

**Synthese γ -alkylierter
fluoreszierender Tri*PP*Pro-
Verbindungen
für Zellaufnahmestudien und
symmetrischer antitumoraktiver
Tri*PP*Pro-Verbindungen für
Zellproliferationsassays**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Maria Roßmeier

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2022

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von September 2018 bis November 2022 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungskommission:

Prof. Dr. Chris Meier, Prof. Dr. Wolfgang Maison, Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 20.01.2023

Druckfreigabe: 20.01.2023

Gott mit uns, dem Bayernvolke,
wenn wir, unsrer Väter wert,
stets in Eintracht und in Frieden
bauen unsres Glückes Herd;
dass vom Alpenland zum Maine
jeder Stamm sich fest vertrau
und die Herzen freudig eine
unser Banner, weiß und blau!

Joseph Maria Lutz

II INHALTSVERZEICHNIS

II Inhaltsverzeichnis	VI
III Abkürzungen	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	4
3 Einleitung	7
4 Kenntnisstand	10
4.1 Nucleosidanaloga	10
4.2 Prodrug-Konzepte	13
4.2.1 Monophosphat-Prodrugs	13
4.2.2 Diphosphat-Prodrugs	22
4.2.3 Triphosphat-Prodrugs	26
4.3 Bicyclische Nucleosidanaloga	33
4.3.1 BCNA-Was ist das genau?	33
4.3.2 Vorteile der fluoreszenzbasierten Messmethoden	38
5 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit	40
6 Ergebnisse und Diskussion	44
6.1 Synthese der fluoreszierenden second-generation TriPPPPro-Verbindungen	44
6.1.1 Synthese des bicyclischen 2'-Desoxynucleosidanalogs	46
6.1.2 Synthese der unsymmetrischen <i>H</i> -Phosphonate	51
6.1.3 Synthese der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	55
6.1.4 Vergleich der Lipophilie der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	61
6.1.5 Synthese der γ -alkylierten BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	65
6.1.6 Tri- und Diphosphat des bicyclischen Nucleosidanalogs	69
6.1.7 Hydrolysestudien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	79
6.1.8 Zellaufnahmestudien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	97
6.2 Synthese der second-generation 5-Fluor-2'-desoxyuridin-TriPPPPro-Verbindungen ...	116
6.2.1 5-Fluor-2'-desoxyuridin: Pharmakologische Eigenschaften, Metabolismus und klinische Anwendung	116
6.2.2 Synthese des 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphats	118
6.2.3 Synthese der second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen	120
6.2.4 Hydrolyse der 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen	122
6.3 Synthese der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen	128
6.3.1 Gemcitabin: pharmakologische Eigenschaften, Metabolismus und klinische Anwendung	128
6.3.2 Synthese des Gemcitabinmonophosphats	132
6.3.3 Synthese der symmetrischen <i>H</i> -Phosphonate	137
6.3.4 Synthese der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen	138
6.3.5 Synthese des Gemcitabintriphosphats	141
6.3.6 Synthese des Gemcitabindiphosphats	143
6.3.7 Hydrolyse der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen	144
6.4 Zellproliferationstests der Gemcitabin- und 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen	154
6.5 Versuchte Synthese einer C18Gem-TriPPPPro-Verbindungen	156
6.5.1 Prodrugkonzept von Gemcitabin: C18Gem	156
6.5.2 Versuchte Synthese des C18Gem-Monophosphats	159
6.6 Synthese einer 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung	162

6.6.1	Klinische Anwendung von 5-Azacytidin	162
6.6.2	Synthese des 5-Azacytidinmonophosphats	163
6.6.3	Synthese der 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung	168
7	Experimenteller Teil (Material und Methoden)	171
7.1	Allgemeines.....	171
7.2	Synthese	175
7.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	175
7.2.2	Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate 84	177
7.2.3	Synthese der γ -maskierten und -alkylierten <i>H</i> -Phosphonate.....	181
7.2.4	Synthese des bicyclischen Nucleosidanalogons	189
7.2.5	Synthese des BCNA-Monophosphats	191
7.2.6	Synthese der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	193
7.2.7	Synthese der γ -alkylierten BCNA-TriPPPPro-Verbindungen	203
7.2.8	Synthese des BCNA-Triphosphats	210
7.2.9	Synthese des BCNA-Diphosphats.....	212
7.2.10	Synthese des 5-FdU-Monophosphats	214
7.2.11	Synthese der 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen	216
7.2.12	Synthese der symmetrischen <i>H</i> -Phosphonate.....	218
7.2.13	Synthese des Gemcitabin-Monophosphats	220
7.2.14	Synthese der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen	223
7.2.15	Synthese des Gemcitabintriphosphats	226
7.2.16	Synthese des Gemcitabindiphosphats	227
7.2.17	C18Gem-TriPPPPro-Verbindung.....	228
7.2.18	Synthese einer 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung	231
7.3	Hydrolysestudien.....	234
7.3.1	Hydrolysestudien in Phosphatpuffer (PBS) bei pH 7.3	234
7.3.2	Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase (PLE) in PBS	234
7.3.3	Hydrolysestudien mit CEM/0-Zellextrakten.....	235
7.4	Biologische Untersuchungen.....	235
7.4.1	Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen.....	235
7.4.2	Zellaufnahmestudien in Krebszellen.....	235
7.4.3	Proliferationstests.....	236
9	Literaturliste	237
10	Anhang	247
11	Danksagung	262
12	Eidesstattliche Versicherung.....	264

III ABKÜRZUNGEN

In den Formelbildern und im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

5-FdU	5-Fluor-2'-desoxyuridin
5-FU	5-Fluoruracil
A	Adenin
Å	Ångström
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
AB	4-Acyloxybenzyl
ABC	Alkoxy-carbonyloxybenzyl
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Äquiv.	Äquivalent
AZT	Zidovudin
BCNA	bicyclisches Nucleosidanalogen
ber.	berechnet
c	Konzentration
C	Cytosin
cb	konjugierte Base (<i>conjugated base</i>)
CEM-Zellen	humane T-Lymphozyten-Zelllinie (Wildtyp)
<i>cycloSal</i>	cycloSaligenyl
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
d4T	Stavudin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAD	Diodenarray-Detektor
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dd	Dublett vom Dublett
dest.	destilliert
dFdC	2',2'-Difluordesoxycytidin, Gemcitabin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMF-DMA	Dimethylformamid-dimethylacetal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPP	Diphenylphosphonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>European Medicines Agency</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fötale Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	US-amerikanische Arzneimittelagentur (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FLD	Fluoreszenzdetektor
Fm	9-Fluorenylmethanol
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPV	Humane Papillomviren
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HSV-1, -2	Herpes-simplex-Viren (humane Herpesviren Typ 1 und 2)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Infrarot
<i>J</i>	Skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Multipllett

m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix assistierte Laser Desorption Ionisierung
MDS	Myelodysplastische Syndrom
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie (<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
NP	Normalphase
NTP	Nucleosidtriphosphat
Nu	Nucleophil
Nucl	Nucleosid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PLE	Schweineleberesterase (<i>pig liver esterase</i>)
ppm	ein Millionstel (<i>parts per million</i>)
q	Quartett
quin.	Quintett
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RR	Ribonucleotidreduktase
Rt	Raumtemperatur
Sdp.	Siedepunkt
t	triplett
T	Thymin
TBAA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumacetat
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
<i>tert</i>	tertiär
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid

THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidinkinase
TMP	Trimethylphosphat
Tpase	Transposase
UV	Ultraviolett
v:v	Volumen:Volumen, Volumenanteil
VEGF	vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
Vol.%	Volumenprozent
VV	Vacciniavirus
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organization</i>)
XTT	2,3,5-Triphenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumchlorid

1 ZUSAMMENFASSUNG

Nucleosidanaloga stellen eine sehr wichtige Substanzklasse bei der Behandlung von Virus- und Krebserkrankungen dar, allerdings hängt der Behandlungserfolg stark von der intrazellulären Metabolisierung zum Triphosphat ab. Aufgrund einer hohen Substratspezifität der beteiligten Enzyme erfolgen die benötigten Phosphorylierungsschritte häufig langsam und ineffektiv. Geeignete Prodrugstrategien, mit denen intrazellulär bereits phosphorylierte Nucleotide freigesetzt werden können, sollen zu einer Umgehung der Aktivierungsschritte führen und dadurch die Effizienz erhöhen. Mit der Entwicklung des TriPPPPro-Konzepts von GOLLNEST wurde erstmals eine Prodrugstrategie geschaffen, mit der direkt das Triphosphat in der Zelle freigesetzt werden kann. Durch Acyloxybenzylmaskierungen an der γ -Phosphatgruppe werden die negativen Ladungen des Triphosphats verdeckt, wodurch die Verbindung eine ausreichende Lipophilie aufweist, um die Zellmembran passieren zu können. Anschließend wird intrazellulär das Triphosphat durch enzymatische Abspaltungen der Maskierungseinheiten freigesetzt. Mit TriPPPPro-Verbindungen einiger Nucleosidanaloga konnte die antivirale Aktivität gesteigert werden. Der Beweis der Zellaufnahme und der intrazellulären Freisetzung des Triphosphats gelang GOLLNEST durch die Verwendung eines fluoreszenten Nucleosidanalogs. Es konnte allerdings ebenso eine schnelle Dephosphorylierung des Triphosphats beobachtet werden, weswegen von ZHAO second-generation TriPPPPro-Verbindungen entwickelt wurden. Hier liegt an der γ -Phosphatgruppe eine spaltbare Maskierungseinheit sowie ein nichtspaltbarer Alkylsubstituent vor. Durch diese Modifizierung wird nach der Abspaltung der Maskierungseinheit die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung, jedoch nicht das Triphosphat freigesetzt. Von ZHAO konnte dadurch eine höhere Stabilität und antivirale Aktivität nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Anwendung des TriPPPPro-Konzepts für einen Einsatz in der Krebsbehandlung erprobt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deswegen die Zellaufnahme der second-generation TriPPPPro-Verbindungen in Krebszellen sowie die anschließende intrazelluläre Metabolisierung untersucht. Im zweiten Teil wurde das TriPPPPro-Konzept bei anti-tumoraktiven Nucleosidanaloga angewendet sowie deren Einfluss auf das Zellwachstum betrachtet.

Für die Zellaufnahmestudien wurde aufbauend auf den guten Ergebnissen von GOLLNEST, REIMER, PERTENBREITER und WITT als fluoreszentes Nucleosidalogon ein bicyclisches Nucleosidalogon verwendet. In dieser Arbeit gelang die erfolgreiche Darstellung von zehn verschiedenen second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen. Durch Variationen der Alkylkettenlängen sowohl in der Maskierungseinheit als auch im Alkylsubstituenten wurden Verbindungen mit unterschiedlicher Lipophilie synthetisiert. Dadurch konnte die optimale Lipophilie für die Zellaufnahme ermittelt werden. Die Synthese der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen erfolgte über die *H*-Phosphonatroute in guten bis sehr guten Ausbeuten von 24-65%. In dieser Arbeit gelang außerdem die Darstellung von zwei

γ -alkylierten BCNA-TriPPPro-Verbindungen in Ausbeuten von 25% bzw. 31%. Zudem konnte durch Varianten der YOSHIKAWA-Reaktion das 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphat und -triphosphat in 30% bzw. 16% zugänglich gemacht werden. Durch Hydrolysestudien in PBS-, PLE- und im CEM/0-Medium wurde gezeigt, dass die second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen selektiv die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung freisetzen. Der Verlauf der Hydrolyse entspricht folglich dem postulierten Mechanismus aus **Abbildung 70**. Es gelang außerdem der Beweis der hohen Stabilität der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen sowie des BCNA-Diphosphats und -triphosphats durch Hydrolysen in PBS und PLE. Dadurch kann deren Einfluss auf die Ergebnisse der Hydrolyse und Zellaufnahmestudien der BCNA-TriPPPro-Verbindungen ausgeschlossen werden. In CEM-SS-Zellaufnahmestudien konnte erstmals die erfolgreiche Aufnahme der beiden untersuchten second-generation BCNA-TriPPPro-Verbindungen sowie der γ -alkylierten BCNA-TriPPPro-Verbindungen gezeigt werden. Außerdem gelang der Beweis der erfolgreichen Aufnahme in Krebszellen von allen zehn second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen. Dabei konnte die selektive Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen in Krebszellen erstmalig bestätigt werden. Anhand dieser Studien wurde gezeigt, dass die second-generation BCNA-TriPPPro-Verbindungen in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren, und, dass es auch in Krebszellen zur enzymatischen Abspaltung der Acyloxybenzylmaskierungen und somit zur Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung kommt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung intrazellulär den Hauptmetaboliten darstellt.

Für den zweiten Teil dieser Arbeit wurde das TriPPPro-Konzept auf bereits in der Krebsbekämpfung verwendete Zytostatika angewendet, um den Einfluss des TriPPPro-Konzepts auf deren Wirkung zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Synthese von zwei second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen in guten Ausbeuten von 37% sowie 46%. Mit Hilfe von PBS- und PLE-Hydrolysestudien konnte auch hier die erfolgreiche und selektive Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden symmetrische Prodrugs anderer antitumoraktiver Nucleosidanaloga dargestellt. Es gelang die erstmalige Synthese dreier verschiedener Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute in Ausbeuten von 21-35%. In durchgeführten PBS-, PLE- und CEM/0-Hydrolysestudien konnte die erfolgreiche Freisetzung des Gemcitabintriphosphats gezeigt werden. Bei der CEM/0-Hydrolyse kam es jedoch durch Dephosphorylierungen des Triphosphats zur Bildung des Diphosphats und des Monophosphats. Über Varianten der YOSHIKAWA-Reaktion gelang die erfolgreiche Darstellung des Gemcitabindiphosphats und -triphosphats in 28% und 18%. Durch Hydrolysestudien konnte eine hohe Stabilität des Di- und Triphosphats bewiesen werden, wodurch gezeigt wurde, dass die Zersetzung dieser Verbindungen keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Hydrolyse oder den Proliferationsassays der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen hat. In Zellproliferationsassays konnte bei den in

dieser Arbeit synthetisierten 5-FdU- und Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen keine Verbesserung der Wirkung im Vergleich zum Nucleosidanalogen beobachtet werden.

Bei Gemcitabin gilt die Aminofunktion in der Nucleobase als ein möglicher Angriffspunkt für die Inaktivierung des Nucleosidanalogs. Laut Literatur¹ lässt sich durch das Anbringen eines Stearoylsubstituenten diese Position schützen und die Aktivität von Gemcitabin steigern. In der Zelle kommt es durch enzymatische Abspaltung der Schutzgruppe zur Freisetzung von Gemcitabin. Es sollte deswegen eine TriPPPro-Verbindung dieses geschützten Gemcitabin-derivats C18Gem synthetisiert werden. Die Synthese von C18Gem gelang in einer Gesamtausbeute von 71% über drei Stufen. In einer YOSHIKAWA-Reaktion sollte anschließend das Monophosphat dargestellt werden, diese Reaktion gelang jedoch nicht. Es wird vermutet, dass der Alkylsubstituent diese Reaktion verhindert hat, indem er die 5'-Hydroxylgruppe abgeschirmt hat.

Als letztes Nucleosidanalogen sollte 5-Azacytidin für die TriPPPro-Synthese verwendet werden. Dafür wurde zunächst 5-Azacytidin dargestellt, dies gelang in einer Gesamtausbeute von 21% über fünf Stufen. Über die YOSHIKAWA-Methode wurde das Monophosphat in 18% Ausbeute gebildet. Anschließend wurde das 5-Azacytidinmonophosphat mit einem C11-Pyrophosphat zur TriPPPro-Verbindung gekoppelt. Es gelang der erfolgreiche Nachweis der 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung via 2D-NMR und MS, allerdings kam es während der Aufarbeitung zur Zersetzung der TriPPPro-Verbindung, wodurch eine Isolierung des Produkts verhindert wurde.

2 ABSTRACT

Nucleoside analogues play a very important role in the treatment of virus infections and cancer. The success of the treatment strongly depends on the intracellular metabolism of the nucleoside analogues into the corresponding triphosphate. Due to high substrate specificity of the relevant enzymes the necessary phosphorylation steps often occur slowly and insufficiently. Suitable prodrug strategies which release phosphorylated nucleotides intracellularly can be used to avoid those activation steps and thereby increase efficiency. Through the development of the TriPPP_{Pro} concept by GOLLNEST, a suitable prodrug strategy was created that is capable of releasing the active triphosphate directly into the cell. Acyloxybenzyl moieties at the γ -phosphate group can hide the negative charges of the triphosphate and thereby create enough lipophilicity for the molecule to penetrate the cell membrane. Intracellularly the triphosphate gets released by enzymatical cleavage of the acyloxybenzyl moieties. The synthesis of TriPPP_{Pro} compounds led to an increase of the antiviral activity of several nucleoside analogues. Proving successful cellular uptake was done by GOLLNEST through investigations with fluorescent nucleoside analogues. Such investigations also led to the observation of rapid dephosphorylation of the triphosphate and the development of second generation TriPPP_{Pro} compounds by ZHAO. These second generation compounds include a removable masking unit and a non-removable alkyl chain at the γ -phosphate group. Because of these modifications the γ -alkylated TriPPP_{Pro} compound is formed after the removal of the masking unit, the triphosphate cannot be released from such a compound. ZHAO was able to show higher stability and higher antiviral activity of these compounds.

In this thesis the application of the TriPPP_{Pro} concept for cancer treatment was investigated. In the first part, the cellular uptake of second generation TriPPP_{Pro} compounds in cancer cells and the following intracellular metabolism was analysed. In the second part, the TriPPP_{Pro} concept was applied to antitumor active nucleoside analogues and their influence on cell growth was assessed.

Following the good results of GOLLNEST, REIMER, PERTENBREITER and WITT a bicyclic nucleoside analogue was used as a fluorescent nucleoside analogue. In this thesis the second generation 2'-deoxy BCNA TriPPP_{Pro} compounds were synthesized via the *H*-phosphonate route in good to excellent yields of 24-65%. Varying the length of the alkyl chain in the masking unit as well as in the alkyl substituent led to the formation of compounds with different lipophilicity. This enabled the optimal lipophilicity for cellular uptake to be determined. Also, the synthesis of two different γ -alkylated BCNA TriPPP_{Pro} compounds with yields of 25% and 31%, respectively, was accomplished during this thesis. Besides that, the synthesis of the BCNA diphosphate and triphosphate was also done via variations of the YOSHIKAWA reaction with 30% and 16% yields, respectively. With hydrolysis studies in PBS, PLE and CEM/0 medium it was proven that the second generation 2'-deoxy BCNA TriPPP_{Pro} compounds released the γ -alkylated TriPPP_{Pro} compound selectively. The process of the hydrolyses matched the

postulated mechanism in **figure 70**. It was also possible to prove the high stability of the γ -alkylated TriPPPPro compounds, the BCNA diphosphate and triphosphate through hydrolyses in PBS and PLE. Therefore, it can be excluded that these compounds interfere with the hydrolyses or cellular uptake studies of the BCNA TriPPPPro compounds. In uptake studies with CEM SS cells the successful uptake of the two investigated BCNA TriPPPPro compounds as well as the γ -alkylated TriPPPPro compounds could be shown for the first time. Also, the successful uptake of the ten synthesised 2'-deoxy BCNA TriPPPPro compounds in cancer cells was proven by uptake studies and the intracellular release of γ -alkylated TriPPPPro compounds could be confirmed. With those studies it could be reassured that the second generation BCNA TriPPPPro compounds are able to penetrate the cell membrane and that the masking unit gets cleaved enzymatically in cancer cells and thereby the γ -alkylated TriPPPPro compound gets released. In addition, it has been shown that the γ -alkylated TriPPPPro compound is the main metabolite released intracellularly.

In the second part of this work the TriPPPPro concept was applied to cytostatic drugs that are already used in the treatment of cancer to be able to investigate the influence of the TriPPPPro concept on those substances.

During this work the synthesis of two different second generation 5-FdU TriPPPPro compounds was accomplished with good yields of 37% and 46%, respectively. Through PBS and PLE hydrolysis studies, the successful and selective release of the γ -alkylated TriPPPPro compound has been proven. In the course of this work, symmetric TriPPPPro compounds of other antitumor active nucleoside analogues have been synthesised. The synthesis of three different gemcitabine TriPPPPro compounds via the *H*-phosphonate route was accomplished for the first time, with yields ranging from 21% to 35%. The conducted PBS, PLE and CEM/0 hydrolysis studies demonstrated the successful release of the gemcitabine triphosphate. During the CEM/0 hydrolysis dephosphorylation of the triphosphate occurred and thereby the diphosphate was generated. Again, Gemcitabine diphosphate and triphosphate have been synthesised through variations of the YOSHIKAWA reaction with yields of 28% and 18%, respectively. Hydrolysis studies again showed high stability of the gemcitabine diphosphate and triphosphate. Therefore, interference with the hydrolysis or cell proliferation assays could be eliminated. The performed cell proliferation assays showed no improvement of the synthesised 5-FdU and gemcitabine TriPPPPro compounds in comparison to the parent nucleoside.

Within gemcitabine the amino function of the nucleobase is presumed to be a potential point of attack for the inactivation process of the nucleoside analogue. According to the literature¹, the addition of a stearyl substituent protects this position and increases the activity of gemcitabine. Within the cell this protective group gets cleaved enzymatically and thereby gemcitabine is released. Because of that, this protected gemcitabine derivative C18Gem should be used for the synthesis of a TriPPPPro compound. The synthesis of C18Gem was accomplished with an overall yield of 71% over 3 steps. The C18Gem monophosphate should

be synthesised via YOSHIKAWA reaction. Unfortunately, this reaction wasn't successful. The assumption is that the long alkyl chain prevents this reaction by hiding the 5'-hydroxyl group.

The last investigated nucleoside analogue for the TriPPPro synthesis was azacytidine. Therefore, azacytidine has been synthesised over five steps with a total yield of 21%. Via YOSHIKAWA reaction the azacytidine monophosphate was created with a yield of 18%. Next this monophosphate was coupled with a C11 pyrophosphate to create the corresponding TriPPPro compound. It has been proven via 2D NMR and MS that the azacytidine TriPPPro compound was successfully synthesised but unfortunately the compound decomposed during the purification process.

3 EINLEITUNG

Krebs ist weltweit eine ernstzunehmende Gesundheitsgefahr, die mehr als 150 verschiedene einzelne Krankheiten umschließt. Sie ist jährlich für den Tod von Millionen Menschen verantwortlich.² In Deutschland werden jedes Jahr fast 500.000 neue Krebsdiagnosen gestellt. Seit über 20 Jahren geht außerdem mehr als ein Viertel aller jährlichen Todesfälle hierzulande auf eine Krebserkrankung zurück (2019: 231.000 Krebstote von insgesamt 939.520 Verstorbenen).^{3,4} Die Zahl der weltweiten Krebsdiagnosen wird in den nächsten Jahren und Jahrzehnten weiter steigen.⁵ So geht das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) davon aus, dass sich innerhalb der nächsten 20 Jahre weltweit die Anzahl der Krebserkrankungen verdoppeln und in Deutschland während der nächsten zehn Jahre die Zahl der Neuerkrankungen von 500.000 auf 600.000 steigen wird.⁶ Durch medizinischen Fortschritt konnten die Überlebensraten bei vielen Tumorformen deutlich verbessert werden. Inzwischen überleben 50% der Männer und 58% der Frauen die ersten fünf Jahre nach einer Erkrankung. Nach Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert-Koch-Institut (RKI) hat sich die Gesamtüberlebensrate (welche über Geschlecht, Alter und Entität gemittelt wird) von 52.5% in 2007/08 auf 55.5% in 2015/16 verbessert.³

2019 wurde in Deutschland die Initiative „Nationale Dekade gegen Krebs“ des Bundesforschungsministeriums und des Bundesgesundheitsministeriums ins Leben gerufen. Dabei sollen innerhalb von zehn Jahren die Forschungsinteressen des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) und anderen Vertretern aus translationaler Krebsforschung, Politik, Forschungsförderung, Gesundheitswesen, Wirtschaft und Gesellschaft gebündelt und gemeinsam Strategien entwickelt werden, um Krebs erfolgreich zu bekämpfen.⁶

Mit Krebs wird in der Medizin eine bösartige Gewebeneubildung bezeichnet. Die Tumorzellen vermehren sich dabei unkontrolliert und wachsen in Nachbargewebe ein, wodurch gesundes Gewebe zerstört wird. Gelangen bösartige Tumorzellen in die Blut- oder Lymphbahnen, so kommt es zur Bildung von Metastasen. In diesen bösartigen Zellen funktionieren die Signale nicht mehr, die in gesunden Zellen das Wachstum steuern, wodurch unkontrolliertes Zellwachstum möglich wird. Alle Tumore und Krebsformen unterscheiden sich, keine gleicht der anderen, allerdings führen alle unbehandelt zum Tod des Patienten.⁶ Dadurch werden unterschiedliche und oftmals individuelle Therapien benötigt. Es wird zwischen genetischen und epigenetischen Veränderungen der Erbinformation unterschieden. Bei genetischen Änderungen wird die Reihenfolge der DNA-Bausteine alterniert. Dies kann durch den Verlust, das Hinzufügen oder Verschieben einzelner oder mehrerer Bausteine erfolgen. Dadurch wird von den entsprechenden Genprodukten zu viel oder zu wenig hergestellt oder die erhaltenen Eigenschaften sind verändert.⁶ Bei epigenetischen Variationen liegen die Veränderungen an der Verpackung der DNA vor. Dabei sorgen Moleküle, die an die Erbinformation angehängt sind, dafür, dass Gene nicht abgelesen werden können. Auch dadurch kann Krebs entstehen.

Epigenetische Veränderungen können umkehrbar sein, beispielsweise kann durch Lebensstilveränderungen manche krebsfördernde Veränderung an der DNA wieder rückgängig gemacht werden.⁶

Welche Einflüsse können die Erbinformation verändern bzw. schädigen? Dazu gehören bekannte Gewohnheiten wie Rauchen.^{6,7} Lungenkrebs ist mit 11.6% aller Krebsneuerkrankungen die am häufigsten gestellte Diagnose und mit 18.4% aller durch Krebs verursachter Todesfälle die am häufigsten tödlich verlaufende Krebsvariante.⁸ Andere Risikofaktoren sind Übergewicht und damit einhergehende Stoffwechselveränderungen, Bewegungsmangel, UV-Strahlung, Alkoholkonsum und schlechte Ernährung mit wenig Obst, Gemüse und Ballaststoffen, dafür mit viel rotem und verarbeitetem Fleisch.^{6,7} Chronische Infektionen sind ebenfalls für einige Krebserkrankungen verantwortlich, etwa 4% der Krebserkrankungen werden durch Infektionen hervorgerufen. Durch Impfungen oder ursächliche Therapien kann dieses Risiko gesenkt werden. Beispiele für diese Behandlungen sind: Impfung gegen Hepatitis B und humane Papillomviren (HPV).⁷ Krebs kann allerdings auch durch eine spontane Mutation entstehen. Oftmals werden diese Fehler durch körpereigene Reparaturmechanismen behoben, allerdings häufen sie sich mit steigendem Alter und dadurch können nicht mehr alle beseitigt werden, weswegen mit dem Alter die Krebsgefahr zunimmt.⁵⁻⁷ Es sind noch nicht alle Mechanismen der Krebsentstehung bekannt, allerdings soll dies durch intensive Forschung behoben werden, da durch ein größeres Verständnis der Entstehung auch eine gezieltere Therapie möglich wird.⁶

Bei der Behandlung der Krebserkrankungen sind seit Jahrzehnten die Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie die Standardmethoden. Daneben wurden zielgerichtete medikamentöse Therapien, Immuntherapien und Virotherapien entwickelt und werden immer häufiger eingesetzt.^{5,6} Obwohl es in den letzten Jahren einige Erfolge bei der Entwicklung neuer Therapien gab, bleibt die Chemotherapie mit dem Einsatz von zytotoxischen Medikamenten eine unentbehrliche Methode in der Krebsbehandlung.^{9,10,11} Es gibt eine große Vielfalt verschiedener Chemotherapeutika. Sie können grob in die Kategorien Alkylierungsreagenzien, Antimetabolite, Naturstoffe, Hormone und Hormonantagonisten unterteilt werden.⁹ Aufgrund der hohen Komplexität der Krebserkrankungen erhalten die meisten Patienten für eine optimale Therapie Kombinationen aus unterschiedlichen Präparaten.⁹ Ein großes Hindernis der erfolgreichen Therapie stellt die Chemoresistenz dar, diese kann sowohl intrinsisch als auch erworben sein.^{12,13} Sie stellt den Hauptgrund für die Bildung eines Rezidivs dar, weswegen ein großes Interesse an der Erforschung der Resistenzbildung besteht.^{9,11} Krebszellen sind zudem in der Lage, Chemotherapien auf vielfältige Weise zu torpedieren. Dazu gehören eine verminderte Zellaufnahme oder ein erhöhtes Ausscheiden der Wirkstoffe, Veränderung des Metabolismus oder die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen.^{9,13} Die häufig bei der Chemotherapie verwendeten Nucleosidanaloga sind Antimetabolite und weisen strukturelle Ähnlichkeit mit den natürlichen Nucleosiden auf. Sie besitzen außerdem ein breites Wirkungsspektrum und Vertreter davon sind sowohl gegen solide Tumore als auch

bösartige Erkrankungen des Blutes wirksam. Deswegen finden sie vielfach Anwendung in der Chemotherapie und gehören zu den am häufigsten verwendeten Zytostatika.^{2,5,9,14} Obwohl chemotherapeutische Medikamente bei der Krebsbehandlung eine wichtige Rolle spielen, gibt es immer noch einige Nachteile, die behoben werden müssen.²

Im pharmazeutischen Bereich werden durch die Verwendung von Prodrugs bestimmte Probleme, die bei der Gabe des reinen Wirkstoffs bestehen, vermieden. Durch die Herstellung von Prodrugs werden physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Medikamenten verbessert. Die Probleme umfassen dabei eine schlechte Wasserlöslichkeit, geringe chemische Stabilität, kurze Halbwertszeit sowie schnelle Metabolisierung.¹⁵

Im Rahmen dieser Arbeit soll das im AK MEIER entwickelte TriPPPro-Konzept auf einen Einsatz in der Krebsbehandlung untersucht werden. Dafür sollen zunächst fluoreszente second-generation TriPPPro-Verbindungen synthetisiert und anschließend deren Zellaufnahme sowie Metabolisierung in Krebszellen untersucht werden. Außerdem sollen symmetrische TriPPPro-Verbindungen von bereits eingesetzten Zytostatika dargestellt werden. Mit ihnen soll untersucht werden, ob eine verbesserte Wirkung im Vergleich zu den Nucleosidanaloga erzielt werden kann.

4 KENNTNISSTAND

4.1 Nucleosidanaloga

Nucleoside und Nucleotide sind natürliche Verbindungen, die in vielen wichtigen zellulären Abläufen wie DNA- und RNA-Synthese, Zellsignalwegen, Enzymregulierung und Metabolismus involviert sind. Nucleoside bestehen aus einer Purin- (Adenin oder Guanin) oder Pyrimidinbase (Cytosin, Uracil oder Thymin), die mit einer Pentose (β -D-Ribofuranose oder β -D-Desoxyribofuranose) verknüpft ist. Veresterungen der 5'-Hydroxylgruppe führen zur Bildung der 5'-Nucleotide und damit der aktiven Formen des Nucleosids.^{16,17} Natürliche Desoxyribonucleotide werden im Körper auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt, der *de novo*-Synthese und dem *salvage*-pathway. Bei der *de novo*-Synthese werden Ribonucleotide ausgehend von kleinen Molekülen synthetisiert, in das Ribonucleotidmonophosphat überführt und zum Diphosphat phosphoryliert. Durch die Ribonucleotidreduktase erfolgt anschließend in einer irreversiblen Reaktion die Reduktion zum 2'-Desoxyribonucleotid, wodurch die 2'-Desoxyribonucleotiddiphosphate erhalten werden. Beim *salvage*-pathway werden vorgeformte Desoxyribonucleotide über Nucleotidtransporter in die Zelle geschleust und durch zelluläre Kinasen in das Triphosphat überführt. Diese intrazellulären Phosphorylierungsschritte sind reversibel. Die Nucleotide können somit wieder in die Nucleoside gespalten werden.¹⁸

Bei Nucleosid- und Nucleotidanaloga handelt es sich um chemisch modifizierte Verbindungen, die entwickelt wurden, um die physiologischen Verbindungen zu imitieren.¹⁶ Sie stellen eine pharmakologisch diverse Klasse dar, welche cytotoxische, antivirale und immunsuppressive Verbindungen beinhaltet. Nucleosidanaloga sind Antimetabolite, die mit der Synthese von Nucleinsäuren interferieren.^{19,20} Sie können den gleichen zellulären Metabolismus nutzen, um in die DNA oder RNA eingebaut zu werden und so die Zellteilung oder die Virusreplikation stören. Dieser zelluläre Ablauf ermöglicht den therapeutischen Einsatz bei der Inhibierung des Tumorstwachstums oder der Virusreplikation.¹⁶ Nucleosidanaloga werden über den *salvage*-pathway in das entsprechende Triphosphat überführt.¹⁸ In **Abbildung 1** sind der Metabolismus sowie die möglichen Wirkweisen und Deaktivierungen der Nucleosidanaloga in der Zelle gezeigt.

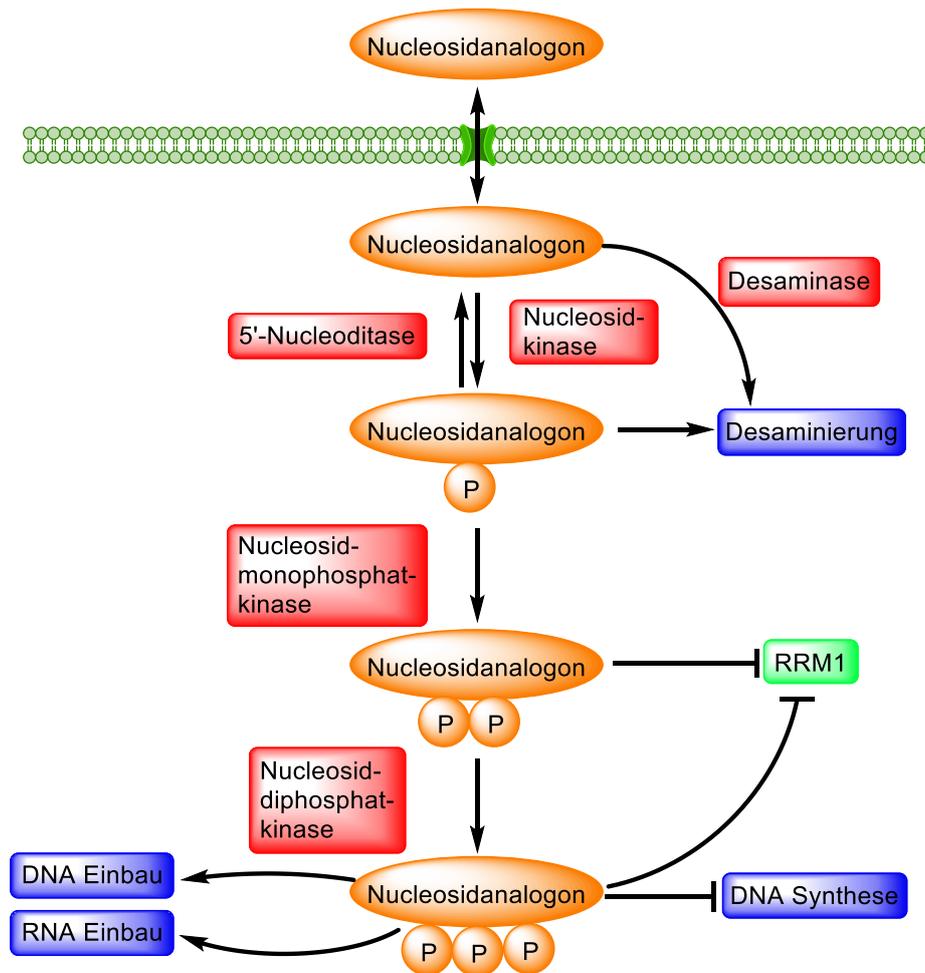


Abbildung 1: Intrazelluläre Metabolisierung der Nucleosidanaloga.¹⁶

Da die Nucleosidanaloga, genauso wie die natürlichen Nucleoside, hydrophile Verbindungen sind, erfolgt die Zellaufnahme über einen Transporter. Sie stellt somit einen aktiven Prozess dar.²¹ Im menschlichen Körper existieren drei konzentrationsabhängige Nucleosidtransporter (CNTs) und vier gleichgewichtsabhängige Nucleosidtransporter (ENTs), mit denen sie in die Zelle aufgenommen werden können. Bei Nucleosidanaloga handelt es sich um Prodrugs, sie müssen somit in der Zelle in die aktive Form überführt werden. Die intrazelluläre Phosphorylierung zum Nucleosidmonophosphat erfolgt durch Nucleosidkinasen, wobei es sich oftmals um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Umwandlung in die aktiven Triphosphate handelt. Die zweite Phosphorylierung erfolgt durch die Nucleosidmonophosphatkinase und die Umwandlung zum Triphosphatanaloga wird anschließend durch die Nucleosiddiphosphatkinase katalysiert. Die Triphosphatanaloga konkurrieren mit ihren natürlichen Gegenspielern um den Einbau in die DNA oder RNA. Sie sind außerdem in der Lage, durch die Inhibition essenzieller Enzyme, wie beispielsweise der DNA-Polymerase, die DNA-Synthese zu hemmen. Die Ribonucleotidreduktase M1 (RRM1), ein wichtiges Enzym bei der Nucleotidmetabolisierung, kann sowohl durch diphosphorylierte als auch triphosphorylierte Nucleosidanaloga inhibiert werden. Dadurch wird die gebildete Menge von natürlichen

Desoxyribonucleotiden geringer und somit der Einbau der Nucleotidanaloga in die DNA-Kette wahrscheinlicher. Katabolische Enzyme, wie beispielsweise Desaminasen oder 5'-Nucleotidasen, können die Menge an aktiven Metaboliten reduzieren. Sobald das aktive Triphosphat in der Zelle vorliegt, wird der Abbruch der Kettenverlängerung oder die Apoptose eingeleitet.^{2,16,22}

Im Folgenden sollen diese beiden Mechanismen detaillierter dargestellt werden.

Beendigung der Kettenverlängerung

Nucleotidanaloga stehen in Konkurrenz zu den natürlichen Nucleotiden um den Einbau in den DNA- oder RNA-Strang durch virale oder humane Polymerasen. Dadurch hängt der Einbau des Nucleotidanalogs von der Affinität der beteiligten Enzyme für Nucleotide ab. Das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe in der Zuckereinheit verhindert das Ausbilden der 3'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen dem Nucleotidanalogen und dem folgenden Nucleotid, woraus ein früher Abbruch der Kettenverlängerung der wachsenden viralen DNA- oder RNA-Kette resultiert. Der Kettenabbruch wird ebenfalls bei antitumoraktiven Nucleotidanaloga, welche eine 3'-Hydroxylgruppe besitzen, beobachtet. Für diesen Effekt wird das Erkennen des Analogons als nicht-human als Grund angegeben.^{16,23}

Einleiten der Apoptose

Der genaue Mechanismus, der dem Einleiten der Apoptose durch antitumoraktive Nucleosidanaloga zugrunde liegt, wurde noch nicht vollständig aufgeklärt.¹⁴ Sie greifen in der S-Phase des Zellzykluses ein. Nucleosidanaloga werden oft zusammen mit Reagenzien eingesetzt, die giftig für die DNA sind, beispielsweise Alkylierungs- oder Platinverbindungen. Durch diese Substanzen wird die Reparatur von DNA-Schäden verhindert oder können durch diese ebenso verursacht werden. So wird beispielsweise Fludarabin zusammen mit Cyclophosphamid für die Behandlung chronischer lymphatischer Leukämie und Gemcitabin mit Cisplatin bei der Behandlung von Lungenkrebs eingesetzt.^{16,24}

Die Familie der Nucleosidanaloga beinhaltet verschiedene Purin- und Pyrimidinanaloga. Zu den Pyrimidinanaloga gehört Cytarabin (ara-C, **1**), welches 1969 als erstes Nucleosidanalogen durch die FDA zugelassen wurde und bei der Behandlung der akuten Leukämie eingesetzt wird. Wohingegen Gemcitabin (**2**), ebenfalls ein Pyrimidinanalogen, auf solide Tumore wirkt. Es wird bei der Therapie von Pankreas-, Lungen- und Brustkrebs angewendet.^{2,20,22,25,26} Die Fluorpyrimidine Capecitabin (**3**) und Fluoruracil (**4**) sind aktiv gegen Brust- und Kolorektal Karzinome.¹⁹ Zu den Purinanaloga gehören beispielsweise Cladribin (2-CdA, **5**) und Fludarabin (**6**). Diese beiden Vertreter werden in der Behandlung von bösartigen Erkrankungen des Blutes verwendet.^{2,22,26,27} Die Pyrimidinanaloga 5-Azacytidin (**7**) und Decitabin (**8**)

werden als Methylierungsreagenzien bei der Behandlung verschiedener Leukämien eingesetzt.² Ein signifikanter Anteil der heute verwendeten Chemotherapien involviert die Verwendung von Nucleosidanaloga.²⁸ In **Abbildung 2** sind die genannten Nucleosidanaloga dargestellt.

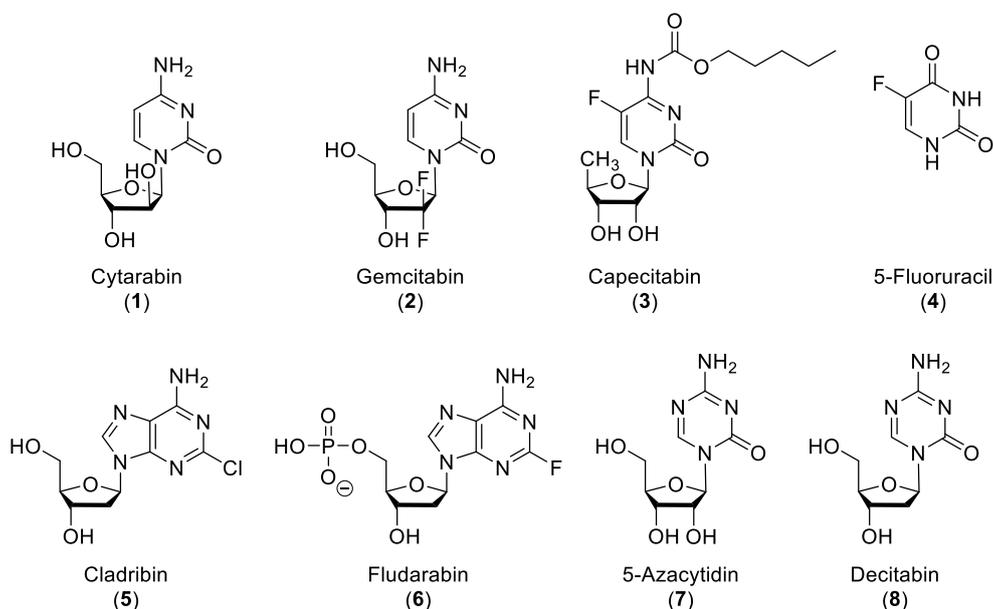


Abbildung 2: Darstellung einiger cytotoxischer Nucleosidanaloga.²

4.2 Prodrug-Konzepte

Obwohl bereits einige Nucleosidanaloga im klinischen Alltag Anwendung finden, werden trotzdem neue Strategien benötigt, damit bekannte Hindernisse wie schlechte Bioverteilung, Entwicklung von Resistenzen, Langzeittoxizität und die Notwendigkeit von patientenindividuellen Dosen vermieden werden können.^{16,28}

4.2.1 Monophosphat-Prodrugs

Aufgrund der leichten Modifizierungen der Nucleosidanaloga, welche sowohl am Glykon als auch der Nucleobase vorliegen können, erfolgt die Umsetzung durch die zellulären Enzyme teilweise sehr langsam und ineffizient. Für Stavudin (d4T), ein sehr wirksames Medikament bei der Behandlung vom Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), stellt der erste Phosphorylierungsschritt durch das *salvage*-pathway Enzym Thymidinkinase (TK) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.^{29–33} Daneben können auch katabolische Prozesse der Grund für die Inaktivität eines Nucleosidanalogs sein. Beispielsweise wird Didesoxyadenosin (ddA)

durch Desaminierung zum inaktiven Didanosin (ddl). Erst durch mehrere enzymatisch kontrollierte Reaktionen könnte ddA zurückerhalten werden. Durch eine direkte Gabe des Nucleosidmonophosphats ließe sich sowohl der geschwindkeitsbestimmende Schritt als auch die genannte Inaktivierung umgehen, dadurch sollte eine Erhöhung der Nucleotidkonzentration und damit der Aktivität erzielt werden können. Da es sich bei Nucleotiden um geladene Moleküle handelt, können diese nur schlecht die Zellmembran oder die Blut-Hirn-Schranke passieren. Deswegen würde die Gabe des reinen Nucleosidmonophosphats als Medikament nicht zu einer Verbesserung der therapeutischen Effizienz führen, da es nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu passieren und zudem anfällig für Dephosphorylierungen ist.³⁴ Eine Herangehensweise, um die therapeutische Effizienz zu erhöhen, ist das Nucleotid in der Zelle aus einem neutralen, membranpermeablen Prodrug freizusetzen. Durch das Anbringen einer lipophilen Maske an die Phosphatgruppe sollte eine Verbindung entstehen, welche die Zellmembran passieren kann und intrazellulär das Nucleosidmonophosphat freisetzt. Durch anschließende Phosphorylierungen durch zelluläre Kinasen sollte das aktive Triphosphat gebildet werden und die gewünschte biologische Wirkung erhalten werden können.^{30,35} In **Abbildung 3** ist das Prinzip des Pronucleotidkonzepts anschaulich dargestellt.

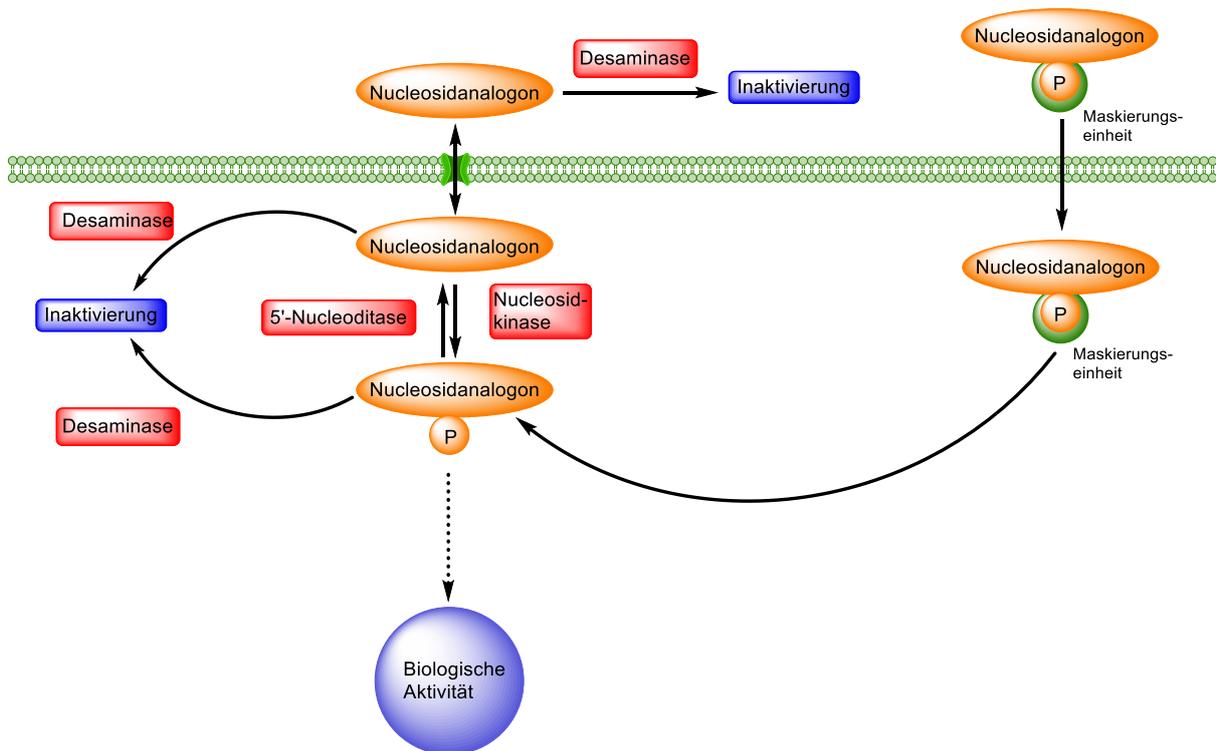


Abbildung 3: Darstellung des Pronucleotidkonzepts.¹⁶

Konventionelle Nucleosidanaloga sind Prodrugs, da sie nicht intrinsisch aktiv sind. Es sind intrazelluläre Aktivierungsschritte notwendig, damit das cytotoxische oder antivirale Reagenz erhalten wird. Während des Transports oder des Aktivierungsprozesses existieren einige Resistenz- und Inaktivierungsmöglichkeiten, die der Metabolisierung in die aktive Form im Wege stehen. Pronucleotide sind ebenfalls Prodrugs, es handelt sich um phosphorylierte Nucleoside, die aufgrund von Maskierungen in der Lage sind, die Zellmembran eigenständig zu passieren und, aufgrund der bereits vorhandenen Phosphatgruppe, wichtige Aktivierungsschritte umgehen können. Da der erste Phosphorylierungsschritt oftmals den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, wurden Pronucleotide auf Monophosphatbasis entwickelt. Pronucleotide werden nicht durch extra- oder intrazelluläre Desaminasen angegriffen und können somit diese Inaktivierungsschritte umgehen. Aufgrund lipophiler Modifizierungen sind sie in der Lage, durch die Zellmembran zu diffundieren und intrazellulär durch enzymatisch oder chemisch induzierte Reaktionen das Nucleotid freizusetzen. Dadurch sind sie für die Bildung des Monophosphats unabhängig von zellulären Kinasen. Die chemische Vielfalt der Pronucleotide resultiert aus dem verwendeten Nucleosid sowie den verwendeten Maskierungseinheiten.¹⁶ Einige vorklinische Studien konnten den Erfolg der Pronucleotide im Modell zeigen, das normalerweise resistent gegen die ursprünglichen Nucleoside ist.^{16,34}

Ein passendes Pronucleotidkonzept muss folgende Anforderungen erfüllen. Es muss für das Passieren der Zellmembran und Blut-Hirn-Schranke ausreichend lipophil sein. Außerdem muss das Nucleotid durch enzymatische oder chemische Hydrolyse freigesetzt werden. Zudem darf die abgespaltene Maskierungseinheit nicht toxisch sein. Bei Monophosphatprodrugs müssen zwei negative Ladungen „verdeckt“ werden, damit eine neutrale und lipophile Verbindung gebildet werden kann. Dies führte zur Entwicklung einiger Methoden, bei denen ein Phosphotriester als membranpermeable Vorstufe eingesetzt wird.³⁰

4.2.1.1 Erste Monophosphatprodrugs

Prodrugtechnologien, die Nucleosidmonophosphate in der Zelle freisetzen können, haben eine hohe Effektivität bei der Verbesserung therapeutischer Möglichkeiten gezeigt.³⁴ Im Folgenden sollen einige Monophosphatprodrugtechnologien vorgestellt werden.

Von FARQUHAR *et al.*³⁶ wurde das Bis(POM)-Konzept entwickelt, dabei werden Bis(pivaloyloxymethyl)phosphotriester **9** eingesetzt. In der Zelle kommt es durch eine Carboxyesterase zur Abspaltung der Maskierungseinheit, wobei unter Freisetzung von Pivalinsäure und Formaldehyd das monomaskierte Intermediat freigesetzt wird. Eine Wiederholung dieses Abspaltungsprozesses führt zur Freisetzung des Monophosphats. Durch Verwendung dieses Konzepts konnte die Zellaufnahme signifikant erhöht werden. In *in vitro* Untersuchungen von

Bis(POM)-5FdU konnte eine deutlich verbesserte Aktivität beobachtet werden. Da das monomaskierte Intermediat ein schlechteres Substrat für die Carboxyesterase ist, dauert die Abspaltung der zweiten Maske deutlich länger. Hinzukommt, dass die Freisetzung eines Äquivalents Monophosphat zur Bildung von je zwei Äquivalenten Formaldehyd und Pivalinsäure führt und beide Substanzen toxisch sind.^{30,36}

Durch eine Modifizierung dieses Konzepts wurden von FRIDLAND *et al.*^{37,38} und NAESENS *et al.*³⁹ die Bis(POC)-Nucleotide **10** entwickelt. Dabei handelt es sich um Bis(isopropoxyloxycarbonyloxymethyl)nucleotide **10** mit einem Carbodiester in der Maskierungseinheit. Deren Abspaltung erfolgt erneut über die Carboxyesterase, wobei Isopropanol, Kohlenstoffdioxid und Formaldehyd als Nebenprodukte gebildet werden. Aus dem gebildeten monomaskierten Intermediat wird wiederum die zweite Maske abgespalten und damit das Monophosphat freigesetzt.^{30,37–39} In **Abbildung 4** sind Bis(POM)- **9** und Bis(POC)-Nucleotide **10** dargestellt.^{36–39}

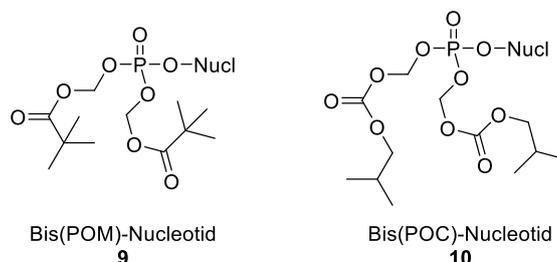


Abbildung 4: Darstellung der Bis(POM)- **9** und Bis(POC)-Nucleotide **10**.

