ^[59] C. Meier; 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxides A New Concept for lipophilic, potential Prodrugs of biologically active Nucleoside Monophosphates; *Angew. Chem.* 1996, *108*, 77 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, *35*, 70 73.

- [^{60]} C. A. Bunton, M. M. Mhala, K. G. Oldham, C. A. Vernon; The Reactions of Organic Phosphates, Part III: The Hydrolysis of Dimethyl Phosphate; *J. Chem. Soc.* 1960, 3293 3301.
- ^[61] J.-L. Giradet, G. Gosselin, C. Périgaud, J. Balzarini, E. De Clercq, J.-L. Imbach; New Prodrugs of 9-(2-Phosphonomethoxyethyl)adenine [PMEA]: Synthesis and Stability Studies; *Nucleosides & Nucleotides* 1995, *14*, 563 – 565.
- S. N. Farrow, A. S. Jones, A. Kumar, R. T. Walker, J. Balzarini, E. De Clercq,
 Synthesis and Biological Properties of Novel Phosphotriesters: A New Approach to
 the Introduction of Biologically Active Nucleotides into Cells; *J. Med. Chem.* 1990,
 33, 1400 1406.
- ^[63] C. Meier, L. W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq; 5',5'-Di-O-nucleosy-O'benzylphosphotriesters as Potential Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate; *Liebigs Ann.* 1995, 2203 – 2208.
- ^[64] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of
 2'-3'-Dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine (d4T) A New Pro-Nucleotide Approach ;
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997, 7, 99 104.
- ^[65] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; cycloSal-2',3'-dideoxy-2',3'didehydrothymidine monophosphate (cycloSal-d4TMP): Synthesis and antiviral evalution of a new d4TMP delivery system; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417 – 1427.
- J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Ramazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; *Cyclosaligenyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine-*monophosphate: efficient intracellular delivery of d4TMP; *Mol. Pharmacol.* 2000, 58, 928 935.
- ^[67] J. Balzarini, L. Naesens, S. Aquaro, T. Knispel, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; Intracellular Metabolism of CycloSaligenyl 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate, a Prodrug of 3'-Azido-2',3'.dideoxythymidine (Zidovudine); *Mol. Pharmacol.* 1999, *56*, 1354-1361.
- ^[68] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; *cyclo*Sal-Pronucleotides of 2',3' Dideoxyadenosine and 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosine: Synthesis and
 Antiviral Evaluation of a Higly Efficient Nucleotide Delivery System; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1604 1614.

- ^[69] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini ; ADA-Bypass by lipophilic *cyclo*Sal-ddAMP Pro-Nucleotides. A second Example of the Effciency of the *cyclo*Sal-Concept; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1577 1582.
- C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, E. De Clercq, J. Balzarini; *cyclo*Sal-2'*ara(ribo)*-Fluoro-2',3'-Didesoxyadenosine Monophosphate – an Effort to Solve the Structure-Activity Relationship of 2'-Fluoro-ddA; *Nucleotides & Nucleotides* 1999, *18*, 907 – 912.
- C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, E. De Clercq, J. Balzarini;
 cycloSal-Pronucleotides of 2'-Fluoro-ara- and 2'-Fluoro-ribo-2',3'-dideoxyadenosine
 as a Strategy to Bypass a Metabolic Pathway; *J. Med. Chem.* 1999, *42*, 1615-1624.
- C. Meier, L. Habel, F. Haller-Meier, A. Lomp, M. Herderich, R. Klöcking, A. Meerbach, P. Wutzler; Chemistry and anti-herpes simplex virus type 1 evaluation of cycloSal-nucleotides of acyclic nucleoside analogues; *Antiviral Chem. Chemother.* 1998, 9, 389 402.
- ^[73] A. Meerbach, R. Klöcking, C. Meier, A. Lomp, B. Helbig, P. Wutzler; Inhibitory effect of *cyclo*Saligenyl-nucleoside monophosphates (*cyclo*Sal-NMP) of acyclic nucleoside analogues on HSV-1 and EBV; *Antiviral Res.* **2000**, *45*, 69 77.
- C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler; *cyclo*Sal-BVDUMP Pronucleotides from an Antivirally Inactive Nucleoside Analogue to a potential anti-EBV active Drug; *ChemBioChem* 2001, *20*, 283 285.
- C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler; *CycloSal-BVDUMP* Pronucleotides: How to Convert an Antiviral-Inactive Nucleoside Analogue into a Bioactive Compound against EBV; *J. Med. Chem.* 2002, 45, 5157 – 5172.
- [^{76]} A. Lomp; *cyclo*Saligenyl-Nucleotide (*cyclo*Sal-NMP) acyclischer Nucleosidanaloga als potentielle anti-virale Wirkstoffe; *Diplomarbeit*, Universität Würzburg **1998**.
- [77] C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini; Nucleotide Delivery from cycloSaligenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine Monophosphates (cycloSal-AZTMP); *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 837 846.
- J. P. Yan, D. D. Ilsley, C. Frohlick, R. Stee, E. T. Hall, R. D. Kutcha, P. Melancon;
 3'-Azidothymidine (Zidovudine) Inhibits Glycosylation and Dramatically Alters
 Glycoshingolipid Synthesis in Whole Cells at Clinically Relevant Concentrations; *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 22836 22841.