Von IMBACH und GOSSELIN wurden zwei weitere Methoden vorgestellt, bei denen durch enzymatische Reaktionen das Monophosphat freigesetzt wird. Dabei handelt es sich um die Bis(S-[2-hydroxyethylsulfidyl]-2-thioethyl)- (Bis(SDTE)-) **11** und Bis(S-acyl-2-thioethyl)- (Bis(SATE)-)nucleotide **12** (s. **Abbildung 5**).^{30,40–43}

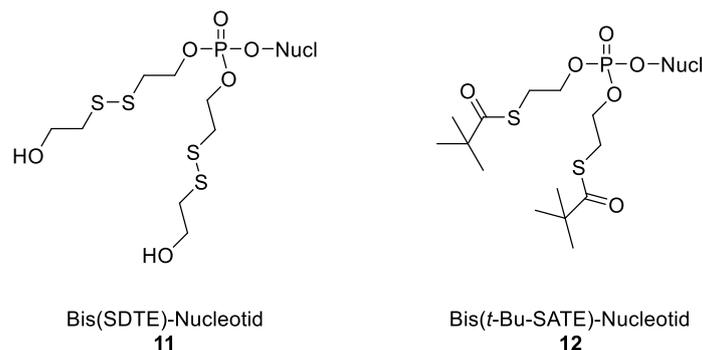
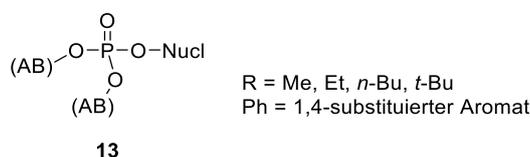


Abbildung 5: Darstellung der Bis(SDTE)- **11** und Bis(SATE)-Nucleotide **12**.

Beim Bis(SDTE)-Konzept erfolgt im Anschluss an eine reduktive Spaltung der Disulfidbindung in der Maskierungseinheit durch eine Reduktase die Bildung von Thioethanol und Episulfid. Dabei wird das monomaskierte Intermediat gebildet. Nach erneutem Ablauf dieser Freisetzungsreaktion wird das Nucleosidmonophosphat erhalten. Die Idee hinter dem Konzept war, dass das weiche Thionucleophil eher das weiche und elektrophile α -Kohlenstoffatom und nicht das harte Phosphoratom angreift.^{30,40–43}

Die Spaltung beim Bis(SATE)-Konzept basiert ebenfalls auf einer enzymatischen Reaktion durch die Carboxyesterase. Dabei wird eine Carbonsäure, im gezeigten Beispiel eine Pivalinsäure, und Episulfid bei der Bildung des monomaskierten Intermediats freigesetzt. Durch die Verwendung des Bis(SATE)-Konzepts konnte die erfolgreiche Freisetzung des d4TMPs gezeigt werden.^{30,40–43}

Die in **Abbildung 6** dargestellten Bis(AB)-Nucleotide **13** wurden unabhängig voneinander von FREEMAN *et al.*⁴⁴ und GLAZIER *et al.*^{45,46} entwickelt.³⁰



Freeman: AB = RO(O)C-Ph-CH(CH₂-C(O)OMe)-
Glazier: AB = RO(O)C-Ph-CH₂-

Abbildung 6: Darstellung der Bis(AB)-Nucleotide **13**.

Die Freisetzung des Nucleosidmonophosphats beruht bei diesem Konzept auf einer enzymatischen Spaltung der Estereinheit in der 4-Position des Aromaten, wobei das monomaskierte Intermediat freigesetzt wird. Durch eine Wiederholung dieser Entschützung wird das Monophosphat erhalten.^{30,44–46}

4.2.1.2 Das *cycloSal*-Konzept

Im Arbeitskreis MEIER wurde das *cycloSal*-Konzept entwickelt, welches, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Methoden, auf einer chemisch induzierten Abspaltung der Maskierungseinheit beruht.³⁰ Es wurde bereits auf die anti-HIV-aktiven Nucleosidanaloga d4T, Dideoxythymidin (ddT) und ddA verwendet und bei allen Verbindungen konnte eine deutliche Steigerung der antiviralen Aktivität beobachtet werden (s. **Abbildung 7**).^{29–31,33,47–49}

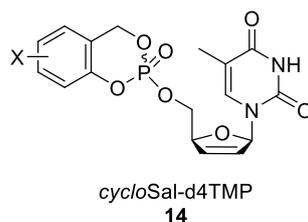


Abbildung 7: Darstellung des *cycloSal*-d4T-Nucleotids **14**.

Die Hydrolyse beruht auf einer schrittweisen und gekoppelten Spaltung der Phenyl- und Benzylbindung des Phosphotriesters, dadurch gelingt die selektive Freisetzung des Monophosphats und der Maskierungseinheit (s. **Abbildung 8**).^{29,30,48,49}

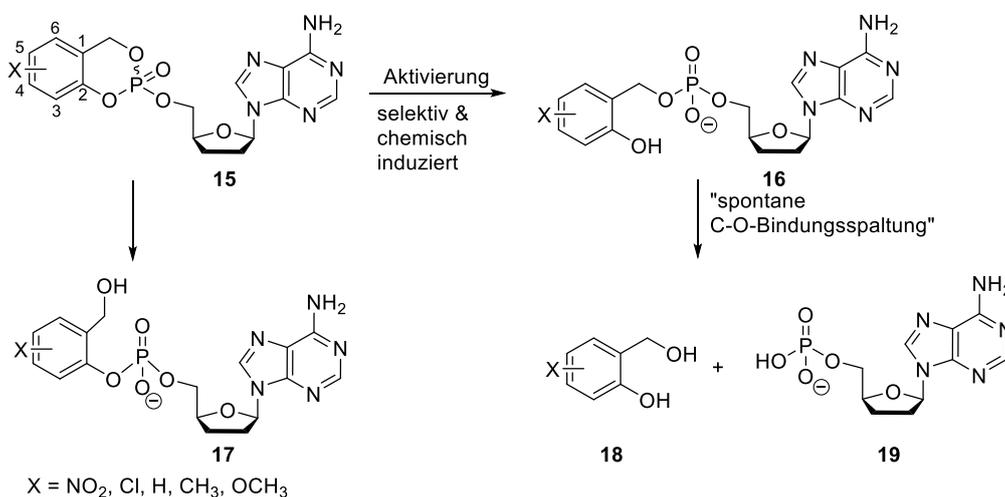


Abbildung 8: Selektive Freisetzung des ddAMPs (**19**) aus dem *cycloSal*-Nucleotid **15**.

Aufgrund der unterschiedlichen Stabilitäten kann die Spaltung der Esterbindungen im *cycloSal*-Nucleotid **15** selektiv erfolgen. Wird die Phenylesterbindung gespalten, so kann die negative Ladung durch Delokalisierung im aromatischen Ring stabilisiert werden, wodurch eine Stabilisierung des gebildeten 2-Hydroxybenzylphosphodiesters **16** erfolgt. Der alternative Weg, die Spaltung der benzylischen Phosphoresterbindung, wobei **17** erhalten wird, wird nicht

begünstigt, da der Phosphatrest in ortho-Position die Esterbindung stabilisiert. Nach Spaltung des Phenylesters liegt in ortho-Position des Benzylsubstituenten nun kein Akzeptorsubstituent (Phosphatgruppe) mehr vor, sondern ein Donorsubstituent (Hydroxylgruppe), wodurch der verbliebene Teil der Maskierungseinheit durch eine Umpolung aktiviert wurde. Dadurch wird eine spontane Spaltung des Diesters **16** eingeleitet, wobei das Nucleosidmonophosphat **19** und der substituierte Salicylalkohol **18** freigesetzt werden. Der Hauptunterschied zu den vorher genannten Methoden ist, dass bei den *cycloSal*-Nucleotiden nur eine chemische Aktivierung für die Abspaltung der Maskierungseinheit benötigt wird und nicht, wie bei den zuerst vorgestellten enzymatisch-katalysierten Konzepten, zwei.^{29–31,48–50}

In Hydrolysestudien konnte die erfolgreiche Freisetzung des Monophosphats und Salicylalkohols über den vorgeschlagenen Mechanismus bestätigt werden. Die Freisetzung des Nucleotids hängt dabei vom pH-Wert ab. Es konnte zudem ein Einfluss des Substituenten am Salicylalkohol auf die Stabilität der *cycloSal*-Nucleotide festgestellt werden. So führten akzeptorsubstituierte Aromaten zu einer Reduzierung und donorsubstituierte zu einer Erhöhung der hydrolytischen Stabilität.^{29–31,48–50} Durch Hydrolysen im biologischen Medium konnte kein Einfluss eines Enzyms auf die Abspaltung der Maskierungseinheit festgestellt werden, da die erhaltenen Halbwertszeiten sehr ähnlich zu denen aus der chemischen Hydrolyse sind. Damit konnte eine rein chemisch induzierte Abspaltung bestätigt werden.⁵⁰

In antiviralen Tests konnte gezeigt werden, dass das *cycloSal*-Konzept zu einer Erhöhung der Aktivität führt. Durch den Nachweis von antiviraler Aktivität in TK-freien CEM-Zellen konnte die erfolgreiche Zellaufnahme und Freisetzung des Monophosphats bestätigt werden.^{29–31,48,50} Zu den Vorteilen des *cycloSal*-Konzepts gehört eine einfache Synthese, gute Löslichkeit in wässrigen Medien und ein 1:1-Verhältnis von Nucleotid zu freigesetzter Maskierungseinheit. Untersuchungen ergaben, dass die gebildeten Salicylalkohole nicht toxisch sind und auch keine antivirale Aktivität besitzen. Das *cycloSal*-Konzept ist das erste bekannte Verfahren, das durch eine chemisch induzierte Reaktion erfolgreich Nucleotide freisetzen kann. Dadurch hängt die intrazelluläre Freisetzung des Nucleosidmonophosphats nicht von der Enzymkonzentration ab.^{29,30,50}

Durch die Bildung der *cycloSal*-Nucleotide konnte die Lipophilie ausreichend erhöht werden, wodurch das Passieren der Zellmembran und Blut-Hirn-Schranke sichergestellt wird. Gleichzeitig sind die Verbindungen immer noch gut in Wasser löslich.^{29–31,48}

Aufgrund der ähnlichen pH-Werte innerhalb sowie außerhalb der Zelle ist die Bildung eines Konzentrationsgleichgewichts über die Zellmembran möglich. Außerdem können die *cycloSal*-Verbindungen der ersten Generation wieder aus der Zelle diffundieren, da sie in der Lage sind die Zellmembran zu passieren.^{31,33,47,50} Da für eine effektive antivirale Therapie eine hohe Nucleotidkonzentration in der Zelle notwendig ist, muss intrazellulär eine hohe Konzentration des Pronucleotids gewährleistet werden können.³³ Aufgrund dieser Problematik wurde eine zweite Generation der *cycloSal*-Verbindungen entwickelt, dabei liegt eine Estergruppe am

Aromaten vor. Diese kann durch eine Carboxyesterase gespalten werden, wodurch eine hydrophile Verbindung erhalten wird, die nicht mehr die Zellmembran passieren kann (*lock-in*-Prinzip). Um eine Reduktion der chemischen Stabilität aufgrund des elektronenziehenden Substituenten zu vermeiden, wurde eine Spacereinheit zwischen der Estergruppe und dem Aromaten eingefügt, dafür wurde eine C2- oder C3-Einheit verwendet (s. **Abbildung 9**).^{31,33,47,50} Diese Weiterentwicklung beruht auf der höheren intrazellulären Esterasekonzentration im Vergleich zum extrazellulären Bereich, wodurch gewährleistet wird, dass die Spaltung des Esters erst in der Zelle erfolgt.³³

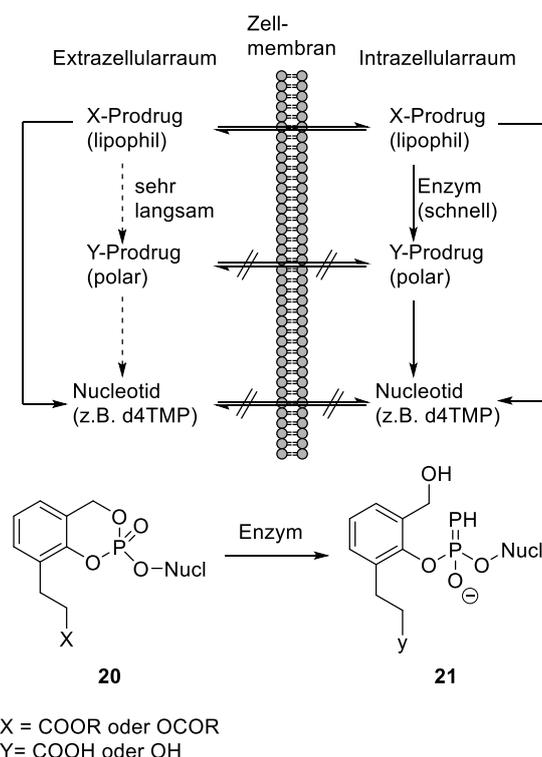


Abbildung 9: Darstellung der second-generation *cycloSal*-Nucleotide.^{47,48}

Unter physiologischen pH-Werten sollte die *cycloSal*-Verbindung an der Esterbindung gespalten werden. Dies war jedoch nicht der Fall, es kam ausschließlich zur Freisetzung des Monophosphats.⁴⁸ Bei Studien in CEM/0-Zellextrakten konnte das Intermediat ebenfalls nicht detektiert werden, eine enzymatisch-katalysierte Esterspaltung trat folglich nicht ein.^{48,51} Alle second-generation *cycloSal*-Verbindungen wiesen antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 und HIV-2 auf, sowohl in wildtyp CEM-Zellen als auch in modifizierten TK-freien Zellen. Die geladene Verbindung (Intermediat) verlor dagegen aufgrund der schlechten Membranpermeabilität ihre gesamte Aktivität in den TK-freien Zellen.^{33,47,48,50} Es gelang der Beweis, dass die second-generation *cycloSal*-Verbindungen intrazellulär das Monophosphat freisetzen.^{31,33,47,48,50} Durch die hohe Stabilität des Intermediats führten die second-generation *cycloSal*-Nucleotide zu einer verzögerten Freisetzung des Monophosphats.³¹

Bei der dritten Generation der *cycloSal*-Verbindungen werden neue, lipophile elektronenschiebende oder schwach elektronenziehende Substituenten durch eine intrazelluläre Spaltung zu einem polaren Akzeptor umgewandelt. Als Substituent wurde das geminale Dialkyldicarboxylat (Acylals) verwendet (s. **Abbildung 10**).³¹

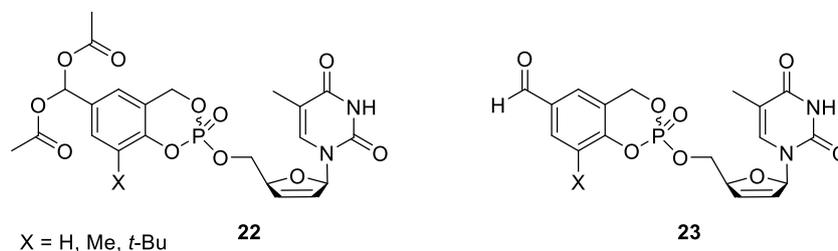


Abbildung 10: Darstellung eines third-generation *cycloSal*-Nucleotids **22** sowie dessen Produkt **23** nach enzymatischer Hydrolyse.³¹

Die starke elektronenziehende Eigenschaft der Formylgruppe im Produkt **23** sollte zu einer signifikanten Reduzierung der Stabilität der *cycloSal*-Verbindung führen. In **Abbildung 11** ist der Verlauf der Hydrolyse der third-generation *cycloSal*-Nucleotide **22** dargestellt.

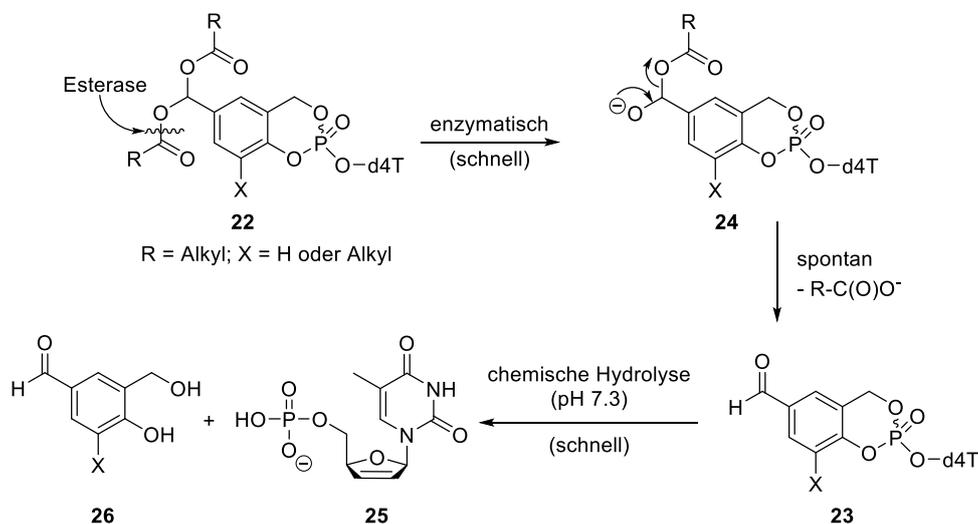


Abbildung 11: Enzymatisch-katalysierte Hydrolysenkaskade der 5-Dialkyloxymethyl*cycloSal*-d4TMPs (**22**).³¹

Nach der erfolgten Zellaufnahme kommt es schnell zur Spaltung des Esters in der third-generation *cycloSal*-Verbindung **22** und dadurch zur Freisetzung des Aldehyds 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMP (**23**). Anschließend werden durch chemische Hydrolyse das Monophosphat **25** und die Maskierungseinheit **26** freigesetzt.³¹

Bei Hydrolysestudien in PBS konnte die erfolgreiche Freisetzung des d4TMPs gezeigt werden. Im Zellextrakt erfolgte die Abspaltung der Maske, wodurch es zur Freisetzung des Aldehyds **23** kam. Für alle Verbindungen konnte antivirale Aktivität in normalen und modifizierten CEM-Zellen bewiesen werden.³¹

4.2.2 Diphosphat-Prodrugs

4.2.2.1 Erste Diphosphat-Prodrugs

Durch die Entwicklung der Monophosphatprodrugs konnte der erste Phosphorylierungsschritt umgangen werden, dieser stellt oftmals den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Metabolisierung zum Triphosphat dar. Daher kann die Entwicklung als wichtiger Meilenstein betrachtet werden. Allerdings existieren ebenso Nucleosidanaloga, bei denen die Phosphorylierung zum Diphosphat langsamer verläuft und es somit zu einer Ansammlung des Monophosphats kommt, was zu schweren Nebenwirkungen führen kann. Dazu gehört beispielsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT), das erste zugelassene Nucleosidanalogen gegen HIV.^{35,52,53,54,55}

Ein großes Problem, welches einer erfolgreichen Entwicklung von Di- oder Triphosphatprodrugs im Wege steht, ist, dass die Phosphoranhydridbindung durch die negativen Ladungen stabilisiert wird. Nur dadurch werden nucleophile Angriffe verhindert.^{35,52,54-56} Deshalb gibt es bisher nur wenige Nucleosiddiphosphat (NDP) Prodrugssysteme. HOSTETLER *et al.* gelang die erfolgreiche Synthese von Nucleosiddiphosphatdiglyceriden **27** als potentielle Prodrugs (s. **Abbildung 12**). Bei durchgeführten Hydrolysen wurde jedoch nur das Monophosphat freigesetzt.^{35,52,54,55,57} HUYNH-DINH *et al.* konnten das β -Phosphat des Diphosphats erfolgreich mit einer Fettsäure verknüpfen, wobei Prodrug **28** gebildet wird (s. **Abbildung 12**). Bei einer anschließend durchgeführten PBS-Hydrolyse gelang der erfolgreiche Nachweis der Diphosphatfreisetzung. Hydrolysen im biologischen Medium führten jedoch zu einer Zersetzung des Prodrugs.^{35,52,54,55,58}

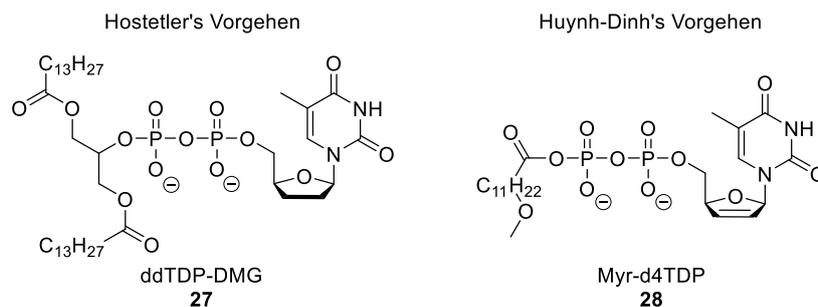


Abbildung 12: Darstellung der Diphosphatprodrugs **27** und **28** nach HOSTETLER und HUYNH-DINH.

Versuche das im AK MEIER entwickelte und bereits vorgestellte *cycloSal*-Konzept auf Diphosphate anzuwenden waren nicht erfolgreich, da für die richtige Öffnung des Prodrugs **29** ein Angriff auf die β -Phosphatgruppe notwendig ist und dies zur Spaltung der Phosphoranhydridbindung und damit zur Freisetzung des Monophosphats führte (s. **Abbildung 13**).

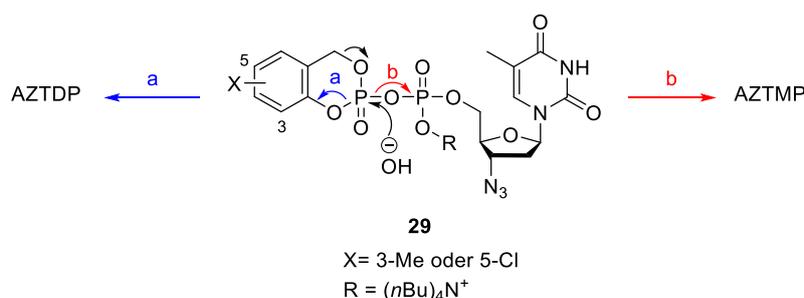


Abbildung 13: Darstellung der *cycloSal*-Technologie für die Freisetzung des Diphosphats.⁵⁹

Jeder Versuch eine Erhöhung des Diphosphatanteils zu erreichen, beispielsweise durch einen Tausch des Methylsubstituenten an der *cycloSal*-Einheit zu einem Chloratom, resultierte in einer geringeren chemischen Stabilität. Auch das Anbringen einer Schutzgruppe an die α -Phosphatgruppe führte nicht zu der erhofften Verbesserung, sondern trug lediglich zu einer Instabilisierung der Phosphoranhydridbindung bei.^{54,56,59}

Damit die erwartete geringe Stabilität der komplett maskierten Pyrophosphateinheit vermieden werden kann, musste eine Vorgehensweise entwickelt werden, bei der die Ladung an der α -Phosphatgruppe erhalten bleibt. Durch die vorhandene negative Ladung wird ein nucleophiler Angriff verhindert und außerdem stellt das geladene Monophosphat eine deutlich schlechtere Abgangsgruppe dar, womit auch ein Angriff auf die β -Phosphatgruppe nicht so leicht zu einer Spaltung der Phosphoranhydridbindung führt. Aufgrund dieser beider Effekte wird die Phosphoranhydridbindung stabilisiert.^{35,52,56,59,60}

4.2.2.2 Das DiPPro-Konzept

Im AK MEIER gelang im Folgenden die Entwicklung des DiPPro-Konzepts (s. **Abbildung 14**). Dabei werden als Schutzgruppen zwei 4-Acyloxybenzylgruppen an der β -Phosphatgruppe verwendet. Gleichzeitig bleibt die negative Ladung an der α -Phosphatgruppe erhalten, damit eine hydrolytische Spaltung der Phosphoranhydridbindung verhindert werden kann. Bei diesem Prodrugkonzept erfolgt die Abspaltung der Acylesterfunktionen durch enzymatische oder chemische Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen.^{35,52,54–56,59,60} Anders als bei der *cycloSal*-Methode erfolgt nun die Abspaltung der lipophilen Maskierung nicht mehr durch einen Angriff auf die Phosphoranhydridbindung sondern die Freisetzung des Diphosphats wird durch einen enzymatisch induzierten Angriff auf die Maskierungseinheit begonnen.^{35,54–56,59}

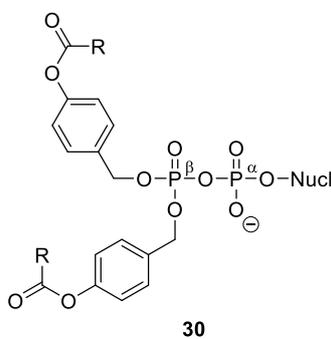


Abbildung 14: Darstellung einer symmetrischen DiPPro-Verbindung **30**.

Nach dem enzymatisch induzierten Angriff auf die Acylesterfunktion in der DiPPro-Verbindung **30** wird aus dem Akzeptorsubstituent ein Donorsubstituent in Form einer Hydroxylgruppe, wie in der Übergangsstufe **31** dargestellt. Dadurch kommt es zu einer Spaltung der C-O-Bindung zwischen dem benzylicen Kohlenstoffatom und der Phosphatgruppe, wodurch via einer 1,6-Eliminierung das monomaskierte Intermediat **32** gebildet wird. Durch Wiederholung dieses Prozesses wird das Diphosphat **33** freigesetzt (s. **Abbildung 15**).^{35,52,54–56,59,60}

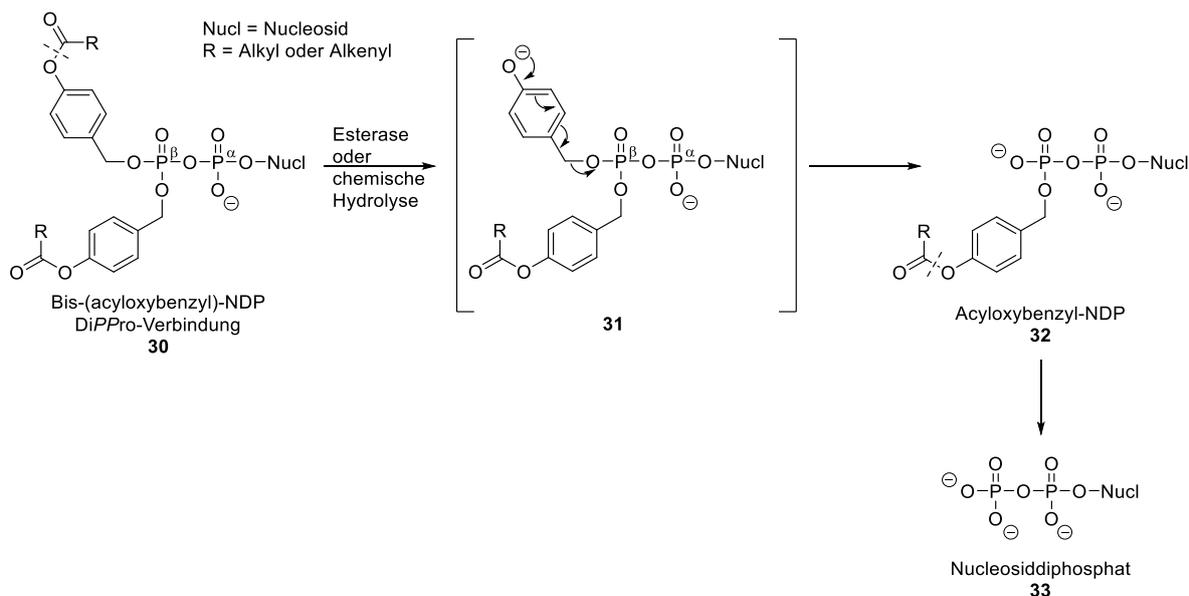


Abbildung 15: Enzymatisch katalysierte Abspaltung der Acyloxybenzylmaskierungseinheiten aus der DiPPro-Verbindung **30**.

In Hydrolysen konnte die erfolgreiche Freisetzung der monomaskierten DiPPro-Verbindung und des Diphosphats gezeigt werden. Durch die Enzymbeteiligung wird dieser Prozess beschleunigt. Die Maskenabspaltung kann durch einen enzymatischen Angriff initiiert werden. Durch eine Verlängerung der Alkylkette konnte eine höhere Lipophilie und damit auch eine höhere Stabilität erreicht werden.^{35,52,54,56,59,60} In antiviralen Tests in modifizierten TK-freien CEM-Zellen konnte die erfolgreiche Zellaufnahme und intrazelluläre Freisetzung des Diphosphats gezeigt werden. Ab einer C₆H₁₃-Alkylkette wiesen die untersuchten Prodrugs eine hohe antivirale Aktivität auf. Bei diesen Verbindungen liegt somit ausreichend Lipophilie für das Passieren der Zellmembran vor.^{35,54,56,59}

Durch die Entwicklung der second-generation DiPPro-Verbindungen **34** konnte eine höhere Stabilität erreicht und die Bildung von Nebenprodukten verhindert werden. Bei diesen Prodrugs **34** wird sowohl ein kurzer als auch ein langer Alkylsubstituent in den Maskierungseinheiten verwendet (s. **Abbildung 16**).^{55,56}

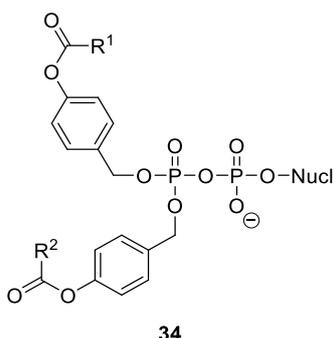


Abbildung 16: Darstellung einer second-generation DiPPro-Verbindung **34**.

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass es bei einer kurzen Alkylkette schnell zur Abspaltung der Maske kommt. Bei den neuartigen DiPPro-Verbindungen **34** sollte durch Abspaltung der kürzeren Maskierungseinheit das Intermediat schneller freigesetzt werden, wodurch die Bildung des Monophosphats verhindert werden sollte. Aus dem monomaskierten Intermediat wird anschließend das Diphosphat freigesetzt. In Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, dass diese neuartigen Prodrugs **34** stabiler sind und das Diphosphat/Monophosphat-Verhältnis verbessert werden konnte.^{35,55} Vor allem bei der Hydrolyse in biologischen Medien konnte eine sehr selektive Freisetzung des Diphosphats beobachtet werden.^{55,56,59}

4.2.3 Triphosphat-Prodrugs

4.2.3.1 Ursprüngliches TriPPPro-Konzept

Nucleosidanaloga müssen in der Zelle durch Phosphorylierungsschritte in die aktive Form des Nucleosidtriphosphats umgewandelt werden.⁶¹⁻⁶⁴ Trotz des therapeutischen Erfolgs einiger Monophosphatprodrugs, wie beispielsweise des HCV-Medikaments Sofosbuvir, oder der intrazellulären Freisetzung des Diphosphats, beispielsweise über die DiPPro-Strategie, sollte das Ziel jedoch trotzdem die intrazelluläre Freisetzung des Triphosphats sein, da die dadurch erhaltenen Vorteile enorm sind. So lassen sich auf diese Weise sämtliche intrazellulären Phosphorylierungsschritte, welche aufgrund der Substratspezifität der beteiligten Enzyme oftmals unzureichend erfolgen, umgehen, da aus dem Prodrug direkt das aktive Triphosphat freigesetzt wird. Außerdem würden einige Inaktivierungsschritte vermieden werden, da diese häufig auf der Stufe des Nucleosids oder des Monophosphats stattfinden. So kann durch die direkte Freisetzung des Triphosphats die Desaminierung der Adenosin- oder Cytidinaloga vermieden werden.⁵⁹ Desweiteren ließe sich durch die direkte Freisetzung des Triphosphats dessen intrazelluläre Konzentration erhöhen. Es gibt jedoch einige strukturelle Herausforderungen bei der Synthese der Triphosphatprodrugs zu beachten. So existieren vier negative Ladungen, an denen Nebenreaktionen stattfinden können. Zudem liegen zwei labile Phosphoranhydridbindungen vor, wodurch das gesamte Molekül an Stabilität einbüßt.

Außerdem gilt die Synthese von Triphosphatprodrugs als schwierig und herausfordernd, weswegen es bisher erst wenige erfolgreiche Berichte darüber gibt.^{59,65} Die verantwortlichen Gründe könnten die geringe chemische Stabilität,⁶⁶ komplizierte Synthese, schlechte Verfügbarkeit und die hohe Sensitivität gegenüber chemischen Dephosphorylierungen sein.^{59,61,67,68} Mit der Entwicklung des TriPPPro-Konzeptes im AK MEIER wurde eine Strategie vorgestellt, mit der in der Zelle das Triphosphat freigesetzt wird und sämtliche intrazelluläre Phosphorylierungsschritte umgangen werden können (s. **Abbildung 17**).^{59,61-64,67,68}

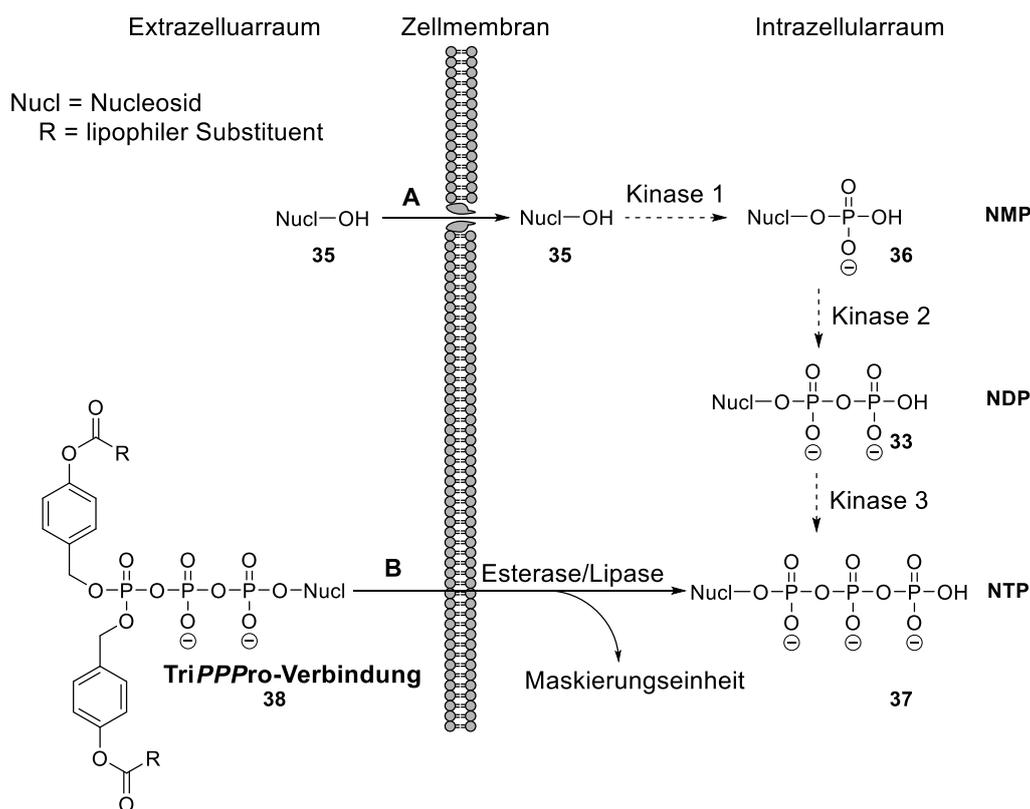


Abbildung 17: Darstellung des Verlaufs des TriPPPro-Konzeptes.

Die Idee des TriPPPro-Konzeptes ist, die Ladungen der Phosphatgruppen durch Acyloxybenzylmaskierungen zu kaschieren und auf diese Weise das Überwinden der Zellmembran zu erreichen. Anschließend erfolgt durch zelluläre Esterasen oder Lipasen die Abspaltung der Maskierungseinheiten und die Freisetzung des Triphosphats. Die negativen Ladungen des Triphosphats verhindern eine Diffusion durch die Zellmembran, aufgrund dieses *lock-in*-Effekts kann eine höhere Triphosphatkonzentration in der Zelle erreicht werden. Durch Variation der Alkylkettenlänge in der Maskierungseinheit wird die Erzeugung unterschiedlich lipophiler Verbindungen ermöglicht, wodurch die erfolgreiche Zellaufnahme sichergestellt werden kann.⁶¹⁻⁶⁴ GOLLNEST gelang die Synthese der TriPPPro-Verbindungen über die Phosphoramidroute mit Ausbeuten von 27-66%.⁶⁴

Studien mit DiPPro-Verbindungen haben gezeigt, dass das Schützen aller Hydroxylgruppen zu einer Destabilisierung der Phosphoranhydridbindung führt, da Nucleophile nun aufgrund der fehlenden Ladungen diese leichter angreifen können. Zwei Maskierungen an der endständigen Phosphatgruppe der TriPPro-Verbindungen generieren bereits ausreichend Lipophilie für das Passieren der Zellmembran, da die enthaltenen Alkylketten die verbliebenen negativen Ladungen verdecken. Außerdem können aufgrund der Ladungen die Phosphoranhydridbindungen vor Angriffen geschützt werden.⁶¹

In durchgeführten Hydrolysestudien konnte die erfolgreiche Freisetzung des Triphosphats im PBS-, PLE- und Zellextraktmedium gezeigt werden. Dabei wurde ein stufenweiser Ablauf der Hydrolyse beobachtet, zunächst kam es zur Bildung einer monomaskierten Verbindung, aus der anschließend das Triphosphat freigesetzt wurde. Die erhaltene Stabilität war aufgrund einer zusätzlichen Phosphoranhydridbindung geringer als bei den DiPPro-Verbindungen. Es wurde mit steigendem Alkylrest ebenso die vermehrte Bildung von Nebenprodukten beobachtet, da es durch Mizellenbildung leichter zum Bruch der Phosphoranhydridbindungen und damit zur Freisetzung von Di- oder Monophosphat gekommen ist. Durch Hydrolysen im PLE- und Zellextraktmedium konnte eine beschleunigte Freisetzung des Triphosphats beobachtet werden. Zellextrakthydrolysen zeigten außerdem die Dephosphorylierung des Triphosphats zum Diphosphat. Durch die Hydrolysen konnte die erfolgreiche und selektive Freisetzung des Triphosphats gezeigt werden. Es konnte bei nahezu allen Hydrolysen ein Ansteigen der Stabilität mit länger werdendem Alkylrest beobachtet werden.^{61,63,64}

Die Untersuchung der antiviralen Aktivität zeigte eine verbesserte Wirkung der TriPPro-Verbindungen im Vergleich zum ursprünglichen Nucleosid, vor allem längere Alkylsubstituenten (ab C₈H₁₇) zeigten eine bessere Wirkung. Der Grund liegt an der besseren Zellaufnahme der lipophileren Verbindungen.^{61–64} Auch bei TK-freien Zellen konnte eine sehr hohe Aktivität der untersuchten TriPPro-Verbindungen festgestellt werden. Bei diesen Zellen kann aufgrund des fehlenden Enzyms keine Phosphorylierung des Nucleosids erfolgen. Damit konnte die erfolgreiche Freisetzung des Triphosphats ebenfalls bewiesen werden.⁶¹

Außerdem konnte die erfolgreiche Zellaufnahme der TriPPro-Verbindung und intrazelluläre Freisetzung des Triphosphats durch die Verwendung eines fluoreszenten Nucleosidanalogs dargelegt werden. Durch die Verwendung eines bicyclischen Nucleosidanalogs (BCNA) kann aufgrund dessen unnatürlichen Absorptionsmaximums von 330 nm eine Überlagerung der Metabolite mit Zellbestandteilen vermieden werden.^{59,62,69–71} Zudem gelang die Synthese der TriPPro-Verbindungen mit unterschiedlichen Nucleosidanaloga. Dies spricht für vielfältige Einsatzmöglichkeiten dieser Prodrugstrategie.⁶² Durch das TriPPro-Konzept steht ein nützliches Werkzeug zur Verfügung, mit dem alle intrazellulären Aktivierungsschritte durch zelluläre Kinasen umgangen und direkt das Triphosphat freigesetzt werden kann. Durch das Vermeiden der intrazellulären Aktivierungsschritte können neue Einsatzmöglichkeiten für als inaktiv geltende Nucleosidanaloga geschaffen werden.

4.2.3.2 Weiterentwicklungen des TriPPPro-Konzepts

Durch das TriPPPro-Konzept können Nucleosidtriphosphate in der Zelle erfolgreich freigesetzt werden. Bei der Verwendung von zwei symmetrischen Maskierungseinheiten kommt es jedoch ebenfalls zur Bildung von Nucleosidiphosphat und -monophosphat. Bei der Entwicklung des DiPPPro-Konzeptes konnte festgestellt werden, dass durch die Verwendung zweier verschiedener Masken eine Nebenproduktbildung vermieden werden kann und selektiv das Diphosphat erhalten wird.⁷² Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte nun ebenfalls bei den TriPPPro-Verbindungen versucht werden, durch die Verwendung zweier verschiedener Maskierungen ausschließlich das Triphosphat in der Zelle freizusetzen (s. **Abbildung 18**).^{64,72}

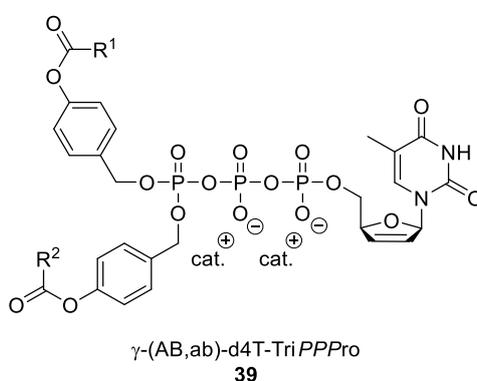


Abbildung 18: Darstellung einer d4T-TriPPPro-Verbindung **39** mit unterschiedlichen Resten an den Acyloxybenzylmaskierungseinheiten.

Die Synthese der unsymmetrischen TriPPPro-Verbindungen **39** gelang über die *H*-Phosphonatroute in Ausbeuten von 28-64%. Durch Hydrolysestudien wurde jedoch festgestellt, dass es zu keiner bevorzugten Abspaltung einer der beiden Maskierungseinheiten kommt. Beide möglichen Intermediate wurden zu ähnlichen Anteilen im erhaltenen Chromatogramm nachgewiesen. Wurde in einer der beiden Maskierungseinheiten jedoch eine PEG-Einheit eingefügt, so führte dies zu einer selektiven Abspaltung der anderen Maskierungseinheit. Jedoch wiesen diese TriPPPro-Verbindungen deutlich weniger antivirale Aktivität auf.⁷² Da vor allem bei den Zellextrakthydrolysen wenig Triphosphat beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses schnell durch die vorhandenen Enzyme zum Diphosphat dephosphoryliert wird.^{64,72}

Von JIA wurden nichtsymmetrische TriPPPro-Verbindungen mit einer Acyloxybenzyl- (AB) **40** und einer Alkoxybenzylmaskierungseinheit (ACB) **41** erfolgreich dargestellt (s. **Abbildung 19**).^{67,68}

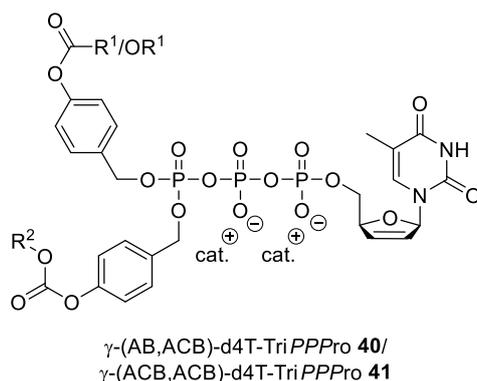
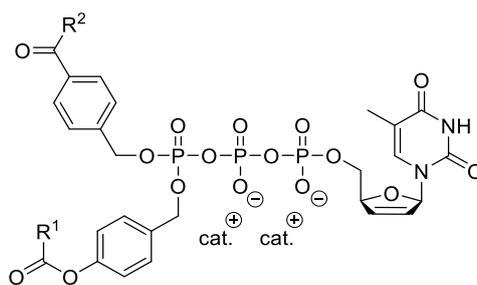


Abbildung 19: Darstellung einer d4T-TriPPPPro-Verbindung mit einer Acyloxybenzyl- (AB) **40** und einer Alkoxybenzylmaskierungseinheit (ACB) **41**.

Die Synthese erfolgte ebenfalls über die *H*-Phosphonatroute mit Ausbeuten von bis zu 85%. In Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, dass es zunächst zur Abspaltung der AB-Maske kommt, wodurch selektiv die γ -ACB-TriPPPPro-Verbindung erhalten wird. Anschließend erfolgt aus dieser Verbindung die Freisetzung des Triphosphats. Vor allem bei der Zellextrakt-hydrolyse gelang eine selektive Abspaltung der AB-Maskierungseinheit, dabei konnte ein Verhältnis von 10:1 der entsprechenden Intermediate erhalten werden. Die Stabilitäten dieser unsymmetrischen TriPPPPro-Verbindungen waren höher als die der Bis-AB-TriPPPPro-Verbindungen.^{67,68} Es gelang die erfolgreiche Synthese verschiedener TriPPPPro-Verbindungen mit inaktiven oder nur wenig aktiven Nucleosidanaloga, welche dadurch in aktive Triphosphate überführt werden konnten.⁶⁸ In Tests konnte für alle erhalten Prodrugs sowie für die γ -ACB-TriPPPPro-Verbindung eine antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM-Zellen sowie gegenüber HIV-2 in CEM/TK⁻-Zellen nachgewiesen werden. Die antivirale Wirkung der dargestellten Prodrugs war gleich oder sogar höher als die von d4T. Durch den Beweis der Wirkung in TK-defizienten CEM-Zellen konnte die erfolgreiche Zellaufnahme sowie Freisetzung des Triphosphats aus den γ -AB-ACB-TriPPPPro-Verbindungen gezeigt werden. Es gelang die erfolgreiche Darstellung eines nichtsymmetrischen TriPPPPro-Konzepts, durch das selektiv und enzymkatalysiert die Freisetzung von d4TTP stattfindet.^{67,68}

Beide bisher vorgestellten Weiterentwicklungen des TriPPPPro-Konzepts führen erfolgreich zur Freisetzung des Triphosphats. In Zellextrakt-hydrolysen konnte für das Triphosphat nachgewiesen werden, dass es durch Dephosphorylierungen zügig abgebaut wird. Es sollen deswegen Strategien entwickelt werden, die eine zusätzliche Stabilisierung des Triphosphats beinhalten, wodurch eine schnelle Inaktivierung vermieden werden sollte.

Von NACK wurde eine Methode entwickelt, bei der an der γ -Phosphatgruppe eine Alkylketobenzyleinheit sowie eine Acyloxybenzylgruppe vorliegen (s. **Abbildung 20**).⁷³

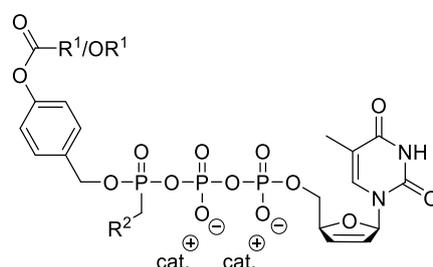


γ -(AB, kb)-d4T-TriPPPPro
42

Abbildung 20: Darstellung einer d4T-TriPPPPro-Verbindung **42** mit einer Alkylketobenzyleinheit und einer Acyloxybenzylgruppe.

Es liegt nun nur noch eine spaltbare Maskierungseinheit vor. Die Wahl dieser beiden Maskierungseinheiten verhindert eine Freisetzung des Triphosphats. Hydrolysestudien haben gezeigt, dass es zur Abspaltung der AB-Maskierung kommt und dadurch selektiv die γ -Ketobenzyl-TriPPPPro-Verbindung freigesetzt wird. Diese Verbindung ist, anders als das Triphosphat, bei Zellextrakthydrolysen über mind. 24 Stunden stabil. Alle untersuchten Verbindungen zeigten Aktivität gegen HIV-2 in CEM/TK-Zellen. Es kommt somit zur Zellaufnahme und erfolgreichen Freisetzung der γ -Ketobenzyl-TriPPPPro-Verbindung. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die freigesetzte Verbindung ausschließlich ein Substrat für die HIV-RT darstellt, jedoch nicht für humane DNA-Polymerasen.⁷³

Von JIA wurden TriPPPPro-Verbindungen entwickelt, bei denen sich an der γ -Phosphatgruppe direkt ein Alkylsubstituent befindet. Da die P-C-Bindung nicht hydrolysiert werden kann, soll die Nebenproduktbildung verhindert werden und dadurch sehr stabile Triphosphatderivate erhalten werden (s. **Abbildung 21**).⁷⁴



γ -AB- γ -C-alkyl-d4T-TriPPPPro **43**/
 γ -ACB- γ -C-alkyl-d4T-TriPPPPro **44**

Abbildung 21: Darstellung einer TriPPPPro-Verbindung mit einem Alkylsubstituenten und einer Acyloxybenzyl- (AB) **43**/Alkoxy-carbonyloxybenzylmaskierungseinheit (ACB) **44**.

Über die *H*-Phosphonatroute gelang die Synthese verschiedener γ -AB- γ -C-alkyl-TriPPPro- **43**, γ -ACB- γ -C-alkyl-TriPPPro- **44** sowie der γ -C-(alkyl)-TriPPPro-Verbindungen mit Ausbeuten von bis zu 68%. Mit Hilfe von Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, dass es zur erfolgreichen Freisetzung der γ -C-(alkyl)-TriPPPro-Verbindung kommt. Es wurde dabei kein Triphosphat erhalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die γ -C-(alkyl)-TriPPPro-Verbindung sowohl im PBS- als auch im Zellextraktmedium stabil ist. Antivirale Tests zeigten eine gleiche oder sogar deutlich bessere Aktivität gegenüber HIV-1 und HIV-2 im Vergleich zu d4T. Durch die Aktivität in CEM/TK-Zellen konnte die erfolgreiche Zellaufnahme und Freisetzung des Triphosphatderivats bewiesen werden. Die γ -C-(alkyl)-TriPPPro-Verbindungen sind ausschließlich Substrate der HIV-RT, nicht jedoch der humanen DNA-Polymerasen.⁷⁴

4.2.3.3 second-generation TriPPPro-Verbindungen

Durch Verwendung des TriPPPro-Konzepts wurde für d4T eine Erhöhung der antiviralen Aktivität festgestellt. Bei Zellextrakthydrolysen wurde jedoch auch eine schnelle Dephosphorylierung zum Diphosphat beobachtet. Da d4T kein gutes Substrat für die zellulären Kinasen darstellt, erfolgt die Rephosphorylierung des erhaltenen Diphosphats langsam und ineffizient.^{18,75–77} Damit vermieden werden kann, dass ein Teil der aktiven Substanz verloren geht, ist eine metabolische Stabilisierung des Triphosphats notwendig. Von ZHAO wurden second-generation TriPPPro-Verbindungen **45** entwickelt, die an der γ -Phosphatgruppe eine spaltbare Maskierungseinheit und einen nicht-spaltbaren Alkylsubstituenten besitzen (s. **Abbildung 22**).^{75,76}

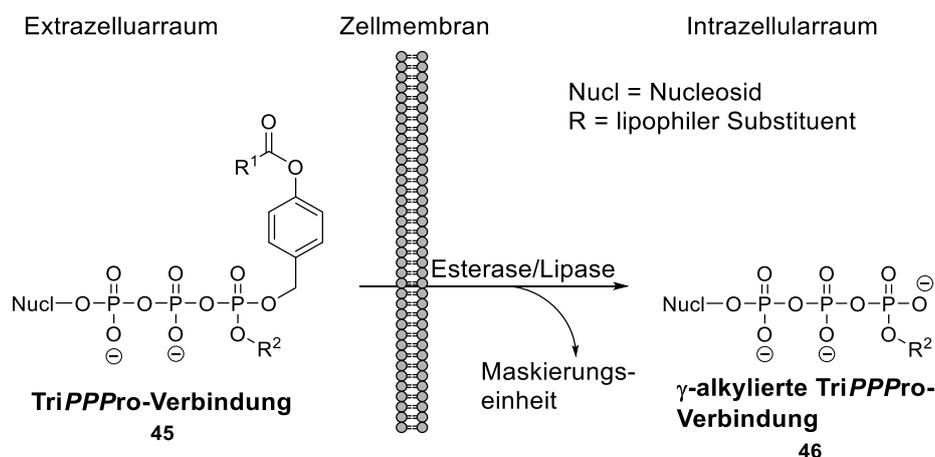


Abbildung 22: Darstellung der second-generation TriPPPro-Verbindung **45** von Zhao.

Durch die Wahl langer Alkylsubstituenten sind diese TriPPPro-Verbindungen **45** ebenfalls in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Anschließend erfolgt die intrazelluläre enzymatische Abspaltung der Maskierungseinheit und die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **46** wird freigesetzt. Die Synthese gelang ZHAO über die *H*-Phosphonatroute in Ausbeuten von 30-63%. Die durchgeführten Hydrolysestudien im PBS-, PLE- und Zellextraktmedium zeigten die erfolgreiche Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **46**. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **46** hydrolysestabil ist und auch unter Enzymbeteiligung nicht gespalten wird. Es lag auch nach mehreren Stunden Inkubationszeit noch die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **46** im Zellextrakt vor. Bei der Hydrolyse der klassischen TriPPPro-Verbindungen **38** wäre das gebildete Triphosphat **37** nach diesem Zeitraum bereits zum Di- und schließlich zum Monophosphat abgebaut worden. In antiviralen Tests konnte gezeigt werden, dass die second-generation TriPPPro-Verbindungen **45** aktiv gegen HIV-1 und HIV-2 sind. Auch in TK-freien CEM-Zellen sind diese Verbindungen aktiv gegenüber HIV-2, wodurch die erfolgreiche Zellaufnahme und anschließende Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **46** gezeigt werden konnte. Es konnte außerdem bewiesen werden, dass die intrazellulär freigesetzten γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen selektiv Substrate für die HIV-RT, aber nicht für humane DNA-Polymerasen darstellen. Durch die Entwicklung der second-generation TriPPPro-Verbindungen **45** wurde ein Prodrugsystem für Nucleosidtriphosphate geschaffen, das in der Lage ist, alle normalerweise notwendigen Phosphorylierungsschritte zu umgehen und welche Verbindungen freisetzt, die ausschließlich Substrate für virale RTs sind, nicht jedoch für humane Enzyme und die zudem sehr stabil gegenüber Dephosphorylierungen sind.^{75,76}

4.3 Bicyclische Nucleosidanaloga

4.3.1 BCNA-Was ist das genau?

Eine etablierte Methode für die Untersuchung zellulärer Prozesse ist die Verwendung von isopenmarkierten Nucleosiden. Damit konnten nützliche Informationen zum Ablauf der Zellaufnahme und Regulierung des Nucleosidgleichgewichts erhalten sowie Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Transporter und Nucleosid ermittelt werden. Auf diese Weise konnten wichtige strukturelle Eigenschaften, die für eine effiziente Aufnahme notwendig sind, erkannt werden.^{78,79} Für die Analyse der Proben muss die Messung jedoch unterbrochen werden, eine fortlaufende Untersuchung ist bei der Verwendung von radioaktiven Substanzen nicht möglich. Ein mehrstufiger Prozess ist notwendig, der mit den damit verbundenen Nachteilen wie der Möglichkeit systemischer Fehler sowie einem hohen zeitlichen Aufwand einhergeht.⁷⁸ Hinzu kommt, dass bei der Arbeit mit radioaktiven Substanzen besondere Sicherheitsvorkehrungen bei Herstellung, Handhabung, Lagerung und Entsorgung zu

beachten sind, wodurch der Arbeitsaufwand zusätzlich erhöht wird.⁷⁸ Zudem sind kommerziell nur einfache Nucleoside in einer radioaktiv-markierten Variante erhältlich, beispielsweise ³H-Uridin und ³H-Adenosin. Die meisten in der Krebs- oder Virustherapie eingesetzten Nucleosidanaloga müssen somit in einem aufwendigen Prozess synthetisiert werden.⁷⁸

Eine Alternative ist die Verwendung von Fluorophoren. Sie stellt eine besonders einfache und vielfältige Möglichkeit dar, um biologische Prozesse, wie die Zellaufnahme oder Metabolisierung, zu untersuchen. Mit ihr lassen sich kleine Verbindungen mit hoher Sensitivität in komplexen Medien, wie Zellkulturmedien, leicht detektieren.⁸⁰ Durch die Entwicklung fluoreszenter Nucleosidanaloga können die Nachteile der radioaktiv-markierten Verbindungen vermieden und zusätzlich die zellulären Bewegungen durch kontinuierliche und nicht invasive Methoden verfolgt werden. Diese fortlaufenden Untersuchungsmöglichkeiten führen zur Vermeidung experimenteller und systemischer Fehler bei den einzelnen Schritten und verringern zusätzlich den Arbeitsaufwand.⁷⁸ Die fluoreszenten Nucleosidanaloga ermöglichen eine Verfolgung der Zellaufnahme und Metabolisierung in Echtzeit.⁸¹ Hinzu kommt, dass bei fluoreszenzbasierten Messungen keine besonderen Sicherheitsvorkehrungen bei Synthese oder Lagerung der Verbindungen notwendig sind.⁷⁸ Allerdings sind die natürlich vorkommenden Nucleoside nicht fluoreszent und somit für diese Untersuchungen ungeeignet. Es ist folglich die Synthese neuer und fluoreszenter Nucleosidanaloga notwendig.⁷⁸ Diese müssen eine ähnliche Struktur wie natürliche Nucleoside aufweisen, damit sie in der Lage sind, die gleichen Transporter und Enzyme zu nutzen.⁸¹

Auch wenn Nucleoside durch die Purin- oder Pyrimidinbase intrinsisch fluoreszent sind, so verhindern eine geringe Quantenausbeute, Überschneidungen mit fluoreszenten Aminosäuren in Proteinen oder kleinen Metaboliten wie Flavonen oder NADH, eine selektive *in vivo* Detektion. Durch geringe Modifikationen der Nucleobase können die spektralen Eigenschaften zunehmen, die Quantenausbeute erhöht und das Absorptionsspektrum verschoben werden.⁸⁰ BERRY *et al.*⁸² beschrieben in ihrer Arbeit das Anbringen einer Furano- oder Pyrroloeinheit an Thymidin, wodurch die fluoreszenten Nucleosidanaloga **47** und **48** erhalten wurden (s. **Abbildung 23**).⁸⁰

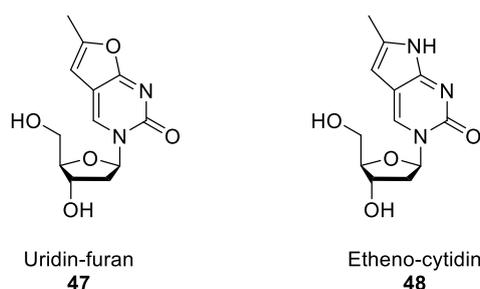


Abbildung 23: Von BERRY *et al.*⁸² dargestellten fluoreszenten Nucleosidanaloga **47** und **48**.

Die Synthese der bicyclischen Nucleosidanaloga gelingt über eine einfache Synthesemethode, bestehend aus der Kupplung eines Alkyls mit einem 5-Iodnucleosid unter Palladiumkatalyse und anschließender Cyclisierung durch Kupferkatalyse.^{80,81,83} Durch diese Modifikationen konnte das Absorptionsspektrum zu 331-335 nm und das Emissionsspektrum zu 413-415 nm verschoben werden, wodurch eine Überlagerung mit zellulären Bestandteilen verhindert werden kann.⁸⁰

VON ZHANG *et al.*⁸⁴ wurde untersucht, ob die bicyclischen Nucleosidanaloga **49** Substrate der Transporterproteine sind und damit in die Zelle aufgenommen werden können (s. **Abbildung 24**).⁷⁸

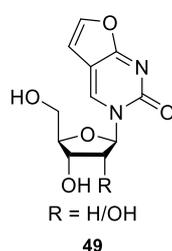
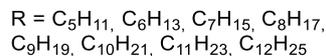
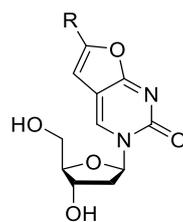


Abbildung 24: Darstellung der von ZHANG *et al.*⁸⁴ verwendeten bicyclischen Nucleosidanaloga **49**.

ZHANG *et al.*⁸⁴ gelang der Beweis, dass die dargestellten Nucleosidanaloga **49** strukturelle Ähnlichkeit zu den natürlich vorkommenden Pyrimidinnucleosiden haben und dadurch ein ähnliches Aufnahmeverhalten über einige Nucleosidtransporter (hCNT1 und hCNT3) aufweisen. Außerdem konnten zum ersten Mal die entstandenen Metabolite der eingesetzten Nucleosidanaloga nachgewiesen werden.⁸⁴ CLAUDIO-MONTERO *et al.*⁸¹ konnte durch die Verwendung von Uridinfuran die Verteilung und Funktion der Nucleosidtransporter (NT) analysieren. Durch das intrazelluläre Vorliegen des fluoreszenten Nucleosidanalogs konnte die erfolgreiche Zellaufnahme gezeigt werden.⁸¹ Antivirale Untersuchungen zeigten keine Aktivität des BCNAs **49** gegen Herpes-simplex-Viren (HSV-1 und HSV-2), humane Cytomegaloviren (HCMV) oder Varicella-Zoster-Viren (VZV).⁸⁵

Durch das Anbringen einer langen Alkylkette in C6-Position der Nucleobase konnten antivirale BCNAs **50** erhalten werden (s. **Abbildung 25**).⁸⁵⁻⁸⁸



50

Abbildung 25: Darstellung der bicyclischen Nucleosidanaloga **50** mit antiviraler Aktivität gegen VZV.

Untersuchungen ergaben, dass für eine optimale antivirale Wirkung eine Alkylkette von acht bis zehn Kohlenstoffatomen benötigt wird. Die besten Verbindungen erreichten die 300-fache Aktivität im Vergleich zur Referenzsubstanz Acyclovir.^{85,86,89} Bei allen BCNA-Verbindungen wurde keine Zytotoxizität festgestellt.^{85–88} Eine Besonderheit der BCNAs ist, dass sie ausschließlich antivirale Aktivität gegen VZV zeigen. Sie sind inaktiv gegen die anderen untersuchten Viren HSV-1, HSV-2, Vacciniavirus (VV) und HCMV.^{85–88} Die Spezifität auf VZV ist einzigartig bei Virostatika und kann mit der lipophilen Einheit und der damit verbundenen Interaktion mit der Bindungstasche der Enzyme zusammenhängen.^{88,90} Studien haben gezeigt, dass für die antivirale Wirkung die Phosphorylierung an der 5'-Position der BCNAs durch die VZV-Thymidinkinase entscheidend ist.^{86,88,91} In modifizierten TK-freien VZV-Zellen konnte keine antivirale Aktivität der BCNAs nachgewiesen werden. Diese Tatsache verdeutlicht die Notwendigkeit der Phosphorylierung der BCNAs durch die VZV-TK für deren antivirale Wirkung. Durch das Fehlen der antiviralen Wirkung in anderen Viruszellen kann davon ausgegangen werden, dass nur die VZV-TK in der Lage ist, die BCNAs zu phosphorylieren. Untersuchungen ergaben zudem, dass die zelluläre Thymidylat-Synthase das BCNA-Monophosphat nicht erkennt und somit nicht in das Diphosphat überführen kann.^{91,92} BCNAs oder ihre phosphorylierten Formen sind außerdem keine Substrate für cytosolische oder mitochondriale TKs. Die humane erythrozytische Nucleosiddiphosphatkinase ist zudem nicht in der Lage das BCNA-Diphosphat in das BCNA-Triphosphat zu überführen.⁹¹

Durch das Anbringen eines p-Alkylphenylsubstituenten an der C6-Position kann eine Erhöhung der antiviralen Wirkung erreicht werden (s. **Abbildung 26**).^{87,89,90,93}

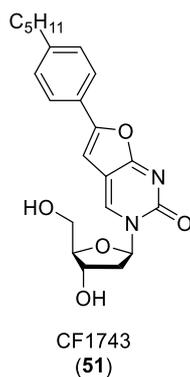
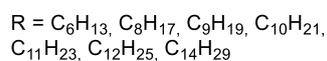
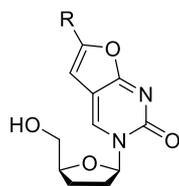


Abbildung 26: Darstellung von CF1743 (**51**), eines sehr aktiven antiviralen bicyclischen Nucleosid-analogons.

Die aktivste Verbindung der p-alkylphenylsubstituierten BCNAs stellt CF1743 (**51**) dar. Diese Verbindung zeigt antivirale Wirkung gegen eine Reihe von VZV-Virusstämmen bei subnanomolarer Konzentration und ist gleichzeitig nicht cytotoxisch.⁸⁹ Auch diese BCNAs wirken ausschließlich gegen VZV.⁹³ Untersuchungen mit CF1743 (**51**) ergaben, dass es nach intravenöser oder peroraler Gabe nicht zur Abspaltung der Base durch die zelluläre Thymidinphosphorylase (TPase) kommt, sondern eine hohe Konzentration der eingesetzten Verbindung im Plasma vorliegt.⁹² Weder die humane noch die bakterielle TPase erkennen die BCNAs als Substrat, dadurch können sie die Base nicht abspalten.^{87,88,92} Dies spricht für eine hohe Stabilität der BCNAs in biologischen Systemen.⁹²

Die 2'-Desoxy-BCNAs stellen aufgrund der genannten Eigenschaften eine komplett neue Klasse an Virostatika dar, mit einer bisher unerreichten antiviralen Wirkung (im picomolaren Bereich) und einer sehr selektiven Wirkweise (ausschließlich gegen VZV).⁸⁸

MCGUIGAN *et al.*⁹⁰ gelang der Beweis, dass die 3'-Hydroxylgruppe essenziell für die antivirale Wirkung gegen VZV ist und die 2',3'-Didesoxy-BCNAs **52** inaktiv gegen VZV sind (s. **Abbildung 27**). Diese Nucleosidanaloga besitzen eine sehr selektive und relativ hohe antivirale Aktivität gegen HCMV.⁹⁰



52

Abbildung 27: Darstellung der 2',3'-Dideoxy-BCNAs **52**.

Die Fluoreszenz der BCNAs dürfte außerdem zu neuen Einsatzmöglichkeiten in biochemischen Untersuchungen führen.⁸⁶ Durch die Fluoreszenz und die hohe Stabilität eignen sich die BCNAs exzellent für Untersuchungen in biologischen Medien. Aufgrund ihrer hohen Stabilität und da sie ausschließlich Substrate für VZV-Enzyme sind, kann eine Metabolisierung bei Zellanalysen ausgeschlossen werden. Aufgrund der fluoreszenten Eigenschaften ist eine einfache Detektion möglich, da aufgrund des zu 330 nm verschobenen Absorptionsmaximums keine Überlagerung mit Zellbestandteilen stattfindet.

4.3.2 Vorteile der fluoreszenzbasierten Messmethoden

Die Messung der Fluoreszenz stellt eine der informativsten und sensitivsten analytischen Methoden dar und spielt somit eine enorm wichtige Rolle in der modernen Forschung.^{94–96} Durch die Entwicklung von fluoreszenzbasierten Methoden konnten innere Mechanismen von Biomolekülen, Zellen und anderen Organismen ohne großen messtechnischen Aufwand untersucht werden. Außer einigen wenigen Aminosäuren existieren keine fluoreszenten Akteure, eine Überlagerung mit biologischen Verbindungen kann dadurch vermieden und der zu untersuchende Prozess ohne störende Einflüsse betrachtet werden. Das Fehlen von intrinsisch fluoreszenten natürlichen Bausteinen bedingt allerdings die Notwendigkeit der Synthese von fluoreszenten Analoga.^{94,97}

Für eine optimale Untersuchung der biologischen Prozesse muss sichergestellt werden, dass der entworfene fluoreszente Baustein strukturell der ursprünglichen Verbindung so nahe wie möglich ist. Er sollte möglichst isomorph sein. Dies bringt deutliche Einschränkungen mit sich, da Versuche ein fluoreszentes Molekül zu entwickeln oftmals durch das Einfügen eines Aromaten oder durch Erweiterung bereits vorhandener π -Konjugationen erfolgen. Beide Vorgehensweisen verändern die Größe und elektronische Struktur der Verbindung jedoch teilweise erheblich, wodurch auch die Wechselwirkungen mit der Umgebung beeinflusst werden. Bei Nucleosiden ist das Erzeugen von Fluoreszenz durch Erweiterung des Heterozyklus der Nucleobase und somit durch eine Erweiterung des π -Systems einfach möglich. Auch bei einigen aromatischen Aminosäuren kann ohne große Veränderungen Fluoreszenz in das Molekül eingefügt werden.⁹⁴

Obwohl frühere Studien⁹⁸ annahmen, dass Nucleobasen und Nucleinsäuren fluoreszent seien, sind die Purin- und Pyrimidinbasen, die in den Nucleosiden vorkommen, in wässriger Lösung nicht fluoreszent. Genaue Messungen ergaben, dass die Nucleobasen nur extrem geringe Quantenausbeuten verbunden mit einer sehr kurzen Verweildauer im Subpicosekundenbereich im angeregten Zustand aufweisen.⁹⁹ Es ist allerdings naheliegend, dass die Natur für ihre sensiblen genetischen Codes stabile Bausteine gewählt hat, die schnell wieder den angeregten Zustand verlassen.¹⁰⁰ Aufgrund dieser Eigenschaften entbrannte eine intensive

Suche nach fluoreszenten Analoga für die Untersuchung sämtlicher DNA- und RNA-Prozesse. Die in natürlichen Nucleosiden enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen stellen eine vielseitige Grundlage für synthetische Veränderungen dar. Durch geringe sterische oder elektronische Veränderungen der aromatischen Heterozyklen kann eine große Veränderung der photo-physikalischen Eigenschaften erzielt werden.⁹⁴

Fluoreszenz stellt die spontane Emission von Licht dar, die nur so lange auftritt, wie die Anregung durch Lichtabsorption erfolgt. In **Abbildung 28** ist zur anschaulichen Erklärung ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm abgebildet.⁹⁴

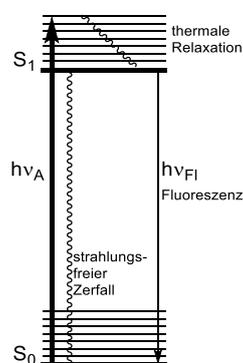


Abbildung 28: Darstellung eines vereinfachten Jablonski-Diagramms.⁹⁴

Die Anregung erfolgt durch einen optischen Impuls, wodurch der Fluorophor aus dem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) versetzt wird. Diese Anregung geschieht innerhalb von Femtosekunden. Durch Wechselwirkung mit den umliegenden Molekülen kann der angeregte Fluorophor durch Schwingungsenergielaxation Energie abgeben und gelangt somit sehr schnell in angeregten Schwingungsgrundzustand. Durch die anschließende Abgabe eines Photons erfolgt die Rückkehr des Fluorophors in den Grundzustand S_0 . Die dabei ausgestrahlte Fluoreszenz verlässt das Molekül senkrecht zur anregenden Strahlung. Aufgrund der strahlungslos abgegebenen Energie im angeregten Zustand ist die abgestrahlte Energie geringer als die bei der Absorption aufgenommene Energie, weswegen das Emissionsspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu kleineren Wellenzahlen verschoben ist.^{94,97,101}

Selektive Anregung verbunden mit der Empfindlichkeit einiger Chromophore gegenüber verschiedenen Umgebungseinflüssen, wie pH-Wert, Polarität, Viskosität oder der Anwesenheit von Quenchern, machen die molekulare Fluoreszenz zu einem extrem effektiven Werkzeug für die *in vitro* biophysikalische und biochemische Analyse und sogar für *in vivo* Zellimaging.^{94–96,102}

5 ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Mit der Entwicklung des TriPPPPro-Konzepts im AK MEIER steht ein nützliches Werkzeug für die Synthese von NTP-Prodrugs zur Verfügung. In der Zelle kommt es zu einer zügigen Abspaltung der Maskierungseinheiten, wodurch das Triphosphat erhalten wird. Durch Anwendung dieser Prodrugstrategie wird eine Konzentrationserhöhung des aktiven Metaboliten in der Zelle erreicht.^{61,62,64,71} GOLLNEST konnte außerdem zeigen, dass inaktive Nucleosidanaloga durch das TriPPPPro-Konzept in antiviral wirksame Substanzen überführt werden können. Der Beweis der Zellaufnahme gelang durch die Verwendung von fluoreszenten Nucleosidanaloga.^{62,64,71} Allerdings wurde in Zellextrakthydrolysen von symmetrischen TriPPPPro-Verbindungen neben der raschen Freisetzung des Triphosphats ebenso dessen schnelle Dephosphorylierung beobachtet.^{62–64,71} Durch die Entwicklung der second-generation TriPPPPro-Verbindungen, bei denen ein nicht abspaltbarer Alkylrest und eine spaltbare Maskierungseinheit an der γ -Phosphatgruppe vorliegen, konnte eine höhere Stabilität und Wirksamkeit erzielt werden. In Hydrolysestudien konnte die erfolgreiche Abspaltung der Maskierungseinheit sowie Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung gezeigt werden. Da diese Verbindungen keinen spaltbaren Substituenten mehr aufweisen, kann keine weitere Metabolisierung erfolgen. Eine Dephosphorylierung, wie sie bei den Triphosphaten stattfand, wurde deswegen nicht beobachtet.^{75,76} Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse soll nun im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob die Zellaufnahme gelingt und wie die Metabolisierung der second-generation TriPPPPro-Verbindungen in Krebszellen erfolgt. Dabei wird wie in vorherigen Studien auf bicyclische Nucleosidanaloga als fluoreszierendes Strukturmerkmal zurückgegriffen, mit dem eine einfache Verfolgung der Metabolisierung der untersuchten Prodrugs in der Zelle möglich sein sollte. Bei den second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** sollen durch Variationen der Alkylkettenlängen unterschiedliche Lipophilien erreicht werden. Auf diese Weise kann ermittelt werden, welche Kettenlängenkombination für die Zellaufnahme optimal ist. Außerdem sollen die γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** synthetisiert werden, da auch diese Verbindungen hinsichtlich ihrer Zellaufnahme analysiert werden sollen. Die darzustellenden Verbindungen sind in **Abbildung 29** dargestellt.

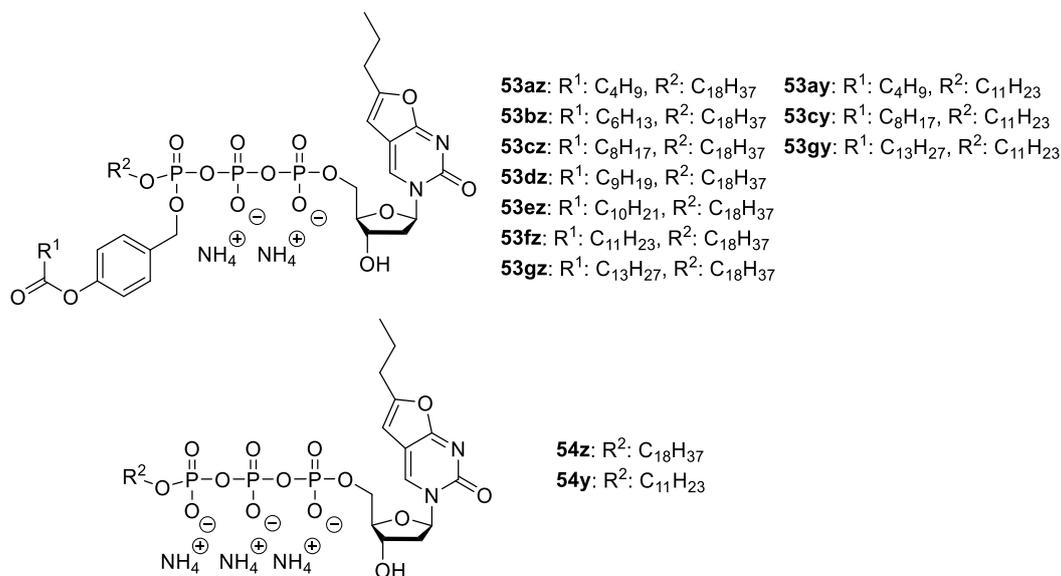


Abbildung 29: Darzustellende second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** mit Acyloxybenzylmaske und Alkylrest an der γ -Phosphatgruppe und γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindungen **54**.

Die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** sollen sich sowohl in der Kettenlänge der Acyloxybenzylmaskierung als auch des Alkylrestes unterscheiden. Als Alkylrest soll eine C₁₈H₃₇- sowie eine C₁₁H₂₃-Kette verwendet werden, wodurch eine ausreichende Lipophilie für das Passieren der Zellmembran erreicht werden kann. Für die Acyloxybenzylmaskierungen sollen unterschiedliche Kettenlängen zwischen vier und 13 Kohlenstoffatomen gewählt werden. Die Stabilität der second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindungen soll anschließend durch chemische und enzymatische Hydrolyse sowie durch Hydrolyse im Zellextrakt untersucht werden. Außerdem soll die Zellaufnahme und intrazelluläre Metabolisierung der second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindungen in Tumor- und CEM-SS-Zellen betrachtet werden.

Die γ -alkylierten BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **54** sollen nach erfolgter Synthese ebenfalls hinsichtlich ihrer chemischen und enzymatischen Stabilität untersucht werden. Anschließend soll anhand von Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen festgestellt werden, ob der Alkylsubstituent für eine ausreichende Abschirmung der negativen Ladung sorgen kann und somit eine Zellaufnahme möglich ist.

In den folgenden Abschnitten dieser Arbeit sollen bereits in der Krebstherapie eingesetzte Cytostatika hinsichtlich ihrer Eignung für das TriPPPPro-Konzept untersucht werden. Dafür sollen die Verbindungen in **Abbildung 30** dargestellt werden.

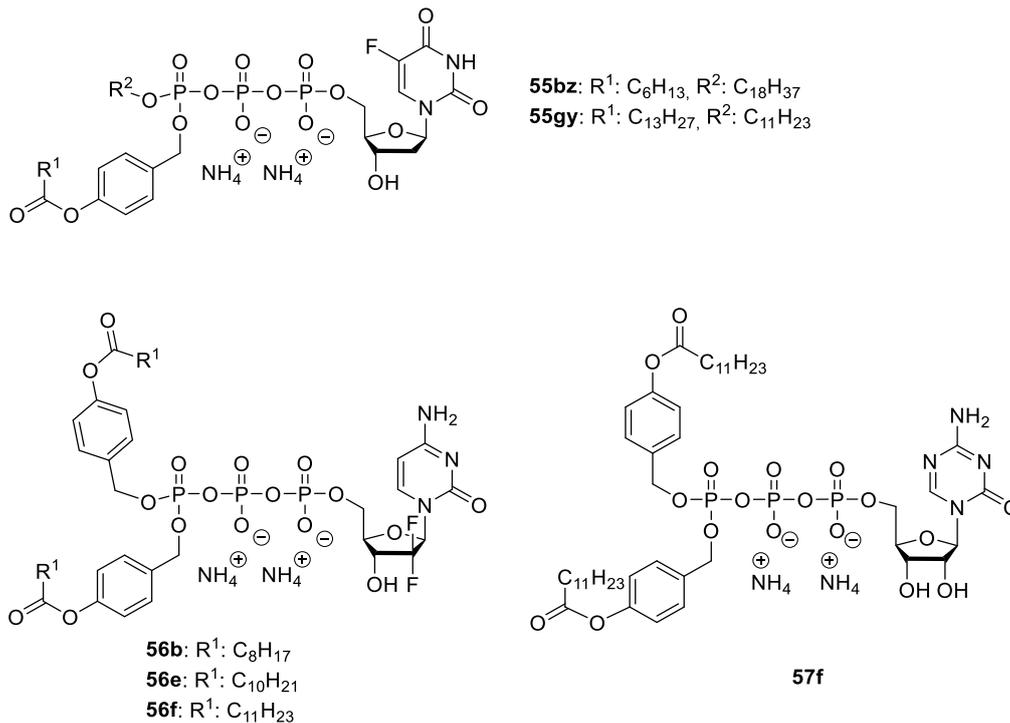


Abbildung 30: Darstellung der geplanten TriPPPPro-Verbindungen von 5-FdU **55**, Gemcitabin **56** und 5-Azacytidin **57**.

Es soll zunächst ermittelt werden, ob second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** einen größeren Einfluss auf das Zellwachstum haben als das bisher verwendete Cytostatikum. Außerdem soll dargelegt werden, ob TriPPPPro-Verbindungen von Gemcitabin und 5-Azacytidin eine Verbesserung bei der Krebsbehandlung darstellen. Auch in diesem Teil der Arbeit soll durch Kombination unterschiedlicher Kettenlängen festgestellt werden, welche Lipophilie benötigt wird, um optimale Ergebnisse bei den Proliferationsuntersuchungen zu erreichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sind die Synthese und die Hydrolysestudien der Di- und Triphosphate des bicyclischen Nucleosidanalogons sowie von Gemcitabin. Diese Verbindungen sind in **Abbildung 31** dargestellt.

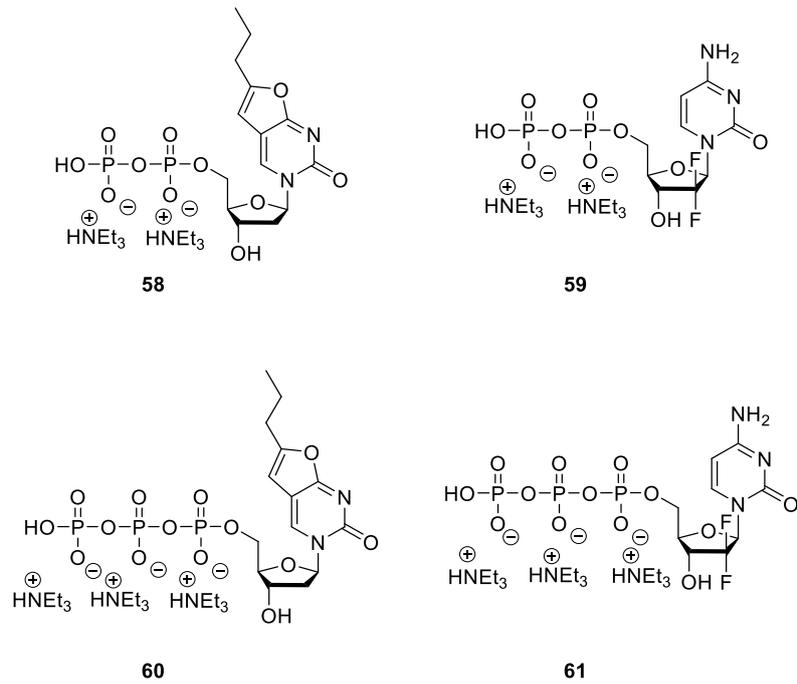


Abbildung 31: Darstellung der Di- und Triphosphate von Gemcitabin und des bicyclischen Nucleosid-analogons.

Durch Analyse der Stabilität der Di- und Triphosphate soll dargelegt werden können, ob diese Verbindungen stabil sind oder ob deren Abbau zur Bildung von Nebenprodukten bei den Hydrolysen oder Zelltests der entsprechenden TriPPP-Verbindungen führen.

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1 Synthese der fluoreszierenden second-generation TriPPPro-Verbindungen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden fluoreszierende second-generation TriPPPro-Verbindungen synthetisiert. Diese Verbindungen sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit die Zellmembran zu passieren und des intrazellulären Metabolismus untersucht werden. Für diese Fragestellung eignen sich bicyclische Nucleosidanaloga besonders gut, da sie intrinsisch fluoreszent sind und trotzdem eine strukturelle Ähnlichkeit zu natürlichen Nucleosiden aufweisen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde ein 2'-Desoxybicyclisches Nucleosid analogon verwendet, da in späteren Teilen dieser Arbeit das TriPPPro-Konzept auf Nucleosidanaloga angewendet werden soll, die bereits als Cytostatikum verwendet werden und welche ebenfalls keine 2'-OH-Gruppe aufweisen. Dadurch kann eine ähnliche Lipophilie sowie ein ähnliches intrazelluläres Verhalten angenommen werden.

Die TriPPPro-Verbindungen lassen sich auf zwei verschiedenen Wegen erfolgreich darstellen (s. **Abbildung 32**).^{59,61–64,69}

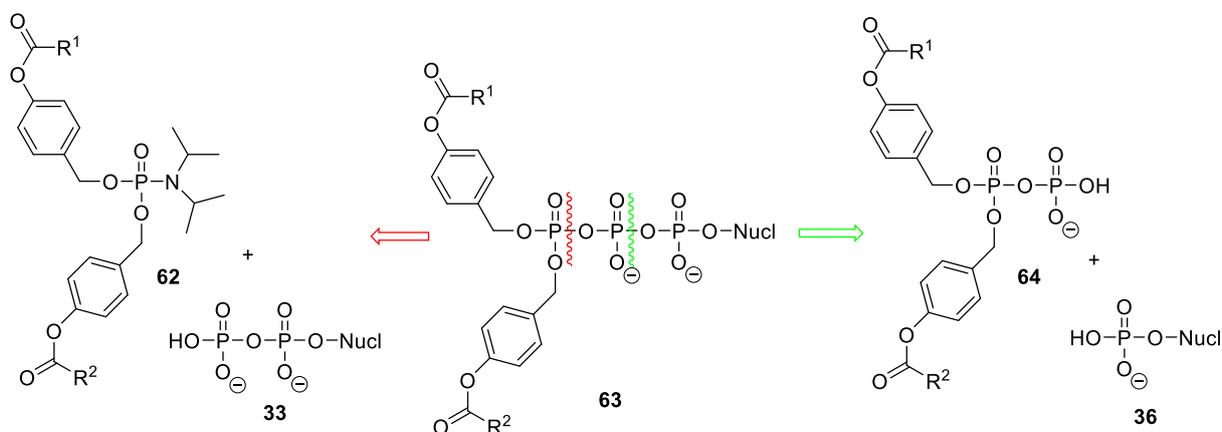


Abbildung 32: Gegenüberstellung der beiden Synthesemöglichkeiten für TriPPPro-Verbindungen.

Die erste Variante stellt die Phosphoramiditroute dar, sie baut auf dem Vorgehen der DiPPPro-Synthese auf. Bei dieser Methode wird ein vorher synthetisiertes (un)symmetrisches Phosphoramidit **62** mit einem Nucleosiddiphosphat **33** gekoppelt und anschließend oxidiert, wobei die TriPPPro-Verbindung **63** erhalten wird.^{59,61–64,69} Es wird dabei die Bindung zwischen der γ - und β -Phosphatgruppe (roter Pfeil) ausgebildet.⁶¹ Die zweite Variante beruht auf der *H*-Phosphonatchemie. Bei diesem Vorgehen wird zunächst ein doppelmaskiertes Pyrophosphat **64** gebildet, anschließend wird es aktiviert und dann mit einem Nucleosidmonophosphat **36** zur Reaktion gebracht.^{59,61–64,69} Hier erfolgt die TriPPPro-Synthese durch Bindungsbildung

zwischen der β - und α -Phosphatgruppe im finalen Schritt (grüner Pfeil).⁶¹ Die Vorteile der *H*-Phosphonatroute sind, dass zum einen die Synthese des Nucleosidmonophosphats einfacher ist und zum anderen diese Route auch für oxidationsempfindliche Nucleoside und Masken geeignet ist.^{59,61,62,69,71}

Von REIMER⁶⁹ wurde festgestellt, dass die Synthese von BCNA-Diphosphaten aufwendig ist und mit einer geringen Ausbeute einhergeht, deswegen wurde die *H*-Phosphonatroute für die Synthese der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** gewählt (s. **Abbildung 33**).

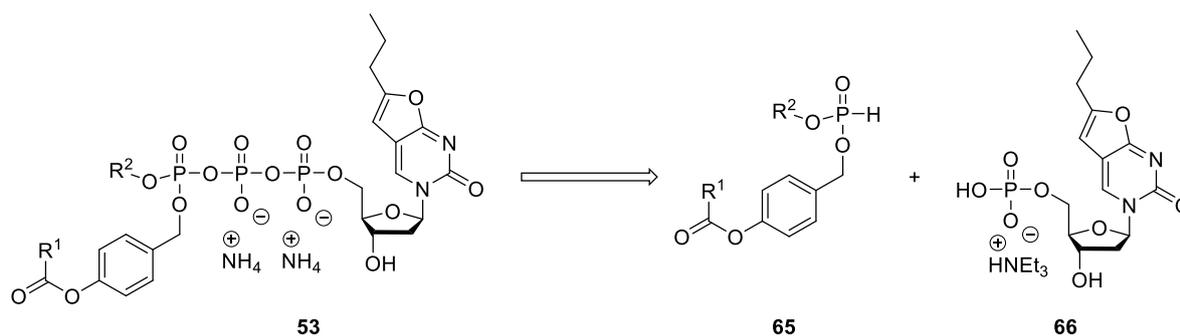


Abbildung 33: Retrosyntheseschema des finalen Schritts der TriPPPro-Synthese über die *H*-Phosphonatroute.

Für die Darstellung der BCNA-TriPPPro-Verbindung **53** über die *H*-Phosphonatroute müssen im letzten Schritt das Monophosphat **66** und das *H*-Phosphonat **65** gekoppelt werden. Auf deren jeweiligen Synthesen soll in den nächsten Abschnitten eingegangen werden.

6.1.1 Synthese des bicyclischen 2'-Desoxynucleosidanalogs

Als bicyclisches Nucleosidanalogs soll in dieser Arbeit Verbindung **67** verwendet werden (s. **Abbildung 34**).

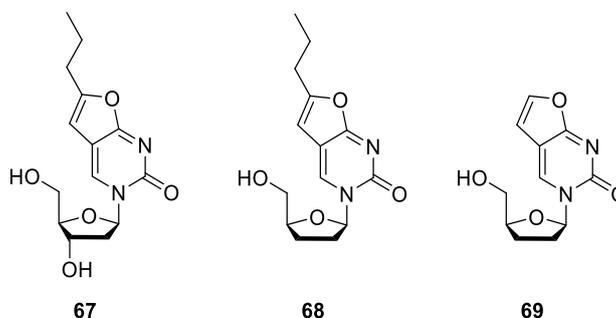


Abbildung 34: Darstellung der bicyclischen Nucleosidanaloga 6-Prop-dBCNA **67**, 6-Prop-ddBCNA **68** und 6-H-ddBCNA **69**.

REIMER⁶⁹ hat festgestellt, dass bei der Synthese der fluoreszierenden Base von 6-Prop-ddBCNA **68** die Sonogashira-Reaktion und die anschließende 5-endo-dig-Reaktion in einer *one-pot*-Reaktion durchführbar sind. Bei der Synthese von 6-H-ddBCNA **69** mussten diese Reaktionen stufenweise durchgeführt werden. Diese Ergebnisse von REIMER wurden bei der Wahl des BCNAs **67** in dieser Arbeit zugrunde gelegt.

Für die Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphats **66** wurde eine Syntheseroute verwendet, die von REIMER⁶⁹ und PERTENBREITER⁷⁰ optimiert worden war und auf einer Route von MCGUIGAN¹⁰³ beruht (s. **Abbildung 35**).

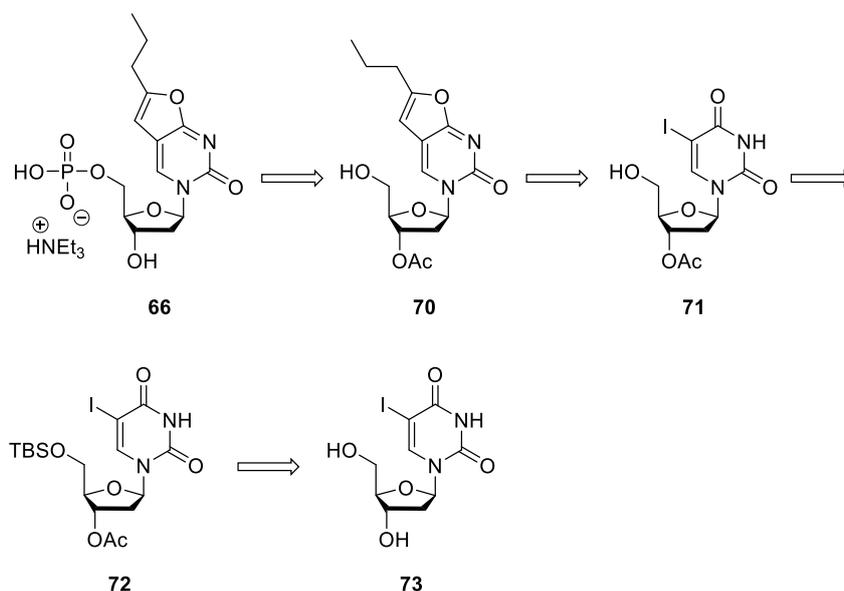


Abbildung 35: Retrosyntheseschema der 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphatsynthese.

Das 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphat **66** sollte über die Fm-Amiditroute ausgehend vom 2'-Desoxy-3'-acetyl-BCNA **70** und anschließender Entfernung der Schutzgruppen dargestellt werden. Das 3'-acetylgeschützte BCNA **70** sollte durch die Sonogashira-Reaktion mit anschließender Cyclisierung in einer *one-pot*-Synthese aus 3'-Acetyl-5-iod-2'-desoxyuridin **71** gebildet werden. Das 3'-acetylgeschützte Nucleosidanalogen **71** musste zuvor durch Verwendung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie aus 5-Iod-2'-desoxyuridin (**73**) via dem 5'-TBS-geschützten Nucleosidanalogen **72** synthetisiert werden.

Die Synthese des bicyclischen 2'-Desoxynucleosidanalogs **70** wurde ausgehend vom kommerziell verfügbaren 5-Iod-2'-desoxyuridin **73** durchgeführt (s. **Abbildung 36**).

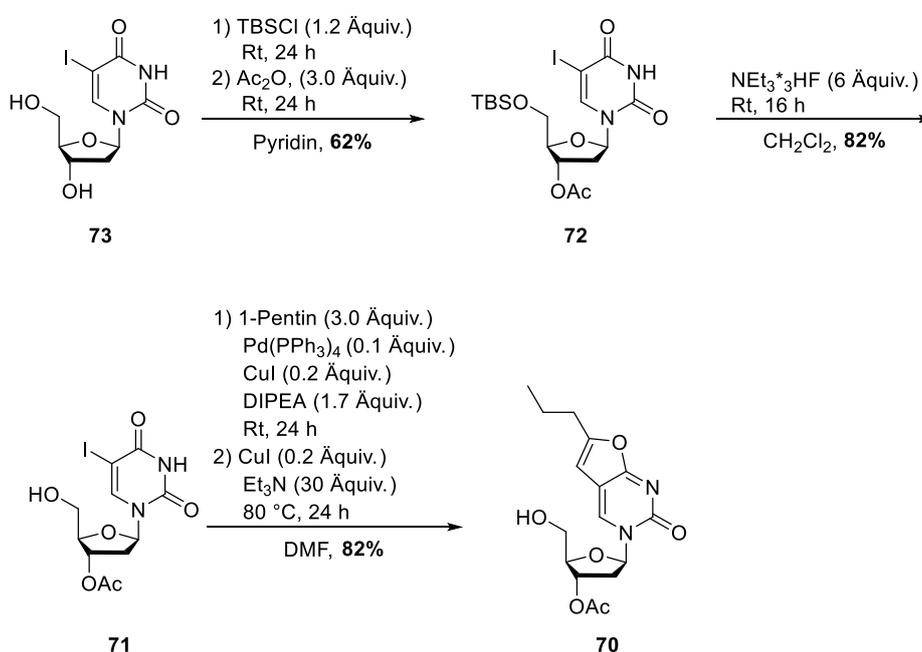


Abbildung 36: Synthese des acetylgeschützten bicyclischen 2'-Desoxynucleosidanalogs **70**.

Es wurde eine orthogonale Schutzgruppenstrategie verwendet, damit es bei der Monophosphatsynthese nicht zu Nebenreaktionen der 3'-Hydroxylgruppe kommt. Im ersten Schritt wurde in einer *one-pot*-Reaktion die 5'-Hydroxylgruppe durch Umsetzung mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) geschützt und anschließend die 3'-Hydroxylgruppe durch Zugabe von Essigsäureanhydrid acetyliert. Das doppelt geschützte Nucleosid **72** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 62% erhalten. Im nächsten Schritt wurde die TBS-Schutzgruppe durch Reaktion mit Triethylamin·Trihydrofluorid als Fluoriddonor abgespalten, dadurch konnte die für die folgende Reaktion benötigte freie 5'-OH-Gruppe erhalten werden. Die Acetylschutzgruppe an der 3'-Hydroxylgruppe wurde dabei nicht beeinflusst. Durch die Zugabe von Kieselgel konnte überschüssiges Triethylamin·Trihydro-

fluorid abreagieren und die Reaktion wurde beendet. Nach der anschließenden säulenchromatographischen Reinigung wurde das 3'-acetylgeschützte Nucleosid **71** in einer Ausbeute von 82% isoliert.

Die Synthese des 3'-acetylgeschützten BCNAs **70** erfolgte durch eine Sonogashira-Kupplung mit anschließender Cyclisierung in einer *one-pot*-Reaktion. Das iodierte Nucleosid **71** wurde mit 1-Pentin, Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator, Kupfer(I)iodid als Cokatalysator zur Aktivierung des Alkins und *N,N*-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach der Cyclisierung mit Kupfer(I)iodid und Triethylamin wurde das 2'-Desoxy-3'-acetylgeschützte bicyclische Nucleosidanalogon **70** gebildet, welches nach zweifacher säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 82% isoliert wurde.

Bei der Cyclisierung zum sauerstoffhaltigen Fünfring handelt es sich nach BALDWIN um eine *5-endo-dig*-Cyclisierung.¹⁰⁴ Bei dieser Klassifizierung der Ringschlussreaktionen beschreibt die vorangestellte Zahl die Ringgröße. Durch *endo* oder *exo* wird gezeigt, ob der Ring endo- oder exocyclisch in Bezug auf den kleinsten entstandenen Ring gebildet wurde. Zum Schluss folgt *tet*, *trig* oder *dig* in Abhängigkeit von der Hybridisierung des an dem Ringschluss beteiligten Kohlenstoffatoms.

Die anschließende Synthese des Monophosphats sollte durch eine Reaktion mit Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit (**76**) und anschließender Oxidation erfolgen. Die vorhandenen Fm-Schutzgruppen können anschließend unter milden basischen Bedingungen abgespalten werden, wodurch das BCNA nicht beschädigt werden sollte. Für diese Monophosphatsynthese musste zunächst das Reagenz Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit (**76**) dargestellt werden (s. **Abbildung 37**).^{69,105}

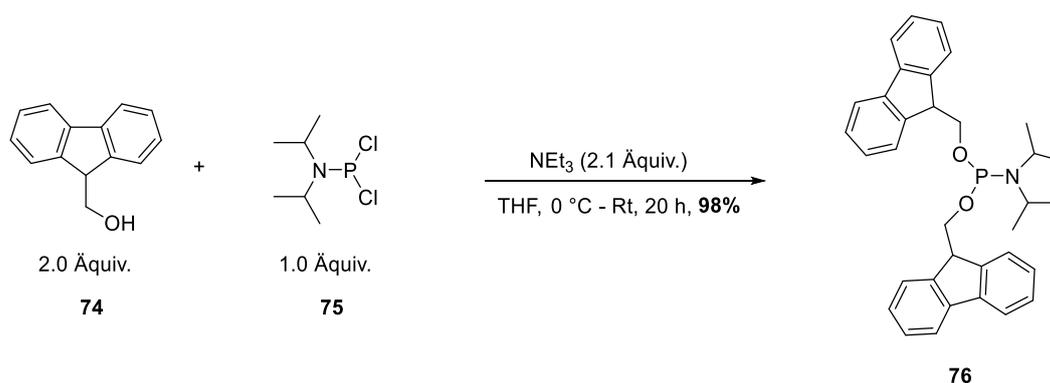


Abbildung 37: Synthese des Bis(flourenylmethyl)phosphoramidits (**76**).

Das Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit (**76**) wurde durch Umsetzung von 9-Flourenylmethanol (**74**) mit Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (**75**) bei 0 °C und 20-stündigem Rühren bei Raumtemperatur dargestellt. Darauf folgte die wässrige Aufarbeitung. Auf eine

säulenchromatographische Reinigung wurde bei dieser Reaktion verzichtet, da die Reinheit des Produkts **76** nach der wässrigen Aufarbeitung ausreichend hoch war. Durch eine bei einer ersten Durchführung der Reaktion ausgeführten Säulenchromatographie wurden erhebliche Ausbeuteverluste (ca. 40%) beobachtet. Deswegen wurde in den folgenden Versuchen darauf verzichtet. Das Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) konnte mit wässriger Aufarbeitung in einer Ausbeute von 98% und einer ausreichenden Reinheit erhalten werden.

Die Kupplung des bicyclischen 2'-Desoxy-3'-acetylnucleosidanalogons **70** erfolgte mit einem Überschuss von Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**), damit eine vollständige Umsetzung zum geschütztem Monophosphat **66** gewährleistet werden konnte (s. **Abbildung 38**).

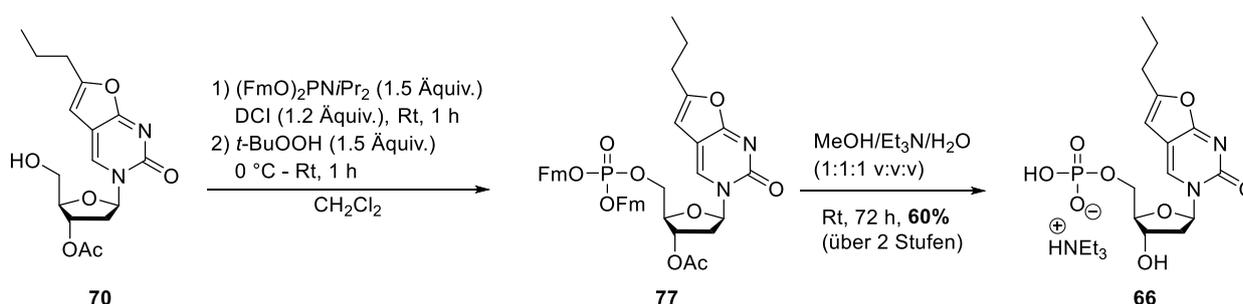


Abbildung 38: Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphats **66**.

Zur Aktivierung wurde 4,5-Dicyanoimidazol (DCI, $c = 0.25\text{ M}$ in Acetonitril) verwendet, welches über einen Zeitraum von 30 Minuten zugegeben wurde. In Vorarbeiten von WEINSCHENK¹⁰⁶ konnte gezeigt werden, dass eine portionsweise Zugabe von DCI zu einem vollständigen Umsatz führt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend erfolgte die Oxidation des Phosphits durch die Zugabe von 1.50 Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid. Das BisFm-geschützte Nucleosidmonophosphat **77** wurde nach automatisierter NP-Säulenchromatographie leicht verunreinigt erhalten. Es wurde eine automatisierte NP-Säulenchromatographie durchgeführt, damit ein genauer und stetiger Gradient durchführbar ist und somit eine bessere Reinigung erzielt wird. Da die Verunreinigungen gering waren und bei der nachfolgenden Entschützung nicht störten, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet, um Ausbeuteverluste zu vermeiden. Für die Abspaltung aller Schutzgruppen wurde das geschützte Monophosphat **77** zunächst eine Stunde in einer Methanol/Triethylamin-Mischung (1:1 v:v) gerührt. Es folgte die Zugabe des gleichen Volumens Wasser und nach weiteren 72 Stunden Rühren bei Raumtemperatur waren beide Fm-Schutzgruppen sowie die Acetylschutzgruppe abgespalten worden. Die Entfernung der ersten Fm-Schutzgruppe erfolgt in der Regel schnell, da keine Abstoßung der Base aufgrund von elektronischen Wechselwirkungen erfolgen kann. Die Abspaltung der zweiten Fm-Gruppe erfolgt deutlich langsamer, da hier bereits eine negative Ladung vorliegt und die Base aufgrund elektrostatischer Abstoßung nicht mehr ungehindert ein Proton abstrahieren kann. Durch die

Zugabe des Wassers kann auch die Acetylschutzgruppe in diesem Reaktionsschritt mitabgespalten werden. Das 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphat **66** wurde über beide Stufen in einer Ausbeute von 60% erhalten. Die Gesamtausbeute der gezeigten 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphatsynthese lag über 5 Stufen bei 57%.

Die basische Abspaltung der Fm-Schutzgruppen ist in **Abbildung 39** dargestellt.

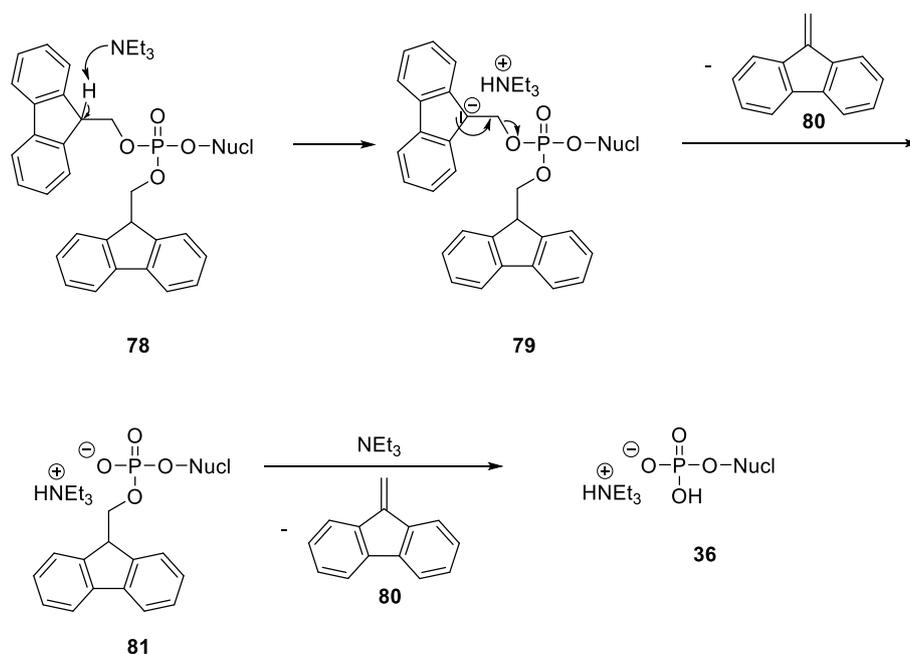


Abbildung 39: Mechanismus der basischen Abspaltung der Fm-Schutzgruppen.

Die Abspaltung der Fm-Schutzgruppen verläuft über einen E1_{cb} -Mechanismus.¹⁰⁷ Zunächst abstrahiert die verwendete Base das acidifizierte H-Atom der Fm-Gruppe. Aus dem dabei entstandenen Anion **79** werden durch Elektronenpaumlagerungen das ungeschützte Phosphat **81** und Dibenzofulven **80** freigesetzt. Die Abspaltung der zweiten Fm-Schutzgruppe erfolgt analog, dauert aufgrund der vorhandenen negativen Ladung an der Phosphatgruppe allerdings deutlich länger. Durch das zugesetzte Wasser kann die Acetylschutzgruppe unter basischen Bedingungen hydrolysiert werden.

6.1.2 Synthese der unsymmetrischen *H*-Phosphonate

In diesem Kapitel soll die Synthese der *H*-Phosphonate **65** vorgestellt werden. Das Retrosyntheseschema ist in **Abbildung 40** gezeigt.

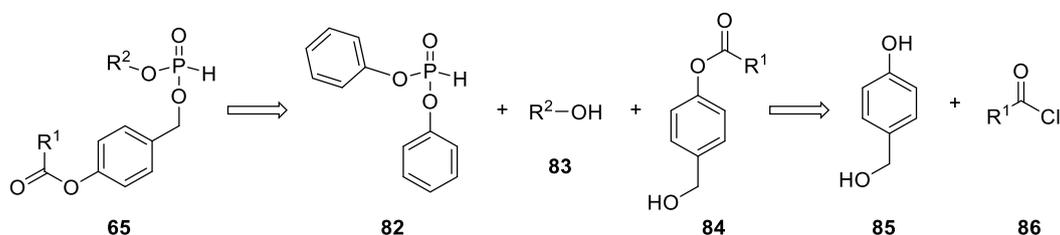


Abbildung 40: Retrosyntheseschema der *H*-Phosphonatsynthese.

Die Synthese der unsymmetrischen *H*-Phosphonate **65** erfolgte ausgehend von Diphenylphosphit (DPP, **82**). Im basischen Milieu sollten die beiden Phenylsubstituenten abgespalten und durch 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoat **84** und dem langkettigen Alkohol **83** substituiert werden. Die 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate **84** wurden vorher in einer Veresterung des 4-Hydroxybenzylalkohols (**85**) mit dem entsprechenden Säurechlorid **86** zugänglich gemacht.