- [79] A. Lavie, I. Schlichting, I. R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, R. S. Goody; The bottleneck in AZT activation; *Nature Medicine* 1997, *3*, 922 – 924.
- E. M. Cretton, M. Y. Xie, J. Bevan, N. M. Goudgaon, R. F. Schinazi, J.-P.
 Sommadossi; Catabolism of 3'-Azido-3'-deoxythymidine in Hepatocytes and Liver
 Microsomes with Evidence of Formation of 3'-Amino-3'-deoxythymidine, a Higly
 Toxic Catabolite for Human Bone Marrow Cells; *Mol. Pharmacol.* 1990, *39*, 258 266.
- [81] J. P. Sommadossi, R. Carlisle, Z. Zhou; Cellular pharmacology of 3'-azido-3'deoxythymidine with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells; *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 9 – 14.
- [^{82]} A. Y. Yong, J. L. Campbell; Characterisation of Saccharomyces cerevisiae
 Thymidylate Kinase, the CDC8 Gene Product; *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 14394 14398.
- D. G. Rhoads, J. M. Lowenstein; Initial Velocity and Equilibrium Kinetics of Myokinase; *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 3963 – 3972.
- ^[84] Y. C. Cheng, W. H. Prusoff; Mouse Ascites Sarcoma 180 Thymidylate Kinase General Properties, Kinetic Analysis and Inhibition Studies; *Biochem.* 1974, *13*, 1179 1185.
- ^[85] J. P. Richard, M. C. Carr, D. H. Ives, P. A. Frey; The stereochemical course of thiophosphoryl group transfer catalyzed by adenosine kinase; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, *94*, 1052 1056.
- [^{86]} R. A. Cooper, S. Perry, T. R. Breitman; Pyrimidine metabolism in human leukocytes.
 I. Contribution of exogenous thymidine to DNA-thymine and its effect on thymine nucleotide synthesis in leukemic leukocytes; *Cancer Res.* 1966, *26*, 2267 2275.
- ^[87] M. Saraste, P. R. Sibbald, A. Wittinghofer; The P-Loop- A Common Motif in ATPand GTP-binding Proteins; *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 430 - 434.
- ^[88] C. Vonrhein, G. J. Schlauderer, G. E. Schulz; Movie of the Structural Changes
 During a Catalytic Cycle of Nucleoside Monophosphate Kinases; *Structure* 1995, *3*, 483 490.
- [89] A. Lavie, N. Ostermann, R. Brundiers, R. S. Goody, J. Reinstein, M. Konrad, I. Schlichting; Structural Basis for Effcient Phosphorylation of 3'-Azidothymidine
Monophosphate by Escherichia coli Thymidylate Kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14045 – 14050.