Die für die Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate **84** eingesetzten Säurechloride konnten alle bis auf das hochpreisige Undecanoylchlorid (**87e**) kommerziell erworben werden. Das C_{10} -Säurechlorid **86e** konnte durch eine einfache und schnelle Reaktion hergestellt werden, wodurch die Kosten deutlich reduziert werden konnten (s. **Abbildung 41**).

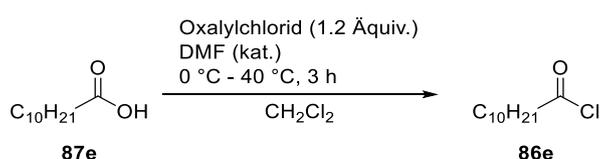


Abbildung 41: Synthese des Undecanoylchlorids (**86e**).

Undecanoylchlorid (**86e**) wurde ausgehend von der Undecansäure (**87e**) dargestellt. Die Säure **87e** wurde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Dichlormethan mit Oxalylchlorid und einer katalytischen Menge DMF versetzt und anschließend drei Stunden zum Sieden erhitzt. Das erhaltene Säurechlorid **86e** wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

Die Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate **84** erfolgte anhand einer Syntheseroute, die von JESSEN und SCHULZ⁵⁴ etabliert und von GOLLNEST⁷¹ und WEISING¹⁰⁸ modifiziert wurde (s. **Abbildung 42**).

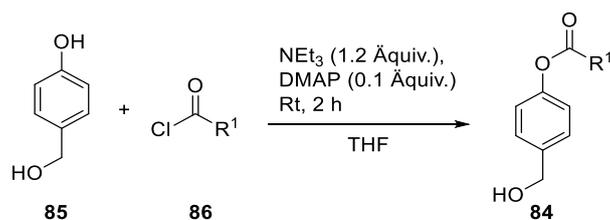


Abbildung 42: Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate **84**.

Bei dieser Syntheseroute erfolgte zunächst die Veresterung von 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) mit den entsprechenden Säurechloriden **86**. Die beiden Reaktionspartner wurden in THF gelöst, mit Triethylamin und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Base Triethylamin wurde mit 1.2 Äquivalenten eingesetzt, dadurch wurde eine vollständige Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe des 4-Hydroxybenzylalkohols (**85**) ermöglicht. Der Benzolring ist durch das vorhandene π -System in der Lage das Phenolatanion durch mesomere Effekte zu stabilisieren, wohingegen eine Stabilisierung des Benzylanions nicht möglich ist. Durch die Mesomeriestabilisierung der Zwischenstufe besitzt die phenolische Hydroxylgruppe eine höhere Acidität, wodurch diese Position für den nucleophilen Angriff aktiviert wird und die Deprotonierung zuerst an dieser Position stattfindet. Durch einen leichten Überschuss der Base Triethylamin wird die vollständige Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe gewährleistet und gleichzeitig das gebildete Hydrochlorid als Triethylammoniumchlorid abgefangen. Durch Studien von WEISING¹⁰⁸ konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz des Katalysators DMAP die Ausbeute erhöht wird. Die erhaltenen Ausbeuten sind in **Tabelle 1** dargestellt. Die Synthese von Verbindung **84g** wurde ohne den Katalysator DMAP durchgeführt. Dadurch wurde bei dieser Reaktion nur eine Ausbeute von 32% erhalten. Da dabei trotzdem ausreichend Substanz hergestellt werden konnte, wurde auf eine Wiederholung verzichtet.

Tabelle 1: Verwendete Alkylkettenlängen der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate **84**.

Verbindung	84a	84b	84c	84d	84e	84f	84g
R ¹	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇
Ausbeute [%]	68	53	58	45	65	58	32

Der Katalysator DMAP (**88**) kann durch einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus die Carbonylfunktion des Säurechlorids **86** für die folgende Reaktion mit dem Alkoholat durch Bildung des mesomeriestabilisierten *N*-Acylpyridiniumsalzes **89** aktivieren. Der Mechanismus der Aktivierung von DMAP ist in **Abbildung 43** gezeigt.

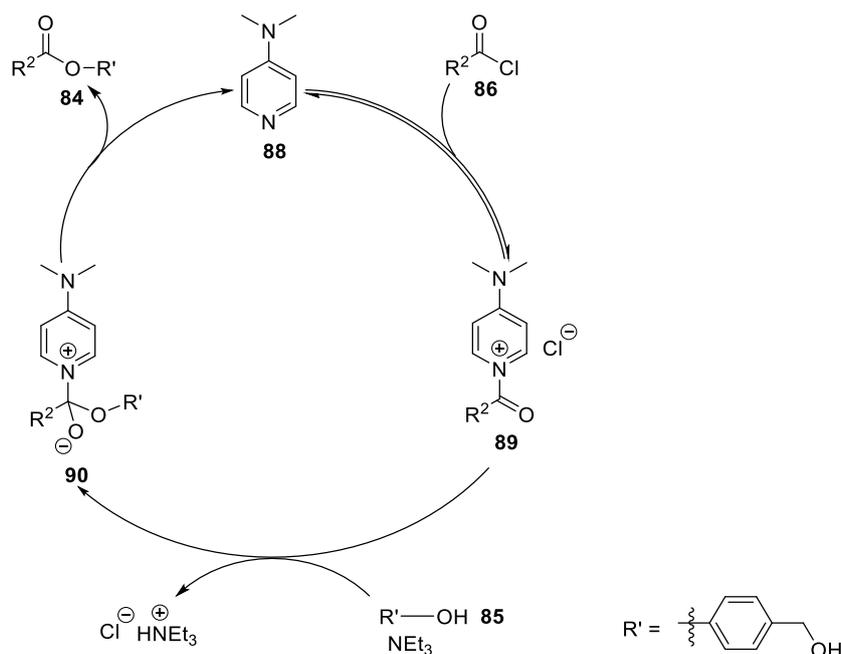


Abbildung 43: Schematische Darstellung des katalytischen Zyklus der Veresterung des Alkohols **85** mit DMAP (**88**) als Katalysator.¹⁰⁹

Der Katalysator DMAP (**88**) greift das Carbonylkohlenstoffatom des Säurechlorids **86** nucleophil an, dadurch kommt es zur Bildung des *N*-Acylpyridiniumsalzes **89**, wodurch die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffatoms deutlich erhöht und der Angriff des Alkoholats **85** begünstigt werden. Im nächsten Schritt kommt es durch den Angriff des Alkohols **85** zur Bildung der tetraedrischen Zwischenstufe **90**, aus der im nächsten Schritt durch Elektronenpaarverschiebungen das Produkt **84** freigesetzt und der Katalysator **88** regeneriert wird.

Bei der Synthese der Maskierungseinheiten **84** wurde, wie in vorherigen Arbeiten,^{71,110} beobachtet, dass es zu einer doppelten Veresterung sowie zu einer Veresterung der benzyliischen Hydroxylgruppe kommt. Diese Nebenprodukte wurden nach Abtrennung nicht genauer analysiert. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen *R_f*-Werte war eine chromatographische Trennung der entstandenen Nebenprodukte und des Produkts leicht möglich. Die Synthesen der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate **84** gelangen mit Ausbeuten von 32-68%.

Die unsymmetrischen *H*-Phosphonate **65** wurden auf einer von QIANG XIAO *et al.*¹¹¹ entwickelten und von GOLLNEST⁷¹, ZHAO⁷⁶ und KULLIK¹¹² modifizierten Route dargestellt (s. **Abbildung 44**).

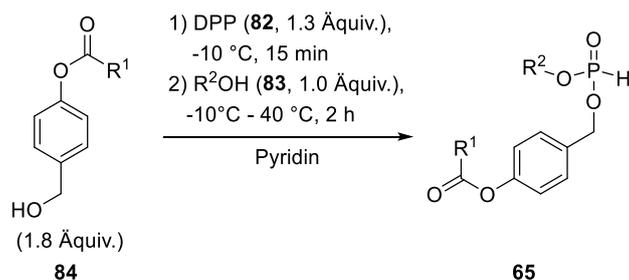


Abbildung 44: Synthese der *H*-Phosphonate **65** mit einem langkettigen Alkylrest und einer Acyloxybenzylmaske an der γ -Phosphatgruppe.

Bei -10 °C wurde Diphenylphosphonat (DPP, **82**) in Pyridin gelöst und langsam mit einem 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoat **84**, welches in Pyridin gelöst vorlag, versetzt. Die langsame Zugabe bei tiefer Temperatur sollte eine Zweifachsubstitution verhindern. Anschließend wurde der langkettige Alkohol (R² = C₁₁H₂₃ oder C₁₈H₃₇) zugegeben und für eine vollständige Umsetzung zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Bei der chromatographischen Reinigung wurde dem Lösungsmittel 0.5 Vol.% Essigsäure zugesetzt, dadurch sollte die Zersetzung des Produkts verhindert werden. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen konnte die Zweifachsubstitution des 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoats nicht zuverlässig verhindert werden, allerdings war die säulenchromatographische Trennung des Nebenprodukts und des Produkts ohne großen Aufwand möglich. Die unsymmetrischen *H*-Phosphonate **65** konnten in mittleren bis sehr guten Ausbeuten von 49-94% erhalten werden. Die erhaltenen Ausbeuten der *H*-Phosphonatsynthesen sind in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Darstellung der erreichten Ausbeuten der *H*-Phosphonatsynthesen.

Verbindung	65az	65bz	65cz	65dz	65ez	65fz	65gz	65ay	65cy	65gy
R ¹	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇	C ₄ H ₉	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇
R ²	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃						
Ausbeute [%]	94	70	76	88	80	85	84	70	64	49

6.1.3 Synthese der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen

Damit die Kopplung zu den second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** erfolgen kann, müssen die beiden erfolgreich dargestellten Verbindungen, das 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphat **66** und ein *H*-Phosphonat **65** miteinander zur Reaktion gebracht werden. In **Abbildung 45** ist das Retrosyntheschema dieses Schrittes gezeigt.

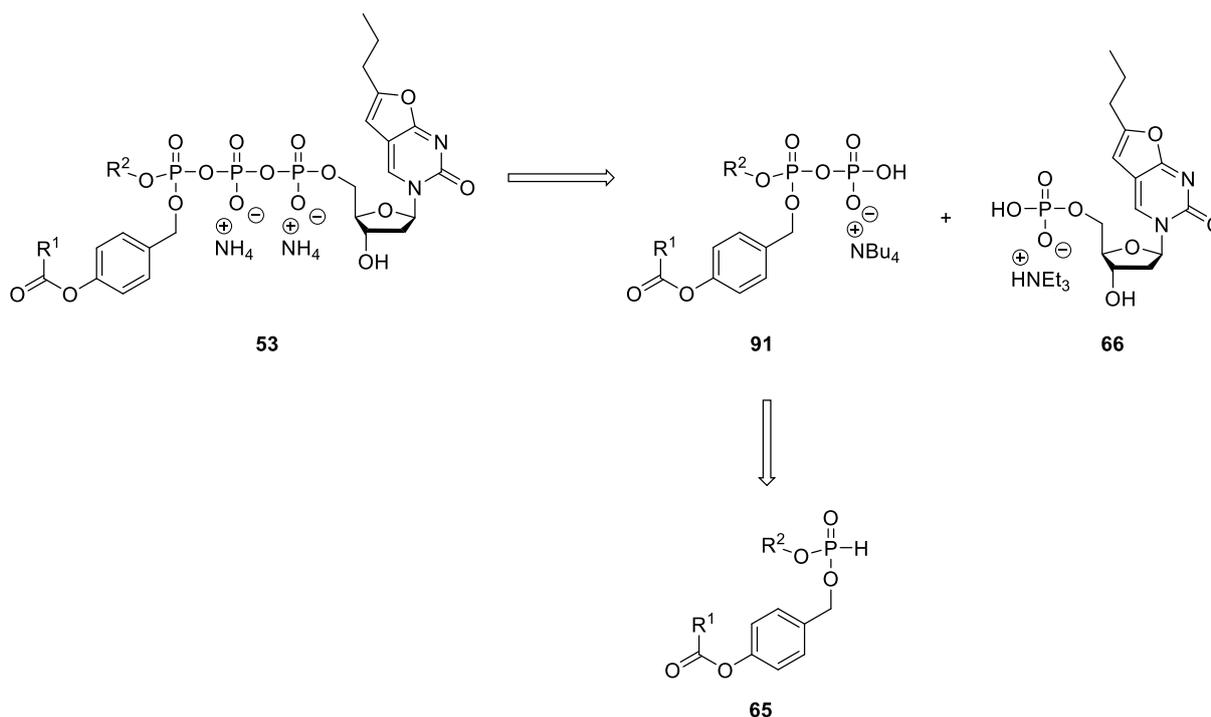


Abbildung 45: Retrosyntheschema der letzten beiden Syntheseschritte der TriPPPPro-Synthese.

Die Darstellung der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** erfolgte, indem das Monophosphat **66** mit einem Pyrophosphat **91** zur Reaktion gebracht wurde. Das Pyrophosphat **91** wurde zuvor aus dem entsprechenden *H*-Phosphonat **65** generiert. Die durchgeführten Reaktionsschritte des finalen Kopplungsschrittes sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

Die Synthese der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** wurde mit einer von GOLLNEST⁷¹ etablierten Syntheseroute durchgeführt. Dafür musste zunächst das *H*-Phosphonat **65** in das entsprechende Pyrophosphat **91** überführt werden (s. **Abbildung 46**).

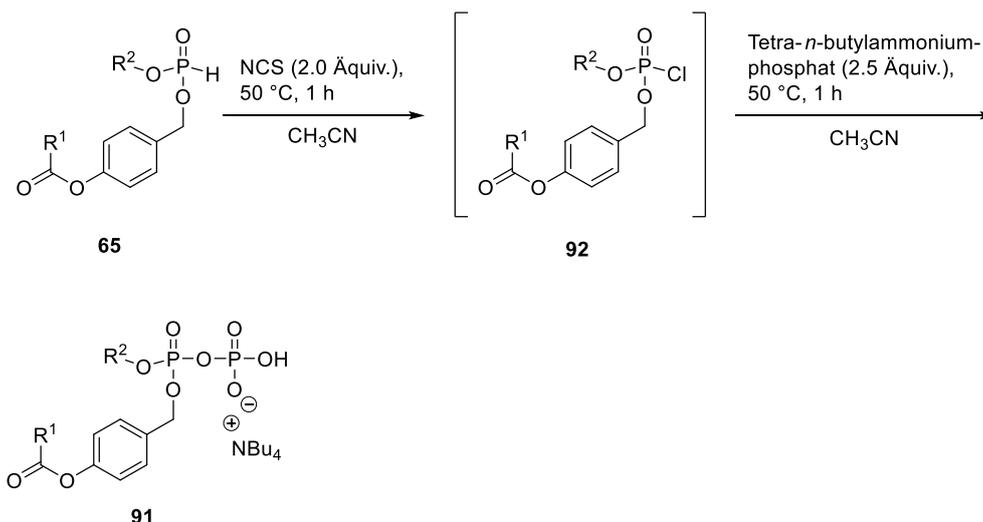


Abbildung 46: Umsetzung der *H*-Phosphonate **65** zu den Pyrophosphaten **91**.

Das *H*-Phosphonat **65** wurde zunächst eine Stunde mit *N*-Chlorsuccinimid in Acetonitril bei 50 °C gerührt, danach erfolgte die Zugabe von Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.40$ M in Acetonitril) sowie wiederum eine Stunde Rühren bei 50 °C. Im ersten Reaktionsschritt wurde durch eine oxidative Chlorierung mit NCS das Intermediat **92** gebildet. Diese Aktivierung ermöglichte im nächsten Schritt den nucleophilen Angriff des Tetra-*n*-butylammoniumphosphats, dabei wurden die Pyrophosphate **91** gebildet. Überschüssige Edukte bzw. Nebenprodukte, wie das Phosphatsalz, NCS oder Succinimid wurden im Anschluss durch wässrige Aufarbeitung entfernt. Bei der Aufarbeitung war es aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Pyrophosphate **91** notwendig, dass es zu einer zügigen Phasentrennung durch Zentrifugation kommt. Durch die Beschleunigung der Aufarbeitung aufgrund der Verwendung der Zentrifuge sollten Ausbeuteverluste vermieden werden. Aufgrund der Instabilität der Pyrophosphate **91** wurden sie ohne weitere Analysen und ohne lange Lagerung weiter umgesetzt. Die Synthesen der Pyrophosphate **91** gelangen in mittleren bis sehr guten Ausbeuten von 43%-97% (s. **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Darstellung der erreichten Ausbeuten der Pyrophosphatsynthesen **91**.

Verbindung	91az	91bz	91cz	91dz	91ez	91fz	91gz	91ay	91cy	91gy
R ¹	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇	C ₄ H ₉	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇
R ²	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃						
Ausbeute [%]	87	97	95	91	87	51	57	57	43	43

Die benötigte Aktivierung der *H*-Phosphonate **65** soll nun detaillierter betrachtet werden. Der Mechanismus der oxidativen Chlorierung der *H*-Phosphonate **65** ist in **Abbildung 47** dargestellt.

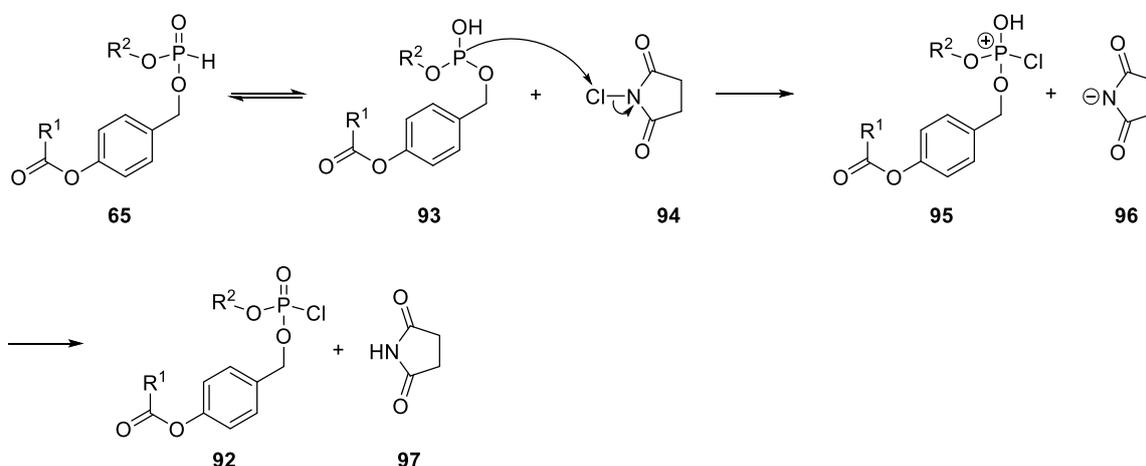


Abbildung 47: Mechanismus der oxidativen Chlorierung der *H*-Phosphonate **65** mit NCS (**94**).

H-Phosphonate **65** liegen im tautomeren Gleichgewicht mit den Phosphiten **93** vor. Das Gleichgewicht liegt dabei auf der Seite des stabileren *H*-Phosphonats **65**, allerdings können Solvatisierungseffekte das Gleichgewicht auf die Seite der Phosphite **93** verschieben. Durch das freie Elektronenpaar der Phosphite **93** erfolgt ein nucleophiler Angriff auf das positiv polarisierte Chloratom des NCS (**94**), wobei ein Phosphoniumion **95** und das deprotonierte Succinimid (**96**) gebildet werden. Durch eine anschließende Deprotonierung des Phosphoniumions **95** werden das Phosphorchloridat **92** und *N*-Succinimid (**97**) erhalten.^{71,113}

Die verwendete Syntheseroute für die Darstellung der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen soll nun näher betrachtet werden (s. **Abbildung 48**).

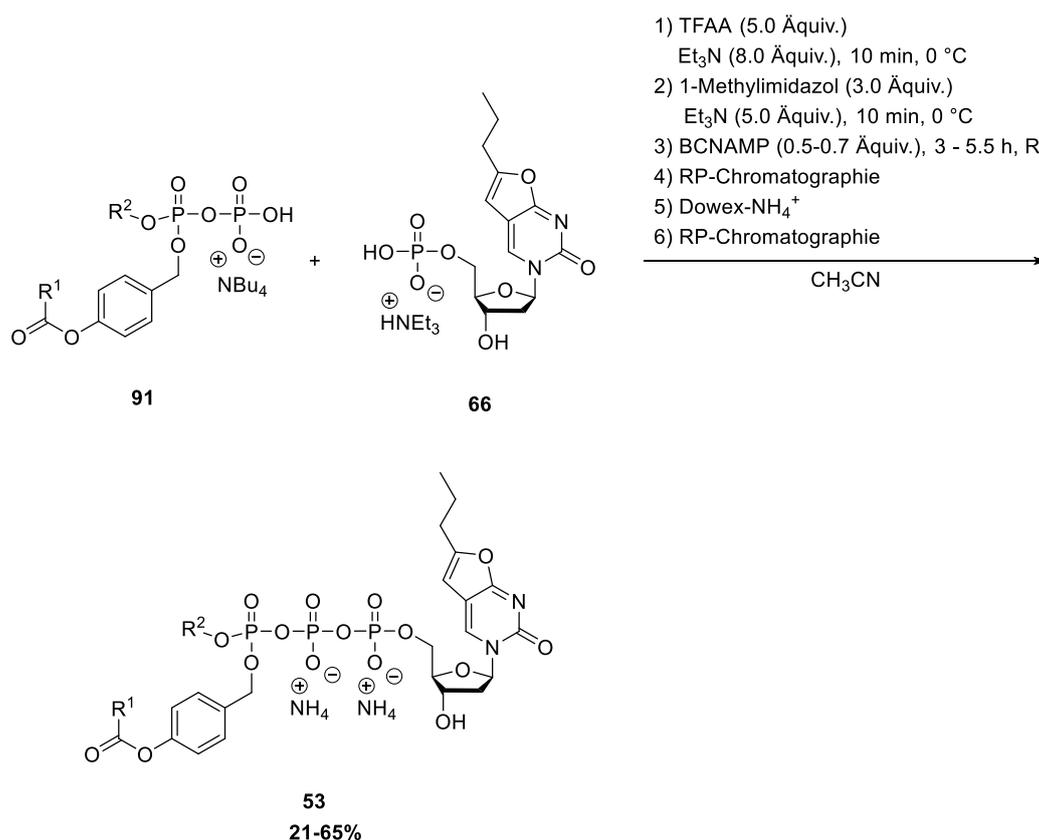


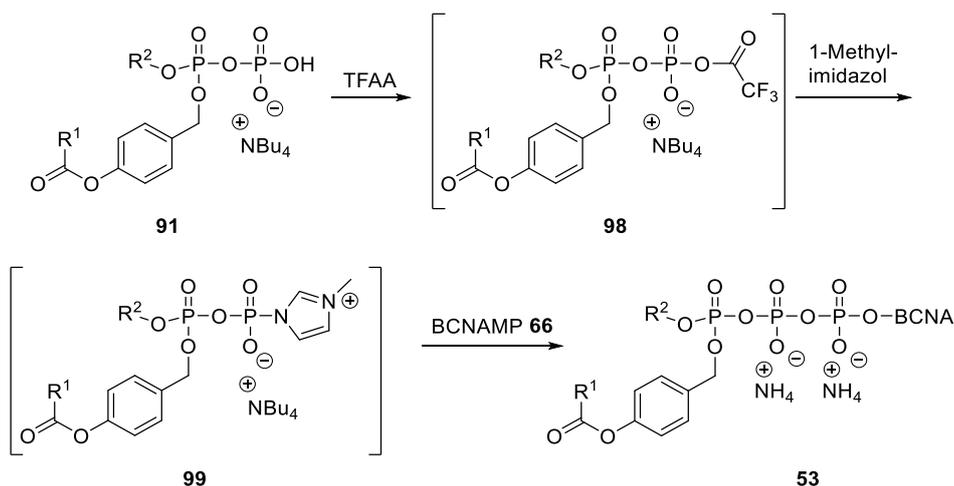
Abbildung 48: Kupplungsschritt der Pyrophosphate **91** mit dem BCNA-Monophosphat **66** zu den second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53**.

Die frisch hergestellten Pyrophosphate **91** wurden durch Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol aktiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphat als Triethylammoniumsalz (**66**). Die Reaktionsverfolgung mittels RP-HPLC ergab, dass nach 3-5.5 Stunden, je nach Kettenlänge des Pyrophosphats **91**, das Monophosphat als Unterschusskomponente komplett umgesetzt war. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer Reinigungssequenz bestehend aus automatisierter RP-Chromatographie, Dowex-Kationenaustauschersäule und erneuter RP-Chromatographie wurden die second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** in Ausbeuten von 21-65% erhalten (s. **Tabelle 4**).

Tabelle 4: Erreichte Ausbeuten der Synthesen der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53**.

BCNA-TriPPPPro	BCNA -01	BCNA -02	BCNA -03	BCNA -04	BCNA -05	BCNA -06	BCNA -07	BCNA -08	BCNA -09	BCNA -10
Verbindung	53az	53bz	53cz	53dz	53ez	53fz	53gz	53ay	53cy	53gy
R ¹	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇	C ₄ H ₉	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇
R ²	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃						
Ausbeute [%]	42	24	41	22	21	25	44	30	23	65

Die benötigte Aktivierung der Pyrophosphate **91** soll ebenfalls detaillierter betrachtet werden. Der Ablauf ist in **Abbildung 49** dargestellt.

**Abbildung 49:** Aktivierung der Pyrophosphate **91**.

Das Pyrophosphat **91** wird es durch Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid in das gemischte Anhydrid **98** überführt. Überschüssiges TFAA wird danach durch verminderten Druck entfernt. Im nächsten Reaktionsschritt wird das gemischte Anhydrid **98** durch Reaktion mit 1-Methylimidazol in das Imidazolidat **99** überführt. Dieser Reaktionsschritt führt zu einer Erhöhung der Elektrophilie des Phosphorzentrums. Der nucleophile Angriff des Nucleosidmonophosphats **66** wird dadurch begünstigt. Im finalen Schritt kommt es durch Zugabe des Nucleosidmonophosphats zur Kopplung der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindung **53**.

Zum Nachweis der erfolgreichen Darstellung der TriPPPPro-Verbindungen eignet sich die Betrachtung des ³¹P-NMR-Spektrums. Anhand des charakteristischen Verschiebungs- und Aufspaltungsmusters der TriPPPPro-Verbindungen kann daran zweifelsfrei deren erfolgreiche

Synthese gezeigt werden. An dieser Stelle soll stellvertretend für alle second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen das ^{31}P -NMR-Spektrum von BCNA-10 (**53gy**) betrachtet und damit dessen erfolgreiche Synthese nachgewiesen werden (s. **Abbildung 50**).

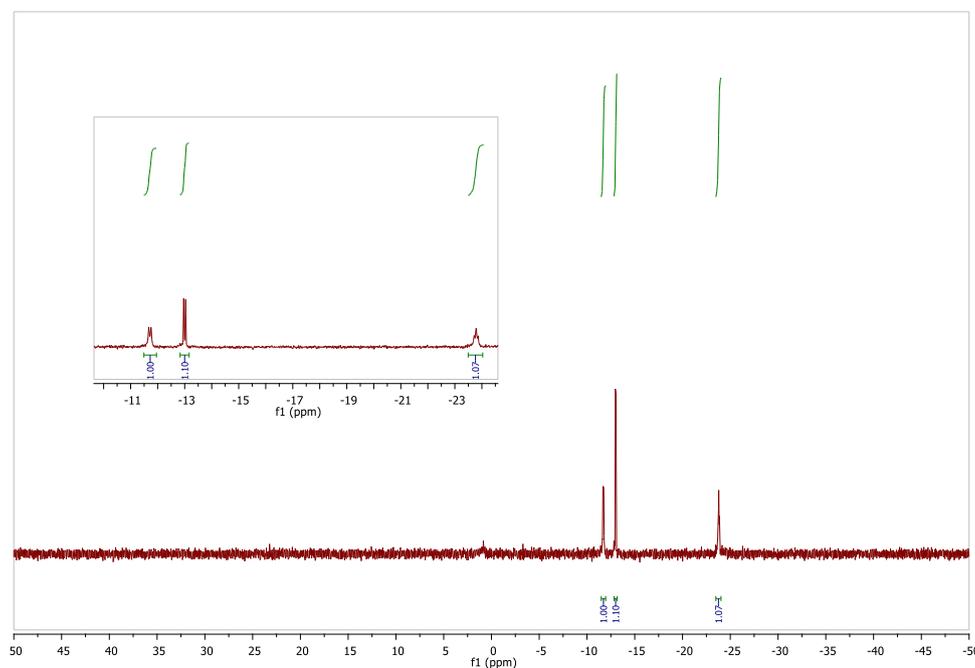


Abbildung 50: ^{31}P -Spektrum der BCNA-TriPPPro-Verbindung BCNA-10 (**53gy**).

In dem gezeigten ^{31}P -Spektrum von BCNA-10 (**53gy**) ist die charakteristische Aufspaltung der Phosphatgruppen gut zu erkennen. Die α -Phosphatgruppe liefert bei -11.71 ppm und die γ -Phosphatgruppe bei -13.00 ppm je ein Dublett, das Signal der β -Phosphatgruppe weist bei -23.79 ppm eine pseudo-Triplettstruktur auf. Dadurch kann die erfolgreiche Synthese der TriPPPro-Verbindung BCNA-10 (**53gy**) nachgewiesen werden.

6.1.4 Vergleich der Lipophilie der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Die dargestellten second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** besitzen aufgrund der unterschiedlichen Kettenlängen der Maskierungseinheiten und des Alkylsubstituenten unterschiedliche Lipophilien. Da die Lipophilie ein entscheidender Faktor für die Zellaufnahme ist, soll nun verglichen werden, wie groß der Unterschied bei den 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen ist. GOLLNEST⁷¹ und WITT¹¹⁴ haben festgestellt, dass zu lange Alkylketten in der Maskierungseinheit zu einer schlechteren Zellaufnahme führen, da die Verbindungen in der Zellmembran bleiben. Es muss allerdings ebenfalls ausreichend Lipophilie vorliegen, damit die Verbindungen die Zellmembran passieren können. Bei GOLLNEST⁷¹ war dies ab einer Kettenlänge von C₈H₁₇ der Fall. Die Lipophilie der zu untersuchenden 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** muss folglich in einem bestimmten Rahmen liegen. Der Vergleich erfolgt mittels HPLC-Analyse, da bereits während der Reaktionsverfolgungen eine kettenlängenabhängige Retentionszeit beobachtet werden konnte. Damit eine bessere Abschätzung möglich ist, ob die Lipophilien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen in einem für die Zellaufnahme geeigneten Bereich liegen, werden sie mit einer symmetrisch maskierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung mit C₁₀H₂₁-Maskierungseinheit **100** von JULIAN WITT¹¹⁴ verglichen (s. **Abbildung 51**). Diese Verbindung hat bereits eine sehr gute Eignung für die Aufnahme in Krebszellen gezeigt. Eine ähnliche Lipophilie der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen sollte also ebenfalls zu einer guten Aufnahme in die gleichen Zellen führen.

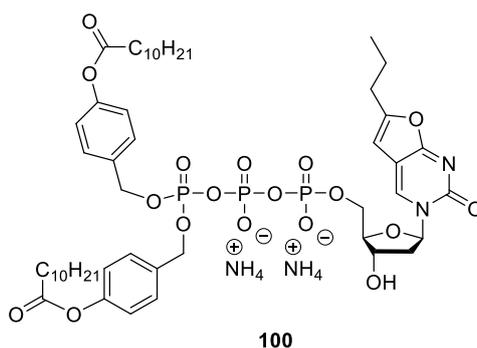


Abbildung 51: Von JULIAN WITT dargestellte, symmetrische 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung **100**, die beim Lipophilievergleich als Referenz verwendet wird.

In **Abbildung 52** ist der Vergleich der Lipophilien der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit C₁₈H₃₇-Alkylrest (BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**)) dargestellt. Es wird nur der Bereich zwischen 15 und 25 Minuten abgebildet, da in diesem Zeitabschnitt die Retentionszeiten der untersuchten Verbindungen liegen. Durch die Fokussierung auf diesen

Bereich können die einzelnen Peaks basisliniengetrennt dargestellt werden. Außerhalb des betrachteten Abschnittes waren keine weiteren Peaks vorhanden.

Lipophilievergleich $C_{18}H_{37}$ -Alkylsubstituent

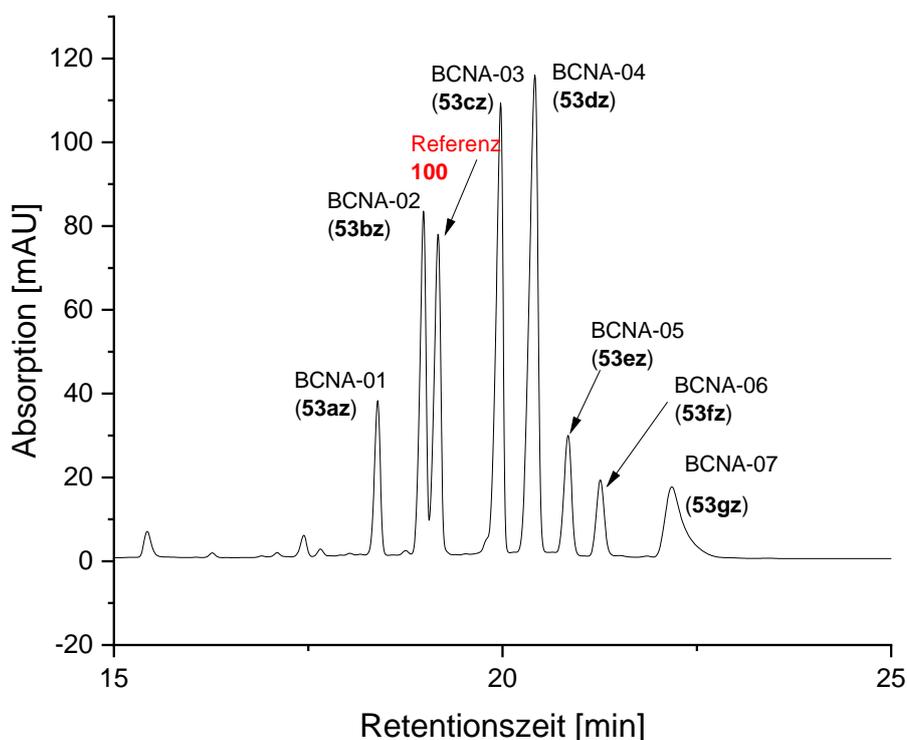


Abbildung 52: Vergleich der Lipophilien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit $C_{18}H_{37}$ -Alkylrest (BCNA-01 (53az) - BCNA-07 (53gz)).

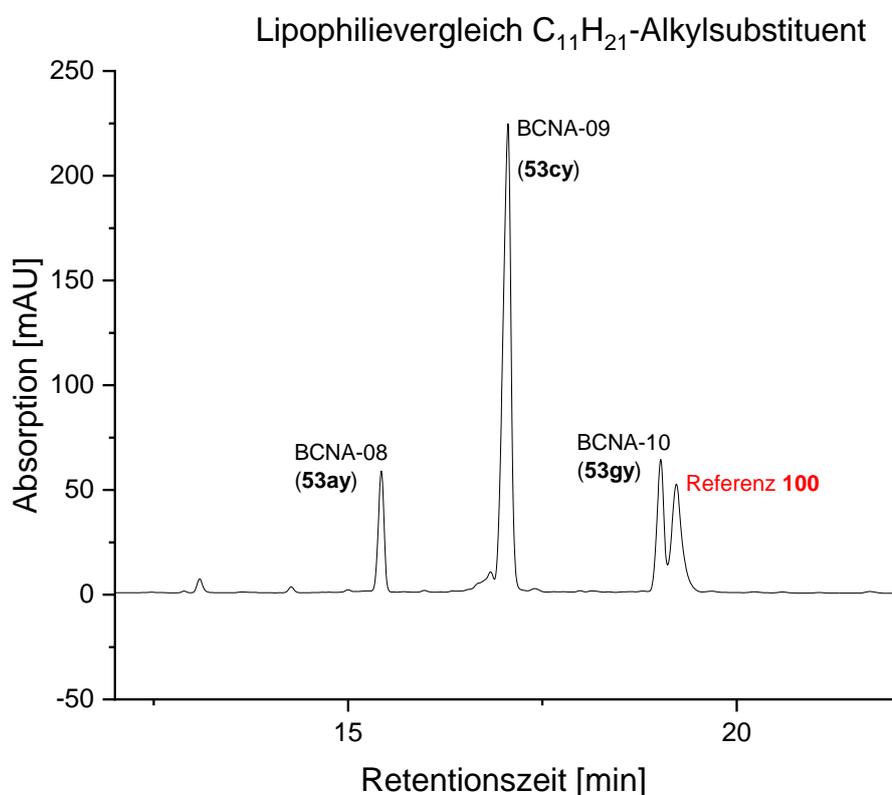
Die unterschiedlichen Peakhöhen sind dadurch entstanden, dass 1 mg/mL-Stammlösungen verwendet wurden und deswegen die verschiedenen Stoffmengen zu unterschiedlichen Peakflächen führten. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Retentionszeit der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen BCNA-01 (53az) - BCNA-07 (53gz) in Abhängigkeit der steigenden Kettenlänge der Maskierungseinheit zunimmt. Von den hier dargestellten BCNA-TriPPPPro-Verbindungen besitzt BCNA-02 (53bz) eine sehr ähnliche Retentionszeit wie die Referenzverbindung 100, folglich sollte diese Verbindung am besten in die Zelle aufgenommen werden (im Vergleich mit den anderen TriPPPPro-Verbindungen mit $C_{18}H_{37}$ -Alkylsubstituent).

In **Tabelle 5** sind die erhaltenen Retentionszeiten dargestellt. Sowohl in **Abbildung 52** als auch in **Tabelle 5** ist eindeutig zu erkennen, dass die Retentionszeiten zum Teil sehr ähnliche Werte aufweisen. Für eine bessere Übersicht der hergestellten Verbindungen werden die verwendeten Alkylreste ebenfalls angegeben.

Tabelle 5: Erhaltene Retentionszeiten der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit C₁₈H₃₇-Alkylsubstituent.

TriPPPPro-Verbindung	BCNA-01	BCNA-02	BCNA-03	BCNA-04	BCNA-05	BCNA-06	BCNA-07	Ref.
Verbindung	53az	53bz	53cz	53dz	53ez	53fz	53gz	100
Maske	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇	C ₁₀ H ₂₁
Alkylrest	C ₁₈ H ₃₇	-						
Retentionszeit [min]	18.393	18.984	19.975	20.416	20.843	21.258	22.178	19.171

Auch die 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit C₁₁H₂₁-Alkylsubstituent (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)) wurden hinsichtlich ihrer Lipophilie mit der Referenzsubstanz **100** von JULIAN WITT verglichen (s. **Abbildung 53**). Von dem erhaltenen Chromatogramm wird aus den oben genannten Gründen nur der wichtige Teil (12-22 Minuten) gezeigt, damit eine genauere Darstellung der Peaks möglich ist. Aufgrund des kürzeren Alkylsubstituenten sind die Retentionszeiten geringer und der betrachtete Zeitabschnitt ist nach vorne verschoben.

**Abbildung 53:** Darstellung der erhaltenen Retentionszeiten der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit C₁₁H₂₁-Alkylsubstituent (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)).

Der Vergleich der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**) mit der Referenzsubstanz **100** zeigt, dass BCNA-10 (**53gy**) eine sehr ähnliche Retentionszeit besitzt. Die beiden anderen Verbindungen eluieren deutlich früher, sie sind folglich weniger lipophil als die Referenzverbindung. Für BCNA-10 (**53gy**) kann somit eine für die Zellaufnahme optimal geeignete Lipophilie angenommen werden.

In **Tabelle 6** ist eine Übersicht der erhaltenen Retentionszeiten der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit C₁₁H₂₃-Alkylsubstituent (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)) abgebildet. Für eine bessere Übersicht der hergestellten Verbindungen werden die verwendeten Alkylreste ebenfalls angegeben.

Tabelle 6: Erhaltene Retentionszeiten der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit C₁₁H₂₃-Alkylsubstituent.

TriPPPPro-Verbindung	BCNA-08	BCNA-09	BCNA-10	Referenz
Verbindung	53ay	53cy	53gy	100
Maske	C ₄ H ₉	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇	C ₁₀ H ₂₁
Alkylrest	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	-
Retentionszeit [min]	15.428	17.023	19.023	19.223

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse des Lipophilievergleichs kann angenommen werden, dass mit BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-10 (**53gy**) die beste Zellaufnahme möglich sein sollte.

6.1.5 Synthese der γ -alkylierten BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Bei den Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen sollte untersucht werden, ob γ -alkylierte 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** ebenfalls die Zellmembran passieren können. Dafür sollten zwei verschiedene γ -alkylierte 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54**, eine mit C₁₈H₃₇- **54z** und eine mit C₁₁H₂₃-Alkylrest **54y**, dargestellt werden. Die Synthese dieser Verbindungen beruht auf der bewährten und in dieser Arbeit bereits verwendeten *H*-Phosphonatroute nach GOLLNEST⁷¹, die von ZHAO⁷⁶ für die Synthese γ -alkylierter TriPPPro-Verbindungen modifiziert wurde (s. **Abbildung 54**).

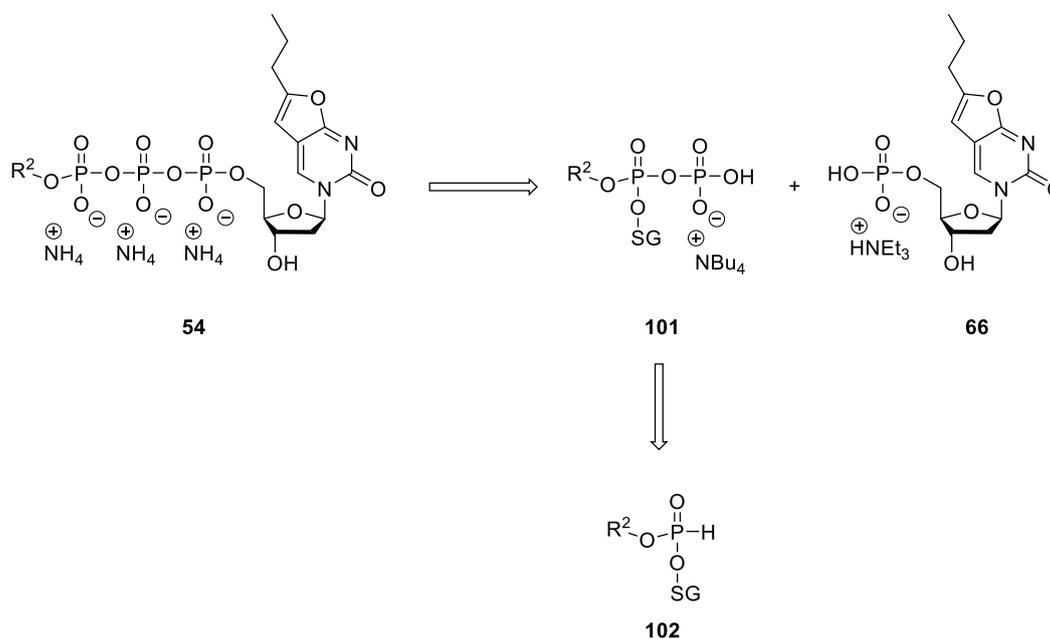


Abbildung 54: Retrosyntheschema der Synthese der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54**.

Die γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** sollten ebenfalls über die *H*-Phosphonatroute dargestellt werden, da damit bisher gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Im finalen Schritt sollte das Monophosphat **66** mit den Pyrophosphaten **101**, welche den Alkylrest und eine biospaltbare Gruppe enthalten, gekoppelt werden. Nach der erfolgreichen Kopplung sollte die Schutzgruppe abgespalten werden, dabei wurde die γ -alkylierte 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung **54** erhalten. Die Pyrophosphate **101** sollten zuvor aus den *H*-Phosphonaten **102** synthetisiert werden.

Für die Synthese der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** wurde eine Route von ZHAO⁷⁶ verwendet. Bei der spaltbaren Gruppe handelt es sich um 9-Fluorenylmethanol. Das Syntheschema dieser Route ist in **Abbildung 55** gezeigt.

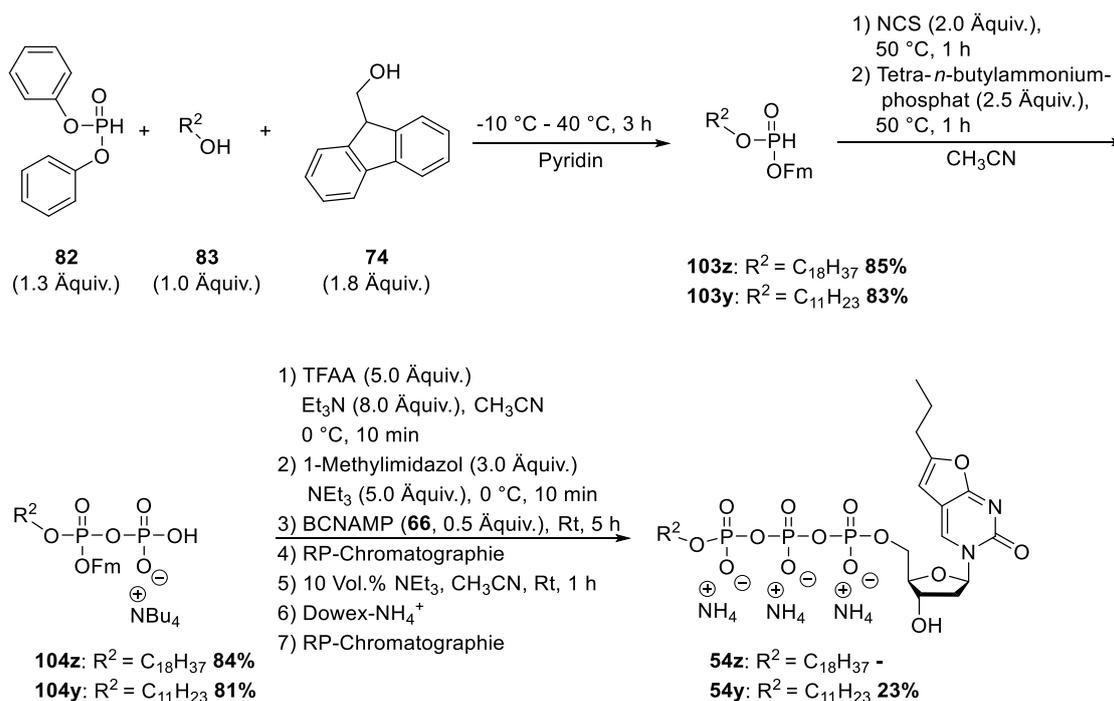


Abbildung 55: Synthese der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** via Fm-Schutzgruppenstrategie nach ZHAO⁷⁶.

Die benötigten *H*-Phosphonate **103** sollten über die gleiche Route dargestellt werden wie die *H*-Phosphonate in **Kapitel 6.1.2**, da dieser Syntheseweg bereits erfolgreich verwendet werden konnte. Für die Synthese der *H*-Phosphonate **103** wurde zu einer auf -10 °C gekühlten Lösung aus DPP (**82**) und Pyridin nacheinander der Alkohol **83** und 9-Fluorenylmethanol (**74**) gegeben. Durch die stufenweise Zugabe bei niedrigen Temperaturen sollte eine Mehrfachsubstitution eines der Reaktionspartner verhindert werden. Die Reaktionslösung wurde für die vollständige Umsetzung anschließend drei Stunden bei 40 °C gerührt. Beide *H*-Phosphonate **103** konnten in guten Ausbeuten von 85% bzw. 83% erhalten werden. Anschließend erfolgte die Umsetzung der *H*-Phosphonate **103** zu den entsprechenden Pyrophosphaten **104**. Durch oxidative Aktivierung mit NCS und anschließender Reaktion mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat wurden die *H*-Phosphonate **103** in die Pyrophosphate **104** überführt. Diese Reaktionen konnten in guten Ausbeuten von 81% und 84% durchgeführt werden. Die Pyrophosphate **104** wurden sofort für die TriPPPro-Synthese verwendet. Nach der Aktivierung durch TFAA und Reaktion mit 1-Methylimidazol zur Erhöhung der Elektrophilie, wurde das Monophosphat **66** zu der Reaktionsmischung gegeben und bei Raumtemperatur in Acetonitril gerührt. Durch eine Reaktionsverfolgung per RP-HPLC konnte festgestellt werden, dass bei der Synthese der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung **54y** nach fünf Stunden das Monophosphat verbraucht war. Bei dem Chromatogramm der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung **54z** konnte kein Umsatz des Monophosphates **66** festgestellt werden. Damit Fehler bei der Synthese oder bereits zersetzte Edukte ausgeschlossen werden konnten, wurde diese Reaktion wiederholt, doch auch bei der Wiederholung kam es nicht zur

Bildung der TriPPPro-Verbindung **54z**. Das Pyrophosphat mit der Fm-Schutzgruppe und dem C₁₈H₃₇-Alkylrest ist offensichtlich sterisch zu anspruchsvoll, um eine erfolgreiche Darstellung der TriPPPro-Verbindung **54z** zu ermöglichen.

Durch die Verwendung der Fm-Schutzgruppe war es nicht möglich beide γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** darzustellen. Es sollte nun durch einen Tausch der Schutzgruppe eine Syntheseroute gefunden werden, mit der beide Verbindungen verlässlich synthetisiert werden konnten. Dafür wurde 3-Hydroxypropionitril als Schutzgruppe gewählt (s. **Abbildung 56**). Diese Schutzgruppe wurde ebenfalls bereits von ZHAO⁷⁶ erfolgreich für die Synthese γ -alkylierter TriPPPro-Verbindungen verwendet.

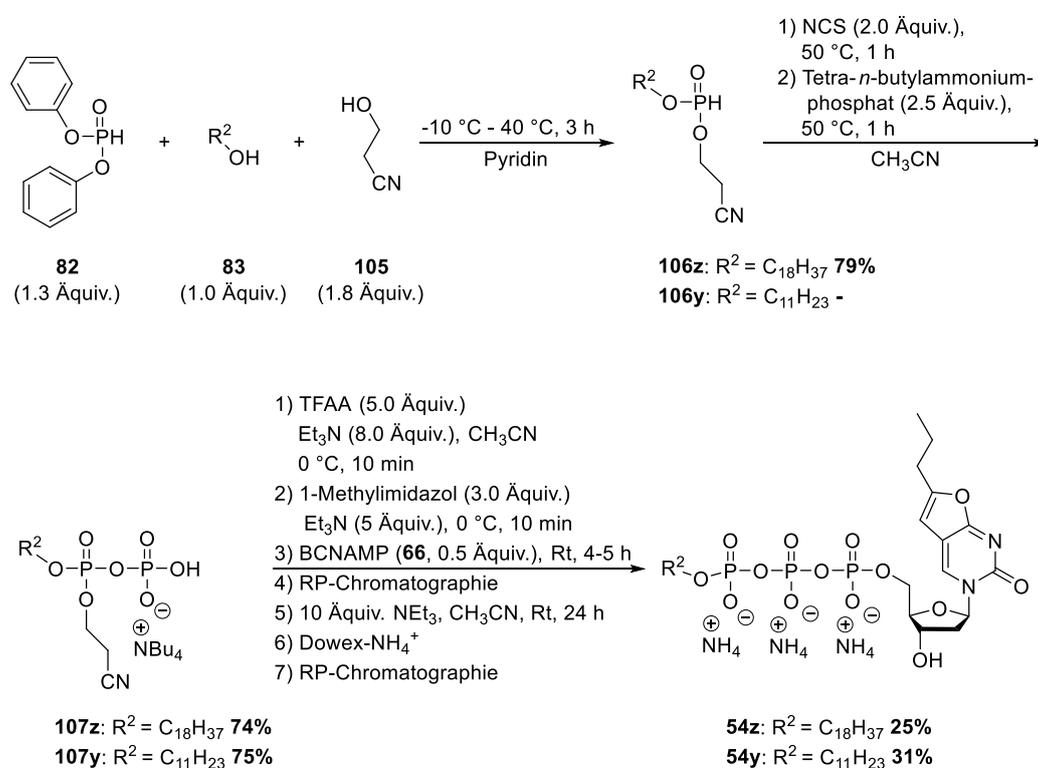


Abbildung 56: Synthese der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** via 3-Hydroxypropionitrilschutzgruppenstrategie.

Die Synthese der *H*-Phosphonate **106** wurde mit der in **Kapitel 6.1.2** beschriebenen Methode betrieben. DPP (**82**) wurde in Pyridin gelöst und bei -10 °C stufenweise mit 3-Hydroxypropionitril (**105**) und dem Alkohol **83** versetzt. Eine vollständige Umsetzung wurde durch 3-stündiges Erhitzen auf 40 °C erreicht. Das *H*-Phosphonat **106z** konnte in einer guten Ausbeute von 79% erhalten werden. Das *H*-Phosphonat **106y** wurde von VANESSA MEYEN und MATTHIAS WINKLER zur Verfügung gestellt, weswegen auf eine eigene Synthese in dieser Arbeit verzichtet werden konnte. Anschließend wurden beide *H*-Phosphonate **106** durch Reaktion mit NCS und Tetra-*n*-butylammoniumphosphat in die entsprechenden Pyrophosphate **107**

überführt. Die Pyrophosphate **107** konnten in Ausbeuten von 74% bzw. 75% erhalten werden. Die Umsetzung zur γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung **54** erfolgte über die bereits in **Kapitel 6.1.3** vorgestellte Reaktionssequenz durch Umsetzung mit TFAA, 1-Methylimidazol und anschließender Zugabe des BCNA-Monophosphats **66**. Mittels RP-HPLC konnte der Endpunkt der Reaktion nach vier bzw. fünf Stunden festgestellt werden. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend erfolgte eine erste automatisierte RP-Chromatographie zur Abtrennung von nicht umgesetzten Edukten oder entstandenen Nebenprodukten. Im nächsten Schritt sollte die Schutzgruppe entfernt werden. Dafür musste die Vorschrift von ZHAO angepasst werden, da damit eine Zersetzung der TriPPPro-Verbindung beobachtet wurde. Eine Übersicht der durchgeführten Entschützungen ist in **Tabelle 7** dargestellt.

Tabelle 7: Entschützungsversuche zur Herstellung der γ -alkylierten BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54**.

Lösungsmittel	Base	Menge der Base	Reaktionszeit	Ergebnis
Acetonitril	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumhydroxid (10% in H ₂ O)	10 Vol.%	24 h	Kein Umsatz
		dann 40 Vol.%	5 d	Zersetzung
Acetonitril	Triethylamin	10 Vol.%	24 h	Kein Umsatz
	DBU	10 Vol.%	24 h	Kein Umsatz
Acetonitril	Triethylamin	10 Äquiv.	2-3 d	Entfernung der Schutzgruppe

Die Entschützungen wurden zunächst an Aliquoten der hergestellten geschützten BCNA-TriPPPro-Verbindung **54** getestet, damit bei Fehlversuchen nicht das komplette Produkt verloren geht. Alle Reaktionen wurden via RP-HPLC verfolgt, damit sollte der Endpunkt der Entschätzung ermittelt werden. Im ersten Entschätzungsversuch wurde analog zu der Methode nach ZHAO⁷⁶ vorgegangen. Ein Aliquot von 50 mg wurde in Acetonitril gelöst und mit 10 Vol.% Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (10% in Wasser) versetzt. Nach 24 Stunden konnte noch kein Umsatz beobachtet werden, deswegen wurde die Konzentration der Base auf 40 Vol.% erhöht. Dadurch konnte nach fünf Tagen die vollständige Zersetzung und nicht die Bildung des Produktes beobachtet werden. Im nächsten Versuch wurde eine schwächere Base verwendet, um damit die Zersetzung des Produktes zu verhindern. Zu der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung in Acetonitril wurden 10 Vol.% Triethylamin zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit konnte kein Umsatz beobachtet werden, deswegen sollte der Basenanteil in der Reaktionsmischung erhöht werden. Bei Triethylamin handelt es sich um eine nucleophile Base, eine zu hohe Konzentration könnte also erneut zur Zersetzung führen. Um dies zu verhindern, sollte eine nicht nucleophile Base

verwendet werden, deswegen wurde als zweite Basenkomponente DBU gewählt. Bei DBU handelt es sich aufgrund der Größe um eine nicht nucleophile Base. Die Gefahr der Produktzersetzung sollte folglich vermieden werden. Es erfolgte die Zugabe von 10 Vol.% DBU zur Reaktionslösung. Nach weiteren 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur konnte durch RP-HPLC-Reaktionsverfolgung keine Abspaltung der Schutzgruppe beobachtet werden. Diese Methode wurde daraufhin verworfen. Beim zweiten Versuch war die eingesetzte Basenmenge zu gering, deswegen sollte für den nächsten Versuch das Produkt mit zehn Äquivalenten Triethylamin versetzt werden. Es wurde ein weiteres Aliquot der geschützten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung in Acetonitril gelöst und anschließend mit Triethylamin (10 Äquiv.) versetzt. Mittels RP-HPLC konnte bei diesem Versuch festgestellt werden, dass es zur Spaltung der Schutzgruppe kommt. Nach zwei bzw. drei Tagen war die Schutzgruppe abgespalten und die γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** wurden freigesetzt. Es folgte der Ionentausch auf Ammoniumionen mit einer Kationenaustauschersäule und eine erneute automatisierte Säulenchromatographie. Die beiden γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **54** konnten in Ausbeuten von 25% bzw. 31% erhalten werden.

6.1.6 Tri- und Diphosphat des bicyclischen Nucleosidanalogons

In diesem Kapitel soll auf die Synthesen von Tri- und Diphosphat des 2'-Desoxy-BCNAs eingegangen werden. Beide Verbindungen sollen in Stabilitätsuntersuchungen analysiert werden, damit eine verlässliche Aussage über den Einfluss von Tri- und Diphosphat auf die Produktbildung bei der Hydrolyse und dem intrazellulären Abbau der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** getroffen werden kann.

6.1.6.1 Synthese des BCNA-Triphosphats

Für die Synthese von Nucleosidtriphosphaten existiert noch keine Methode, die für alle Nucleoside und deren Analoga gleich zufriedenstellende Resultate liefert. Aufgrund einiger Faktoren sind die Synthese, Isolierung, Charakterisierung und Lagerung der Triphosphate nicht einfach. So sind bei der Herstellung Kombinationen aus Ionenpaarverbindungen mit lipophilen Reagenzien notwendig, beispielsweise bei der Reaktion des Pyrophosphats mit dem geschützten Nucleosid. Die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels wird dadurch erschwert. Auch die Reinigung stellt einige Anforderungen, da sowohl lipophile als auch hydrophile Verbindungen abgetrennt werden müssen. Hinzu kommt, dass die Nucleosidtriphosphate nicht sonderlich robust sind und es sowohl im sauren als auch im basischen Medium zu deren

Hydrolyse kommen kann. Die Stabilität der Triphosphate lässt sich durch die Wahl des Gegenions beeinflussen, so tragen Trialkylammoniumionen zu einer höheren Stabilität bei.¹¹⁵

Eine gebräuchliche und weit verbreitete Methode der Triphosphatsynthese ist die Reaktion des Pyrophosphats mit einem aktivierten Nucleosidmonophosphat (s. **Abbildung 57**).¹¹⁵

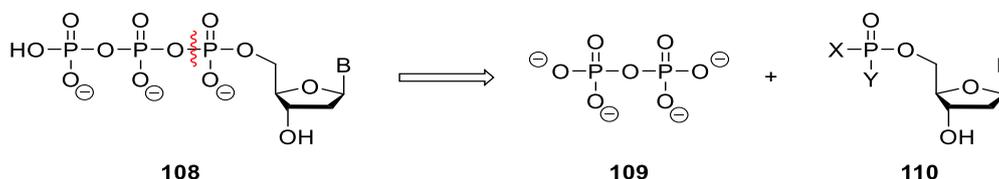


Abbildung 57: Retrosynthetische Darstellung der Triphosphatsynthese.¹¹⁵

Das eingesetzte Pyrophosphat **109** kann oft kommerziell erworben werden, das aktivierte Nucleosidmonophosphat **110** muss dagegen synthetisch dargestellt werden.¹¹⁵ Als aktiviertes Monophosphat **110** eignet sich ein Phosphordichloridat, welches bei der Umsetzung des ungeschützten Nucleosids mit Phosphorylchlorid nach der Methode von YOSHIKAWA entsteht.^{115,116}

Die YOSHIKAWA-REAKTION ist eine weit verbreitete Methode um selektiv 5'-Nucleosidmonophosphate darzustellen.¹¹⁵⁻¹²¹ Bei Verwendung dieser Syntheseroute kann eine aufwendige Schutzgruppenstrategie umgangen werden.¹¹⁷ Bei der Methode nach YOSHIKAWA handelt es sich um eine direkte Phosphorylierung von ungeschützten Nucleosiden mit Phosphorylchlorid zum entsprechenden 5'-Nucleosidmonophosphat. YOSHIKAWAS Studien ergaben, dass die Zugabe einer definierten Menge Wasser zum Phosphorylierungsreagenz Phosphorylchlorid die Ausbeute des 5'-Monophosphats erhöht. Durch die Bildung von HCl werden die Hydroxylgruppen in 2'- und 3'-Position protoniert, wodurch Nebenreaktionen verhindert werden.^{115,121} Wird ein Trialkylphosphat als Lösungsmittel verwendet, so kann die Reaktionszeit deutlich verkürzt werden. Die Gründe dafür sind zum einen die bessere Löslichkeit der Reaktionspartner sowie die Bildung des aktiven Reagenzes **113** durch Interaktionen des Lösungsmittels **112** mit Phosphorylchlorid **111** (s. **Abbildung 58**).^{115,121}

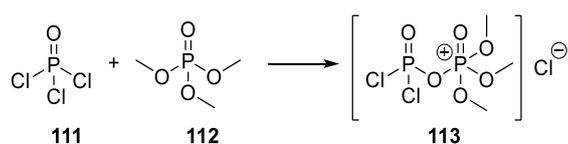


Abbildung 58: Bildung der aktiven Spezies **113** aus POCl₃ (**111**) und Trimethylphosphat (TMP, **112**).¹¹⁵

Durch spätere Arbeiten konnte herausgefunden werden, dass die Zugabe von Wasser und das dadurch saure Reaktionsmedium bei säurelabilen Nucleosiden zur Spaltung der *N*-glykosidischen-Bindung führen kann.¹¹⁵ Durch die Zugabe von Protonenschwamm und Arbeiten im wasserfreien Medium können auch säureempfindliche Nucleoside durch Anwendung der YOSHIKAWA-REAKTION selektiv zum 5'-Monophosphat umgesetzt werden. Bei Protonenschwamm (1,8-Bis(dimethylamino)naphthalen) handelt es sich um eine große, sperrige Base mit geringer Nucleophilie, weswegen die Deprotonierung in der 5'-Position erfolgt.^{117,118,120} Das gebildete Phosphordichloridat wird anschließend zum Monophosphat hydrolysiert.¹²² Zwei Faktoren sind bei der Methode nach YOSHIKAWA allerdings unerlässlich, zum Einen muss die Reaktionstemperatur niedrig gehalten werden und zum Anderen die Verwendung von Trimethylphosphat (TMP, **112**) als Lösungsmittel.¹¹⁷

In **Abbildung 59** ist der Mechanismus der Phosphorylierungsreaktion zum BCNA-5'-Monophosphat **66** gezeigt.

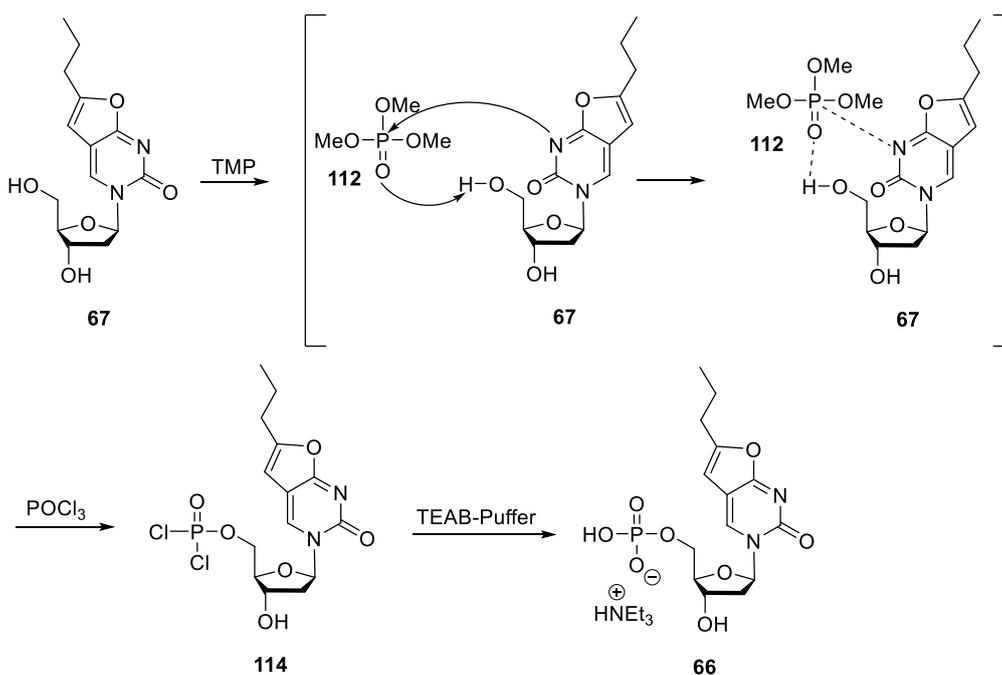


Abbildung 59: Vorgeschlagener Mechanismus der Phosphorylierung von Nucleosiden zum 5'-Monophosphat in TMP (hier am Beispiel der BCNA-Monophosphatsynthese gezeigt).^{123–125}

Durch die Verwendung von Trimethylphosphat (**112**) als Lösungsmittel wird die Phosphorylierung in die 5'-Position dirigiert. TMP (**112**) kann durch sein LEWIS-basisches Sauerstoffatom Wasserstoffbrückenbindungen mit den Protonen der Hydroxylgruppe in 5'-Position des BCNAs **67** ausbilden, dadurch wird dessen nucleophile Reaktivität erhöht. Gleichzeitig wird durch eine stabilisierend wirkende Interaktion des Stickstoffatoms der Nucleobase und dem Phosphoratom von TMP eine räumliche Nähe zur 5'-OH-Gruppe des BCNAs **67**

hergestellt, dadurch erfolgt eine selektive Aktivierung an dieser Position. Im nächsten Schritt wurde durch einen Angriff auf das elektrophile Phosphorylchlorid ein reaktives Phosphordichloratintermediat **114** gebildet, diese Zwischenstufe wird durch Zugabe von wässrigem TEAB-Puffer zum Monophosphat **66** hydrolysiert.^{123–125}

LUDWIG *et al.* fanden heraus, dass sich das Phosphordichloridat durch Zugabe eines Tributylammoniumpyrophosphatsalzes in das Nucleosidtriphosphat überführen lässt (s. **Abbildung 60**).^{115,116}

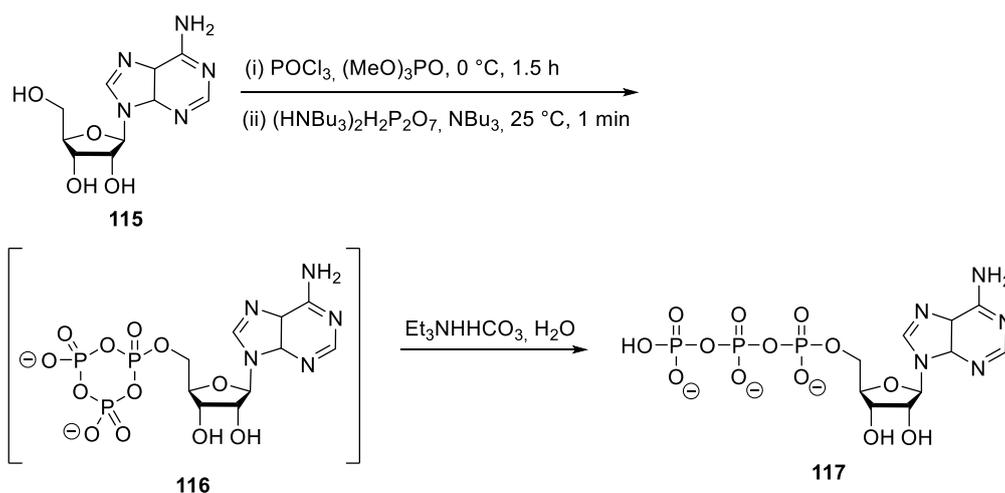


Abbildung 60: Darstellung der Triphosphatsynthese nach LUDWIG *et al.*^{115,116}

LUDWIG *et al.* verwendeten die Methode nach YOSHIKAWA für die Synthese des Phosphordichloridats, fügten allerdings kein Wasser beim ersten Schritt der Reaktion hinzu. Anschließend überführten sie das Phosphordichloridat durch eine Umsetzung mit einem Pyrophosphatsalz in das Nucleosidtriphosphat **117**. Durch Zugabe einer Aminbase zum zweiten Reaktionsschritt konnte die Ausbeute erhöht werden. Durch anschließende Hydrolyse konnte aus dem intermediär gebildeten Trimetaphosphat **116** das Nucleosidtriphosphat **117** erhalten werden.^{115,116} Durch die nicht perfekte Phosphorylierung im ersten Schritt kann es zu Verunreinigungen durch Mehrfachphosphorylierungen kommen.¹¹⁵

Für die Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphats **60** sollte ebenfalls die YOSHIKAWA-METHODE für die Reaktion des Phosphordichloridats verwendet werden und anschließend sollte nach LUDWIG *et al.* durch eine Umsetzung mit einem Pyrophosphatsalz das BCNA-Triphosphat **60** zugänglich gemacht werden (s. **Abbildung 61**).^{115,116,119} Diese Reaktionsfolge konnte von GANTER bereits erfolgreich für die Synthese einiger Triphosphate verwendet werden.¹²⁶

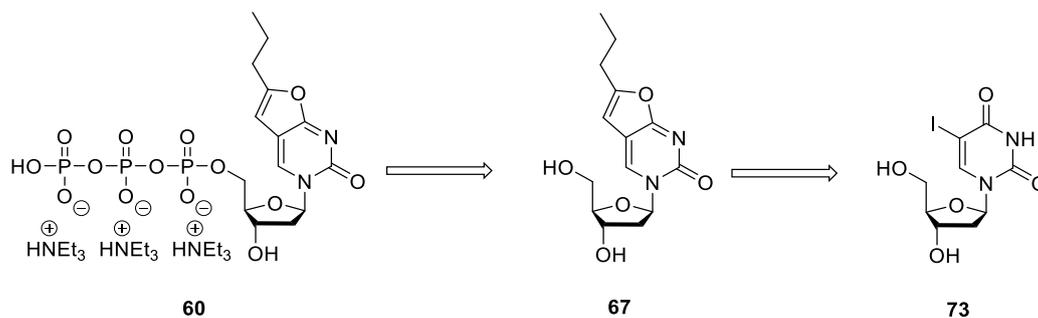


Abbildung 61: Retrosyntheseschema der BCNA-Triphosphatsynthese.

Die Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphats **60** sollte ausgehend vom BCNA **67** über eine YOSHIKAWA-REAKTION mit anschließender Umsetzung mit einem Pyrophosphat erfolgen, dadurch sollte das Triphosphat **60** zugänglich gemacht werden. Das 2'-Desoxy-BCNA **67** sollte durch eine Sonogashira-Kupplung mit anschließendem Ringschluss ausgehend vom 5-Ioddesoxyuridin (**73**) erhalten werden.

Da für diese Syntheseroute eine Schutzgruppe an der 3'-Hydroxylgruppe nicht zwingend erforderlich war, sollte darauf verzichtet werden, da dadurch der synthetische Aufwand reduziert werden konnte. Der erste Schritt dieser Syntheseroute war die Darstellung des BCNAs **67** (s. **Abbildung 62**).

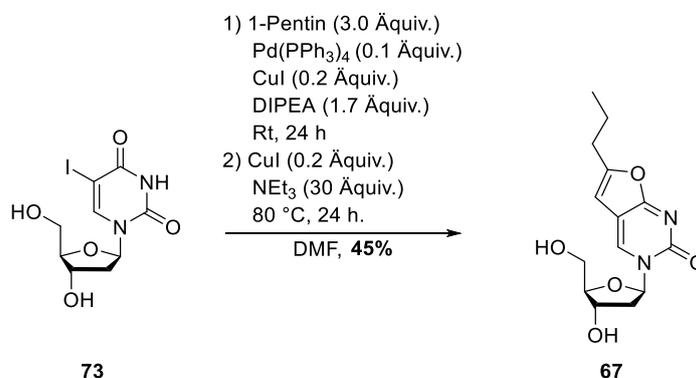


Abbildung 62: Synthese des ungeschützten BCNAs **67**.

Ausgehend vom 5-Iod-2'-desoxyuridin (**73**) wurde in einer *one-pot*-Reaktion, bestehend aus der SONOGASHIRA-KUPPLUNG und dem Ringschluss, das BCNA **67** dargestellt. Für die SONOGASHIRA-KUPPLUNG wurde 5-Iod-2'-desoxyuridin (**73**) in DMF mit 1-Pentin, Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator, Kupfer(I)iodid als Cokatalysator und *N,N*-Diisopropylethylamin 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Für die Cyclisierung wurde Kupfer(I)iodid und Triethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung 24 Stunden auf 80 °C erhitzt. Das 2'-Desoxy-BCNA **67** konnte nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 45% erhalten werden.

Das 2'-Desoxy-BCNA **67** sollte nun in einer YOSHIKAWA-REAKTION mit anschließender Umsetzung mit einem Pyrophosphat in das 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphat **60** überführt werden (s. **Abbildung 63**).^{115,116,119}

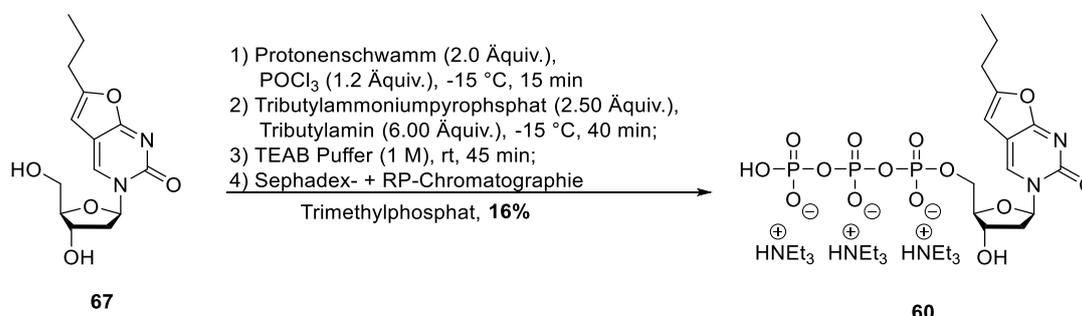


Abbildung 63: Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphats **60**.

Für die Darstellung des 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphats **60** wurde zunächst das BCNA **67** zusammen mit Protonenschwamm im Vakuum getrocknet. Durch die Trocknung sollten Reste von Luftfeuchtigkeit entfernt werden, da es sonst zur Zersetzung von Phosphorylchlorid kommen konnte. Anschließend wurden die beiden Substanzen in Trimethylphosphat gelöst und bei -15 °C mit Phosphorylchlorid versetzt. Durch die tiefe Temperatur sollte verhindert werden, dass es zu Mehrfachsubstitutionen kommt. Bei diesem Reaktionsschritt wurde das Phosphordichloridat gebildet. Durch Zugabe von Tributylammoniumpyrophosphat und Tributylamin wurde das Phosphordichloridat in das Triphosphat überführt. Der Endpunkt der Reaktion wurde durch RP-HPLC-Kontrolle bestimmt, indem der Peak des Monophosphats beobachtet wurde. Zur Beendigung der Reaktion wurde TEAB-Puffer zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt, dadurch kam es ebenfalls zum Austausch der Gegenionen zu Triethylammoniumionen. Erst nach mehrfachen Sephadex- und automatisierten RP-Chromatographien konnte das 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphat **60** in einer Ausbeute von 16% erhalten werden. Die geringe Ausbeute war der aufwendigen Reinigung des Produkts **60** geschuldet.

6.1.6.2 Synthese des BCNA-Diphosphats

Für die Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphats **58** sollte zunächst eine Syntheseroute von REIMER⁶⁹ erprobt werden. Das 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphat **58** sollte dabei analog zu der Monophosphatsynthese über die Fm-Amidit-Route dargestellt werden (s. **Abbildung 64**).

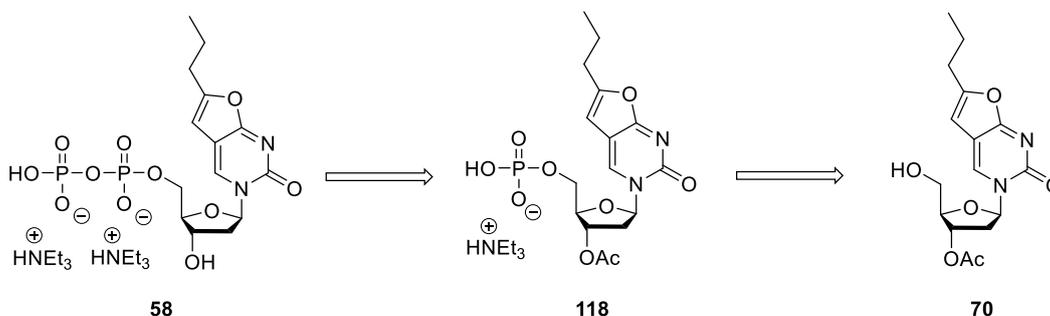


Abbildung 64: Retrosyntheseschema der BCNA-Diphosphatsynthese nach REIMER.⁶⁹

In dieser Syntheseroute von REIMER⁶⁹ sollte das Diphosphat **58** in einer Reaktion des 3'-acetylgeschützten Monophosphats **118** mit Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) und anschließender Entfernung der Schutzgruppen (auch der 3'-Acetylschutzgruppe) erhalten werden. Das 3'-acetylgeschützte Monophosphat **118** sollte zuvor ebenfalls über eine Reaktion des 3'-acetylgeschützten 2'-Desoxy-BCNAs **70** mit Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) mit anschließender Entfernung der Fm-Schutzgruppen dargestellt werden.

Für diese Reaktionsroute musste zunächst das 3'-acetylgeschützte Monophosphat **118** zugänglich gemacht werden (s. **Abbildung 65**). Die 3'-Hydroxylgruppe musste geschützt sein, da es sonst an dieser Position zu ungewollten Nebenreaktionen kommen konnte.

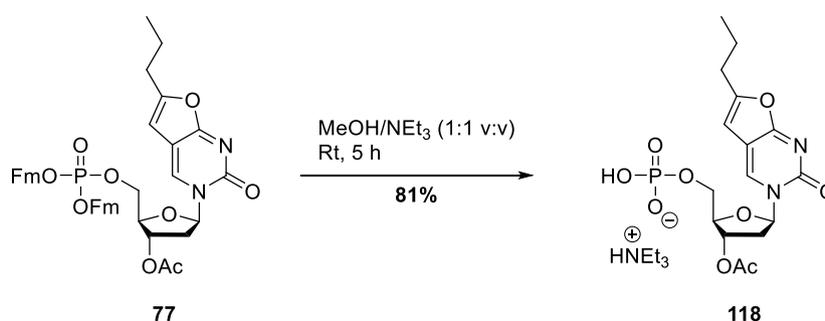


Abbildung 65: Synthese des 3'-acetylgeschützten Monophosphats **118**.

Das Fm-geschützte Monophosphat **77** konnte über die in **Kapitel 6.1.1** dargestellte Route erhalten werden. Aus dem Fm-geschützten Monophosphat **77** sollten nur die beiden Fm-

Schutzgruppen entfernt werden, die 3'-Acetylschutzgruppe musste allerdings erhalten bleiben. Diese Reaktion erfolgte ebenfalls nach einer Vorschrift von REIMER.⁶⁹ Das Fm-geschützte Monophosphat **77** wurde in einer 1:1-Mischung aus Methanol und Triethylamin gelöst und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und nach automatisierter Säulenchromatographie konnte das 3'-acetylgeschützte Monophosphat **118** in einer Ausbeute von 81% erhalten werden.

Anschließend wurde ausgehend vom 3'-acetylgeschützten Monophosphat **118** die Synthese des Diphosphats **58** über die Fm-Amiditroute versucht (s. **Abbildung 66**). Bei dieser Syntheseroute sollte zunächst nur eine Fm-Gruppe aus dem geschützten Diphosphat **119** abgespalten werden, da laut REIMER⁶⁹ dadurch die Abtrennung von nicht-umgesetztem Monophosphat **66** einfacher funktioniert. Erst danach sollte die zweite Fm-Schutzgruppe entfernt werden.

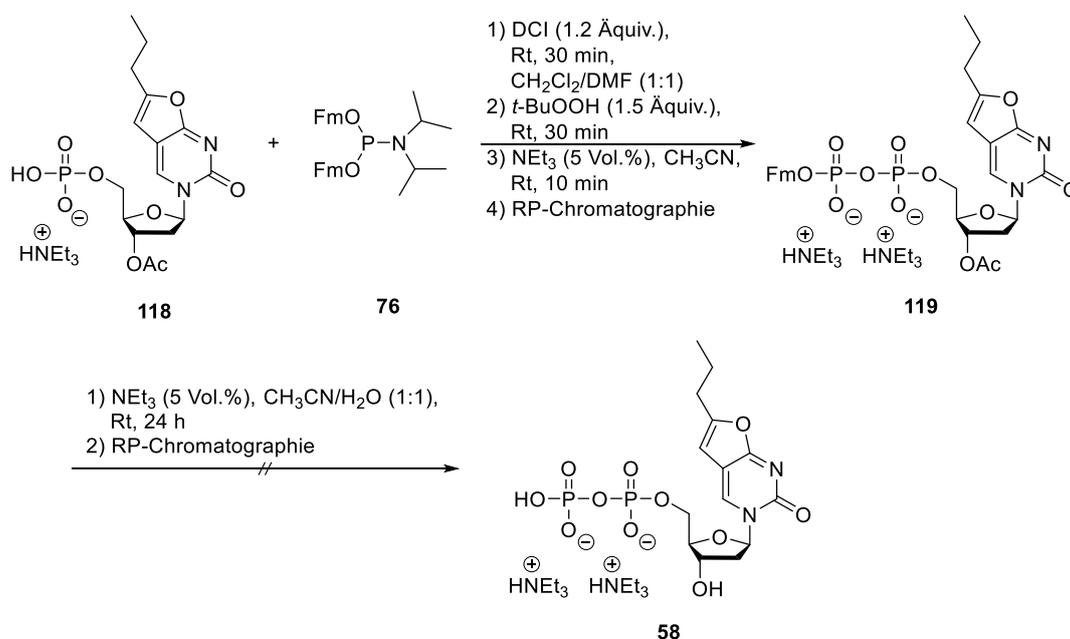


Abbildung 66: Versuchte BCNA-Diphosphatsynthese nach REIMER⁶⁹.

Das 3'-acetylgeschützte Monophosphat **118** und Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) wurden in abs. Dichlormethan suspendiert, durch die Zugabe einiger Tropfen DMF löste sich der verbliebene Niederschlag vollständig auf. Anschließend erfolgte die Zugabe von DCI ($c = 0.25$ M in Acetonitril) über 30 Minuten. Für die Oxidation wurde nach weiteren 30 Minuten *tert*-Butylhydroperoxid ($c = 5.50$ M in *n*-Decan) zugegeben und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand für die Entschützung in Acetonitril gelöst, mit 5 Vol.% Triethylamin versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dadurch wurde nur eine Fm-

Schutzgruppe des Diphosphats entfernt. Das erhaltene Diphosphat mit einer Fm-Schutzgruppe **119** wurde anschließend in einer automatisierten Säulenchromatographie von Monophosphatresten gereinigt. Das einfach-Fm-geschützte Diphosphat **119** sollte im nächsten Schritt durch Umsetzung mit 5 Vol.% Triethylamin in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (1:1 v:v) von der verbleibenden Fm-Schutzgruppe und der Acetylschutzgruppe befreit werden. Auch nach mehrfachen automatisierten Säulenchromatographien konnte das 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphat **58** durch Verwendung dieser Route nicht rein dargestellt werden.

Da die Methode nach REIMER nicht geeignet war, um das 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphat **58** darzustellen, sollte als Alternative eine Variante der YOSHIKAWA-/LUDWIG-REAKTION für die Diphosphatsynthese verwendet werden. Bei dieser Reaktion wird bevorzugt die 5'-Hydroxylgruppe phosphoryliert. Das Retrosyntheschema ist in **Abbildung 67** gezeigt.

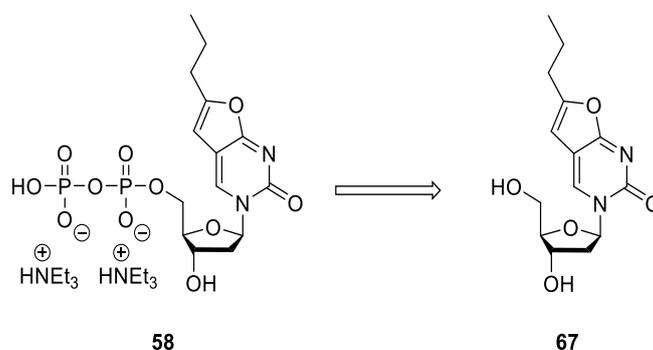


Abbildung 67: Retrosyntheschema der erfolgreichen BCNA-Diphosphatsynthese.

In dieser Syntheseroute sollte das 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphat **58** durch eine Phosphorylierungsreaktion am 2'-Desoxy-BCNA **67** mit einem Phosphatsalz dargestellt werden.

Für die Darstellung des Phosphordichloridats **114** ausgehend vom 2'-Desoxy-BCNA **67** konnte die YOSHIKAWA-METHODE verwendet werden, anschließend wurde das so gebildete Phosphordichloridat **114** durch eine Reaktion mit einem Phosphat in das Diphosphat **58** überführt (s. **Abbildung 68**).¹²²

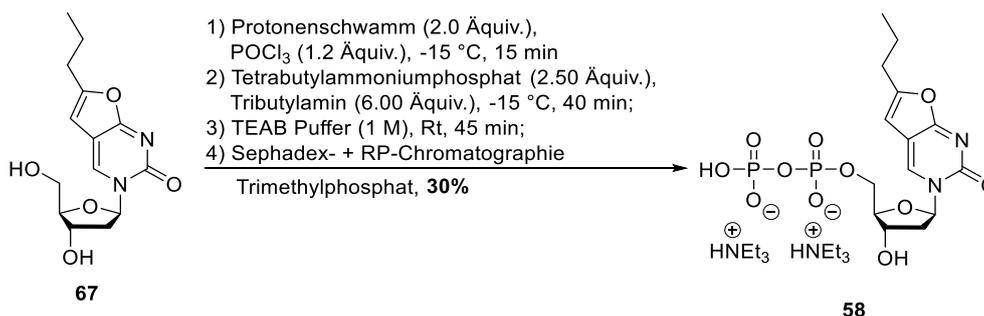


Abbildung 68: Erfolgreiche Synthese des BCNA-Diphosphats **58**.

Zuerst wurden BCNA **67** und Protonenschwamm im Vakuum vorgetrocknet. Dadurch sollte verhindert werden, dass es durch Reste von Wasser zu Nebenreaktionen mit Phosphorylchlorid kommen konnte. Das BCNA **67** sollte durch Umsetzung mit Protonenschwamm und Phosphorylchlorid in Trimethylphosphat bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ in das entsprechende Phosphordichloridat überführt werden. Durch Umsetzung mit Tetrabutylammoniumphosphat und Tributylamin konnte anschließend das BCNA-Diphosphat **58** erhalten werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TEAB-Puffer beendet. Die Reinigung erfolgte durch mehrfache automatisierte Sephadex- und RP-Chromatographien. Das 2'-Desoxy-BCNA-Diphosphat **58** konnte durch Verwendung dieser Methode mit einer Ausbeute von 30% dargestellt werden. Bei dieser Synthese kam es ebenfalls zur Bildung von 2'-Desoxy-BCNA-Triphosphat **60**. Das Triphosphat **60** konnte in einer Ausbeute von 25% isoliert werden. Die beobachtete Bildung des Triphosphats **60** wurde bereits in der Literatur¹²² beschrieben (s. **Abbildung 69**).

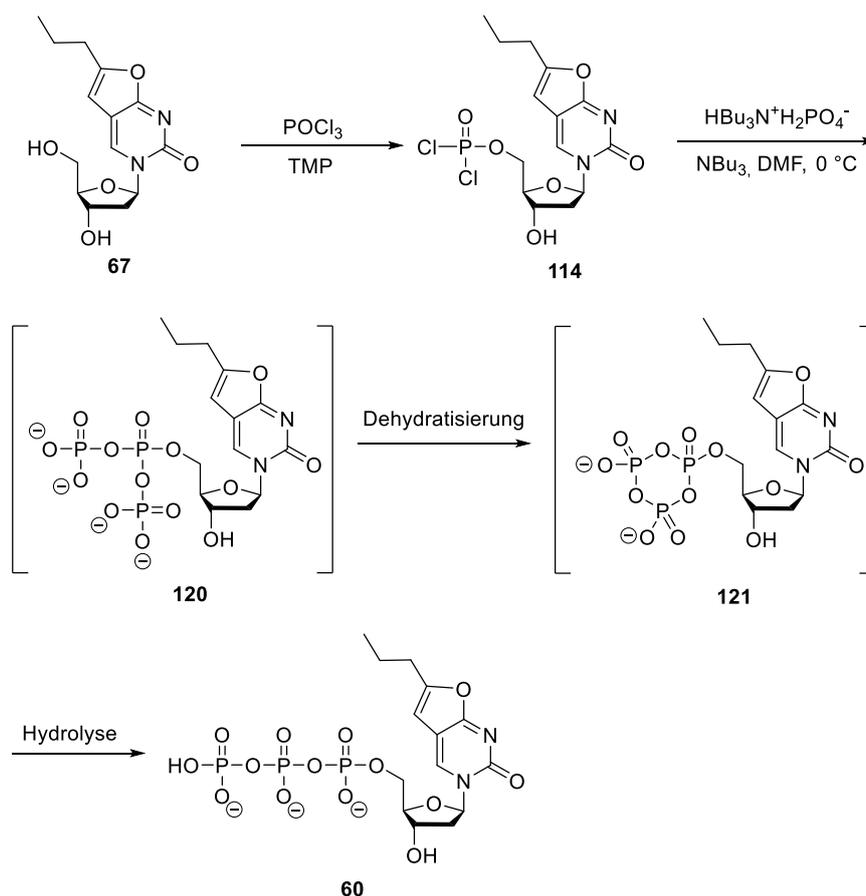


Abbildung 69: Bildung des Triphosphats **60** bei der Umsetzung des Phosphordichloridats **114** mit einem Phosphatsalz.¹¹⁵

Das Triphosphat **60** konnte bei dieser Reaktion gebildet werden, weil das Phosphordichloridat **114** mit zwei Äquivalenten des Phosphatsalzes reagieren und dadurch das pseudo-Triphosphat **120** gebildet werden kann. Aus dem pseudo-Triphosphat **120** kann durch

Dehydratisierung das Trimetaphosphat **121** gebildet werden, welches durch Hydrolyse das Nucleosidtriphosphat **60** freigibt.¹¹⁵

6.1.7 Hydrolysestudien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Damit die BCNAs als Fluoreszenzsonden für Zellaufnahmestudien geeignet sind, ist neben einer ähnlichen Lipophilie und Stabilität der Prodrugs auch ein entsprechendes Hydrolyseverhalten Voraussetzung. Es wurden bereits von PERTENBREITER,⁷⁰ GOLLNEST,⁷¹ REIMER⁶⁹ und WITT¹¹⁴ die Hydrolysen einiger BCNA-Prodrugs in PBS-Puffer, PLE-Medium und CEM/0-Zellextrakt untersucht. Dabei wurde jeweils die erfolgreiche Freisetzung des gewünschten Nucleotids beobachtet. Die Vorteile der BCNAs sind das unnatürliche Absorptionsmaximum bei 330 nm sowie ihre Fluoreszenz. Dadurch wird eine von den Zellbestandteilen unabhängige Detektion der Hydrolyseprodukte ermöglicht. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima wird eine Überlagerung verhindert und eine eindeutige Zuordnung der Signale zu den Abbauprodukten ermöglicht. GOLLNEST⁷¹ hat bei Verwendung der d4T-Prodrugs bei Zellextrakthydrolysen eine Überlagerung der Mono- und Diphosphatsignale mit den Signalen von Zellbestandteilen beobachtet, wodurch eine exakte Zuordnung und Quantifizierung erschwert wurde. Dieses Problem soll durch die Verwendung von BCNAs umgangen werden.

Für die Simulation von *in vivo*-Bedingungen wurden verschiedene Hydrolyseansätze gewählt. So sollte zum einen die chemische Stabilität bei einem physiologischen pH-Wert von 7.3 in Phosphatpuffer (PBS, phosphat buffered saline) untersucht werden. Außerdem sollte durch Hydrolyse mit dem isolierten Enzym Schweineleberesterase (PLE, pig liver esterase) analysiert werden, welchen Einfluss die Enzymaktivität auf die Stabilität des Prodrugs ausübt. Die Hydrolyse in CEM/0-Medium soll abschließend noch einmal möglichst realitätsnah zeigen, welchen Einfluss enzymatische Aktivität besitzt. Auf diese Weise sollte eine realistische Simulation der intrazellulären Metabolisierung der Prodrugs möglich sein. Für die Verfolgung der Hydrolysen wurde RP-HPL-Chromatographie (Methode A oder B) verwendet. Durch vorherige Arbeiten^{69,71,114} konnte herausgefunden werden, dass mit diesen Methoden die beste Detektion aller Hydrolyseprodukte möglich ist. Durch Verwendung des Tetra-*n*-butylammoniumphosphatpuffers wird die Basislinientrennung und damit die Identifikation aller Hydrolyseprodukte möglich.

Die Hydrolyse der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** sollte, wie bei den symmetrisch maskierten TriPPPro-Verbindungen in vorherigen Studien bestätigt wurde,^{69-71,114} durch einen nucleophilen Angriff initiiert werden. Dies konnte von ZHAO^{75,76} bereits erfolgreich bei second-generation TriPPPro-Verbindungen gezeigt werden. Der

erwartete Verlauf der Hydrolysen der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** ist in **Abbildung 70** gezeigt.

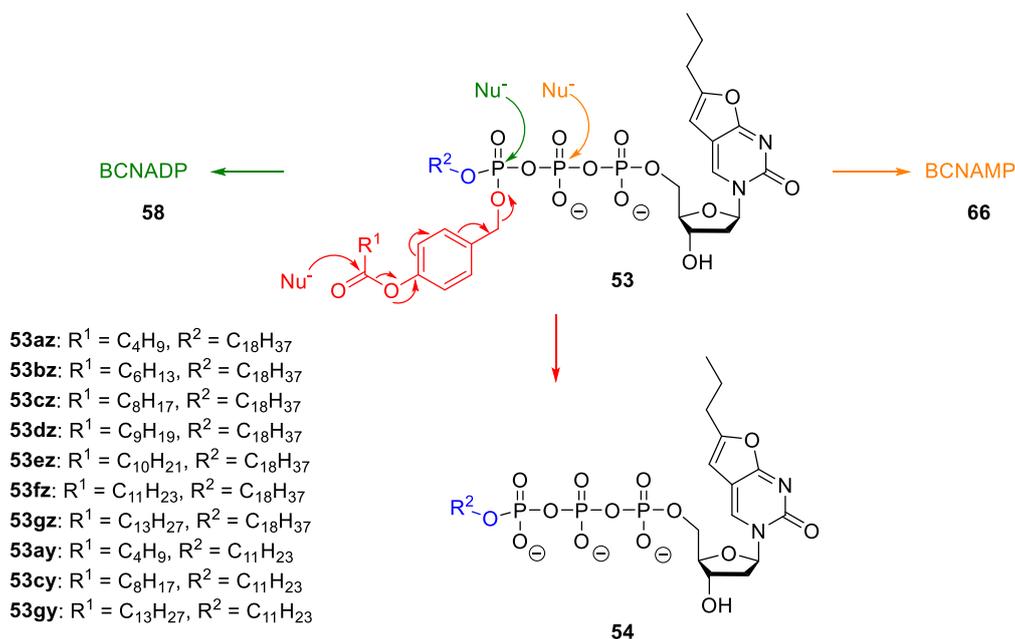


Abbildung 70: Darstellung der hydrolytischen Spaltung der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53**.

Auch bei den second-generation TriPPPro-Verbindungen **53** existieren mehrere Angriffsmöglichkeiten des Nucleophils. So kommt es durch einen Angriff auf die Acylesterfunktion der Maskierungseinheit und anschließender 1,6-Eliminierung zur Abspaltung der Maske und der Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54** (roter Weg). Dieser Angriffspunkt und die Abspaltung der Maske war in bisherigen Studien immer der bevorzugte Angriffspunkt und damit war die Freisetzung des monomaskierten Intermediats der hauptsächliche Verlauf der Hydrolyse.^{69–71,114} Bei den neuartigen TriPPPro-Verbindungen **53** kommt es durch diesen Angriffspunkt zur Bildung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54**. Da diese Verbindung keinen weiteren spaltbaren Substituenten aufweist, endet die Hydrolyse an dieser Stelle und die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **54** sollte das Hauptprodukt der Hydrolyse darstellen. Bei bisher durchgeführten Hydrolysestudien mit second-generation TriPPPro-Verbindungen von ZHAO^{75,76} kam es ausschließlich zur Bildung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung. Die Bildung des Triphosphats konnte aufgrund des nichtspaltbaren Alkylsubstituenten nicht beobachtet werden. Alternative Angriffspunkte stellen die Phosphoranhydridbindungen dar. Erfolgt der nucleophile Angriff auf die Bindung zwischen γ - und β -Phosphat (grüner Pfeil) so wird das Diphosphat **58** erhalten. Dieser Angriffspunkt wurde in bisherigen Studien bei längeren Alkylketten der Maskierungseinheiten aufgrund von Mizellenbildung und einem damit erleichterten Zugang verstärkt beobachtet. Alternativ kann der Angriff auch an der Bindung

zwischen β - und α -Phosphatgruppe erfolgen (orangener Pfeil), dabei kommt es zur Bildung des Nucleosidmonophosphats **66**. ZHAO konnte bei seinen Hydrolysestudien die Bildung einer sehr geringen Menge Diphosphat sowie die Abspaltung der Nucleobase beobachten. Es kam somit zur Spaltung der Bindung zwischen γ - und β -Phosphatgruppe sowie zur Abspaltung aller Phosphatgruppen, allerdings nur in einem sehr geringen Ausmaß.

6.1.7.1 PBS-Hydrolyse

Die Hydrolyse in PBS-Medium liefert Informationen über die chemische Stabilität der Prodrugs bei physiologischem pH-Wert (pH = 7.3). Es werden wichtige Informationen für den extrazellulären Bereich gesammelt, in dem die chemische Stabilität eine wichtige Rolle spielt. Diese Hydrolyse wurde für alle synthetisierten second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** durchgeführt. Dafür wurde von jedem Prodrug eine Stammlösung mit einer Konzentration von 25 mM in DMSO angefertigt. Anschließend wurde diese mit PBS-Puffer, Wasser und DMSO versetzt und bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und mittels RP-HPLC (Methode A) vermessen. Die gewählten Zeitabstände waren groß, da durch vorher durchgeführte Hydrolysen eine hohe Stabilität erwartet werden konnte.

Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte, indem die Integrale der entsprechenden Peaks gegen die Inkubationsdauer aufgetragen wurden. Es wurde eine Reaktion pseudo erster Ordnung angenommen, da die Konzentration der Hydrolyselösung gering war. Mithilfe entsprechender Kalkulationsprogramme konnte eine Ausgleichsgerade erstellt werden mit der die Geschwindigkeitskonstante k bestimmt wurde. Mithilfe der Geschwindigkeitskonstanten k wurde die Halbwertszeit der TriPPPro-Verbindungen berechnet. In **Tabelle 8** sind die so ermittelten Halbwertszeiten der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** in PBS-Puffer aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht der Halbwertszeiten der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** in PBS-Medium.

TriPPPro- Verbindung	BCNA -01	BCNA -02	BCNA -03	BCNA -04	BCNA -05	BCNA -06	BCNA -07	BCNA -08	BCNA -09	BCNA -10
Verbindung	53az	53bz	53cz	53dz	53ez	53fz	53gz	53ay	53cy	53gy
R ¹	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇	C ₄ H ₉	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇
R ²	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃						
PBS t _{1/2} [h]	115	136	160	81	102	65	160	172	119	114

In **Abbildung 71** sind für eine anschauliche Darstellung der nachfolgend beschriebenen Tendenzen die Halbwertszeiten der BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** graphisch abgebildet.

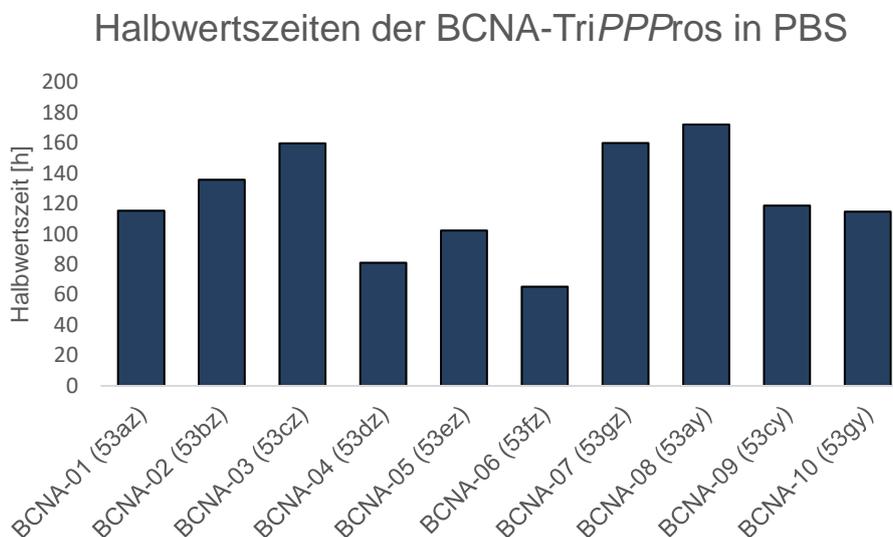


Abbildung 71: Graphische Darstellung der Halbwertszeiten der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen in PBS-Medium.

Von SCHULZ,¹¹⁰ GOLLNEST,⁷¹ WITT¹¹⁴ und ZHAO⁷⁶ wurde beobachtet, dass eine Zunahme der Alkylkettenlänge in der Maskierungseinheit eine Erhöhung der Stabilität und damit der Halbwertszeit bewirkt. Gleichzeitig kam es bei den symmetrischen TriPPPro-Verbindungen mit steigender Kettenlänge zu einer vermehrten Spaltung der Phosphoranhydridbindungen und damit zur Bildung des Mono- bzw. Diphosphats.

Ein Vergleich der Halbwertszeiten der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit C₁₈H₃₇-Alkylrest BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) zeigt eine Zunahme bei steigender Kettenlänge der Maskierungseinheit nur bis zu BCNA-03 (**53cz**, C₈H₁₇-Alkylrest). Mit weiter steigender Kettenlänge, wie in BCNA-04 (**53dz**, C₉H₁₉) und BCNA-05 (**53ez**, C₁₀H₂₁), kommt es zwar erneut zu einem Anstieg der Stabilität, allerdings auf einem geringeren Niveau als zuvor. Die höhere Stabilität von BCNA-03 (**53cz**, C₈H₁₇-Alkylrest) im Vergleich zu BCNA-04 (**53dz**, C₉H₁₉-Alkylrest) entspricht den Ergebnissen der Hydrolysestudien von GOLLNEST.⁷¹ Auch GOLLNEST⁷¹ hat für sein Prodrug mit C₈H₁₇-Maskierungseinheiten eine höhere Stabilität erhalten als für die Verbindung mit C₉H₁₉-Alkylrest. Überraschenderweise weist BCNA-06 (**53fz**, C₁₁H₂₃-Alkylrest) die geringste Stabilität von allen TriPPPro-Verbindungen auf. Eine weitere Erhöhung der Alkylkette bis zum C₁₃H₂₇-Alkylrest (BCNA-07 (**53gz**)) führt erneut zu einer Erhöhung der Stabilität, wodurch BCNA-07 (**53gz**) eine ähnliche Halbwertszeit wie BCNA-03 (**53cz**) besitzt. Bei diesen beiden Verbindungen handelt es sich somit um die stabilsten Vertreter der langkettigen BCNA-TriPPPro-Verbindungen. Anders als bei ZHAO⁷⁶

konnte hier mit steigender Kettenlänge in der Maskierungseinheit keine Erhöhung der Stabilität der second-generation TriPPPro-Verbindungen beobachtet werden. Bei allen BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit C₁₈H₃₇-Alkylrest (BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**)) kommt es von Beginn an zur Spaltung der Phosphoranhydridbindung zwischen γ - und β -Phosphatgruppe und damit zur Bildung des Diphosphats. Allerdings erfolgt die Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54** schneller, es handelt sich dabei um das Hauptprodukt der Hydrolyse. Durch die Hydrolysestudien von ZHAO wurde dieses Ergebnis erwartet. Bei den Verbindungen BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) kommt es im späteren Verlauf zur Abnahme der Konzentration der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **54z**. Überraschenderweise war der Anteil an Diphosphat **58** bei den second-generation BCNA-TriPPPro-Verbindungen höher als bei ZHAOS Ergebnissen. Die Nebenproduktbildung stellt vermutlich den Grund für die geringere Stabilität der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** im Vergleich zu ZHAOS Ergebnissen dar.

Ein Vergleich der BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit C₁₁H₂₃-Alkylrest BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**) zeigt eine Abnahme der Stabilität bei zunehmender Alkylkettenlänge der Maskierungseinheit. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass für diese Verbindungen ein besseres Verhältnis von Diphosphat **58** zu γ -alkylierter TriPPPro-Verbindung **54y** besteht (Verhältnis 1:2). Außerdem ist bei diesen Verbindungen nur eine geringere Abnahme des Peaks der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54y** zu beobachten, es bleibt außer bei BCNA-09 **53cy** immer das Hauptprodukt der Hydrolyse.

Bei allen PBS-Hydrolysen der BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** ist zu erkennen, dass die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **54** das Hauptprodukt der Hydrolyse darstellt. Es kommt allerdings parallel ebenfalls zur Bildung des Diphosphats **58**. Da die Zunahme des Diphosphatpeaks aufhört, wenn das Prodrug **53** verbraucht ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Diphosphat **58** aus der TriPPPro-Verbindung **53** und nicht aus dem Hydrolyseprodukt **54** gebildet wird. Es wurde bereits von GOLLNEST⁷¹ und ZHAO⁷⁶ beobachtet, dass das Diphosphat aus dem Prodrug gebildet wird, da auch bei deren Studien der Diphosphatpeak nur so lange anstieg wie Prodrug vorhanden war. Bei bisherigen Untersuchungen⁷¹ wurde als Grund für die Spaltung zum Diphosphat die Mizellenbildung angegeben, dabei sind die langen Alkylketten der Maskierungseinheiten im Inneren und die polareren Phosphatgruppen an den Außenseiten der Mizellen angeordnet. Da es durch diese Anordnung für die Nucleophile einfacher ist die Phosphoranhydridbindungen zu spalten, kommt es vermehrt zur Bildung von Nebenprodukten. Das Vorhandensein eines langen Alkylrests in den TriPPPro-Verbindungen stützt die Theorie der Mizellenbildung. Der Anteil an Diphosphat **58** wird mit steigender Kettenlänge der Maskierungseinheit in den in dieser Arbeit synthetisierten TriPPPro-Verbindungen **53** größer, dies liegt an der höheren Lipophilie und der damit einhergehenden begünstigten Mizellenbildung. Am Ende der Hydrolyse kommt es ebenfalls zum Abbau der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **54**. Durch den gleichzeitigen, sprunghaften Anstieg an Monophosphat **66**, liegt die Vermutung nahe, dass die γ -alkylierte

TriPPPro-Verbindung **54** zum Monophosphat **66** hydrolysiert wird. Aufgrund des Vorhandenseins der negativen Ladung an der γ -Phosphatgruppe ist ein nucleophiler Angriff an der Bindung zwischen γ - und β -Phosphat, aufgrund von elektronischer Abstoßung des Nucleophils, nicht möglich. Somit ist die Spaltung zum Monophosphat **66** deutlich realistischer, da hier die Spaltung zwischen β - und α -Phosphatgruppe erfolgt und nicht durch das Vorhandensein einer negativen Ladung verhindert wird. Außerdem haben Studien von GOLLNEST,⁷¹ REIMER⁶⁹ und ZHAO⁷⁶ ergeben, dass es bei der Hydrolyse von monomaskierten DiPPPro- und TriPPPro-Verbindungen aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung an der endständigen Phosphatgruppe nicht zu deren Abspaltung kam.