- ^[90] D. E. Koshland Jr.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98.
- T. Veit; Kinetischer Mechanismus der menschlichen Thymidylatkinase der *induced fit* als Grund für die unzureichende Aktivierung des Anti-HIV-Medikaments 3'-Azido-2',3'-didesoxythymidinmonophosphat (AZTMP); *Dissertation*, Dortmund, 2000.
- [92] A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting; Structure of thymidylate kinase revelas the cause behind the limiting step in AZT activation; *Natural Structural Biology* 1997, 4, 601 – 604.
- H. C. Müller; Synthese und Charakterisierung acyclischer Nucleosidanaloga sowie ihrer *cyclo*Sal-Pro-Nucleotide; *Diplomarbeit*, Würzburg, 1998.
- L. W. Habel; Synthese und Charakterisierung lipophil maskierter
 Nuclesidmonophosphate und -phophonate als Prodrugs antiviral aktiver
 Nucleosidanaloga; *Dissertation*, Frankfurt am Main, 1999.
- M. R. Harnden, R. L. Jarvest, T. H. Bacon, M. R. Boyd; Synthesis an Antiviral Activity of 9-[4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)but-1-yl]purines; *J. Med. Chem.* 1987, 30, 1636 1642.
- K. Izawa, H. Shiragami; Practical Synthesis of Antiviral Nucleosides; *Pure & Appl. Chem.* 1998, 70, 313 318.
- H. C. Padgett, I. G. Csendes, H. Rapoport; The Alkoxycarbonyl Moiety as a Blocking Group. A Generally Useful Variation of the Malonic Ester Synthesis; J. Org. Chem. 1979, 44, 3492 - 3496.
- [98] N. M. Horwarth, L. P. G. Wakelin; α-DNA: A Novel Peptide Nucleic Acid Analogue of DNA; J. Org. Chem. 1997, 62, 5441 - 5450.
- ^[99] G. V. B. Madhavan, J. C. Martin; A Novel and Stereospecific Synthesis of (±)- and (–)-Aristeromycin; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1287 1293.
- W. S. DiMenna, C. Piantadosi; Synthesis of Potential Hypolipidemic Agents.
 Reaction of Substituted Phenyl 2,3-Epoxypropyl Ethers with Adenine, Uracil and Thymine; *J. Med. Chem.* 1978, *21*, 1073 - 1076.

[101]	K. K. Ogilvie, R. G. Hamilton, M. F. Gillen, B. K. Radatus, K. O. Smith, K. S. Galloway; Uracil analogues of the acyclonucleosides 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine (BIOLF-62); <i>Can. J. Chem.</i> 1984 , <i>62</i> , 16 - 21.
[102]	B. Wirz, R. Schmid, J. Foricher; Asymmetric Enzymatic Hydrolysis of Prochiral 2- <i>O</i> -Allylglycerol Ester Derivatives; <i>Tetrahedron: Asymmetry</i> 1992 , <i>3</i> , 137 - 142.
[103]	W. F. Bailey, A. D. Rivera; Acetolysis of Cyclic Acetals: Regioselective Acylative Celavage of Cyclic Formals; <i>J. Org. Chem.</i> 1984 , <i>49</i> , 4958 - 4964.
[104]	A. K. Field, M. E. Davies, C. DeWitt, H. C. Perry, R. Liou, J. Germershausen, J. D. Karkas, W. T. Ashton, D. B. R. Johnston, R. L. Tolman; 9-{[2.Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl}guanine: A selective inhibitor of herpes group virus replication; <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 1983 , <i>80</i> , 4139 - 4143.
[105]	E. Lukevics, A. Zablocka; <i>Nucleoside Synthesis - Organosilicon Methods</i> ; Ellis Horwood Ltd., New York, London, Toronto, 1991 , S. 28 - 33.
[106]	MC. Trinh, JC. Florent, D. S. Grierson, C. Monneret; Synthesis of Acyclic Analogs of Azido-Thymidine, Amino-Thymidine, and related Nucleosides; <i>Tetrahedron Lett.</i> 1991 , <i>32</i> , 1447 - 1448.
[107]	M. Murata, K. Achiwa; Synthesis of Biologically Active AcycloAZT Derivatives and related Compounds; <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 1990 , <i>38</i> , 836 - 838.
[108]	M. R. Harnden, H. T. Serafinowska; Synthesis and Properties of S-Phosphates of Some Antiviral Acyclonucleosides; <i>Nucleosides & Nucleotides</i> 1994 , <i>13</i> , 903 - 913.
[109]	M. Kawana, H. Kuzuhara; Synthesis of 2'- and 3'-Azido-2',3'-dideoxyadenosines. Preparative Applications of the Deoxygenative [1,2]-Hydride Shift and β-Elimination Reactions of O-Sulfonylated Adenosines; <i>Carbohydrate Research</i> 1989 , <i>189</i> , 87 - 101.
[110]	W. H. G. Laux; Enantioselektive Synthesemethoden für α - sowie β - und γ - Hydroxyphosphonate und α -Aminophosphonate; DDD Druck und Verlag, Darmstadt 1996 .

[111] M. Plath; Enantioselektive Synthese von α-Aminophosphonaten als Monomere für die Synthese von Peptidmimetika; *Diplomarbeit*, Hamburg, 2001.

- S. L. Schreiber, N. Ikemoto; Synthesis of Chemically Reactive Analogues of AZT and their Biological Evaluation against HIV; *Tetrahedron Lett.* 1988, 26, 3211 3214.
- P. Herdewijn, J. Balzarini, E. De Clercq, R. Pauwels, M. Baba, S. Broder, H.
 Vanderhaeghe; 3'-Substituted 2',3'-Dideoxynucleoside Analogues as Potential Anti-HIV (HTLV-III/LAV) Agents; *J. Med. Chem.* 1987, *30*, 1270 - 1278.
- R. P. Glinski, M. S. Khan, R. L. Kalamas, M. B. Sporn; Nucleotide Synthesis. IV.
 Phosphorylated 3'-Amino-3'deoxythymidine and 5'-Amino-5'-deoxythymidine and
 Derivatives; J. Org. Chem. 1973, 38, 4299 4305.
- [116] A. L. Stuart, N. K. Ayisi, G. Tourigny, V. S. Gupta; Antiviral Activity, Antimetabolic Activity, and Cytotoxicity of 3'-Substituted Deoxypyrimidine Nucleosides; *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 246 - 249.
- J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel; Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy-β-D-lyxofuranosyl)thymine; *J. Org. Chem.* 1964, *29*, 2076 - 2079.
- K. Stolze, U. Koert, S. Klingel, G. Sagner, R. Wartbichler, J. W. Engels; Synthesis of
 3'-Sugar- and Base-Modified Nucleotides and Their Application as Potent Chain
 Terminators in DNA Sequencing; *Helvetica Chimica Acta* 1999, 82, 1311 1323.
- ^[119] J. C. Jochims, A. Seeliger; Eine neue Synthese aliphatischer Isothiocyanate; *Angew*. *Chem.* **1967**, *79*, 151.
- [120] D. H. R. Barton, C. Tachdijan; The Invention of Radical Reactions. Part XXVI. New Thio- and Seleno-Hydroxamic Acids; Radical Chemistry of their O-Acyl Derivatives.; *Tetrahedron* 1992, 48, 7091-7108.
- [121] J. C. Jochims; Über eine neue Synthese aromatischer Isothiocyanate; *Chem Ber.***1968**, *101*, 1746 -1 752.
- [122] http://cactus.nci.nih.gov/Pseurot/
- [123] A. Camerman, D. Mastropaolo, N. Camerman; Azidothymidine:: Crystal Structure and possible functional role of the azido group; *Proc. Natl. Aced. Sci. USA* 1987, *84*, 8293 8242.

[124]	P. Van Roey, J. M. Salerno, W. L. Duax, C. K. Chu, M. K. Ahn, R. F. Schinazi;
	Solid-State Conformation of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type-1 Agents:
	Crystal Structure of Three 3'-Azido-3'-deoxythymidine Analogues; J. Am. Chem.
	Soc. 1988, 110, 2277 - 2282.

^[125] R. Parthasarathy, H. Kim; Conformation and sandwiching of bases by azido groups in the crystal structure of 3'-Azido-3'-deoxy-thymidine (AZT), an antiviral agent that inhibits HIV reverse transcriptase; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *152*, 351 - 358.