Es soll anhand zweier Beispiele der Hydrolyseverlauf der BCNA-TriPPPro-Verbindungen genauer diskutiert werden. Zunächst wird exemplarisch für die Verbindungen mit C₁₈H₃₇-Alkylrest der Hydrolyseverlauf von BCNA-02 (**53bz**) betrachtet (s. **Abbildung 72**). Die Verbindung besitzt eine C₆H₁₃-AB-Maskierungseinheit.

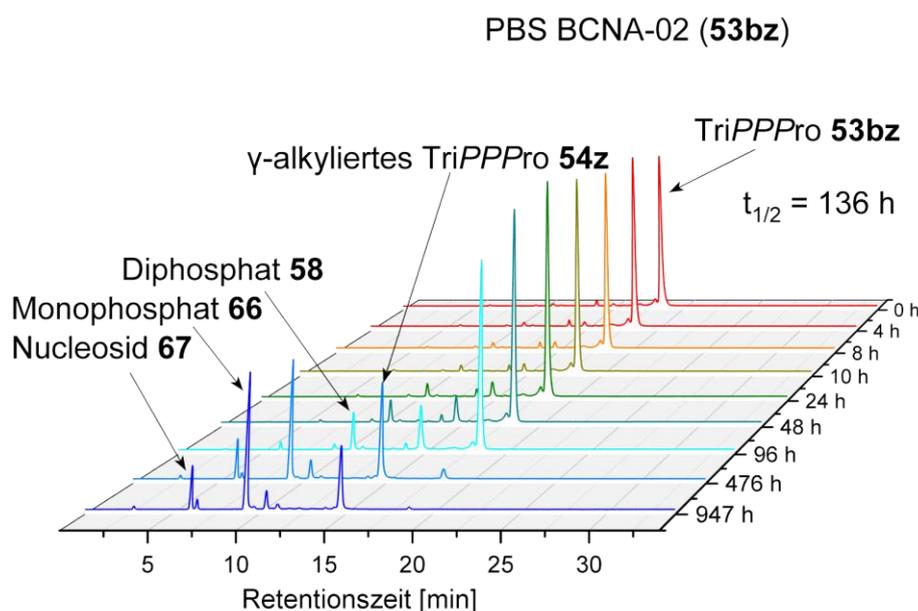


Abbildung 72: PBS-Hydrolyse von BCNA-02 (**53bz**).

Die Konzentration des Prodrugs BCNA-02 (**53bz**) bleibt in den ersten 24 Stunden relativ konstant und nur wenig γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **54z** wird gebildet. Die Konzentration des Diphosphats **58** nimmt ebenfalls von Beginn an zu. Nach 96 Stunden liegt eine deutliche Abnahme der Prodrugkonzentration und gleichzeitige Zunahme der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54z** vor. Die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **54z** stellt das Hauptprodukt der Hydrolyse dar. Es wurde jedoch ebenfalls eine große Menge Diphosphat **58** freigesetzt. Nach knapp 500 Stunden ist das Prodrug **53bz** bereits fast vollständig verbraucht worden, wodurch

es zum letzten Mal zu einer Zunahme der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** gekommen ist. Der Diphosphatpeak ist nach dieser Zeit fast verschwunden und die Monophosphatkonzentration angestiegen. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass es zur Hydrolyse zum Monophosphat **66** gekommen ist. Nach fast 1000 Stunden Inkubationszeit ist das Prodrug **53bz** vollständig abgebaut und auch die Konzentration der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** hat abgenommen. Die enorme Zunahme der Monophosphatkonzentration stützt die Vermutung, dass es in der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** zum Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen β - und α -Phosphatgruppe kommt. Ab 96 Stunden ist außerdem die Entstehung des Nucleosids **67** zu beobachten. Es kam folglich ebenso zur Abspaltung aller Phosphatgruppen. In dem Chromatogramm der Nullprobe ist bereits eine geringe Zersetzung des Prodrugs **53bz** zu erkennen, da die Konzentration der Nebenprodukte allerdings sehr gering ist, konnte sie vernachlässigt werden.

Für die TriPPPPro-Verbindungen mit einem $C_{11}H_{23}$ -Alkylrest soll BCNA-10 (**53gy**) betrachtet werden, dessen PBS-Hydrolyseverlauf in **Abbildung 73** dargestellt ist. Die Verbindung besitzt eine $C_{13}H_{27}$ -AB-Maskierungseinheit.

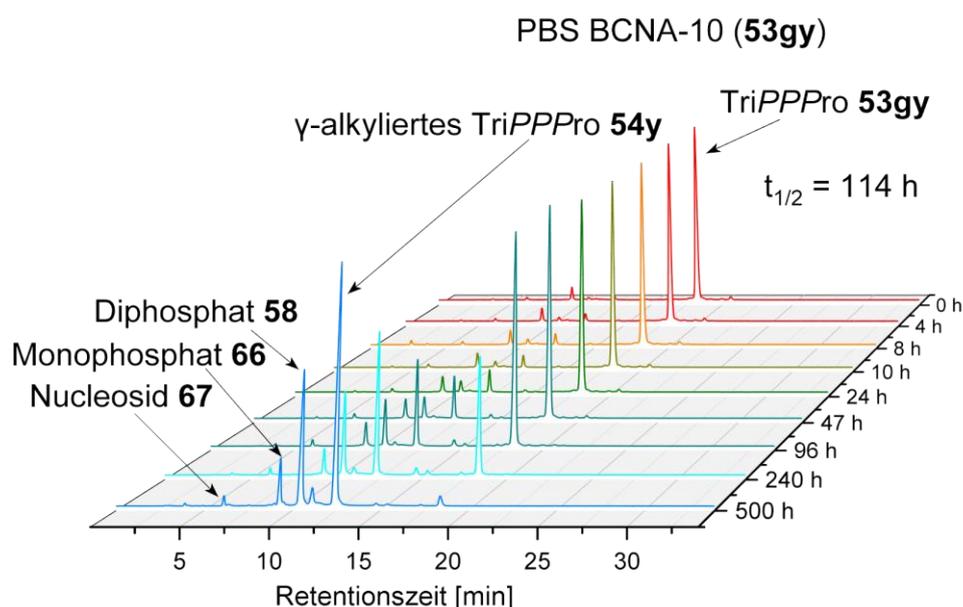


Abbildung 73: PBS-Hydrolyse von BCNA-10 (**53gy**).

Die Prodrugkonzentration bleibt in den ersten zehn Stunden relativ konstant. Nach 24 Stunden ist ein sprunghafter Anstieg der Konzentration der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y** zu erkennen. Auch hier wird von Beginn an auch das Diphosphat **58** gebildet, allerdings in einem geringeren Anteil als bei dem zuvor betrachteten BCNA-02 (**53bz**). Diese Beobachtung stützt die Theorie der Mizellenbildung als Grund für den Bruch der Phosphoranhydridbindung. Durch den kürzeren Alkylrest in BCNA-10 (**53gy**) sollte die Bildung der Mizellen und somit die

Freisetzung des Diphosphats **58** langsamer erfolgen, dies führt zu der beobachteten geringeren Menge. Nach 500 Stunden ist das Prodrug **53gy** fast vollständig verbraucht und die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** stellt das Hauptprodukt der Hydrolyse von BCNA-10 (**53gy**) dar. Es ist keine Abnahme der Konzentration des Hydrolyseprodukts **54y** zu beobachten, die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** mit kürzerem Alkylrest ist somit stabiler. Ein nucleophiler Angriff auf die Phosphoranhydridbindung und die damit verbundene Bildung des Monophosphats **66** spielt bei dieser Hydrolyse keine Rolle. Da nur ein kleiner Monophosphatpeak erhalten wird, kann davon ausgegangen werden, dass dieser auf der Hydrolyse des Diphosphats **58** beruht.

In **Abbildung 74** ist die PBS-Hydrolyse von BCNA-10 (**53gy**) graphisch dargestellt, dadurch soll der Verlauf der Hydrolyseprodukte anschaulicher abgebildet werden.

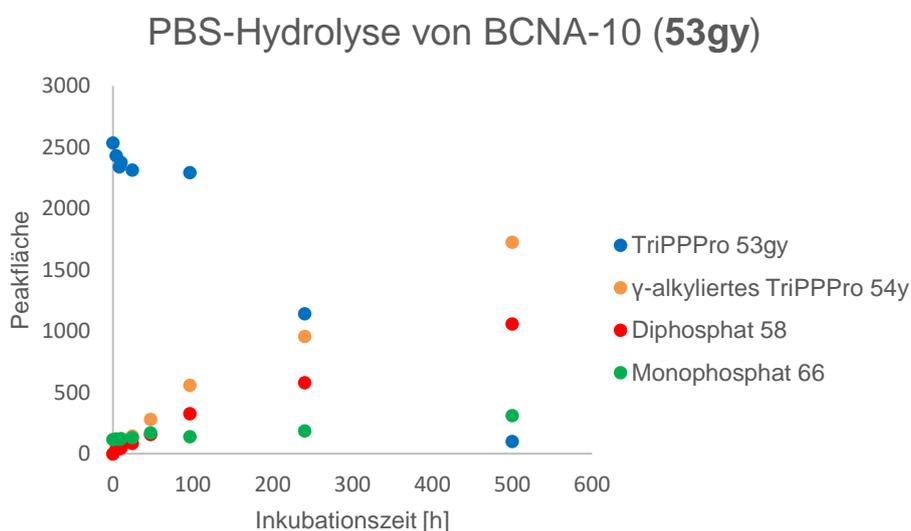


Abbildung 74: Graphische Darstellung der gebildeten Hydrolyseprodukte von BCNA-10 (**53gy**).

In der graphischen Darstellung ist gut zu erkennen, dass nach 500 Stunden das Prodrug **53gy** fast vollständig verbraucht wurde und die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** das Hauptprodukt der Hydrolyse darstellt. Mithilfe dieser Abbildung lässt sich außerdem gut zeigen, dass die Diphosphatkonzentration im Vergleich zur γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y** nur halb so hoch ist. Da diese beiden Konzentrationen fast parallel zunehmen, kann davon ausgegangen werden, dass sie aus einer Verbindung, dem Prodrug **53gy**, stammen. Die leichte, konstante Zunahme des Monophosphats **66** geht wahrscheinlich auf die zeitgleich stattfindende Hydrolyse des Diphosphats **58** zurück.

6.1.7.2 PLE-Hydrolyse

Die PLE-Hydrolyse soll zeigen, wie stabil die synthetisierten second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** in Anwesenheit eines Enzyms sind. In diesem Versuchsaufbau wird untersucht, ob das verwendete Enzym Schweineleberesterase (PLE, pig liver esterase) in der Lage ist, die Abspaltung der Maskierungseinheiten zu initiieren und damit die Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** zu beschleunigen.

Für die Ermittlung der Halbwertszeit im PLE-Medium wurde von den untersuchten second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** eine 6 mM-Stammlösung in DMSO vorbereitet, welche anschließend in einer Mischung aus PBS-Puffer und DMSO mit PLE (gelöst in PBS-Puffer, $c = 1$ U/mL) versetzt wurde. Es wurden an vorher definierten Zeitpunkten Aliquote entnommen, diese wurden mittels RP-HPLC (Methode A) vermessen. Die zeitlichen Abstände waren deutlich geringer als bei der PBS-Hydrolyse, da hier geringere Halbwertszeiten erwartet wurden. Die Hydrolyse wurde nach 24 Stunden beendet, da nach diesem Zeitraum keine Enzymaktivität mehr vorhanden ist. Die PLE-Hydrolyse wurde von einzelnen BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** durchgeführt, damit eine allgemeine Tendenz ermittelt werden kann. In **Tabelle 9** sind die Halbwertszeiten im PLE-Medium aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht der Halbwertszeiten der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** im PBS- und PLE-Medium.

TriPPPPro-Verbindung	BCNA-01	BCNA-02	BCNA-03	BCNA-04	BCNA-05	BCNA-06	BCNA-07	BCNA-08	BCNA-09	BCNA-10
Verbindung	53az	53bz	53cz	53dz	53ez	53fz	53gz	53ay	53cy	53gy
R ¹	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₃ H ₂₇	C ₄ H ₉	C ₈ H ₁₇	C ₁₃ H ₂₇
R ²	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃						
PBS t _{1/2} [h]	115	136	160	81.1	102	65.3	160	172	119	114
PLE t _{1/2} [h]	3.9	3.7	14.4	-	-	31	20.4	1.2 min	2.2 min	15.8

In **Abbildung 75** sind die Halbwertszeiten graphisch dargestellt, damit die nachfolgend beschriebenen Tendenzen anschaulich abgebildet werden können.

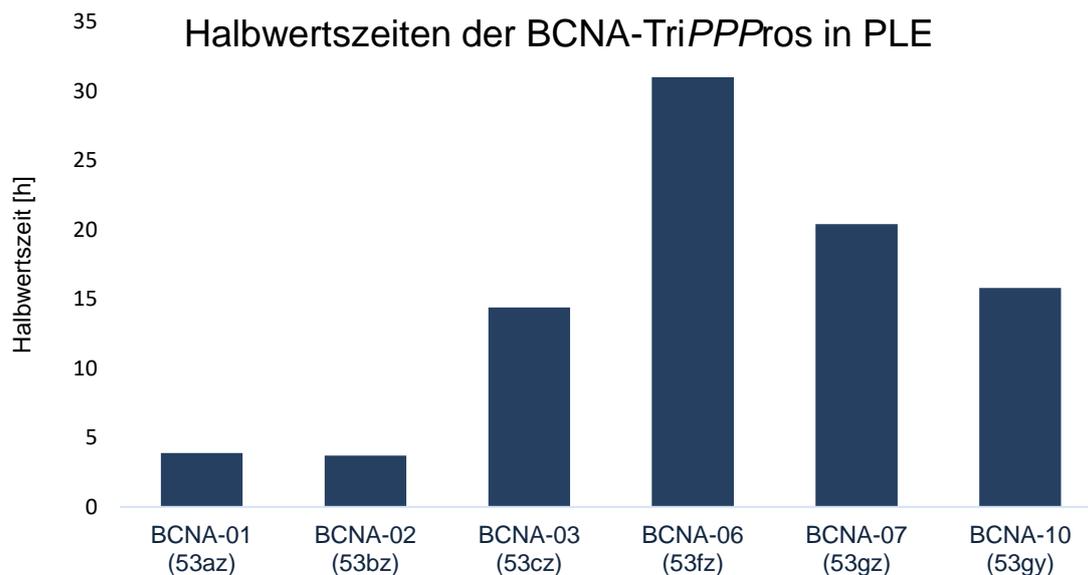


Abbildung 75: Graphische Darstellung der PLE-Halbwertszeiten ausgewählter second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen.

Bei der PLE-Hydrolyse kann bei den second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit $C_{18}H_{37}$ -Alkylrest BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) ein genereller Anstieg der Stabilität bis zu BCNA-06 (**53fz**, $C_{11}H_{23}$) beobachtet werden. Bei BCNA-01 (**53az**, C_4H_9) und BCNA-02 (**53bz**, C_6H_{13}) ist die Halbwertszeit mit 3.9 bzw. 3.7 Stunden annähernd gleich. Die beiden Kettenlängen haben somit einen ähnlichen Einfluss auf das Enzym und spielen noch keine entscheidende Rolle bei der Abspaltung der Maskierungseinheiten. Bei diesen beiden Messungen handelte es sich um Einfachbestimmungen der Halbwertszeit, dies könnte ebenfalls einen Einfluss auf den exakten Wert haben. BCNA-03 (**53cz**) mit einer C_8H_{17} -Alkylkette ist mit 14.4 Stunden bereits deutlich stabiler. Die Verlängerung der Alkylkette führt hier zu einer Vervierfachung der Halbwertszeit. Die höchste Stabilität weist BCNA-06 (**53fz**) mit einer Halbwertszeit von 31 Stunden auf. Bei der $C_{11}H_{23}$ -Maskierungseinheit findet die enzymatische Abspaltung folglich am langsamsten statt. Eine weitere Verlängerung der Kettenlänge bis zur $C_{13}H_{27}$ -Maskierungseinheit (BCNA-07 (**53gz**)) verursacht erneut eine geringere Stabilität. Die Halbwertszeit der TriPPPro-Verbindungen mit $C_{11}H_{23}$ -Alkylrest BCNA-08 (**53ay**) -BCNA-10 (**53gy**) steigt mit länger werdender Alkylkette in der Maskierungseinheit an. Die Stabilität von BCNA-08 (**53ay**) und BCNA-09 (**53cy**) ist deutlich geringer und so wurde bereits nach 1.2 bzw. 2.2 Minuten die Hälfte des Prodrugs zur γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung umgesetzt. Aufgrund der deutlichen Differenz dieser beiden Werte wurden sie durch eine zweite Messung verifiziert. BCNA-10 (**53gy**) weist mit 15.8 Stunden im Vergleich dazu eine deutlich höhere Stabilität auf. Bei den PLE-Hydrolysen der second-generation TriPPPro-Verbindungen von ZHAO^{75,76} konnte gezeigt werden, dass eine längere Alkylkette in der Maskierungseinheit zu einer höheren Stabilität führt. Diese Ergebnisse stimmen mit den erhaltenen Stabilitäten für BCNA-08 (**53ay**) bis BCNA-10 (**53gy**) überein.

Bei allen durchgeführten Hydrolysen im PLE-Medium war die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54** das Hauptprodukt der Hydrolyse. Die bei der PBS-Hydrolyse aufgrund des Bruchs der Phosphoranhydridbindung beobachtete Bildung des Diphosphats **58** kommt bei der PLE-Hydrolyse kaum vor. Durch das Enzym wird die Abspaltung der Maskierungseinheit so stark beschleunigt, dass der Angriff eines Nucleophils auf die Phosphoranhydridbindung kaum eine Rolle spielt und somit nur sehr wenig Diphosphat **58** gebildet wird. Die Bildung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** als Hauptprodukt der Hydrolyse sowie die geringe Freisetzung des Diphosphats **58** als Nebenprodukt stimmen mit den Ergebnissen von ZHAO^{75,76} überein.

Im Folgenden sollen erneut einzelne Hydrolysen im PLE-Medium näher betrachtet werden. In **Abbildung 76** ist der Verlauf von BCNA-02 (**53bz**) dargestellt. Diese Verbindung weist einen C₁₈H₃₇-Alkylrest und eine C₆H₁₃-AB-Maskierungseinheit auf.

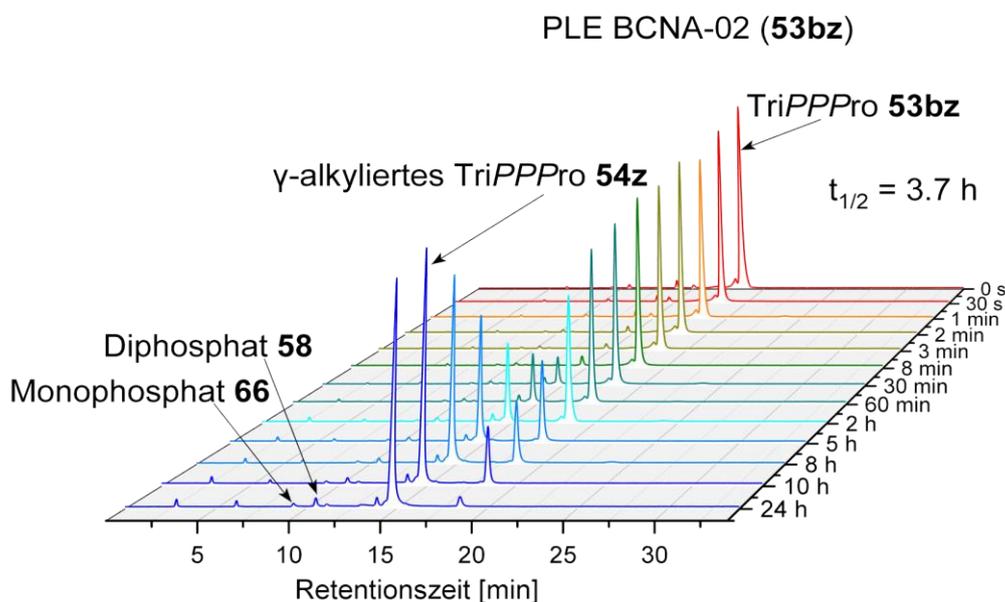


Abbildung 76: Darstellung der PLE-Hydrolyse von BCNA-02 (**53bz**).

Bei der Hydrolyse von BCNA-02 (**53bz**) in PLE kommt es bereits nach 30 Minuten zu einem deutlichen Anstieg der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z**. Im weiteren Verlauf ist die Abnahme des Prodrugpeaks und die gleichzeitige Zunahme der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** zu beobachten. Innerhalb der betrachteten 24 Stunden wird fast das gesamte Prodrug verbraucht. Dabei wird fast ausschließlich die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54z** gebildet. Die verwendete Substanz lag bereits zu Beginn zu einem geringen Teil hydrolysiert vor, dies kann durch das Vorhandensein der Hydrolyseprodukte in der Nullprobe festgestellt werden. Da die geringe Zersetzung keinen Einfluss auf den Hydrolyseverlauf hat, wurde die Probe trotzdem verwendet. Es ist festzustellen, dass nur sehr wenig Diphosphat **58** und Monophosphat **66** gebildet werden. Somit spielt die Spaltung der Phosphoranhydridbindungen, wie

bereits erwähnt, aufgrund der schnellen, enzymkatalysierten Maskenabspaltung nur eine vernachlässigbare Rolle. Die Enzymbeteiligung führt bei BCNA-02 (**53bz**) zu einer schnellen und selektiven Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z**.

Als nächstes wird der Hydrolyseverlauf von BCNA-06 (**53fz**) im PLE-Medium näher betrachtet, dieser ist in **Abbildung 77** dargestellt. Die Verbindung besitzt einen $C_{18}H_{37}$ -Alkylrest und eine $C_{11}H_{23}$ -AB-Maskierungseinheit.

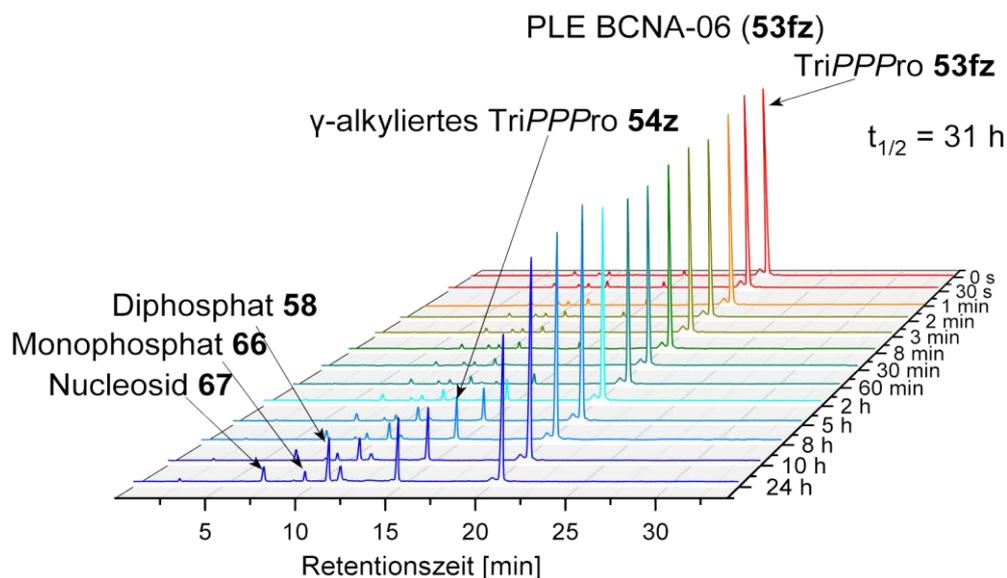


Abbildung 77: PLE-Hydrolyse von BCNA-06 (**53fz**).

Die Konzentration von BCNA-06 (**53fz**) bleibt die ersten zehn Stunden relativ konstant. Bereits nach zwei Stunden kommt es zur Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** sowie einer geringen Menge Diphosphat **58**. Im weiteren Verlauf nimmt die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54z** weiter zu und stellt nach 24 Stunden das Hauptprodukt dar, obwohl, entsprechend der hohen Halbwertszeit, nur ein geringer Teil des Prodrugs **53fz** umgesetzt wurde. Es kommt allerdings auch zur Bildung einer beachtlichen Menge Diphosphat **58**. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der PBS-Hydrolyse, wenn die Halbwertszeit der TriPPPPro-Verbindung größer ist, spielt der Bruch der Phosphoranhydridbindung eine wichtigere Rolle und es wird mehr Diphosphat **58** gebildet. BCNA-06 (**53fz**) ist mit einer Halbwertszeit von 31 Stunden deutlich stabiler als BCNA-02 (**53bz**, Halbwertszeit von 3.7 Stunden), da der längere Alkylrest eine schnelle enzymatische Abspaltung verhindert.

Mit BCNA-10 (**53gy**) soll auch eine Verbindung mit kürzerem Alkylsubstituent ($C_{11}H_{23}$) analysiert werden. In **Abbildung 78** ist der PLE-Hydrolyseverlauf von BCNA-10 (**53gy**) dargestellt. Diese Verbindung besitzt eine Maskierungseinheit mit einem $C_{13}H_{27}$ -Alkylrest.

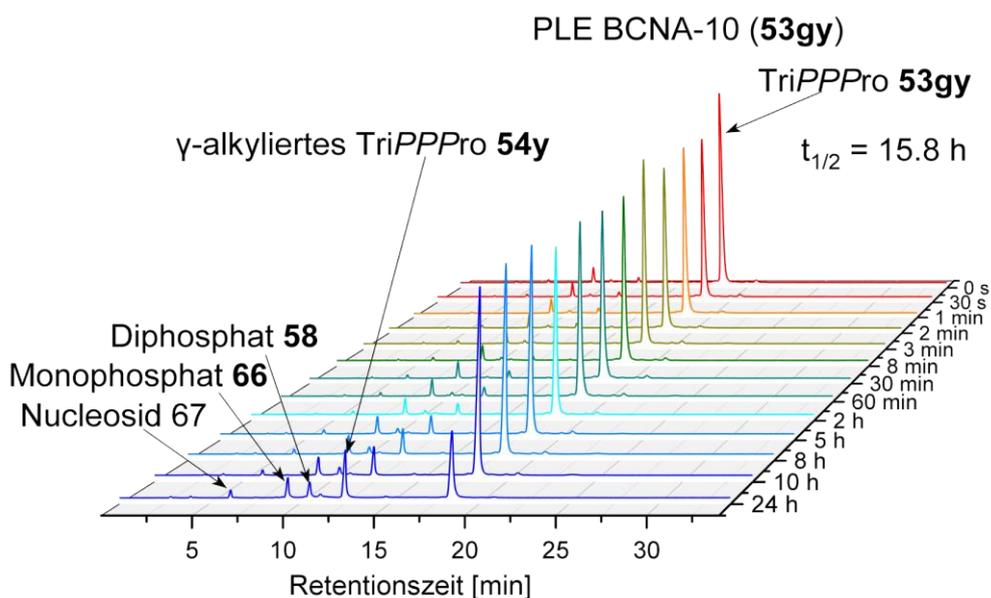


Abbildung 78: Darstellung des PLE-Hydrolyseverlaufs von BCNA-10 (**53gy**).

Die Konzentration des Prodrugs (**53gy**) bleibt bei der PLE-Hydrolyse in den ersten zehn Stunden relativ konstant, parallel dazu kommt es nur zu einer geringen Zunahme der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y**. Aufgrund der hohen Halbwertszeit ist am Ende der Inkubationszeit noch Edukt vorhanden. Die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** stellt das Hauptprodukt der Hydrolyse dar. Auch hier wird das Diphosphat **58** freigesetzt, allerdings, aufgrund der geringeren Halbwertszeit, in einer geringeren Menge als bei BCNA-06 (**53fz**) und erst nach zehn Stunden Inkubationsdauer. Der Monophosphatpeak ist bereits am Anfang der Hydrolyse zu erkennen und geht auf eine geringe Lagerstabilität der TriPPPPro-Verbindung **53gy** zurück. Während der Inkubationszeit kommt es dagegen kaum zur Bildung des Monophosphats. Bei der Hydrolyse kommt es ebenfalls zur Bildung des Nucleosids **67** durch Abspaltung aller Phosphatgruppen.

Abschließend soll die graphische Darstellung der PLE-Hydrolyse von BCNA-10 (**53gy**) in **Abbildung 79** den Verlauf der Hydrolyse und aller entstehender Produkte genauer zeigen.

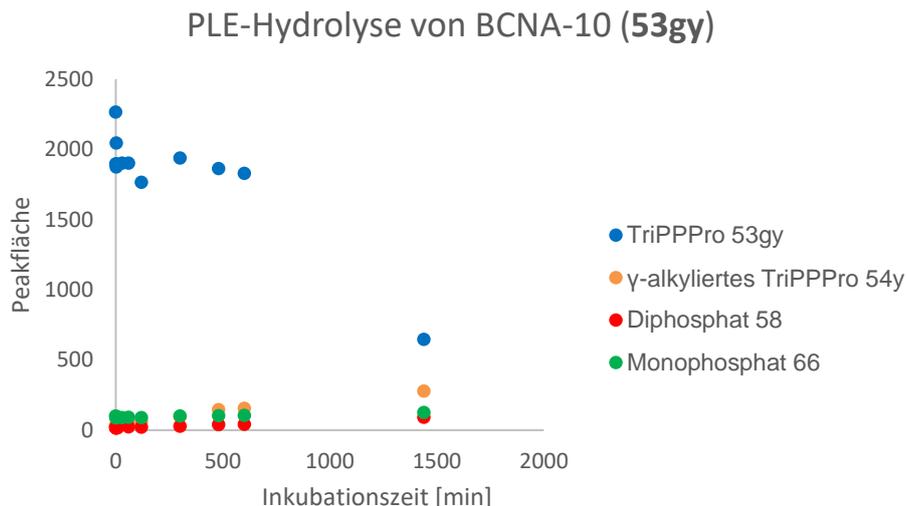


Abbildung 79: Graphische Darstellung des PLE-Hydrolyseverlaufs von BCNA-10 (53gy).

Auch in dieser Darstellung lässt sich erkennen, dass die Prodrugkonzentration in den ersten zehn Stunden wenig und nach 24 Stunden deutlich abnimmt. Das bereits zu Beginn, aufgrund von Zersetzungsprozessen vorhandene, Monophosphat **66** bleibt im Verlauf der Hydrolyse konstant. Die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** steigt zunächst, aufgrund des langsamen Abbaus des Prodrugs **53gy**, nur wenig an. Erst nach 24 Stunden kommt es zu einer deutlichen Erhöhung. Es kommt kaum zur Bildung des Diphosphats **58**, dies ist an dem nur sehr geringen Anstieg zu erkennen. Aufgrund des geringen Prodrugabbaus bleibt die TriPPPPro-Verbindung **53gy** immer der Hauptbestandteil der Hydrolyselösung. Danach weist die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** die zweitgrößte Konzentration auf. Es ist hier deutlich zu erkennen, dass die enzymatische Hydrolyse selektiv die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54y** freisetzt.

6.1.7.3 Hydrolyse im CEM/0-Zellextrakt

Für eine möglichst realitätsnahe Umgebung der Stabilitätsuntersuchungen kann die Hydrolyse im Zellextrakt durchgeführt werden. Damit wird die größte Aussagekraft über die erwartete Stabilität der TriPPPPro-Verbindungen **53** bei Zellaufnahmestudien gewonnen und gleichzeitig ermittelt, ob es bei der Zellextrakthydrolyse ebenfalls zur Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** gemäß **Abbildung 70** kommt. Es wurde mit BCNA-06 (**53fz**) eine second-generation TriPPPPro-Verbindung mit $C_{11}H_{23}$ -AB-Maskierungseinheit und $C_{18}H_{37}$ -Alkylrest gewählt. Da in dieser Arbeit noch eine Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindung im CEM/0-Zellextrakt hydrolysiert werden soll, wurde für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse die gleiche AB-Maskierungseinheit ($C_{11}H_{23}$) gewählt.

Die verwendeten CEM/0-Zellextrakte stammen von J. BALZARINI und D. SCHOLS, Katholieke Universiteit Leuven (Belgien). Für die Hydrolyse wurde vom verwendeten Prodrug eine 12.5 mM Stammlösung in DMSO erstellt. Anschließend wurde sie mit Zellextrakt und Wasser vermischt und bei 37 °C inkubiert. Es wurden an vorher definierten Zeitpunkten Aliquote entnommen. Da auch hier Enzyme die Hydrolyse steuern, wurden erneut kurze zeitliche Abstände gewählt, da eine ähnliche Halbwertszeit erwartet wurde. Die entnommenen Proben wurden zur Fällung der Proteine mit Methanol versetzt, zehn Minuten auf Eis gelagert und zehn Minuten zentrifugiert (14.000 rpm, 0 °C). Der erhaltene Überstand wurde entnommen, über einem Spritzenfilter filtriert und mittels RP-HPLC analysiert. In **Abbildung 80** ist der Hydrolyseverlauf von BCNA-06 (**53fz**) in CEM/0-Zellextrakt dargestellt.

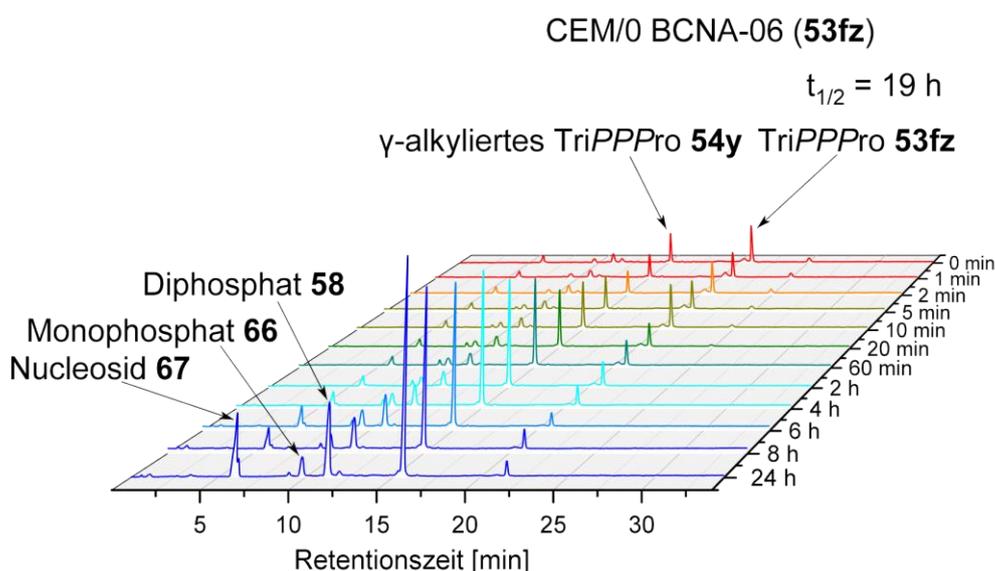


Abbildung 80: Darstellung des Hydrolyseverlaufs von BCNA-06 (**53fz**) in CEM/0-Zellmedium.

Die Hydrolyse von BCNA-06 (**53fz**) zeigt von Beginn an eine kontinuierliche Zunahme der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z**. Während des gesamten Hydrolyseverlaufs ist zu erkennen, dass die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54z** das Hauptprodukt der Hydrolyse darstellt. Der vermutete Verlauf aus **Abbildung 70** findet folglich statt. Die berechnete Halbwertszeit von BCNA-06 (**53fz**) im Zellextrakt liegt mit 19 Stunden deutlich unter der Halbwertszeit im PLE-Medium (31 Stunden). Der vorhandene Zellextrakt und die darin vorliegenden Enzyme führen zu einer Reduktion der Stabilität der betrachteten Verbindung, allerdings reicht sie immer noch für die Verwendung bei Zellaufnahmestudien aus. Die Spaltung der Phosphoranhydridbindung spielt im Zellextrakt erst nach vier Stunden eine Rolle, erst dann kommt es zur Diphosphatbildung. Gegen Ende der Hydrolyse kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Diphosphatkonzentration, die aber weit unter der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** bleibt. Es kommt außerdem zur Freisetzung einer geringen Menge

Monophosphat **66**. Eine Spaltung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54z** oder die Hydrolyse des Diphosphats **58**, wie sie bei der PBS-Hydrolyse beobachtet werden kann, findet hier also nur in einem vernachlässigbaren Ausmaß statt. Es kommt außerdem zur Bildung des Nucleosids **67**. Dies deutet auf das Vorhandensein von Phosphatasen hin, die in der Lage sind, die Phosphatgruppe des Monophosphats abzuspalten. Die Bildung des Nucleosids wurde von REIMER⁶⁹ bei der CEM/0-Zellextrakthydrolyse ebenfalls beobachtet. Die verwendete TriPPPro-Verbindung weist aufgrund schlechter Lagerstabilität bereits zu Beginn erhebliche Zersetzung auf, dies wurde bei der Berechnung der Halbwertszeit berücksichtigt.

Bei einem Vergleich der durchgeführten Hydrolysen von BCNA-06 (**53fz**, PBS, PLE und CEM/0) ist zu erkennen, dass durch die Enzyμβeteiligung die Halbwertszeit sinkt. Diese geringere Stabilität führt zu einer schnelleren und selektiveren Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54z**. Gleichzeitig ist deswegen der Diphosphatanteil kleiner. Eine niedrigere Halbwertszeit führt folglich dazu, dass der Einfluss der chemischen Stabilität abnimmt.

6.1.7.4 Hydrolyse von BCNA-Triphosphat und -Diphosphat

Damit bei den durchgeführten Hydrolysen und den Zellaufnahmestudien ausgeschlossen werden kann, dass der Abbau des Di- **58** oder Triphosphats **60** zur Bildung von Nebenprodukten führt, wurden auch von diesen Verbindungen PBS- und PLE-Hydrolysen durchgeführt. Bei den PBS-Hydrolysen der beiden Verbindungen konnte eine sehr hohe Stabilität festgestellt werden. So lagen die Halbwertszeiten bei 1386 Stunden für das Diphosphat **58** und bei 2310 Stunden für das Triphosphat **60**. Bei der Diphosphathydrolyse konnte erst nach knapp 400 Stunden die Bildung einer geringen Menge Monophosphat **66** beobachtet werden. Bei der Triphosphathydrolyse konnte zwar eine geringe Abnahme des Triphosphatpeaks beobachtet werden, diese führte jedoch lediglich zur Bildung einer nicht quantifizierbaren Produktmenge.

Bei der PLE-Hydrolyse wurde ebenfalls das bereits in **Kapitel 6.1.7.2** vorgestellte Verfahren verwendet. Die errechneten Stabilitäten sind wiederum sehr hoch. So liegt die Halbwertszeit des Diphosphats **58** bei 63 Stunden und die des Triphosphats **60** bei 173 Stunden. Beide weisen folglich eine sehr hohe Stabilität im PLE-Medium auf. Ein Vergleich der Halbwertszeiten von Diphosphat **58** und Triphosphat **60** in PBS- und PLE-Medium zeigt deutlich, dass PLE die Hydrolyse dieser beiden Verbindungen **58** und **60** deutlich beschleunigt. Aufgrund der hohen Stabilitäten kann ausgeschlossen werden, dass diese beiden Substanzen **58** und **60** zur Bildung von Nebenprodukten bei den Hydrolysen oder Zellaufnahmestudien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** beitragen.

6.1.7.5 Hydrolyse der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung BCNA-12

In allen durchgeführten Hydrolysen kam es erwartungsgemäß zur Bildung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54**. Der Ablauf der Hydrolyse entspricht demnach dem postulierten Mechanismus aus **Abbildung 70**. Es soll nun anhand einer der beiden synthetisierten γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **54** deren Stabilität untersucht werden. Mit den Ergebnissen kann anschließend abgeschätzt werden, aus welchen Verbindungen die erhaltenen Abbauprodukte bei den Hydrolysen der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** entstanden sind. In **Abbildung 81** ist die Verbindung BCNA-12 (**54y**) dargestellt, dabei handelt es sich um die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung mit einem C₁₁H₂₃-Alkylrest. Diese Verbindung wurde für Stabilitätsuntersuchungen im PBS- und PLE-Medium verwendet.

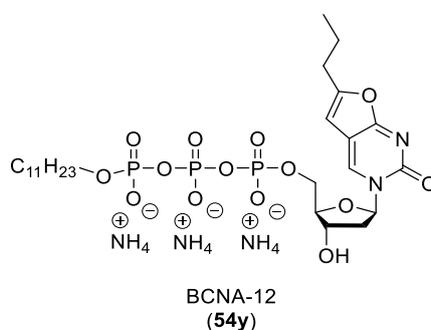


Abbildung 81: Darstellung von BCNA-12 (**54y**), dabei handelt es sich um die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung, deren Stabilität ebenfalls untersucht wurde.

Der Ablauf der PBS-Hydrolyse entspricht der in **Kapitel 6.1.7.1** beschriebenen Durchführung. Die Halbwertszeit von BCNA-12 (**54y**) in PBS-Puffer beträgt 3465 Stunden. Eine Hydrolyse der Verbindung findet somit nur extrem langsam statt. Dies deckt sich mit der Betrachtung der Chromatogramme, dabei war nahezu keine Abnahme des Peaks zu erkennen. Die bei der PBS-Hydrolyse der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** erhaltenen Hydrolyseprodukte stammen somit ausschließlich aus dem untersuchten Prodrug. Die γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **54** haben dabei keinen Einfluss. Bereits bei der Hydrolyse einer γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung von ZHAO⁷⁶ wurde eine sehr hohe Stabilität beobachtet, dabei kam es nur zur Bildung einer geringen Menge Diphosphat.

Die Durchführung der Hydrolyse im PLE-Medium wurde etwas abgeändert im Vergleich zu dem bisher verwendeten Protokoll. Aufgrund der sehr hohen Halbwertszeit im PBS-Medium kann auch bei der PLE-Hydrolyse mit einer sehr hohen Stabilität gerechnet werden. Die bisher verwendeten sehr kurzen Hydrolysezeiträume insbesondere zu Beginn sind damit unnötig, da sie kaum eine Veränderung anzeigen dürften. Es wurde deswegen nur zu Beginn der Hydrolyse und nach 24 Stunden je eine Probe entnommen und anschließend mittels HPLC

(Methode A) vermessen. Eine weitere entnommene Probe nach 48 Stunden diente zum einen zum Sichern der Ergebnisse und außerdem, um festzustellen, ob das Enzym nach 48 Stunden in der Hydrolyselösung noch aktiv ist. Dabei konnte ermittelt werden, dass das Enzym nach 24 Stunden keine Aktivität mehr aufweist, da nur in diesem Zeitraum eine Abnahme der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54y** stattfand. Deswegen wurden die Werte nach 48 Stunden nicht für die Berechnung der Halbwertszeit verwendet. Für die Absicherung der erhaltenen Ergebnisse wurde von allen Messungen eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die auf diese Weise errechnete Halbwertszeit von BCNA-12 (**54y**) im PLE-Medium liegt bei 898 Stunden. Da diese Halbwertszeit weit oberhalb der betrachteten Zeiträume der PLE-Hydrolyse liegt und für diese lange Zeitspanne keine gleichbleibende Enzymaktivität angenommen werden kann, wird ein Einfluss der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54** ausgeschlossen. Somit gehen alle erhaltenen Hydrolyseprodukte auf die Hydrolyse der ursprünglichen second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** zurück. Die hohe Stabilität der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **54** stimmt mit den Ergebnissen von GOLLNEST⁷¹, REIMER⁶⁹ und ZHAO⁷⁶ überein. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Phosphoranhydridbindungen mit nur einem Substituenten stabil sind, da die zusätzliche negative Ladung einen nucleophilen Angriff verhindert. Dies spiegelt sich in der hohen Stabilität dieser Verbindung wider.

6.1.7.6 Fazit der Hydrolysen

Die Hydrolysen der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** führten bei allen Verbindungen zur erfolgreichen Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung als Hauptprodukt. Der Ablauf der Hydrolyse folgt also bei allen Verbindungen dem in **Abbildung 70** postulierten Mechanismus. Bei der PBS-Hydrolyse kam es vor allem bei den Verbindungen mit einem längeren Alkylrest (BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**)) durch die Spaltung der Phosphoranhydridbindung zur Bildung des Diphosphats. Eine Steigerung der Stabilität mit zunehmender Kettenlänge der Maskierungseinheit konnte nur teilweise beobachtet werden. Bei den TriPPPro-Verbindungen BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) konnte kein Einfluss der Kettenlänge in der Maskierungseinheit auf die Stabilität festgestellt werden. Die kurzkettigen Prodrugs BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**) wiesen mit steigender Kettenlänge eine geringere Stabilität auf.

Die Hydrolyse im PLE-Medium führt zu einer schnelleren Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung. Es ist sowohl bei den Prodrugs mit C₁₈H₃₇- als auch mit C₁₁H₂₃-Alkylrest ein Anstieg der Stabilität mit steigender Alkylkettenlänge in der Maskierungseinheit zu beobachten. Bei den Prodrugs BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) erfolgt der Anstieg der Halbwertszeit nur bis zu BCNA-06 (**53fz**), BCNA-07 (**53gz**) weist im Vergleich dazu eine geringere Stabilität auf. Die Stabilität der kurzkettigen TriPPPro-Verbindungen steigt mit steigender Alkylkettenlänge stark an. Die Halbwertszeit von BCNA-08 (**53ay**) und BCNA-09

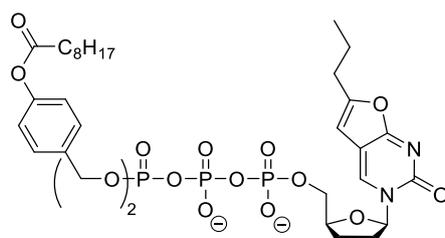
(**53cy**) liegt bei wenigen Minuten, wohingegen die Halbwertszeit von BCNA-10 (**53gy**) bei über 15 Stunden liegt. Bei der PLE-Hydrolyse spielt die Spaltung der Phosphoranhydridbindungen eine geringere Rolle als bei der PBS-Hydrolyse, da es enzymbedingt zu einer schnelleren Abspaltung der Maskierungseinheit kommt.

Die Hydrolyse von BCNA-06 (**53fz**) im CEM/0-Zellextrakt zeigt eine schnellere und selektivere Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung. Damit geht eine geringere Halbwertszeit einher. Der Anteil an gebildetem Diphosphat ist geringer im Vergleich zu den Hydrolysen in PBS- und PLE-Medium. Es konnte dadurch eindeutig gezeigt werden, dass eine Abnahme der Halbwertszeit und der damit verbundenen schnelleren enzymatischen Spaltung der Maskierungseinheit zu einem geringeren Einfluss der Diphosphatbildung führt.

Die Hydrolysen vom Diphosphat, Triphosphat und von der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung BCNA-12 (**54y**) lieferten sehr hohe Halbwertszeiten. Deswegen kann ausgeschlossen werden, dass es während der Hydrolyse der TriPPPro-Verbindungen BCNA-01 (**53az**) - BCNA-10 (**53gy**) zu deren Zersetzung kommt. Es kann also angenommen werden, dass die erhaltenen Produkte alle aus der untersuchten TriPPPro-Verbindung stammen. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass diese Verbindungen auch bei den durchgeführten Zellaufnahmestudien stabil sind.

6.1.8 Zellaufnahmestudien der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Aufgrund des unnatürlichen Absorptionsmaximums der BCNAs bei 330 nm eignen sie sich hervorragend für Zellaufnahmestudien, da es zu keiner Überlagerung mit Zellbestandteilen kommen kann und die erhaltenen Peaks eindeutig zugeordnet werden können. Außerdem kann aufgrund der Fluoreszenz der bicyclischen Nucleosidanaloga die Analyse mittels FLD-Detektors erfolgen. Da es kaum fluoreszente zelluläre Bestandteile gibt, kann damit ebenfalls eine Peaküberlagerung vermieden werden.⁶⁹⁻⁷¹ Durch Verwendung der BCNA-TriPPPro-Verbindung **122** konnte GOLLNEST⁷¹ erstmalig beweisen, dass diese Prodrugs in die Zelle gelangen und es intrazellulär durch die Abspaltung der AB-Maskierungseinheiten zur Freisetzung des Triphosphats kam (s. **Abbildung 82**).



122

Abbildung 82: Darstellung der BCNA-TriPPPro-Verbindung **122**, die von GOLLNEST für den Nachweis der Zellaufnahme und des intrazellulären Metabolismus verwendet wurde.

Es soll nun in verschiedenen Zellaufnahmestudien untersucht werden, ob die second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen die Zellmembran passieren können und intrazellulär die Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung erfolgt.

6.1.8.1 Zellaufnahme in CEM-SS-Zellen

GOLLNEST⁷¹ konnte durch Verwendung der BCNA-TriPPPro-Verbindung **122** in CEM-SS-Zellen die erfolgreiche Aufnahme sowie Freisetzung des Triphosphats zeigen. Es kam allerdings zu einer schnellen extrazellulären Zersetzung des Prodrugs, so lag nach einer Stunde bereits ein Gemisch aller Phosphorverbindungen vor. Nach drei Stunden war das Diphosphat extrazellulär das Hauptprodukt. Aufgrund der schnellen extrazellulären Zersetzung konnte nur ein Teil der eingesetzten Substanzmenge aufgenommen werden. Intrazellulär konnte bereits nach einer Stunde die erfolgreiche Freisetzung des Triphosphats beobachtet werden, allerdings wurde dieses bis zur zweiten Messung nach drei Stunden vollständig zum Diphosphat dephosphoryliert. Es lag nun intrazellulär ein Gemisch aus Diphosphat, Monophosphat und Nucleosid vor. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von REIMER⁶⁹ das verwendete Protokoll der Zellaufnahmestudien angepasst. Zum einen wurde die Konzentration von 100 μM auf 10 μM reduziert, damit die verwendete Konzentration im Bereich von antiviralen Tests liegt. Da der CC_{50} -Wert der zu untersuchenden *cycloSal*-Verbindung nur knapp über der vorher verwendeten Konzentration lag, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dies ebenfalls zu Beeinträchtigungen bei der Testdurchführung führte. Außerdem wurde die Reaktionszeit von einer und drei Stunden auf 15 und 60 Minuten reduziert, damit es nur zur Metabolisierung des Prodrugs kommt, nicht aber von dessen Produkten.

REIMER⁶⁹ konnte durch die so durchgeführten Zellaufnahmestudien zeigen, dass es zur Aufnahme der DiPPPro-Verbindungen und zur Freisetzung des Diphosphats kommt. Bereits nach 15 Minuten war das symmetrisch-maskierte Prodrug sowie das Intermediat vollständig zum Diphosphat umgesetzt worden. Bei der zweiten Messung nach 60 Minuten konnte der

Abbau des Diphosphats durch einen Anstieg des Monophosphatpeaks beobachtet werden. Bei Verwendung einer nicht-symmetrisch-maskierten DiPPro-Verbindung konnte REIMER ebenfalls die intrazelluläre Freisetzung zeigen, es konnte außerdem ein verbessertes Verhältnis von Diphosphat zu Monophosphat beobachtet werden. Sowohl bei dem symmetrisch als auch bei dem nicht-symmetrisch maskierten Prodrug konnte extrazellulär kaum DiPPro-Verbindung nachgewiesen werden. REIMER gelang außerdem auch der Nachweis der erfolgreichen Zellaufnahme einer monomaskierten DiPPro-Verbindung. Hier war allerdings die Konzentration des Prodrugs im extrazellulären Raum größer als bei den zweifach-maskierten. Bei dieser Verbindung ist nur ein Substituent an der γ -Phosphatgruppe vorhanden, dadurch ist die Lipophilie geringer und die negativen Ladungen der Phosphatgruppen werden schlechter maskiert, wodurch es zu einer langsameren Zellaufnahme kommt. Dies führt zu einer langsameren Freisetzung des Diphosphats und dadurch zu einem besseren Diphosphat/Monophosphat-Verhältnis.

Bei der Zellaufnahme einer nicht-symmetrischen TriPPro-Verbindung von REIMER⁶⁹ kam es extrazellulär kaum zur Zersetzung des Prodrugs, dieses war auch nach 60 Minuten die vorherrschende Verbindung. Intrazellulär konnte bereits nach 15 Minuten die erfolgreiche Freisetzung des Triphosphats festgestellt werden, außerdem konnte die Bildung des Diphosphats und des Monophosphats beobachtet werden. Bei der zweiten Messung nach 60 Minuten wurde detektiert, dass nun das Monophosphat der Hauptmetabolit ist. Vorher durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass das Diphosphat eine hohe Stabilität aufweist, die nun erhaltene hohe Konzentration des Monophosphats kann somit nicht nur durch den Abbau des Diphosphats entstanden sein. Dies deutet auf das Vorhandensein von Pyrophosphatasen hin, die das Triphosphat direkt zum Monophosphat abbauen. Die Zellaufnahmestudien einer monomaskierten TriPPro-Verbindung zeigten eine hohe Stabilität des Prodrugs im extrazellulären Raum. Intrazellulär konnte die erfolgreiche Freisetzung des Triphosphats gezeigt werden, allerdings wurden auch hier das Diphosphat und das Monophosphat gebildet. Eine Erhöhung des Triphosphatanteils, wie dies zuvor bei der monomaskierten DiPPro-Verbindung gezeigt werden konnte, wurde nicht beobachtet.