- ^[126] D. R. Lide (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 72nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, **1991**.
- ^[127] J. Fiandor, S. Y. Tam; Synthesis of 3'-Deoxy-3'-(2-propynyl)thymidine and 3'-Cyanomethyl-3'-deoxythymidine, Analogs of AZT; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 597 - 600.
- C. K. Chu, B. Doboszewski, W. Schmidt, G. V. Ullas; Synthesis of Pyrimidine 3' Ally-2',3'-dideoxyribonucleosides by Free-Radical Coupling; *J. Org. Chem.* 1989, 54, 2767 2769.
- ^[129] T. Knispel; *Cyclo*Saligenyl-(2'-fluor-*ara*)-2'3'-didesoxyadenosinmonophosphate (*cyclo*Sal-(F)ddAMP) - effiziente Pro-Nucleotide zum ADA-Bypass; *Diplomarbeit*, Frankfurt (Main) **1997**.
- F. Mugnier; A new Preparative Method towards *cyclo*Sal-Nucleoside
 Monophosphates: Cyclic Phosphoramidites as Phosphitylating Agents;
 Diplomarbeit, Würzburg, 1998.
- ^[131] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi; A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides; *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065 5068.
- [132] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi; Studies of Phosphorylation II. Reaction of
 2',3'-O-Isopropylideneinosine and -guanosine with Phosphorylchloride; *Bull. Chem.* Soc. Jpn. 1968, 41, 142 149.
- T. Sowa, S. Ouchi; The Facile Synthesis of 5'-Nucleotides by the Selective Phosphorylation of a Primary Hydroxyl Group of Nucleosides with Phosphoryl Chloride; *Bull. Chem. Soc. Jpn* 1975, *48*, 2084 - 2090.

- T. A. Khwaja, C. B. Reese, J. C. M. Stewart; A Convenient General Procedure for the Conversion of Alcohols into their Monophosphate Esters; *J. Chem. Soc. (C)* 1970, 2092 2100.
- ^[135] A. Lomp; Design, Synthese und Eigenschaften neuer antiviral aktiver Nucleotid Prodrugs; *Dissertation*, Hamburg, **2002**.
- [136] T. W. Abraham, T. I. Kalman, E. J. McIntee, C. R. Wagner; Synthesis and Biological Activity of Aromatic Amono Acid Phosphoramidates of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine an 1-β-Arabinofuranosylcytosine: Evidence of Phosphoramidase Activity; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4569 - 4575.
- ^[137] G. M. Tener; 2-Cyanoethyl phosphate and its use in the synthesis of phosphate esters; *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 159 168.
- ^[138] M. Lorey; *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphat, ein neues Pro-Nucleotid-Konzept für antiviral und antitumor aktive Nucleosidanaloga; *Dissertation*, Würzburg, **1999**.
- ^[139] C. Ducho; Aryl-substituierte und Benzo-anellierte *cyclo*Sal-Nucleotide; *Diplomarbeit*, Hamburg, **2001**.
- D. Voet, J.G. Voet; *Biochemistry*; 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York 1995,
 S. 390 391, S. 1296 1300.
- ^[141] C. Meier, C. Ducho, *unveröffentlichte Ergebnisse*.
- ^[142] S. Benzaria; Dissertationsschrift; *Universität Montpellier* **1995**.
- ^[143] A. Holý, I. Rosenberg; Synthesis of 9-(2-Phosphonomethoxyethyl)adenine and Related Compounds; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1987**, *52*, 2801 - 2809.
- ^[144] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*; 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, Toronto, **1991**.
- ^[145] C. Meier, A.-M. Aubertin, M. de Monte, A. Faraj, J.-P. Sommadossi, C. Périgaud, J.-L. Imbach; Synthesis and antiviral Evaluation of SATE-foscarnet prodrugs and new foscarnet-AZT conjugates; *Antiviral Chem. & Chemother.* **1998**, *9*, 41 52.
- T. Morita, Y. Okamoto, H. Sakurai; A Mild and Facile Synthesis of Alkyl- and Arylphosphonyl Dichlorides Under Neutral Conditions. Reaction of Bis(trimethylsilyl) Phosphonates with PCl₅; *Chem. Lett.* 1980, 435 - 438.