Die Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen sollten mit zwei second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPro-Verbindungen **53** sowie den beiden γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPro-Verbindungen **54** durchgeführt werden. In **Kapitel 6.1.4** wurde die Lipophilie der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPro-Verbindungen **53** mit der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPro-Verbindung **100** von WITT, die vielversprechende Ergebnisse bei Zellaufnahmestudien lieferte, verglichen. Von den second-generation BCNA-TriPPro-Verbindungen **53** sollte nun je ein Vertreter mit einem C₁₈H₃₇- und C₁₁H₂₃-Alkylrest hinsichtlich ihrer Aufnahme in CEM-SS-Zellen untersucht werden. Es wurde jeweils die Verbindung gewählt, deren Lipophilie am meisten der von WITTS Verbindung **100** entsprach, da von diesen die beste Zellaufnahme erwartet wurde (s. Lipophilievergleich in **Kapitel 6.1.4**). Zusätzlich wurden die beiden γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPro-Verbindungen **53** hinsichtlich ihrer Zellaufnahme untersucht. Es sollte

ermittelt werden, ob der Alkylsubstituent für eine ausreichende Lipophilie und Abschirmung der negativen Ladungen sorgt, damit die Verbindungen in die Zelle gelangen können. In **Abbildung 83** sind die vier 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen BCNA-02 (**53bz**), BCNA-10 (**53gy**), BCNA-11 (**54z**) und BCNA-12 (**54y**) dargestellt, die in diesen Zellaufnahmestudien untersucht wurden.

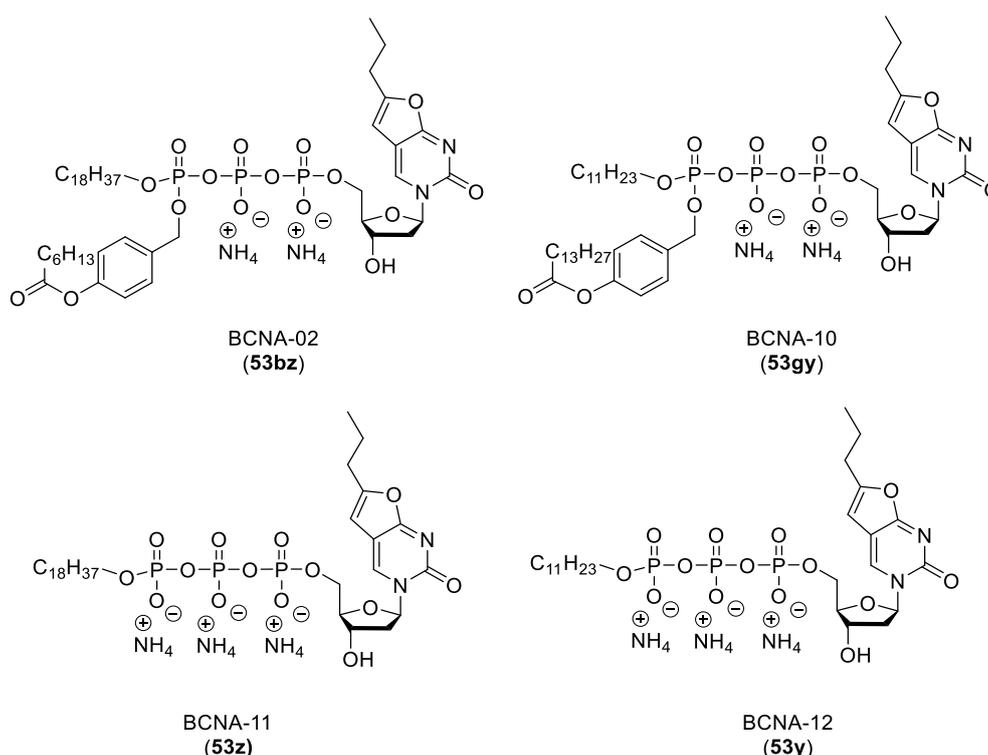


Abbildung 83: Übersicht der bei den CEM-SS-Zellaufnahmestudien verwendeten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen BCNA-02 (**53bz**), BCNA-10 (**53gy**), BCNA-11 (**54z**) und BCNA-12 (**54y**).

Die Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen wurden von DR. ILONA HAUBER am Leibniz-Institut für Virologie in Hamburg durchgeführt. Die CEM-SS-Zellen wurden im Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, pH 7.5, 10% fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamin) expandiert bis 10⁹ Zellen vorlagen. Anschließend wurden die Zellen in 20 mL Zellkulturmedium aufgenommen und 60 Minuten bzw. drei Stunden mit dem Prodrug (Konzentration 10 µM) bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der höheren Stabilität der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** wurden die Inkubationszeiten im Vergleich zu REIMERS Experimenten verlängert, damit intrazellulär eine Freisetzung der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindung **54** beobachtet werden kann. Die Zellen wurden zweimal intensiv mit PBS gewaschen, zentrifugiert und eingefroren. Bis zur Analyse der erhaltenen Zellpellets wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die erhaltene Waschlösung wurde über einen Spritzenfilter filtriert und durch RP-HPLC (Methode A) analysiert. Die

Zellpellets wurden mit 170 μL eines kalten Methanol/Wasser-Gemisches (2:1 v:v) suspendiert, anschließend 10 Minuten im Ultraschallbad und 10 Minuten im Eisbad gelagert, zum Schluss wurde 10 Minuten bei 14 000 rpm und 0 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde abgenommen, über einen Spritzenfilter filtriert und ebenfalls mittels HPL-Chromatographie (Methode A) analysiert. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 100 μL .

Im Folgenden sollen die erhaltenen Ergebnisse dargestellt werden. Bei den Verbindungen BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-10 (**53gy**) wurde die Probe mit 60 Minuten Inkubationszeit zweimal durchgeführt. Die Aufarbeitung der erhaltenen Waschlösungen zeigte, dass darin kein Prodrug oder dessen Abbauprodukte gefunden werden konnte, deshalb sind diese Chromatogramme hier nicht abgebildet. Alle untersuchten Verbindungen sind somit in der Lage die Zellmembran im betrachteten Zeitraum zu passieren.

In **Abbildung 84** sind die erhaltenen Ergebnisse von BCNA-02 (**53bz**) gezeigt. BCNA-02 (**53bz**) wurde als Vertreter der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit dem $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ -Alkylrest bei diesen Zellaufnahmestudien untersucht.

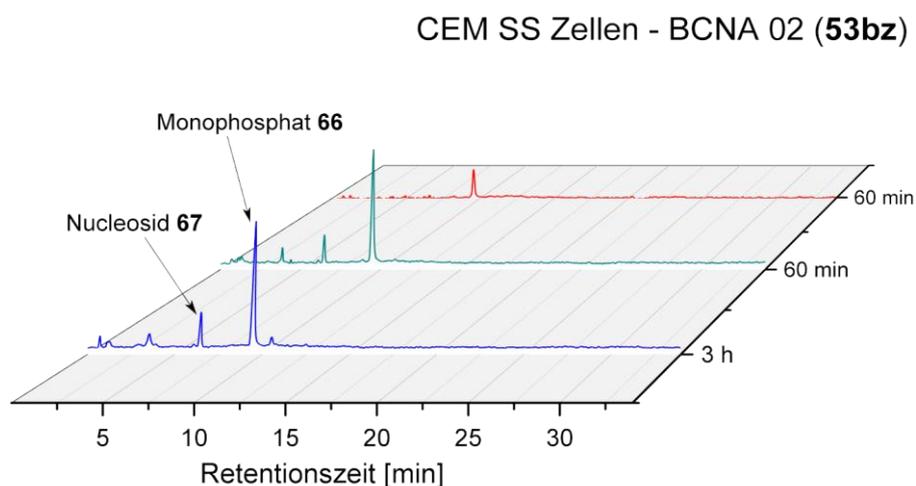


Abbildung 84: Zellaufnahmestudien von BCNA-02 (**53bz**) in CEM SS-Zellen.

Da in den erhaltenen Chromatogrammen das Monophosphat **66** und das Nucleosid **67** nachgewiesen werden konnten, muss BCNA-02 (**53bz**) in der Lage sein, die Zellmembran zu passieren. Intrazellulär kommt es schnell zum Abbau der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindung **53bz**. Bereits nach 60 Minuten ist nur noch das Monophosphat **66** und das Nucleosid **67** zu beobachten. Da auch nach drei Stunden sowohl das Monophosphat **66** als auch das Nucleosid **67** im gleichen Verhältnis wie vorher vorliegen, kann angenommen werden, dass beide Verbindungen aus einer bereits vollständig abgebauten Substanz stammen. Der Monophosphatpeak bleibt über den betrachteten Zeitraum konstant, dies

spricht für eine hohe Stabilität des Monophosphats **66** und dafür, dass das Nucleosid **67** aus einer anderen Verbindung gebildet werden muss. Die Ergebnisse stimmen mit den Studien von REIMER⁶⁹ überein. Auch REIMER konnte aufgrund des Vorhandenseins von Pyrophosphatasen das Monophosphat bei ihren Zellaufnahmestudien detektieren. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse des Triphosphats bzw. bei den hier untersuchten Verbindungen der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen **54z** zum Monophosphat **66**.

In **Abbildung 85** sind die Ergebnisse der Zellaufnahmestudien von BCNA-10 dargestellt. BCNA-10 (**53gy**) wurde stellvertretend für die 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen mit einem C₁₁H₂₃-Alkylsubstituent untersucht.

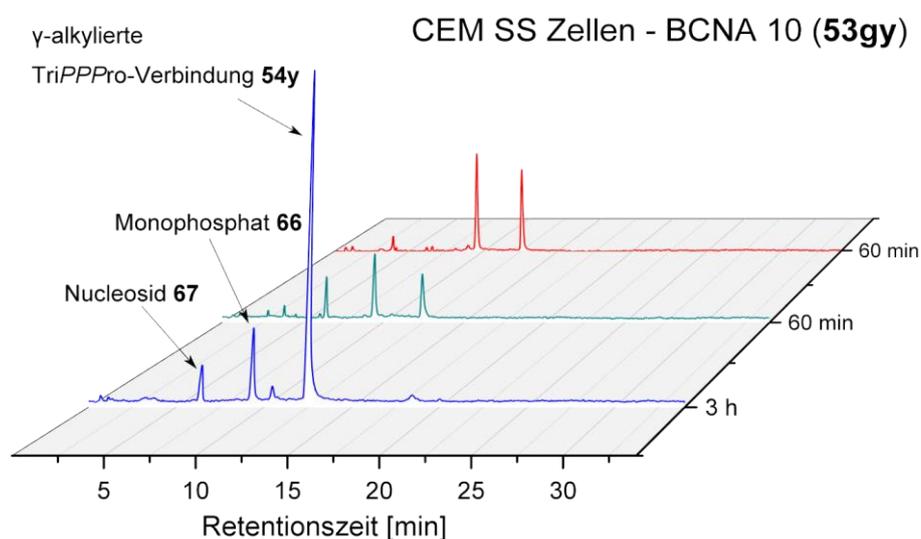


Abbildung 85: Ergebnisse der Zellaufnahmestudien von BCNA-10 (**53gy**) in CEM-SS-Zellen.

Die abgebildeten Chromatogramme zeigen, dass die Zellaufnahme von BCNA-10 (**53gy**) erfolgreich war und es intrazellulär zur zügigen Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54y** kommt. Nach 60 Minuten ist das untersuchte Prodrug **53gy** bereits vollständig metabolisiert worden, es werden nur noch die Abbauprodukte (γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung, Monophosphat und Nucleosid) erhalten. Die Metabolisierung von BCNA-10 (**53gy**) liefert nach 60 Minuten die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung **54y** und das Monophosphat **66**. Die Konzentration des Monophosphats **66** ist zu diesem Zeitpunkt höher. In einer der beiden Messungen wurde außerdem zu diesem Zeitpunkt die Bildung des Nucleosids **67** beobachtet. Nach drei Stunden ist die Konzentration der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54y** größer, dies kann an einer verzögerten Zellaufnahme und dadurch verlangsamten Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54y** liegen. Auch hier führen die vorhandenen Pyrophosphatasen zur Bildung des Monophosphats **66**.

Bei der Untersuchung der Zellaufnahme der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindungen BCNA-11 (**54z**) und BCNA-12 (**54y**) wurde nur eine Inkubationszeit von 60 Minuten verwendet. Bei diesen Verbindungen sollte vordergründig untersucht werden, ob die Lipophilie der Verbindungen für die Zellaufnahme ausreichend ist. Bei der Auswertung von BCNA-11 (**54z**) konnte weder im intrazellulären noch im extrazellulären Bereich das Prodrug **54z** oder dessen Abbauprodukte beobachtet werden, deswegen wurde auf eine Abbildung verzichtet. Die Auswertung von BCNA-12 (**54y**) ist in **Abbildung 86** dargestellt. Auch für diese Verbindung wurde kein Signal im extrazellulären Medium beobachtet.

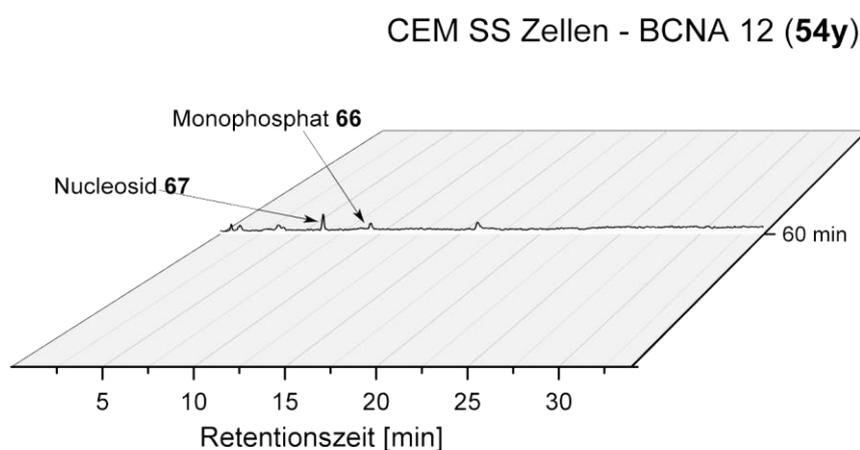


Abbildung 86: Ergebnisse der Zellaufnahmestudien mit BCNA-12 in CEM-SS-Zellen.

Aufgrund des Vorhandenseins von dem Monophosphat **66** und dem Nucleosid **67** im Chromatogramm konnte die Zellaufnahme von BCNA-12 (**54y**) bestätigt werden. Gleichzeitig kann festgestellt werden, dass die Stabilität der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54y** intrazellulär gering ist, da bereits nach 60 Minuten nur ihre Abbauprodukte detektiert werden konnten. Es wird sowohl die Bildung des Monophosphats **66** als auch des Nucleosids **67** beobachtet, wobei die Konzentration des Nucleosids **67** überwiegt. Die geringe Konzentration der intrazellulären Metabolisierungsprodukte von BCNA-12 (**54y**) und die fehlenden Signale für BCNA-11 (**54z**) lassen darauf schließen, dass die Substanzen in der Zellmembran stecken bleiben und langsamer aufgenommen werden als BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-10 (**53gy**).

Mithilfe dieser Zellaufnahmestudien konnte die erfolgreiche Aufnahme der Verbindungen in die Zelle beobachtet werden. Intrazellulär war die Hydrolyse der Prodrugs allerdings vor allem bei BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-12 (**54y**) weit fortgeschritten, nur bei BCNA-10 (**53gy**) konnte die γ -alkylierte TriPPPro-Verbindung als Hauptkomponente in der Zelle beobachtet werden, weswegen die Zellaufnahmestudien mit verkürzten Inkubationszeiten wiederholt wurden. Diese Wiederholung wurde von PROF. DR. THOMAS DOBNER und TINA MEYER am Leibniz-

Institut für Virologie in Hamburg durchgeführt. Die Auswertung erfolgte zusammen mit MICHELLE VOIGTS, die die Auswertung über massenspektrometrische Methoden durchführte. Die aufgenommenen Substanzmengen sollten mithilfe einer Kalibriergeraden quantifiziert werden. Die Durchführung der Zellaufnahmestudien entsprach dem oben beschriebenen Vorgehen, lediglich die Inkubationszeiten wurden auf 30 bzw. 60 Minuten verkürzt.

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse von BCNA-02 (**53bz**) diskutiert. Von den anderen untersuchten TriPPPro-Verbindungen konnten bei der Auswertung keine Signale detektiert werden. In **Abbildung 87** sind die erhaltenen Chromatogramme von BCNA-02 (**53bz**) dargestellt. Bei der Analyse der Waschlösung konnte keine Substanz detektiert werden, weswegen sich im Folgenden erneut auf den intrazellulären Raum beschränkt wird.

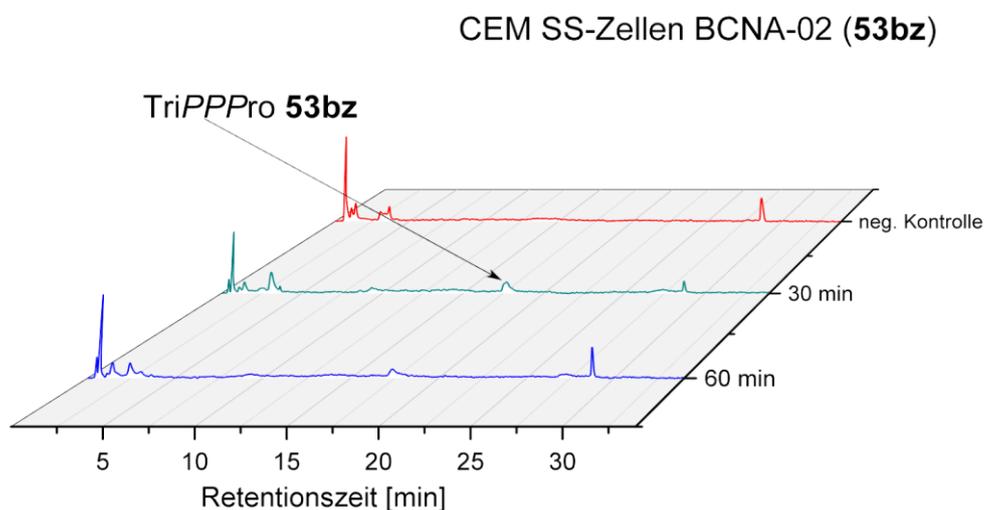


Abbildung 87: Ergebnisse der zweiten Zellaufnahmestudien von BCNA-02 (**53bz**) in CEM-SS-Zellen.

Bei der erneuten Durchführung der Zellaufnahmestudien konnte sowohl nach 30 als auch nach 60 Minuten das Prodrug **53bz** in der Zelle detektiert werden. Die Abbauprodukte konnten zu keinem Zeitpunkt gefunden werden, dies kann an einer zu geringen Konzentration der gebildeten Produkte liegen. Diese Ergebnisse überraschen, da im ersten Durchgang bereits nach 60 Minuten der Abbau des Prodrugs **53bz** beobachtet werden konnte und nur noch das Monophosphat **66** und das Nucleosid **67** vorhanden waren.

Im Folgenden soll auf die Berechnung der Konzentration von BCNA-02 (**53bz**) eingegangen werden. In **Abbildung 88** und **Tabelle 10** ist die verwendete Kalibriergerade dargestellt. Diese wurde durch Vermessen vorher festgelegter Konzentrationen mittels HPL-Chromatographie (Methode A) und anschließendem Auftragen der Konzentration gegen die erhaltene Peakfläche erstellt. Mithilfe dieser Kalibriergeraden soll durch die erhaltenen Peakflächen aus den Chromatogrammen die Konzentration des Prodrugs in der Zelle berechnet werden. In

Tabelle 10 ist außerdem die Genauigkeit des erhaltenen Messwerts sowie der sog. Standard Query Status, der eine Auskunft über die Qualität der Messwerte angibt, abgebildet. In **Tabelle 11** sind die erhaltenen Messwerte der Zellaufnahmestudien aufgeführt. Der aufgenommene Anteil von BCNA-02 (**53bz**) liegt nach 30 Minuten bei 7.7% und nach 60 Minuten bei 5.7%. Die Abnahme des Anteils wurde erwartet, da die Verbindung im intrazellulären Bereich abgebaut wird. Die Menge an aufgenommener Substanz ist relativ gering, möglicherweise hängt noch ein Teil des Prodrugs in der Zellmembran fest und benötigt mehr Zeit, um freigesetzt zu werden.

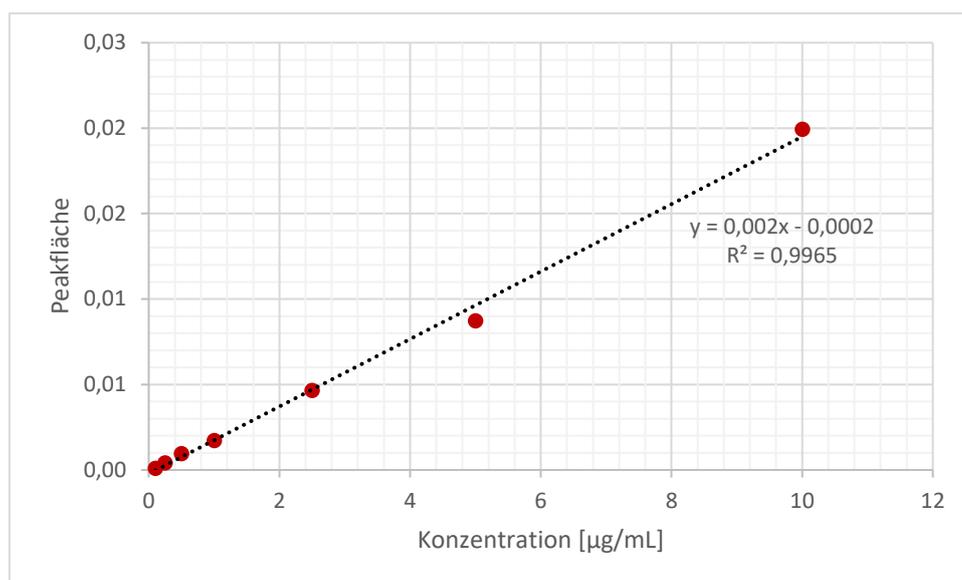


Abbildung 88: Kalibrationskurve für die Bestimmung der Konzentration von BCNA-02 (**53bz**) in den CEM-SS-Zellen.

Tabelle 10: Verwendete Messwerte für die Erstellung der Kalibrationskurve von BCNA-02 (**53bz**).

Konzentration [µg/mL]	Peakfläche des Analyten	Berechnete Konzentration [µg/mL]	Genauigkeit [%]	Standard query status
0.1	9,25E-05	0.05	53	False
0.25	4,26E-04	0.22	14	True
0.5	9,56E-04	0.48	3	True
1.0	0,00173	0.88	12	True
2.5	0,00466	2.36	6	True
5.0	0,00874	4.43	11	True
10	0,01994	10.10	1	True

Tabelle 11: Erhaltene Messwerte von BCNA-02 (**53bz**).

Inkubationszeit [min]	Peakfläche des Analyten	Berechnete Konzentration [µg/mL]	Menge des Analyten in der Zelle [%]*
30	0,00141	0,805	7.7
60	0,000992022	0,596011	5.7

* 100% beziehen sich auf 10 µM inkubierte Verbindung

6.1.8.2 Fazit der Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen

Es ist gelungen bei den Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen die erfolgreiche Aufnahme von BCNA-02 (**53bz**), BCNA-10 (**53gy**) und BCNA-12 (**54y**) zu zeigen. Der Abbau der Verbindungen unterscheidet sich jedoch. So wird BCNA-02 (**53bz**) in der ersten Durchführung der Zelltests komplett zum Monophosphat **66** und Nucleosid **67** abgebaut und in der zweiten Durchführung nur das Prodrug **53bz** detektiert. Es wurde bei BCNA-02 (**53bz**) keine γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54z** nachgewiesen. Der unterschiedliche Abbau kann möglicherweise durch die längere Lagerung der ersten Zelltests bei -80 °C begründet werden. BCNA-10 (**53gy**) dagegen wird zur γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y** hydrolysiert. Bei dieser Verbindung **54y** handelt es sich um das Hauptprodukt, obwohl auch hier das Monophosphat **66** und das Nucleosid **67** detektiert werden konnten. Diese Zellaufnahmestudien haben außerdem gezeigt, dass die Lipophilie der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung BCNA-12 (**54y**) ausreicht, um in die Zelle zu gelangen. Auch wenn BCNA-12 (**54y**) intrazellulär nicht selbst nachgewiesen werden konnte, so kann durch die Detektion der Abbauprodukte eine Zellaufnahme indirekt gezeigt werden.

6.1.8.3 Zellaufnahme in Krebszellen

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Zellaufnahme der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** in Krebszellen und des anschließenden intrazellulären Metabolismus. Die Zellaufnahmestudien wurden von PROF. DR. UDO SCHUMACHER und SIMON REMUS am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf durchgeführt. Für die Zellaufnahmestudien wurden mehrere verschiedene Krebszelllinien verwendet, damit eine fundierte Aussage über die Zellaufnahme und Metabolisierung der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** getroffen werden kann. Bei den verwendeten Tumorarten handelt es sich um das Pankreaskarzinom (BxPC3, Paca-5061), kleinzelliges Lungenkarzinom (H69AR-1), Kolonkarzinom (HCT116, HAT 29, SW 620), Neuroblastom

(HOS SKNSH), maligne Melanom (Mewo, MV 3), Ovarialkarzinom (Ovcar 3, SKOV-3), Prostatakarzinom (PC 3), Mundhöhlenkarzinom (UTSCC-2) und die akute myeloische Leukämie (Molm 13). Die verwendeten Zellen wurden im Zellkulturmedium in T175-Zellkulturflaschen expandiert, mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 10 mL Zellkulturmedium aufgenommen. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C für 60 Minuten mit einer Konzentration von 10 µM. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 2 mL davon für die spätere Aufarbeitung entnommen und eingefroren. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und fünf Minuten zentrifugiert (1 500 rpm). Der erhaltene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 mL PBS-Puffer suspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauerkammer. Die Suspension wurde erneut fünf Minuten bei 1 500 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Zellpellet wieder in PBS-Puffer suspendiert, zwei Minuten zentrifugiert und vom Überstand befreit. Das so erhaltene Zellpellet wurde eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Vor der Analyse des Überstands und des Zellpellets mittels HPL-Chromatographie, erfolgte die Aufarbeitung. Der Überstand wurde über einen Spritzenfilter gereinigt und dann direkt vermessen (Injektionsvolumen 100 µL, HPLC-Methode A). Das Zellpellet wurde in 170 µL einer eiskalten Methanol-Wasser-Lösung (2:1 v:v) suspendiert, zehn Minuten im Ultraschallbad und zehn Minuten im Eisbad gelagert, zum Schluss wurde zehn Minuten zentrifugiert (14 000 rpm, 0 °C). Der Überstand wurde abgenommen, über einen Spritzenfilter gereinigt und anschließend mittels HPLC analysiert (Injektionsvolumen 100 µL, HPLC-Methode A).

Die Zellaufnahmestudien in Krebszellen haben gezeigt, dass alle second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** in die Zelle aufgenommen werden und intrazellulär die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54** als Hauptmetabolit vorliegt. Die Zellaufnahme ist wie erwartet in Abhängigkeit der Lipophilie unterschiedlich gut und hängt zusätzlich noch von der betrachteten Zelllinie ab. Diese beiden Gründe führen zu unterschiedlichen Konzentrationen der Metabolite. Es kann bereits im Extrazellularraum die Zersetzung des Prodrugs **53** beobachtet werden, so werden hier neben dem Prodrug **53** auch die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54**, das Diphosphat **58** und Monophosphat **66** detektiert. Aufgrund der Zersetzung des Prodrugs **53** kann nicht die gesamte eingesetzte Substanz in die Zelle aufgenommen werden, da die geladenen Verbindungen nicht in der Lage sind die Zellmembran zu passieren. Intrazellulär findet der erwartete Metabolismus des Prodrugs zur γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** statt. Nur bei wenigen Zelllinien kommt es mit der Bildung von Monophosphat **66** bzw. von Nucleosid **67** zur Nebenproduktbildung, allerdings ist deren Anteil gering. Die unterschiedliche Lipophilie führt zu einer verschieden guten Zellaufnahme, dadurch unterscheiden sich die Konzentrationen der Verbindungen in der Zelle zum Teil erheblich.

Im Folgenden soll auf drei Zelllinien näher eingegangen werden. Mithilfe dieser Zelllinien sollen die Ergebnisse exemplarisch anhand der erhaltenen Chromatogramme diskutiert werden.

Zunächst soll auf die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3 eingegangen werden. Die Chromatogramme des Überstands sind in **Abbildung 89** dargestellt.

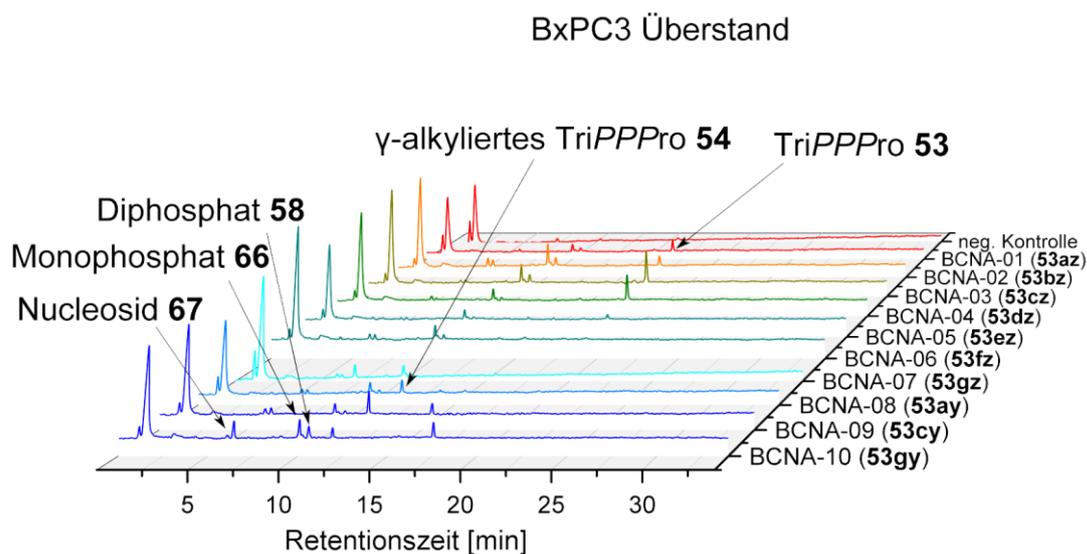


Abbildung 89: Chromatogramme der Überstände der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3.

In den Chromatogrammen der Überstände ist zu erkennen, dass bei den meisten noch Prodrug vorhanden ist. Der gewählte Zeitrahmen war bei dieser Zelllinie folglich zu kurz, damit es zur vollständigen Zellaufnahme der TriPPPPro-Verbindungen kommen kann. Von den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit langer Alkylkette (BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**)) liegt von den Vertretern mit einer AB-Maskierungseinheit ab C₁₁H₂₃-Alkylrest (BCNA-06 (**53fz**)) kein Prodrug mehr vor. Eine längere Alkylkette scheint bei dieser Zelllinie zu einer besseren Aufnahme zu führen. Die detektierte Menge von BCNA-03 (**53cz**) und BCNA-04 (**53dz**) ist am größten, hier scheint die Zellaufnahme am langsamsten zu erfolgen. Außerdem liegt von BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) extrazellulär keine γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54z** vor. Diese Verbindungen werden im extrazellulären Raum nur an den Phosphoranhydridbindungen gespalten, eine Abspaltung der AB-Maskierungseinheit wird nicht beobachtet. Die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen mit kürzerer Alkylkette (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)) werden ebenfalls bereits im Extrazellulären hydrolysiert. Hier kommt es bereits dort zur Abspaltung der Maskierungseinheit und der damit verbundenen Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y**. Bei allen untersuchten TriPPPPro-Verbindungen **53** konnte die Zersetzung in das Di- **58** und Monophosphat **66** sowie das Nucleosid **67** durch den Bruch der Phosphoranhydridbindungen beobachtet werden. Durch die Metabolisierung der TriPPPPro-Verbindungen **53** konnte nicht die gesamte eingesetzte Substanzmenge aufgenommen werden, da vor allem die geladenen Moleküle nicht durch die Zellmembran diffundieren können.

Als nächstes soll nun das Verhalten der 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** in der BxPC3-Zelllinie betrachtet werden. Die erhaltenen Chromatogramme der Zellaufnahme sind in **Abbildung 90** dargestellt.

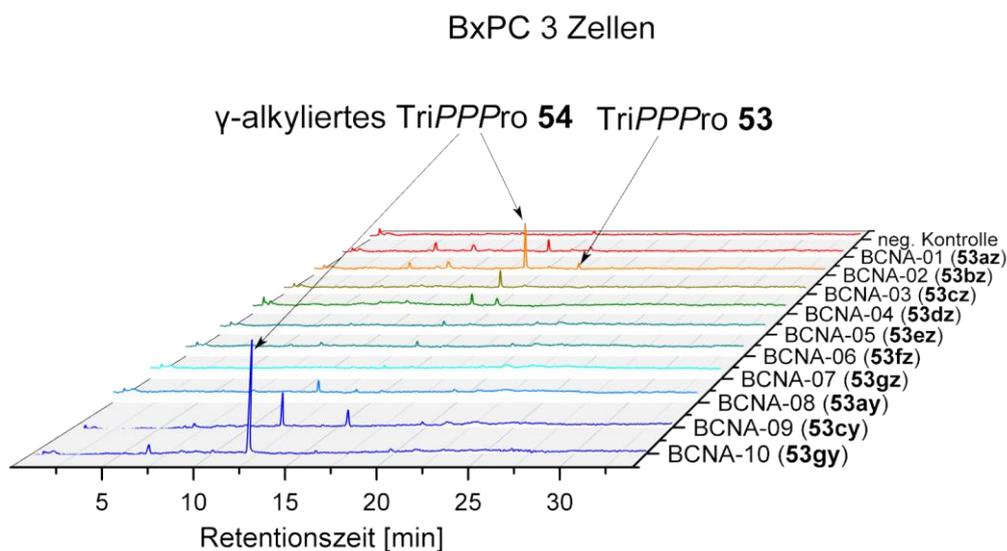


Abbildung 90: Chromatogramme der Zellaufnahmestudien mit BxPC3-Zellen.

Intrazellulär ist die Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** bei fast allen Verbindungen **53** zu beobachten. Das Vorliegen des eingesetzten Prodrugs kann nur bei BCNA-01 (**53az**), BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-09 (**53cy**) beobachtet werden, alle anderen wurden bereits vollständig abgebaut. Bei dieser Zelllinie ist gut zu erkennen, dass die Verbindungen **53** unterschiedlich gut in die Zelle aufgenommen werden. Mit steigender Lipophilie wird die Zellaufnahme der langkettigen TriPPPPro-Verbindungen **53az** - **53gz** schlechter, wodurch die Menge an detektierter γ -alkylierter TriPPPPro-Verbindung **54z** sinkt. GOLLNEST⁷¹ konnte bereits beobachten, dass eine zu hohe Lipophilie zu einer schlechteren Zellaufnahme führt. Seine Hypothese war, dass die langkettigen Verbindungen in der Zellmembran stecken bleiben und deswegen weder in der Zelle noch im Überstand detektiert werden können. Genau diese Beobachtung kann bei der betrachteten Zelllinie für BCNA-06 (**53fz**) und BCNA-07 (**53gz**) gemacht werden. Das Chromatogramm der Zelle zeigt keine Verbindungen und auch außerhalb der Zelle kann nur wenig Monophosphat **66** und Nucleosid **67** detektiert werden. Es liegt also die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen ebenfalls in der Zellmembran verblieben sind. Möglicherweise führt eine Verlängerung der Inkubationszeit zu einer höheren Zellaufnahme bei diesen beiden Verbindungen. Bei den TriPPPPro-Verbindungen **53ay** - **53gy** mit kürzerem Alkylsubstituenten führt die Erhöhung der Lipophilie dagegen zu einer besseren Zellaufnahme. Aufgrund des Lipophilievergleichs (s. **Kapitel 6.1.4**)

wurde für BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-10 (**53gy**) die beste Zellaufnahmefähigkeit vorausgesagt, für diese Zelllinie ist dies auch der Fall.

Als zweite dargestellte Zelllinie wurde H69AR-1 gewählt, dabei handelt es sich um ein kleinzelliges Lungenkarzinom. In **Abbildung 91** sind zunächst die erhaltenen Chromatogramme der Überstände abgebildet.

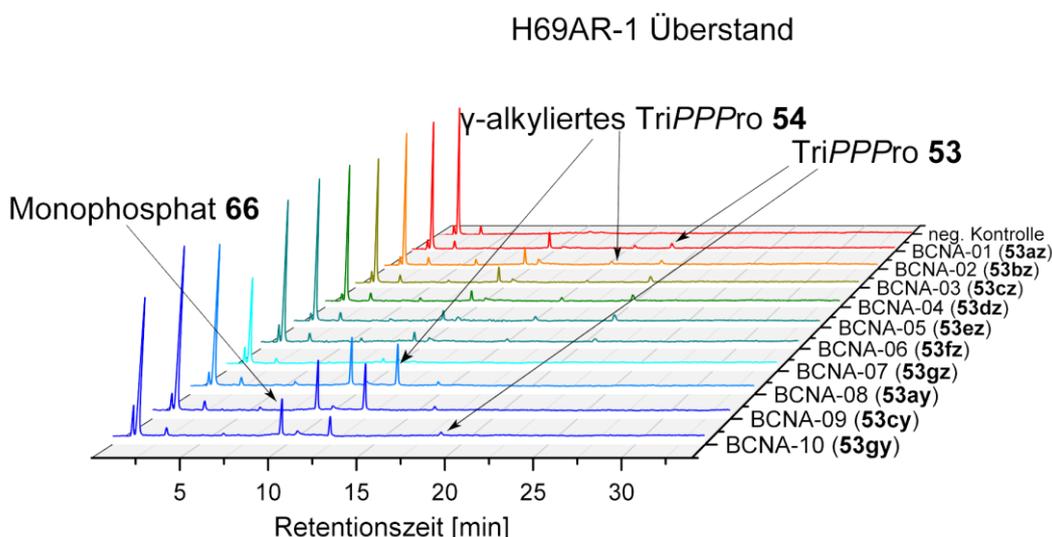


Abbildung 91: Chromatogramme der Überstände der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie H69AR.

Bei den hier dargestellten Chromatogrammen ist gut zu erkennen, dass in fast allen Überständen noch die TriPPPPro-Verbindung **53** vorhanden ist. Auch hier war der gewählte Zeitrahmen nicht ausreichend, sodass die gesamte Substanz aufgenommen werden konnte. Es kommt ebenfalls bereits im extrazellulären Raum zur Hydrolyse, so kann neben dem Prodrugpeak auch ein Signal für die γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** sowie für das Monophosphat **66** beobachtet werden. Bei den TriPPPPro-Verbindungen mit langem Alkylrest **53az** – **53gz** kann bis zu BCNA-05 (**53ez**) eine leichte Zunahme des TriPPPPro-Peaks beobachtet werden, danach nimmt sie ab und für BCNA-07 (**53gz**) kann keine Verbindung detektiert werden. Die Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** und die Bildung des Monophosphats **66** nehmen bei BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) mit steigender Lipophilie des Prodrugs ab. Bei den TriPPPPro-Verbindungen mit kurzem Alkylrest (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)) wurde deutlich mehr γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindungen **54** freigesetzt und auch der Peak des Monophosphats **66** ist deutlich größer als bei BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**). Ein Einfluss der Lipophilie auf den Peak der TriPPPPro-Verbindungen **53** lässt sich hier

nicht beobachten. Bei den Abbauprodukten lässt sich dagegen mit steigender Lipophilie eine Abnahme der Signalintensität feststellen.

Als nächstes soll nun auf das Verhalten der zu untersuchenden 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** in den H69AR-1 Zellen eingegangen werden. Die erhaltenen Chromatogramme sind in **Abbildung 92** dargestellt.

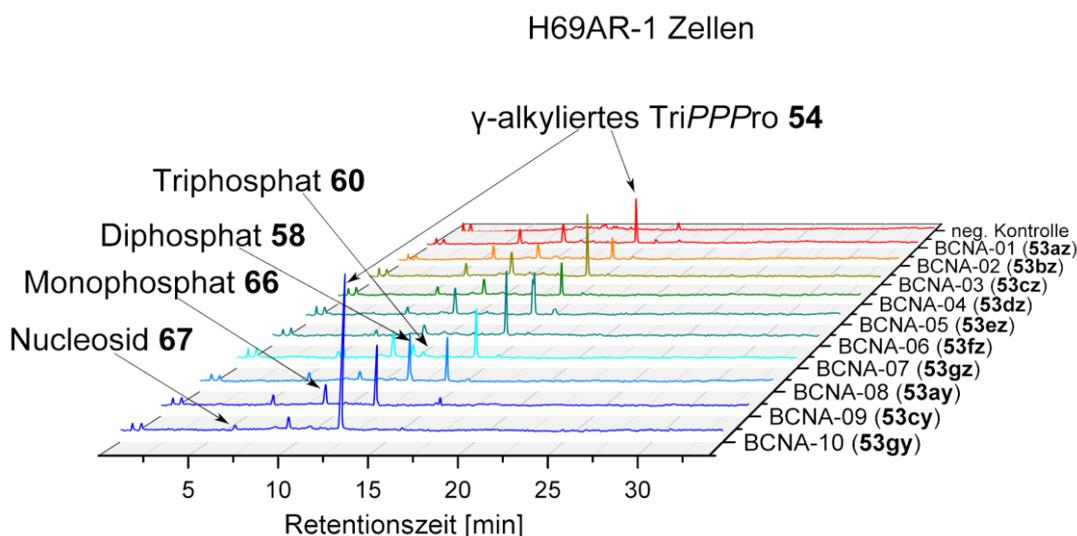


Abbildung 92: Chromatogramme der Zellaufnahmestudien mit H69AR-1 Zellen.

In den H69AR-1-Zellen ist gut zu erkennen, dass es intrazellulär zur Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** gekommen ist. Dabei handelt es sich um den hauptsächlich erhaltenen Metaboliten. Bei BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) kann bei dieser Zelllinie kein Einfluss der Lipophilie auf die Aufnahme oder intrazelluläre Freisetzung beobachtet werden. Bei den kurzkettingen Verbindungen BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**) steigt mit zunehmender Kettenlänge die Konzentration der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y** an. Bei BCNA-10 (**53gy**) handelt es sich um die Verbindung, die am besten in die Zelle aufgenommen wurde. Es kommt bei allen Prodrugs **53** zur Bildung von Monophosphat **66** und von Nucleosid **67**, allerdings sind die Konzentrationen dieser Verbindungen gering. Interessanterweise kommt es bei BCNA-07 (**53gz**) zur Bildung des Diphosphats **58** und Triphosphats **60**. Es sind folglich in den Zellen Enzyme vorhanden, die in der Lage sind den Alkylrest abzuspalten.

Als letzte betrachtete Zelllinie soll mit Molm 13 eine Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie genauer analysiert werden. Die Chromatogramme der Überstände sind in **Abbildung 93** dargestellt.

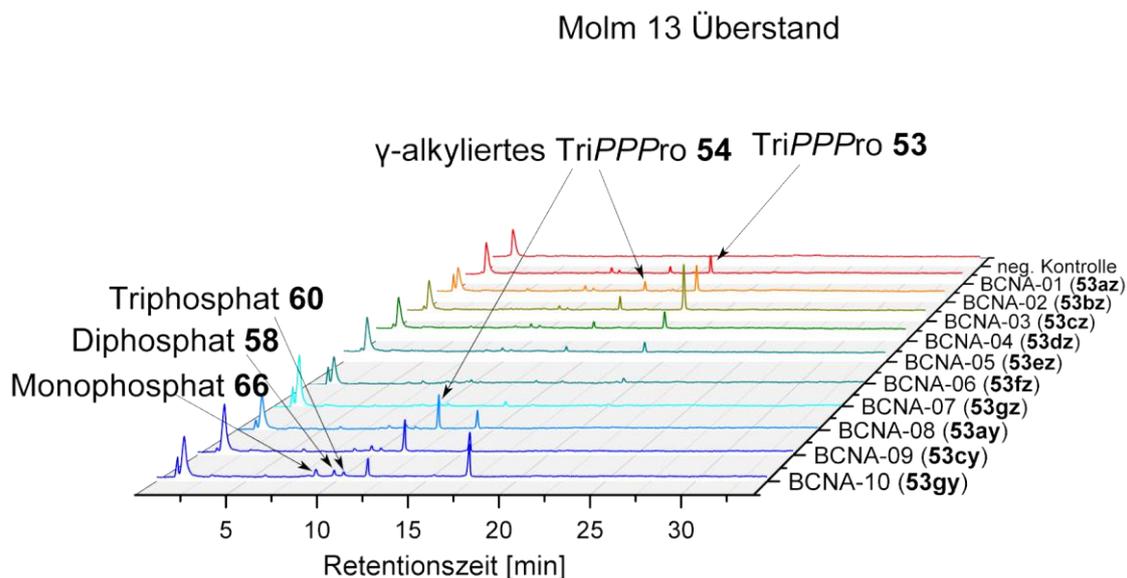


Abbildung 93: Darstellung der Chromatogramme der Überstände der Leukämiezelllinie Molm 13.

In den Chromatogrammen der Zellüberstände von Molm 13 ist zu erkennen, dass noch relativ viel TriPPPPro-Verbindung **53** in den jeweiligen Überständen vorhanden ist. Der Anteil des Prodrugs **53** steigt zunächst bis BCNA-03 (**53cz**) und sinkt anschließend stark ab, bis bei BCNA-07 (**53gz**) kein Prodrug mehr vorhanden ist. Bei den kurzkettigen Verbindungen BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**) ist eine leichte Zunahme des TriPPPPro-Anteils im Überstand mit steigender Alkylänge in der Maskierungseinheit zu erkennen. Es ist bei allen Verbindungen **53** eine Zersetzung des Prodrugs zu beobachten, so wird bereits extrazellulär die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54** gebildet. Es ist sowohl bei den langkettigen als auch bei den kurzkettigen Verbindungen untereinander eine Abhängigkeit der Intermediatbildung von der ansteigenden Kettenlänge zu beobachten. So lässt die höher werdende Lipophilie den Anteil der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** in den Chromatogrammen sinken. Es kommt außerdem zur Bildung von Tri- **60**, Di- **58** und Monophosphat **66**, bei all diesen Verbindungen lässt sich die gleiche Tendenz wie bei dem Intermediat **54** beobachten. Steigt die Lipophilie der TriPPPPro-Verbindung **53**, so sinkt der Anteil der gebildeten Nebenprodukte, es erfolgt scheinbar eine bessere Zellaufnahme mit steigender Lipophilie. Die Bildung des Triphosphats **60** liegt wahrscheinlich an Enzymen, die sich an der Zellmembran befinden und in der Lage sind, den Alkylrest abzuspalten.

Als Nächstes sollen die Chromatogramme der Molm 13 Zellen betrachtet werden, diese sind in **Abbildung 94** dargestellt.

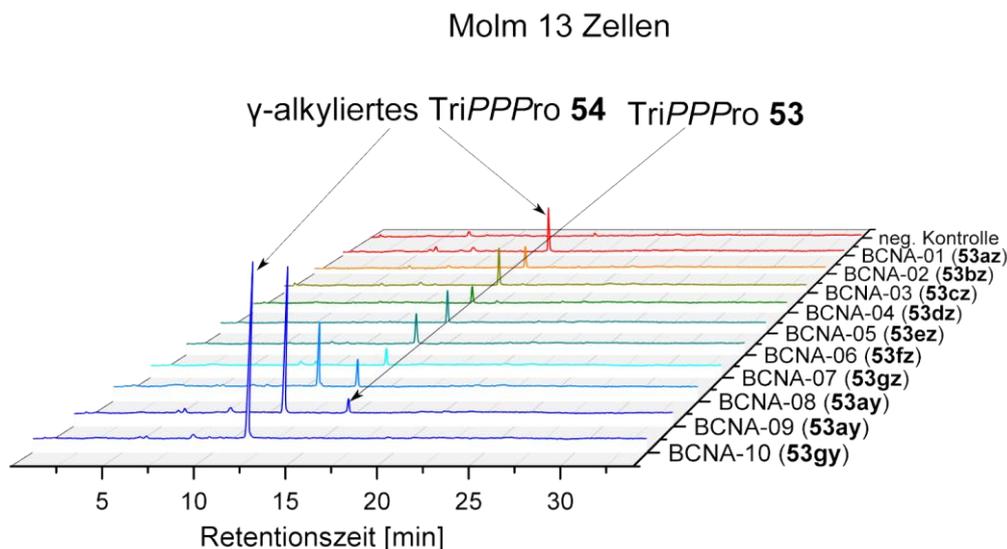


Abbildung 94: Darstellung der Zellaufnahme in Molm 13 Zellen.

Obwohl es beim Überstand der Molm 13 Zellen zur Hydrolyse der TriPPPPro-Verbindungen **53** in die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54**, Monophosphat **66**, Diphosphat **58** und sogar das Triphosphat **60** gekommen war, wurden intrazellulär nur die ursprünglichen TriPPPPro-Verbindungen **53** als auch die γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** detektiert. Es kommt bei dieser Zelllinie intrazellulär zügig zur selektiven Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54**. Da die γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** bei BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) eine $C_{18}H_{37}$ -Alkylkette und bei BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**) eine $C_{11}H_{23}$ -Alkylkette aufweist, kommt es zu unterschiedlichen Retentionszeiten des Hauptmetaboliten. In den dargestellten Chromatogrammen lässt sich gut erkennen, dass von den langkettigen TriPPPPro-Verbindungen **53az** – **53gz** BCNA-01 (**53az**) am besten in die Zellen gelangen kann. Anders als nach dem Lipophilievergleich angenommen, vermag hier nicht BCNA-02 (**53bz**) die Zellmembran am besten zu penetrieren. Von den kurzkettigen Verbindungen **53ay** – **53gy** kann BCNA-10 (**53gy**) die Zellmembran am besten passieren, dies deckt sich mit den erwarteten Ergebnissen aufgrund des Lipophilievergleichs. Bei BCNA-10 (**53gy**) handelt es sich um die am meisten detektierte Verbindung, ihre Lipophile ist somit am besten für die Aufnahme in Zellen geeignet. Die Zelllinie Molm 13 wurde diskutiert, da sie ein oft beobachtetes Ergebnis sehr anschaulich darstellt. Bei vielen der untersuchten Zelllinien konnte bereits extrazellulär eine Zersetzung des Prodrugs **53** in verschiedene Produkte beobachtet werden, intrazellulär wurde dagegen nahezu ausschließlich die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54** erhalten.

Um einen Überblick zu erhalten, welche second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindung **53** am besten in die Zelle gelangen kann, wurde die Summe der Peakflächen von den jeweils erhaltenen Metaboliten der Prodrugs in den untersuchten Zelllinien addiert und graphisch in

Abbildung 95 dargestellt. Die Darstellung erfolgt pro 1000 Zellen, da die Zellzahlen stark variierten und deswegen für die Darstellung berücksichtigt werden mussten.

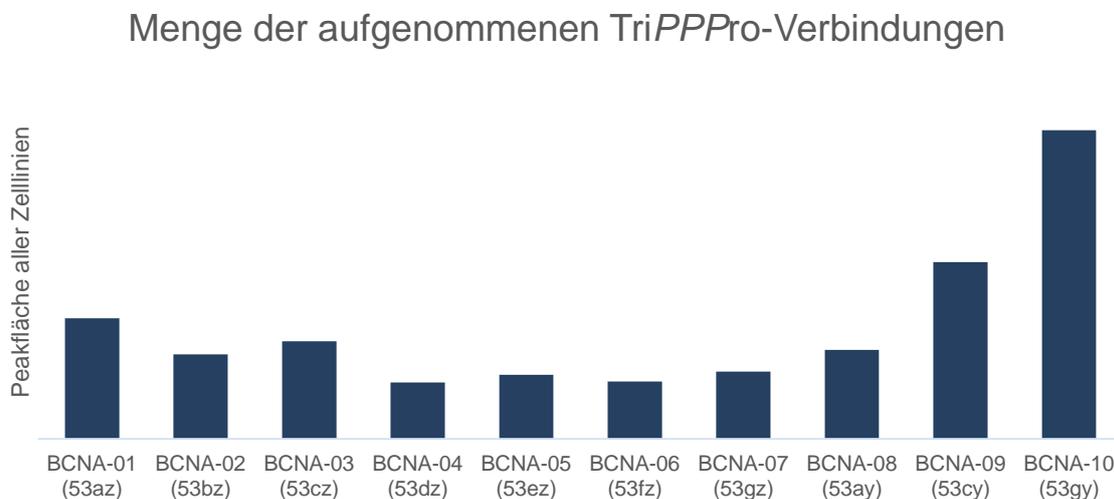


Abbildung 95: Darstellung, welche Verbindung **53** am besten die Zellmembran passieren kann.

Die drei zuvor dargestellten Zelllinien spiegeln den generellen Trend der Zellaufnahmefähigkeit der Verbindungen gut wider. Von den langkettigen TriPPPPro-Verbindungen BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**) wurde durch den Vergleich der Lipophilien (**Kapitel 6.1.4**) erwartet, dass BCNA-02 (**53bz**), aufgrund einer der Referenzsubstanz **100** ähnlichen Lipophilie, mit die beste Zellaufnahme zeigt. Dies war allerdings nicht der Fall, so sind BCNA-01 (**53az**) und BCNA-03 (**53cz**) in der Lage, besser in die Zelle zu gelangen. Betrachtet man alle langkettigen TriPPPPro-Verbindungen **53az** – **53gz**, so lässt sich zwar die Aussage treffen, dass eine kurze Alkylkette (C_4H_9 - C_8H_{17}) in der AB-Maskierungseinheit zu einer besseren Zellaufnahme führt, eine eindeutige Tendenz lässt sich allerdings nicht ausmachen. Die Zellaufnahme der Verbindungen mit längerer AB-Maskierungseinheit ist etwas schlechter. Bei den kurzkettigen Vertretern (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)) lässt sich durch eine Verlängerung der Alkylkette in der AB-Maskierungseinheit eine verbesserte Zellaufnahme erreichen. Hier steigt die Fähigkeit die Zellmembran zu passieren mit steigender Lipophilie deutlich an. Von allen untersuchten Verbindungen ist BCNA-10 (**53gy**) diejenige, die am besten in die Zellen gelangen kann. Dies deckt sich mit der Erwartung aus dem Lipophilievergleich (**Kapitel 6.1.4**), da BCNA-10 (**53gy**) eine sehr ähnliche Lipophilie zur untersuchten Referenzverbindung **100** aufweist.