[147]	 H. T. Serafinowska, R. J. Ashton, S. Bailey, M. R. Harnden, S. M. Jackson, D. Sutton; Synthesis and in Vivo Evaluation of Prodrugs of 9-[2- (Phosphonomethoxy)ethoxy]adenine; <i>J. Med. Chem.</i> 1995, <i>38</i>, 1372 - 1379. 					
[148]	N. Zhang, J. E. Casida; Novel Synthesis of [³³ P]-(2-Chloroethyl)phosphonic Acid; <i>Org. Chem.</i> 2001 , <i>60</i> 327 - 329.					
[149]	R. G. Davies, V. C. Gibson, M. B. Hursthouse, M. E. Light, E. L. Marshall, M. North, D. A. Robson, I. Thompson, A. J. P. White, D. J. Williams, P. J. Williams; Synthesis of nucleic-acid base containing norbornene darivatives as monomers for ring-opening metathesis-ploymerization; <i>J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1</i> 2001, 3365 - 3381.					
[150]	F. Puech, G. Gosselin, I. Lefebvre, A. Pompom, AM. Aubertin, A. Kirn, JL. Imbach; Intracellular delivery of nucleoside monophosphates through a reductase- mediated activation process; <i>Antiviral Res.</i> 1993 , <i>22</i> , 155 - 174.					
[151]	T. Knispel; <i>cyclo</i> Saligenyl-Nucleotide: Untersuchungen zum TK- und ADA-Bypass antiviral aktiver Pro-Nucleotide; <i>Dissertation</i> , Hamburg, 2001 .					
[152]	I. Cepanec, H. Mikuldas, V. Vinkovic; An Improved Method for Synthesis of Jacobsen's Catalyst; <i>Synth. Comm.</i> 2001 , <i>31</i> , 2913–2920.					
[153]	 M. Otmar, M. Masojídková, I. Votruba, A. Holý; An Alternative Synthesis of HPMPC and HPMPA Diphosphoryl Derivatives; <i>Collect. Czech. Chem. Commun.</i> 2001, <i>66</i>, 500-506. 					
[154]	C. Ducho; persönliche Mitteilung, Hamburg 2003.					
[155]	J. R. Cox, Jr., B. Ramsay; Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters; <i>Chem. Rev.</i> 1964 , <i>64</i> , 317 - 352.					
[156]	R. F. Hudson, L. Keay; The Hydrolysis of Phosphonate Esters; <i>J. Chem. Soc.</i> 1956 , 2463 - 2469.					
[157]	F. H. Westheimer, S. Huang, F. Covitz; Rates and Mechanisms of Hydrolysis of Esters of Phosphorous Acid; <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 1988 , <i>110</i> , 181 - 185.					
[158]	C. Meier; unveröffentlichte Ergebnisse; 2002.					
[159]	N. Bischofberger, M. J. Hitchcock, M. S. Chen, D. B. Barkhimer, K. C. Cundy, K. M. Kent, S. A. Lacy, W. A. Lee, Z. H. Li, D. B. Mendel et al.; 1-[((S)-2-hydroxy-2-					

oxo-1,4,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl] cytosine, an intracellular prodrug for (S)-

1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine with improved therapeutic index in vivo; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2387 - 2391.

- ^[160] J. Balzarini; *persönliche Mitteilungen*, Leuven **2000**.
- ^[161] W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra; Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution; *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923 2925.

Ausklapptafel





112



 $\begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\$

115



11



12









X = H 34a X = 3-Me 34b X = 3-*t*Bu 34c X = 3,5-Di-*t*Bu 34d





X = 3-*t*Bu **35a** X = 3,5-Di-*t*Bu **35b**



149

Publikationsliste

Beiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften

- H. C. Müller, C. Meier, J. Balzarini, E. De Clercq, J. Reinstein; Novel Synthetic Route towards Cyclic and Acyclic Analogues of AZT Monophosphate (AZTMP); *Antiviral Res.* 2001, 50, A46.
- 2. H. C. Müller, C. Meier, J. Balzarini, J. Reinstein; Novel Nucleotide Analogues as Potential Substrates for TmpK, a Key Enzyme in the Metabolism of AZT; *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, im Druck.*

Posterbeiträge auf Tagungen

- 20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg, 27.08. 01.09.2000: "Novel Synthetic Route towards Analogues of AZT Monophosphate (AZTMP)"
- 14th International Conference on Antiviral Research (ICAR) in Seattle, WA., 08.04. – 12.04.2001: "Novel Synthetic Route towards cyclic and acyclic analogues of AZT Monophosphate (AZTMP)"
- Jahrestagung Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Würzburg,
 23.09. 29.09.2001: "Novel Synthetic Route towards cyclic and acyclic analogues of AZT Monophosphate (AZTMP)"
- XV International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides und Nucleic Acids, Leuven, 10.09. – 14.09.2002: "Nucleotide Analogues as Potential Substrates for TmpK, a Key Enzyme in the Metabolism of AZT"

Vorträge

- International KDO-Meeting im Forschungszentrum Borstel, 09.02.2001: "Are Glycon-modified Analogues of AZT Monophosphate Substrates for Thymidylate Kinase?"
- Roche Symposium for Leading Chemists of the Next Decade, Basel, 24.10. –
 26.10.2001: "Novel Synthetic Route towards Cyclic and Acyclic Analogues of AZT Monophosphate (AZTMP)"

Lebenslauf

Persönliche Angaben	Hanns Christian Müller				
	geboren am 15.02.1973 in Bremen				
<u>Schulbildung</u>					
Aug. 1979 - Juli 1983	Grundschule an der Oderstraße, Bremen				
Aug. 1983 - Juli 1985	Schulzentrum an der Delmestraße, Bremen				
Aug. 1985 - Juni 1992	Altes Gymnasium, Bremen				
03. Juni 1992	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife mit der				
	Durchschnittsnote 1,0				
Zivildienst					
Juli 1992 - Sep. 1993	Zivildienst in der Individuellen Schwerstbehindertenbetreuung				
	in Bremen				
Akademische Ausbildung					
Okt. 1993 - Nov. 1995	Grundstudium im Diplomstudiengang Chemie an der				
	Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg				
23. Okt.1995	Diplom-Vorprüfung mit der Gesamtnote "sehr gut"				
Nov. 1995 - Dez. 1998	Hauptstudium im Diplomstudiengang Chemie an der				
	Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg				
März 1996 - April 1996	Praktikum bei der Döhler GmbH, Darmstadt unter Anleitung				
	von Dr. Joachim Tretzel mit dem Thema: "Charakterisierung				
	handelsüblicher β-Carotin-Präparate nach physikalisch				
	chemischen und anwendungstechnischen Gesichtspunkten"				
März 1997 - Juli 1997	Praktikum an der Heriot-Watt-University, Edinburgh unter				
	Anleitung von Dr. Richard Wightman mit dem Thema: "Dioxi-				
	rane-mediated Asymmetric Epoxidations using Carbohydrate-				
	derived Ketones as Catalysts"				
März 1998 - Dez. 1998	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität				
	Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier mit dem				

	Thema:	"Synthese	und	Charakterisierung	acyclischer			
	Nucleosidanaloga und ihrer cycloSal-Pro-Nucleotide"							
01. Dez. 1998	Abschluß: Diplom-Chemiker mit der Gesamtnote "sehr gut"							
März 1999	Wechsel an die Universität Hamburg und Beginn der Arbeiten							
	zur Pomotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Meier							
seit Okt. 1999	Studium der Wirtschaftswissenschaften im Zusatzstudiengang							
	mit Diplomabschluß für Ingenieure und Naturwissenschaftler an							
	der Fernuniversität Hagen							
Studienbegleitende Tätigkeiten								
Okt. 1997 - März 1998	Universit	ät Würzburg:	Tutoriu	m für Studenten im	anorganisch-			
	chemisch	en Grundprak	tikum					
März 1999 – Dez. 2002	Universität Hamburg: Betreuung von Studenten des organisch-							
	chemischen Fortgeschrittenenpraktikums							
März 1999 – Dez. 2002	Netzwerkadministrator der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C.							
	Meier							
Stipendien/Auszeichnungen								
Juli 1992	Auszeich	nung der Karl	-Nix-Sti	ftung, Bremen als	bester			
	Abiturien	t des Landes l	Bremen	1992				
März 1997 - Juli 1997	Sokrates S	Stipendium zu	ır Durch	ıführung eines				
	Forschungsaufenthaltes an der Heriot-Watt-University,							
	Edinburg	h						
April 2001	Poster Av	vard bei der 1	4 th Inter	national Conferenc	e for Antiviral			
	Research,	Seattle, WA						
seit November 2001	Stipendia	t von e-fellow	s.net (In	nitiative von Deutso	che Telekom,			
	McKinsey & Co. sowie Georg Holtzbrinck Verlagsgruppe)							

Hamburg, den

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation "Welche Faktoren beeinflussen die Eigenschaften von Nucleosidmonophosphaten? Untersuchungen zu den Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase" selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, den