Nach erfolgter Zellaufnahme soll die abspaltbare AB-Maskierungseinheit der TriPPPPro-Verbindung **53** abgetrennt und dadurch die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54** freigesetzt werden. In **Abbildung 96** ist der prozentuale Anteil jeder Verbindung gezeigt, die während des Metabolismus der second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** gebildet werden

kann. Es wurden sämtliche Peakflächen des jeweils betrachteten Metabolits in jeder Zelllinie aufsummiert (pro 1000 Zellen) und dann anteilig in dem Graphen abgebildet.

Welcher Metabolit liegt in der Zelle vor?

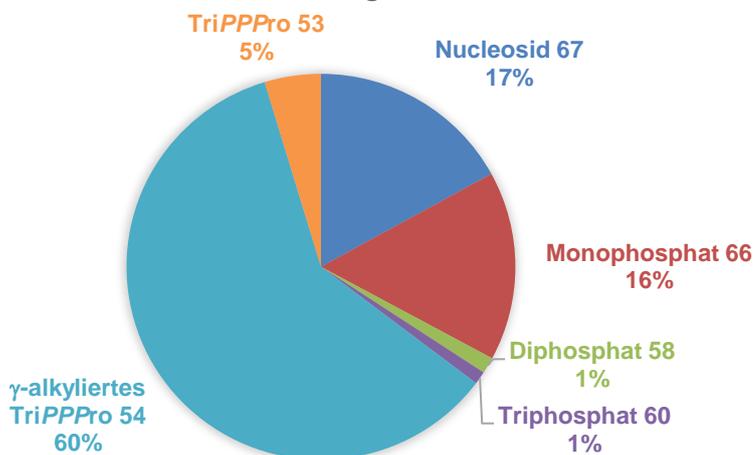


Abbildung 96: Darstellung der in der Zelle vorhandenen Metaboliten in den Zellaufnahmestudien.

Wie in den vorherigen Abschnitten bereits beschrieben wurde, liegt nur ein geringer Anteil der TriPPPPro-Verbindungen **53** in der Zelle vor (5%), die Abspaltung der bioreversiblen Maskierungseinheit erfolgt intrazellulär also sehr schnell. Als Hauptbestandteil liegt die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **54** vor (60%). Dies wurde bereits bei der Betrachtung der einzelnen Zelllinien deutlich, in den Chromatogrammen konnte fast immer der Peak der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindungen **54** beobachtet werden. Es war außerdem zu erkennen, dass diese Verbindung **54** häufig als einziger Metabolit in der Zelle vorliegt. Das erwartete Ergebnis, die Freisetzung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54**, hat bei den Zellaufnahmestudien stattgefunden. Dies wird hier in diesem Graphen noch einmal deutlich dargestellt. Der Anteil der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54** liegt bei 60% und ist somit die mit Abstand am meisten vorliegende Verbindung. Es überrascht, dass es ebenfalls zur Bildung des Triphosphats **60** kommt. Dies geschieht lediglich zu 1% und nur in der H69AR-1-Zelllinie, allerdings wurde nicht erwartet, dass der Alkylrest in der Zelle abgespalten wird. Es sind somit Enzyme vorhanden, die in der Lage sind einen Alkylrest abzuspalten. Auch die Bildung des Diphosphats **58** geschieht nur in der H69AR-1-Zelllinie (Anteil 1%). Die hauptsächlich vorliegenden Nebenprodukte sind das Nucleosid **67** (17%) und das Monophosphat **66** (16%). In der Zelle kommt es also folglich eher zur kompletten Abspaltung aller Phosphatgruppen oder zum Bruch der α -/ β -Phosphoranhydridbindung.

6.1.8.4 Fazit der Zellaufnahmestudien in Krebszellen

Bei den Zellaufnahmestudien in die Krebszellen konnte erstmalig sowohl die Zellaufnahme der second-generation 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** als auch die erfolgreiche Freisetzung der γ -alkylierten 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **54** in den Zellen gezeigt werden. Wie erwartet, gab es Unterschiede bei der Membrangängigkeit der Verbindungen in Abhängigkeit von der Lipophilie. Von den Verbindungen mit langem Alkylrest (BCNA-01 (**53az**) - BCNA-07 (**53gz**)) wurden vor allem die Vertreter mit kurzer Alkylkette in der Maskierungseinheit gut in die Zelle aufgenommen (BCNA-01 (**53az**) - BCNA-03 (**53cz**)), eine weitere Verlängerung der Alkylkette und damit Erhöhung der Lipophilie führte zu einer schlechteren Zellaufnahme (BCNA-04 (**53dz**) - BCNA-07 (**53gz**)). Bei den TriPPPPro-Verbindungen mit kurzem Alkylsubstituenten (BCNA-08 (**53ay**) - BCNA-10 (**53gy**)) war ein eindeutiger Trend zu erkennen, eine Erhöhung der Lipophilie führte zu einer besseren Aufnahme in die Zelle. Bei BCNA-10 (**53gy**) handelt es sich um die Verbindung, die am besten in die Zellen gelangte. Das gute Ergebnis von BCNA-10 (**53gy**) wurde durch einen vorher durchgeführten Lipophilievergleich mit einer Referenzsubstanz erwartet, die bereits gute Ergebnisse bei Zellaufnahmestudien zeigte. Dies konnte durch diese Zellaufnahmestudien bestätigt werden.

6.2 Synthese der second-generation 5-Fluor-2'-desoxyuridin-TriPPPPro-Verbindungen

6.2.1 5-Fluor-2'-desoxyuridin: Pharmakologische Eigenschaften, Metabolismus und klinische Anwendung

5-Fluor-2'-desoxyuridin (5-FdU, **123**) ist ein Analogon von Desoxyuridin (**124**). Es wird als Antimetabolit in der Behandlung verschiedener Tumore eingesetzt und zählt zu der Klasse der Fluorpyrimidine. 1970 wurde es von der FDA für die Behandlung von metastasierten Kolonkarzinomen zugelassen und gehört neben 5-Fluoruracil (5-FU, **4**) zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten bei deren Therapie (s. **Abbildung 97**).^{2,5,127-130} Daneben wird es für die Behandlung von Brust und Eierstockkrebs eingesetzt.¹³⁰ Der Austausch des Wasserstoffatoms durch ein Fluoratom in 5-Position des Pyrimidinrings führt zu signifikanten Reaktivitätsveränderungen der Nucleobase. Auch wenn die sterischen Anforderungen ähnlich sind, führt das elektronenziehende Fluoratom zu einer Reduzierung des pK_a -Werts, wodurch die Fluor-Kohlenstoff-Bindung gestärkt und eine Spaltung erschwert wird.¹³¹

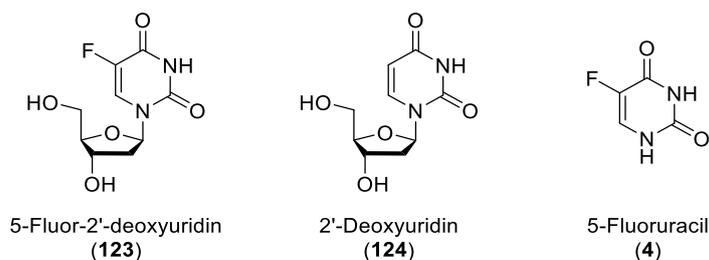


Abbildung 97: Darstellung von 5-Fluor-2'-desoxyuridin (5-FdU, **123**), 2'-Desoxyuridin (**124**) und 5-Fluoruracil (5-FU, **4**).^{2,5,127–130}

Bei 5-FdU (**123**) handelt es sich um ein hydrophiles Nucleosidanalogon, eine passive Diffusion durch die Zellmembran ist folglich nicht möglich. Die Aufnahme in die Zelle muss über einen Transporter erfolgen, wobei es sich um den Pyrimidinnucleosidtransporter handelt.⁵ Nach erfolgter Zellaufnahme wird 5-FdU (**123**) durch die Thymidinkinase in das Monophosphat überführt. Das 5-Fluor-2'-desoxyuridinmonophosphat (5-FdUMP) hemmt die Thymidylat-Synthase.^{2,5,128,130,132} Dieses Enzym katalysiert die Methylierung von 2'-Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Thymidinmonophosphat (TMP). Als Methylierungsdonor fungiert 5,10-Methylen tetrahydrofolat. Bei dieser Reaktion handelt es sich um die einzige *de novo*-Quelle von Thymidin, welches notwendig für die DNA-Replikation ist.^{131,133} 5-FdUMP bindet an die aktive Stelle des Enzyms, wodurch ein stabiler, ternärer Komplex mit dem Enzym und 5,10-Methylen tetrahydrofolat gebildet wird. Dabei wird die Bindungstasche des Enzyms blockiert und die Umsetzung von dUMP zu TMP inhibiert.¹³³ Durch eine geringere Darstellung von TMP reduziert sich ebenfalls die Konzentration von Thymidintriphosphat. Zusätzlich führen intrazelluläre Feedbackmechanismen dazu, dass es zu nichtausgeglichene Desoxynucleotidkonzentrationen kommt. Dadurch kommt es aufgrund von fälschlicherweise stattfindendem Einbau von Desoxynucleotidtriphosphaten zu Schäden bei der DNA-Replikation und dadurch letztendlich zum Zelltod.^{128,130,131,133} Außerdem wird 5-FdU (**123**) durch zelluläre Kinasen in das 5-FdU-Triphosphat (5-FdUTP) überführt. Wird 5-FdUTP in die neugebildete DNA eingebaut, kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese und somit zur Apoptose.^{128,132} Ein großer Teil des eingesetzten 5-FdUs (**123**) wird im Darm zu 5-FU (**4**) metabolisiert. Dies führt dazu, dass die Versorgung der Tumorzellen mit intaktem 5-FdU (**123**) in einer ausreichenden Menge für die cytostatische Wirkung schwierig ist.^{5,128,134,135} Die orale Einnahme von 5-FdU (**123**) führt aufgrund einer schlechten Bioverfügbarkeit und einer geringen Stabilität zu einer niedrigen Konzentration des Wirkstoffs am Zielort. Für 5-FdU (**123**) eignet sich die Gabe über eine Infusion in die Leberarterie, dadurch wird eine hohe Wirkstoffkonzentration am Wirkort erreicht und gleichzeitig die Substanzmenge im restlichen Körper gesenkt.^{5,129,134} Bisher durchgeführte Studien haben gezeigt, dass 5-FdU (**123**) bei der Inhibierung der Tumorzellproliferation in *in vitro* Untersuchungen 10-100-fach effektiver ist als 5-FU (**4**).^{5,135} 5-FU (**4**) kann in 5-Fluoruridin umgewandelt werden, dadurch wird ein Einbau in die RNA ermöglicht.^{5,128,134} 5-FdU (**123**) kann dagegen nur in die DNA eingebaut werden, wodurch Nebenwirkungen minimiert werden.¹³⁵

Trotz aller dieser Vorteile, sind die Nebenwirkungen von 5-FdU (**123**) noch immer hoch und nicht tolerabel. Es wurden bereits Prodrugstrategien entwickelt, mit denen eine Steigerung der physikochemischen Eigenschaften, eine bessere Bioverfügbarkeit sowie Minimierung der Nebenwirkungen erreicht werden konnten.¹³⁵ Mit der Synthese der 5-Fluor-2'-desoxyuridin-TriPPPPro-Verbindungen soll versucht werden, das 5-FdU-Triphosphat so zu modifizieren, dass eine Diffusion durch die Zellmembran möglich wird und durch die intrazelluläre Abspaltung der Maskierungseinheiten direkt die aktive Spezies in der Zelle vorliegt. Es sollen zwei second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen dargestellt werden, die verwendeten Kettenlängen entsprechen für eine bessere Vergleichbarkeit den Kettenlängen aus **Kapitel 6.1.8.1**. Die beiden second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen sollen anschließend in Zellproliferationsassays auf ihre Fähigkeit, das Zellwachstum zu beeinflussen, untersucht werden.

6.2.2 Synthese des 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphats

Das 5-FdUMP **125** sollte über die Fm-Amiditroute erhalten werden, da mit diesem Vorgehen bei der Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-Monophosphats **66** gute Ergebnisse erzielt werden konnten (s. **Abbildung 98**). Auch bei diesem Nucleosidanalogen war es wichtig die 3'-Hydroxylgruppe zu schützen, damit Nebenreaktionen verhindert werden konnten.

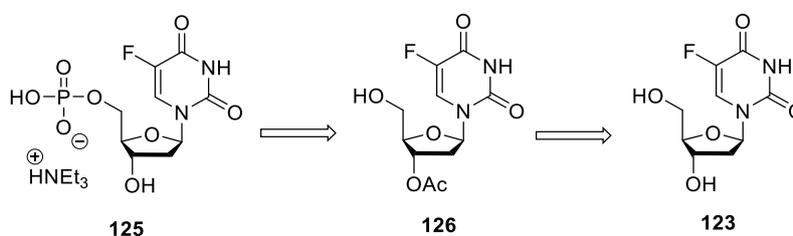


Abbildung 98: Retrosyntheseschema der 5-FdU-Monophosphatsynthese.

Das 5-FdUMP **125** sollte durch Umsetzung des 3'-acetylgeschützten 5-FdUs **126** mit Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) und anschließender Entfernung der Schutzgruppen erhalten werden. Das 3'-acetylgeschützte 5-FdU **126** sollte durch Verwendung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie ausgehend von 5-FdU (**123**) dargestellt werden können.

Die Synthese des 5-FdUMPs **125** begann beim 5-FdU (**123**). Bei dieser Verbindung sollten durch Verwendung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie beide OH-Gruppen unterschiedlich geschützt werden. Damit sollte anschließend durch schrittweise durchgeführte Abspaltungen der Schutzgruppen die Syntheseroute regioselektiv ablaufen. Die orthogonale Schutzgruppenstrategie beinhaltete, wie bei der BCNA-Monophosphatsynthese, eine TBS-

Schutzgruppe für die 5'-Hydroxylgruppe und eine Acetylschutzgruppe für die 3'-Hydroxylgruppe (s. **Abbildung 99**).

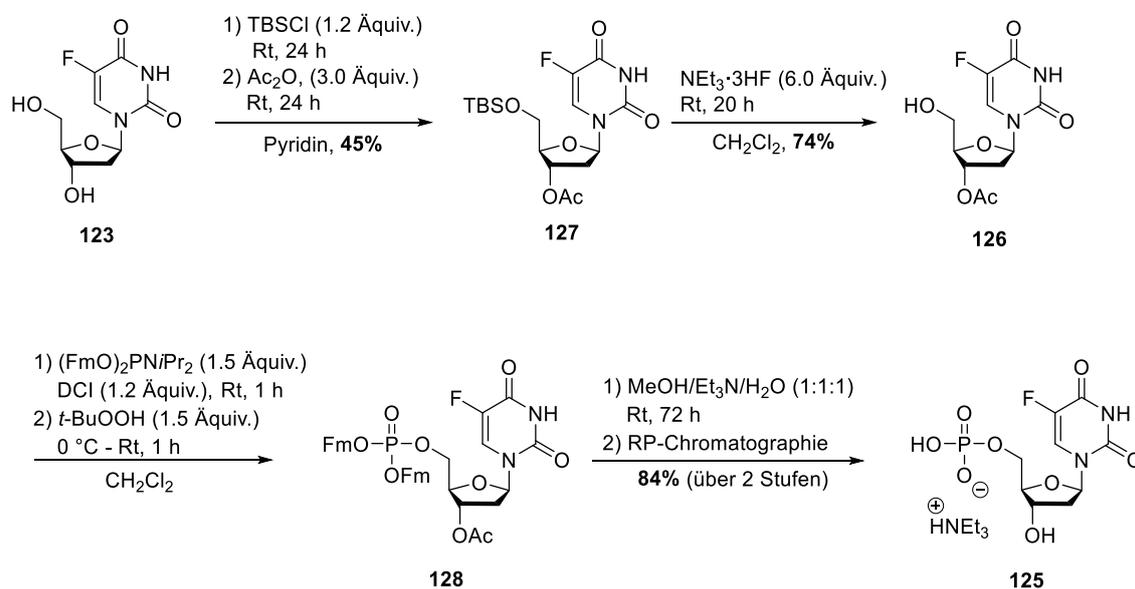


Abbildung 99: Erfolgreiche Synthese des 5-FdUMPs **125**.

Für das Anbringen der Schutzgruppen wurde 5-FdU (**123**) in Pyridin gelöst, mit TBSCl versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wurde die reaktivere, primäre 5'-Hydroxylgruppe mit einer TBS-Schutzgruppe versehen. Für das Anbringen der Acetylschutzgruppe an die 3'-Hydroxylgruppe wurde Essigsäureanhydrid zur Reaktionslösung gegeben und erneut 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das doppelt geschützte 5-FdU **127** wurde nach wässriger und säulenchromatographischer Aufarbeitung in einer Ausbeute von 45% erhalten. Für die anschließende Entfernung der TBS-Schutzgruppe wurde das doppelt geschützte 5-FdU **127** in Dichlormethan gelöst und mit Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Nach 20-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde Kieselgel zur Beendigung der Reaktion zugegeben, damit überschüssiges Triethylamin-Trihydrofluorid abreagieren kann. Es folgte die säulenchromatographische Reinigung und das 3'-acetylgeschützte 5-FdU **126** wurde in einer Ausbeute von 74% erhalten. Für die Synthese des Monophosphats **125** wurde das 3'-acetylgeschützte 5-FdU **126** in Dichlormethan gelöst und mit Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit (**76**) versetzt. Als Aktivator diente DCI ($c = 0.25$ M in Dichlormethan). Die Zugabe erfolgte über 30 Minuten, anschließend wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Für die Oxidation wurde anschließend *tert*-Butylhydroperoxid ($c = 5.50$ M in *n*-Decan) verwendet. Es wurde erneut eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das geschützte Monophosphat **128** wurde durch eine automatisierte NP-Chromatographie vorgereinigt. Die automatisierte Säulenchromatographie wurde verwendet, damit ein genauer und stetiger Gradient aus Dichlormethan und Methanol

angewendet werden konnte. Das Fm-geschützte Monophosphat **128** konnte nicht vollständig rein erhalten werden, weswegen bei diesem Schritt keine Ausbeutebestimmung erfolgte. Im nächsten Schritt war diese leichte Verunreinigung unerheblich, weshalb auf eine vollständige Reinigung verzichtet wurde. Für die Entfernung der Schutzgruppen wurde das geschützte Monophosphat **128** zunächst eine Stunde in einer Methanol/Triethylamin-Mischung (1:1 v:v) gerührt. Es kam zur Abspaltung der ersten Fm-Schutzgruppe, da diese Gruppe leicht abtrennbar ist. Die Entfernung der zweiten Fm-Schutzgruppe erfolgte deutlich langsamer, weswegen die Reaktionslösung über Nacht weitergerührt wurde. Damit es im gleichen Reaktionsschritt auch zur Abspaltung der Acetylschutzgruppe kommen konnte, wurde der gleiche Volumenanteil Wasser zugegeben. Nach automatisierter RP-Säulenchromatographie konnte das 5-FdUMP **125** in einer guten Ausbeute von 84% über die beiden letzten Stufen erhalten werden. Die Gesamtausbeute der 5-FdUMP-Synthese lag über 4 Stufen bei 51%.

6.2.3 Synthese der second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen

Die Synthese der beiden second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** sollte analog zu den 2'-Desoxy-BCNA-TriPPPro-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute erfolgen (s. **Abbildung 100**).

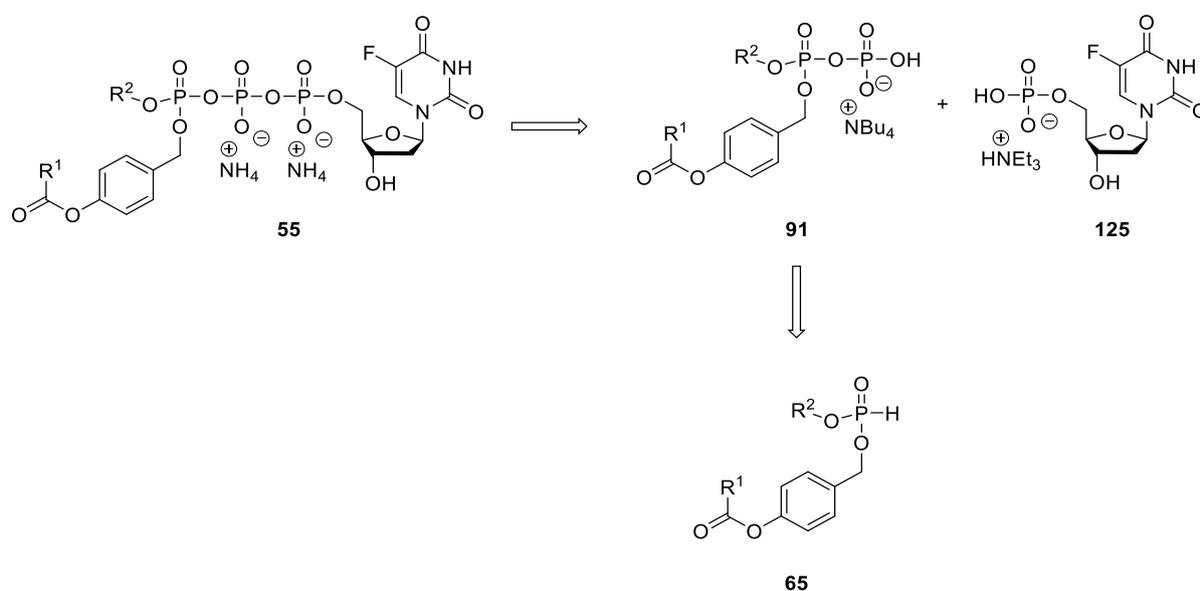


Abbildung 100: Retrosyntheschema der 5-FdU-TriPPPro-Synthese.

Die beiden second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** sollten durch Kupplung des Pyrophosphats **91** mit dem 5-FdUMP **125** erhalten werden. Das Pyrophosphat **91** sollte analog zu **Kapitel 6.1.3** aus einem *H*-Phosphonat **65** zugänglich gemacht werden können.

Die beiden Pyrophosphate **91** sollten aus den *H*-Phosphonaten **65** dargestellt werden. Das *H*-Phosphonat **65** sollte durch Aktivierung mit NCS und anschließender Reaktion mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat in das Pyrophosphat **91** überführt werden. Für die Synthese der second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** gelang die Darstellung der Pyrophosphate **91** in einer Ausbeute von 77% bzw. 85%. Anschließend wurden die frisch dargestellten Pyrophosphate **91** mit dem 5-FdUMP **125** gekoppelt (s. **Abbildung 101**).

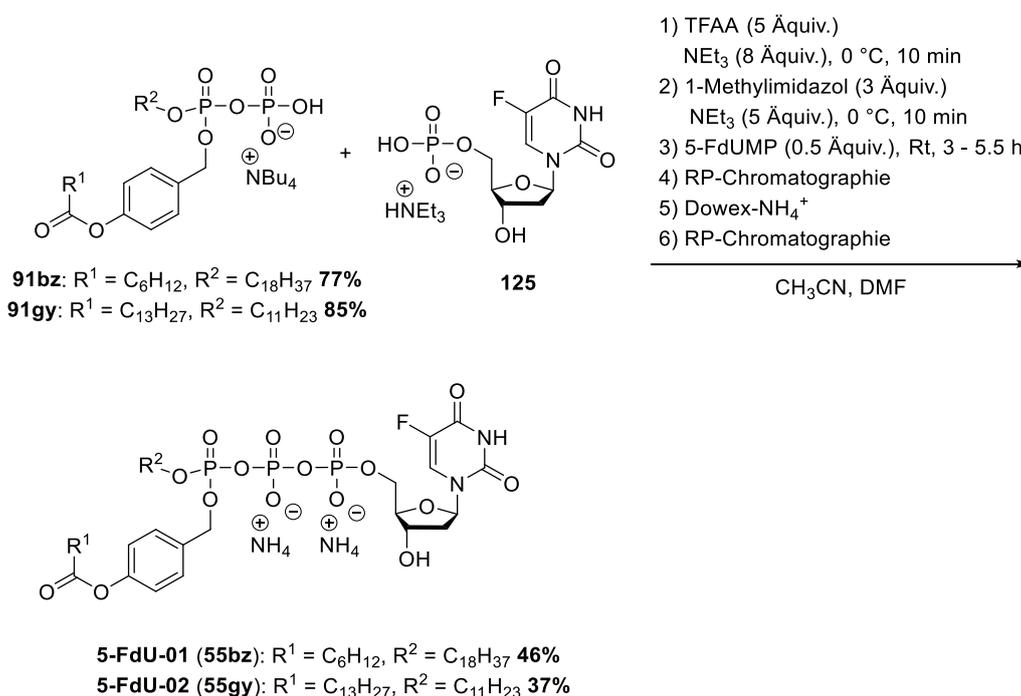


Abbildung 101: Synthese der 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55**.

Für die Kupplung zu den 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** wurden die Pyrophosphate **91** wie in **Kapitel 6.1.3** weiter umgesetzt. Die Pyrophosphate **91** wurden in Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit TFAA in das stabilere gemischte Anhydrid überführt. Nach 10-minütigem Rühren bei 0 °C wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Für die weitere Reaktion wurde DMF als Lösungsmittel verwendet, da sich das 5-FdUMP **125** nicht ausreichend in Acetonitril löste. Der erhaltene Rückstand wurde in DMF gelöst und mit 1-Methylimidazol versetzt, dadurch wurde das Imidazolidat erzeugt. Die damit einhergehende Elektrophilieerhöhung des Phosphoratoms erleichterte den Angriff des 5-FdUMPs **125**. Nach 15-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde 5-FdUMP **125** gelöst in DMF zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels RP-HPLC (Methode B) verfolgt und als kein Monophosphatpeak mehr zu erkennen

war, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es erfolgte eine Vorreinigung mittels automatisierter RP-Chromatographie, ein Austausch der Gegenionen zu Ammoniumionen über die Kationenaustauschersäule und eine anschließende automatisierte RP-Chromatographie. Die beiden second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** konnten in guten Ausbeuten von 46% und 37% erhalten werden.

6.2.4 Hydrolyse der 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen

Die beiden dargestellten second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** sollten ebenfalls hinsichtlich ihrer Stabilität im chemischen und enzymatischen Milieu untersucht werden. Da auch hier ein Alkylsubstituent und eine Acyloxybenzylmaskierungseinheit an der γ -Phosphatgruppe vorhanden sind, entspricht der erwartete Hydrolyseverlauf dem Verlauf der BCNA-TriPPPro-Hydrolyse und ist in **Abbildung 102** gezeigt.

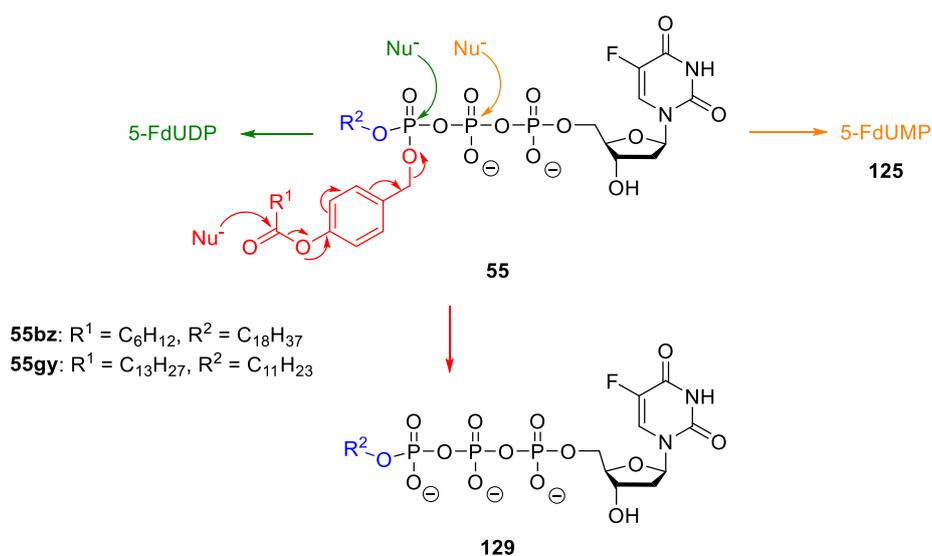


Abbildung 102: Hydrolyseverlauf der second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55**.

Die second-generation 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** besitzen nur einen abspaltbaren Substituenten an der γ -Phosphatgruppe, es kann also kein Triphosphat gebildet werden. Die Hydrolyse sollte nach der Bildung der γ -alkylierten 5-FdU-TriPPPro-Verbindung **129** enden. Diese Verbindungen **129** werden durch den Angriff eines Nucleophils auf die AB-Maskierungseinheit im Prodrug **55** sowie deren Abspaltung durch anschließende Elektronenpaarverschiebungen freigesetzt. Der vorgeschlagene Ablauf der Hydrolyse konnte in dieser Arbeit bereits bei der Hydrolyse der second-generation BCNA-TriPPPro-Verbindungen **55** gezeigt werden. Auch hier sind, durch einen Angriff des Nucleophils auf die Phosphoranhydridbindungen, die Entstehung des 5-FdUDPs bzw. 5-FdUMPs **125** als Nebenprodukte möglich.

Die Bildung der entsprechenden Nebenprodukte wurde bei der Hydrolyse der BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** beobachtet.

6.2.4.1 PBS-Hydrolyse

Für die Bestimmung der chemischen Stabilität sollte die Hydrolyse in PBS-Puffer durchgeführt werden. Das Vorgehen entspricht dem beschriebenen Ablauf aus **Kapitel 6.1.7.1**. In **Tabelle 12** sind die errechneten Halbwertszeiten der beiden 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht der Halbwertszeiten der 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen in PBS.

TriPPPro-Verbindung	5-FdU-01	5-FdU-02
Verbindung	55bz	55gy
R ₁	C ₆ H ₁₃	C ₁₃ H ₂₇
R ₂	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃
PBS t _{1/2} [h]	135	207

Die Halbwertszeit der Verbindung 5-FdU-01 (**55bz**, 135 Stunden) entspricht der Zeit der entsprechenden BCNA-TriPPPro-Verbindung (BCNA-02 (**53bz**): 136 Stunden). Dies ist etwas überraschend, da der Wechsel des Nucleosids bei dieser Kettenlängenkombination keinen Einfluss auf die Stabilität zu nehmen scheint. Die Halbwertszeit von 5-FdU-02 (**55gy**) ist mit 207 Stunden dagegen fast doppelt so hoch wie bei der entsprechenden BCNA-TriPPPro-Verbindung (BCNA-10 (**53gy**): 115 Stunden). Im Vergleich zu den BCNA-TriPPPro-Verbindungen **53** wird hier die Stabilität durch den Wechsel hin zu einer längeren AB-Maskierungseinheit und einem kürzeren Alkylsubstituenten erhöht.

Im Folgenden soll der Verlauf der PBS-Hydrolyse von 5-FdU-02 (**55gy**) genauer betrachtet werden. In **Abbildung 103** sind die erhaltenen Chromatogramme gezeigt.

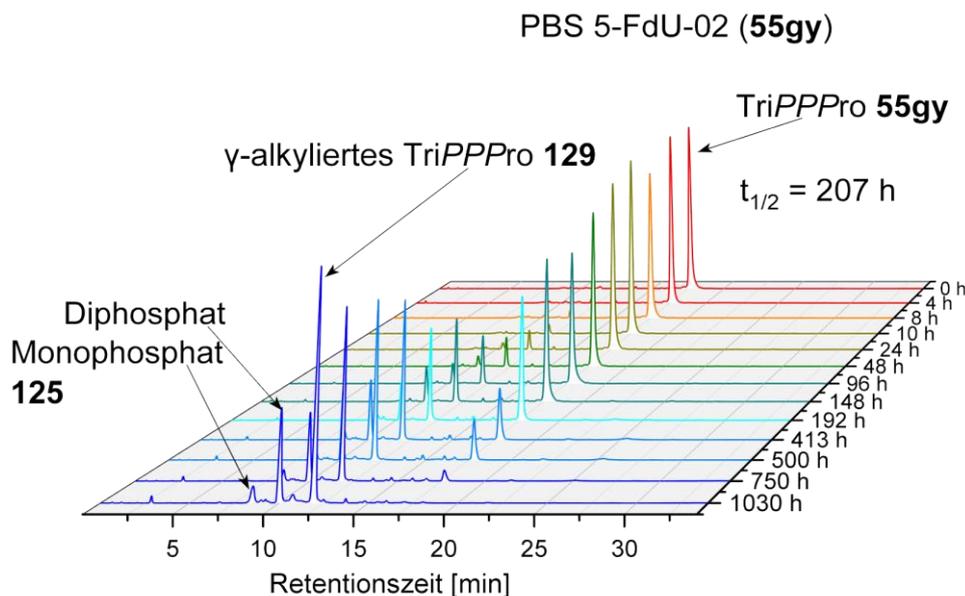


Abbildung 103: Darstellung des PBS-Hydrolyseverlaufs von 5-FdU-02 (**55gy**).

Bei der Hydrolyse von 5-FdU-02 (**55gy**) in PBS ist zu erkennen, dass die Konzentration der TriPPPPro-Verbindung zu Beginn nur langsam abnimmt. Der kleinere Peak nach acht Stunden Inkubationszeit ist vermutlich durch experimentelle Ungenauigkeiten entstanden. Es lässt sich bereits nach acht Stunden die Bildung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **129y** beobachten. Ab 24 Stunden Inkubationszeit kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Prodrugkonzentration und nach 1030 Stunden ist sie vollständig verbraucht. Gleichzeitig steigt die Konzentration der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **129y** an, dabei handelt es sich zu jedem Zeitpunkt der Hydrolyse um das Hauptprodukt. Zeitgleich zur Bildung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **129y** ist die Freisetzung des 5-FdUDPs zu erkennen. Diese resultiert aus dem Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen β - und γ -Phosphatgruppe und ist der Bildung von Mizellen geschuldet. Es kann auch hier davon ausgegangen werden, dass das Diphosphat aus dem Prodrug **55gy** gebildet wird, da dessen Konzentration während der gesamten Hydrolyse nur ansteigt, solange noch Prodrug **55gy** vorhanden ist. Außerdem wächst der Peak der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **129y** stetig, somit kann dessen Spaltung in einer so großen Menge ausgeschlossen werden. Die Spaltung der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **129y** zum Diphosphat ist ohnehin unwahrscheinlich. Nach der Abspaltung der AB-Maskierungseinheit ist eine zusätzliche negative Ladung an der γ -Phosphatgruppe vorhanden, wodurch ein Angriff auf die β - γ -Phosphoranhydridbindung verhindert werden sollte. Nach fast 200 Stunden ist die Bildung einer geringen Menge Monophosphat **125** zu beobachten. Die erst späte Bildung legt die Vermutung nahe, dass es aus der Hydrolyse des Diphosphats stammt. Da es sich nur um eine geringe Menge Monophosphat **125** handelt, wurde auf eine genaue Analyse des Ursprungs verzichtet.

Auch bei der Hydrolyse der second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** war der Anteil an erhaltenem Diphosphat hoch. Bei der Hydrolyse der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** konnte festgestellt werden, dass der Anteil des Diphosphats bei den Vertretern mit längerem Alkylsubstituenten größer war. Der Grund liegt in der Begünstigung der Mizellenbildung durch die längere Alkylkette, dadurch ist die β -/ γ -Phosphoranhydridbindung exponierter und kann leichter angegriffen werden. Diese Beobachtung konnte auch bei der Hydrolyse der 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** gemacht werden. Die Verbindung 5-FdU-01 (**55bz**) besitzt einen $C_{18}H_{37}$ -Alkylrest und bei der Hydrolyse ist der Anteil an Diphosphat (40-65% bei den einzelnen Messungen) deutlich höher als bei der Hydrolyse von 5-FdU-02 mit einem $C_{11}H_{23}$ -Alkylsubstituenten (**55gy**, Anteil Diphosphat 40-45%). Es konnte folglich bei beiden Hydrolysen der second-generation TriPPPPro-Verbindungen Mizellenbildung beobachtet werden, deren Ausmaß von der Länge des Alkylrestes abhängt. Die Bildung des Diphosphats wird durch den Alkylrest beeinflusst und durch die Wahl eines kürzeren Restes kann der Anteil an gebildetem Diphosphat reduziert werden.

6.2.4.2 PLE-Hydrolyse

Für die Ermittlung der enzymatischen Stabilität und des Verlaufs der Hydrolyse in Anwesenheit eines Enzyms wurde anschließend die Hydrolyse mit Schweineleberesterase (PLE) durchgeführt. Das in **Kapitel 6.1.7.2** vorgestellte Verfahren für die Durchführung der PLE-Hydrolyse wurde etwas abgeändert, da bereits bei den second-generation BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** hohe Stabilitäten beobachtet werden konnten. Die ursprünglich verwendeten Messpunkte nach wenigen Sekunden oder Minuten dürften somit nur geringe Veränderungen zeigen und besitzen deswegen keine große Aussagekraft. Zur Vermeidung unnötiger Messzeit wurde ein größerer zeitlicher Abstand zwischen der Probenentnahme gewählt. Damit durch die geringere Anzahl der Proben trotzdem eine verlässliche Aussage über die Stabilität der erhaltenen Werte getroffen werden kann, wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

In **Tabelle 13** sind die errechneten Halbwertszeiten der second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** dargestellt. Die angegebene Halbwertszeit stellt den Mittelwert der drei einzeln berechneten Halbwertszeiten dar.

Tabelle 13: Halbwertszeiten der PLE-Hydrolyse der 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55**.

TriPPPPro- Verbindung	5-FdU-01	5-FdU-02
Verbindung	55bz	55gy
R ₁	C ₆ H ₁₃	C ₁₃ H ₂₇
R ₂	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₁ H ₂₃
PBS t _{1/2} [h]	135	207
PLE t _{1/2} [h]	3.2	7.2

Die hohen Halbwertszeiten der beiden 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** zeigen, dass Messungen nach wenigen Sekunden oder Minuten unnötig sind. Bei den second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** ist zu erkennen, dass die Stabilität durch die Wahl einer längeren Alkylkette in der Maskierungseinheit größer wird. Dies konnte bereits bei der PBS-Hydrolyse dieser Verbindungen beobachtet werden und stimmt mit den Ergebnisse von PERTENBREITER⁷⁰, GOLLNEST⁷¹, REIMER⁶⁹, WITT¹¹⁴ und ZHAO⁷⁶ überein. Die Halbwertszeit von 5-FdU-01 (**55bz**) liegt mit 3.2 Stunden bei ungefähr der Hälfte von 5-FdU-02 (**55gy**, Halbwertszeit: 7.2 Stunden). Auch bei den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** wurde eine Steigerung der enzymatischen Stabilität bei einer längeren Maskierungseinheit beobachtet, wenn nur diese beiden Kettenlängenkombinationen betrachtet werden (BCNA-02 (**53bz**): 3.7 h, BCNA-10 (**53gy**): 15.8 h).

Im Folgenden soll die PLE-Hydrolyse von 5-FdU-02 (**55gy**) näher betrachtet werden. In **Abbildung 104** ist der Verlauf der Hydrolyse dargestellt. Es sind für jeden Entnahmezeitpunkt die drei erhaltenen Chromatogramme dargestellt.

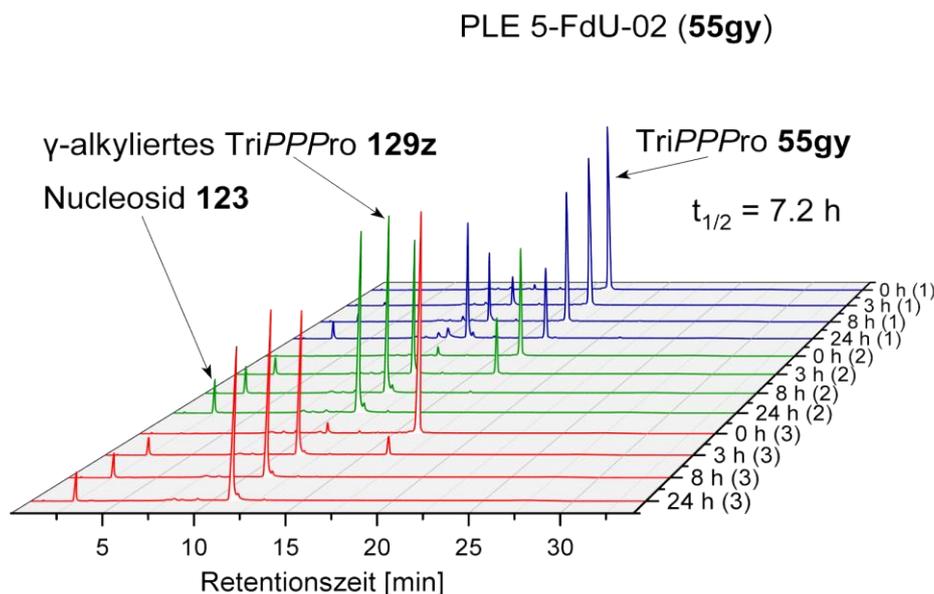


Abbildung 104: Verlauf der PLE-Hydrolysen von 5-FdU-02 (**55gy**).

Die Konzentration des Prodrugs **55gy** nimmt bei der ersten Durchführung langsamer ab als in den beiden folgenden Versuchen. So ist bei der ersten Bestimmung der Halbwertszeit auch nach 24 Stunden noch Prodrug **55gy** vorhanden, bei den beiden anderen ist es dagegen nach acht Stunden vollständig verbraucht. Diese Unterschiede sind etwas überraschend, da die gleiche Durchführung und Enzymlösung verwendet wurde. Es lässt sich allerdings bei allen drei Hydrolysen feststellen, dass hauptsächlich die γ -alkylierte TriPPPPro-Verbindung **129y** gebildet wird. Es findet folglich eine Hydrolyse über den vermuteten Verlauf in **Abbildung 102** statt. Anders als bei den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** kann die Bildung des Diphosphats bei der Hydrolyse in PLE nicht beobachtet werden. Das Enzym spaltet die Maskierungseinheit also schneller ab als es zu einer chemischen Spaltung der Phosphoranhydridbindung kommen kann. Es wird bei jeder Hydrolyse außerdem die Bildung des Nucleosids **123** beobachtet, es kommt somit zur Abspaltung sämtlicher Phosphatgruppen.

6.2.4.3 Fazit der Hydrolysen der 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen

Die Stabilität der second-generation 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** ist sowohl im PBS- als auch im PLE-Medium sehr hoch. Es konnte bei den Hydrolysestudien die erfolgreiche Freisetzung der γ -alkylierten 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **129** im PBS- und PLE-Medium gezeigt werden. Bei der PBS-Hydrolyse wurde eine umgekehrte Stabilitätstendenz im Vergleich zu den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen BCNA-02 (**53bz**) und BCNA-10 (**53gy**) beobachtet, so ist die 5-FdU-TriPPPPro-Verbindung mit kürzerem Alkylrest **55gy** stabiler als die Verbindung mit längerem Substituenten **55bz**. Bei der PBS-Hydrolyse kam es zur Bildung des Diphosphats als Nebenprodukt, als Grund kann hier die Bildung von Mizellen genannt werden

und den dadurch erleichterten Angriff des Nucleophils auf die Phosphoranhydridbindungen. Ähnlich wie bereits bei den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **53** wurde auch hier beobachtet, dass ein längerer Alkylsubstituent die Mizellenbildung begünstigt und dadurch der Diphosphatanteil höher ist. Bei der enzymatischen Hydrolyse der 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** war die Verbindung 5-FdU-02 (**55gy**) mit kürzerem Alkylrest stabiler. Da hier die Maskierungseinheit eine längere Alkylkette hat, deckt sich diese Beobachtung mit den Ergebnissen von GOLLNEST.⁷¹ GOLLNEST stellte in seinen Hydrolyseuntersuchungen fest, dass das Enzym AB-Maskierungseinheiten mit kürzerer Alkylkette schneller abspalten kann. Bei der Hydrolyse in PLE-Medium waren die γ -alkylierten 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **129** das Hauptprodukt.

6.3 Synthese der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen

Das Cytostatikum Gemcitabin (**2**) soll ebenfalls für die Synthese verschiedener TriPPPPro-Verbindungen verwendet werden. Bei diesem Nucleosidanalogen **2** sollen symmetrische TriPPPPro-Verbindungen dargestellt werden, damit untersucht werden kann, ob die TriPPPPro-Strategie die Aktivität und Effizienz von Gemcitabin (**2**) in Tumorzellen erhöhen kann.

6.3.1 Gemcitabin: pharmakologische Eigenschaften, Metabolismus und klinische Anwendung

Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin, **2**) ist ein Analogon von Desoxycytidin (**130**) und weist außerdem strukturelle Ähnlichkeiten mit Cytarabin (ara-C, **1**) auf (s. **Abbildung 105**).^{9,136–143} Es handelt sich um einen Antimetaboliten, der erfolgreich für die Behandlung von soliden Tumoren eingesetzt wird.^{9,138} Gemcitabin (**2**) besitzt an der 2'-Position des Furanoserings zwei Fluoratome.^{137,140–143} Das Einbringen von Fluor in ein Nucleosid führt nur zu einer geringen Veränderung der räumlichen Anordnung, aber gleichzeitig zu einer entscheidenden Änderung im biochemischen Verhalten. Die van-der-Waals-Radien von Wasserstoff (1.20 Å) und Fluor (1.35 Å) sind so ähnlich, dass dieser Austausch zu einer Pseudosubstrataktivität führt. Dadurch kann das neugebildete Nucleosid von den gleichen Enzymen umgesetzt werden.¹⁴⁴ 1996 wurde Gemcitabin (**2**) von der FDA für die Behandlung von fortgeschrittenen oder metastasierenden Pankreaskarzinomen zugelassen.^{136–138} Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gemcitabin (**2**) ebenfalls gegen eine Reihe weiterer solider Tumore wirkt, dazu gehören Kolorektal-, Lungen-, Kopf- und Nacken-, Eierstock-, Brust-, und Nierenkarzinome.^{9,136–138,141,142} Gemcitabin (**2**) kann ebenfalls bei der Behandlung von bösartigen Erkrankungen des Blutes eingesetzt werden, wie der akuten Leukämie.⁹

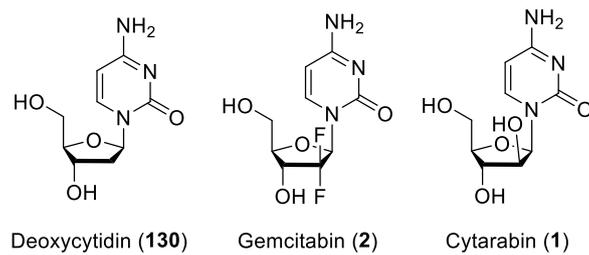


Abbildung 105: Darstellung von Desoxycytidin (**130**), Gemcitabin (**2**) und Cytarabin (**1**).¹⁴³

Anders als Cytarabin (**1**), welches gute Ergebnisse bei der Behandlung von akuter Leukämie bei Erwachsenen liefert, wirkt Gemcitabin (**2**) bei einer Vielzahl solider Tumore.^{137,139} Die Behandlung von soliden Tumoren ist oft schwierig, da die eingesetzten Medikamente nur unzureichend in die Zellen aufgenommen werden, wodurch keine ausreichende intrazelluläre Konzentration des Wirkstoffs erreicht wird. Die Wirkung von Gemcitabin (**2**) auf diese Art von Tumoren wird wahrscheinlich von den vielfältigen, intrazellulären Wirkmechanismen verursacht (s. **Abbildung 106**).^{136,139}

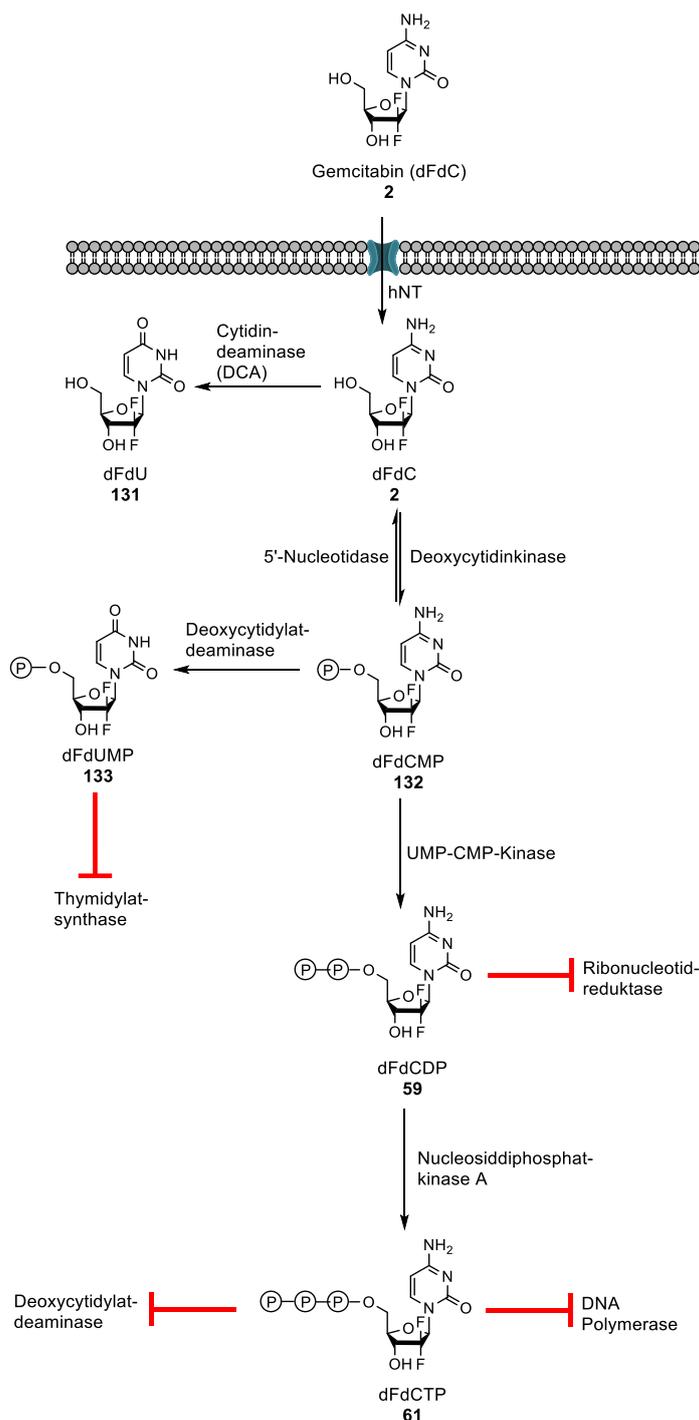


Abbildung 106: Darstellung der Wirkweise und Deaktivierung von Gemcitabin (2).¹³⁶

Die Zellaufnahme von Gemcitabin (2) erfolgt über einen Nucleosidtransporter (hNTs).^{9,136,137,139} Bei Gemcitabin (2) handelt es sich um ein Prodrug, das in der Zelle in seine aktiven Formen, das Gemcitabinmonophosphat 59 und -triphosphat 61, überführt werden muss. Im ersten Schritt wird Gemcitabin (2) durch die Desoxycytidinkinase in das Gemcitabinmonophosphat 132 überführt.^{9,136–143} Die Bildung des Gemcitabinmonophosphats 132 stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.¹³⁶ Anschließend erfolgt die Phosphorylierungsreaktion zum Diphosphat 59, diese wird durch die UMP-CMP-Kinase katalysiert. Das Gemcitabintriphosphat

61 wird anschließend durch eine weitere Phosphorylierungsreaktion mithilfe von Nucleosid-diphosphatkinasen gebildet.^{9,136–139,141–143}

Gemcitabin (**2**) weist verschiedene intrazelluläre Wirkweisen auf, die zusammengenommen zu einem selbstverstärkenden Effekt führen. Die Wirkung beruht auf verschiedenen Einflüssen auf die DNA-Synthese. Das Gemcitabintriphosphat **61** konkurriert mit dem Desoxycytidin-triphosphat (dCTP) um den Einbau in den DNA-Strang. Gleichzeitig kann das Gemcitabin-triphosphat **61** die DNA-Polymerase hemmen. Das Gemcitabindiphosphat **59** ist außerdem ein starker Inhibitor der Ribonucleotidreduktase (RR). Dies resultiert in einer Konzentrations-abnahme der Desoxyribonucleotide, welche für die DNA-Synthese notwendig sind und wo-durch die Wirkung des Gemcitabintriphosphats **61** verstärkt wird, da sich die Wahrscheinlichkeit des Einbaus in den DNA-Strang erhöht. Nach erfolgtem Einbau des Gemcitabintriphosphats **61** und eines weiteren Desoxyribonucleotids kommt es anschließend zum Kettenabbruch. Die nicht-endständige Position von Gemcitabin (**2**) verhindert ein weiteres Wachsen des DNA-Strangs und gleichzeitig kann das Gemcitabintriphosphat **61** nicht von DNA-Reparaturenzymen entdeckt und entfernt werden. Dieser Prozess ist als „masked chain termination“ bekannt.^{9,136–138,140–143} Auch wenn Gemcitabin (**2**) mehrere zelluläre Ziele aufweist, so beruht seine antiproliferative Wirkung hauptsächlich auf der Inhibierung der DNA-Synthese und der daraus resultierenden Apoptose.¹³⁷

Die Verteilung von Gemcitabin (**2**) im Körper erfolgt nach intravenöser Gabe schnell, allerdings kommt es ebenfalls zu einer zügigen Inaktivierung.¹³⁸ Dafür existieren mehrere Angriffsorte, so kann Gemcitabin (**2**) durch die Desoxycytidindesaminase und das Gemcitabinmono-phosphat durch die Desoxycytidylatdesaminase hydrolysiert werden. Außerdem kann die 5'-Nucleosidkinase die Phosphorylierung rückgängig machen, wodurch aus dem Monophosphat **132** wieder Gemcitabin (**2**) erhalten wird.^{9,136,137,141,143}

Das Einsatzgebiet von Gemcitabin (**2**) in soliden Tumoren stellt ein wichtiges Behandlungsfeld dar. Allerdings sind die genannten Inaktivierungsschritte hinderlich bei der erfolgreichen Therapie. Deswegen soll durch die Verwendung des TriPPP_{ro}-Konzeptes eine intrazelluläre Freisetzung des Gemcitabintriphosphats **61** erreicht werden. Dadurch soll die Konzentration der aktiven Spezies in der Zelle erhöht und gleichzeitig die Angriffspunkte der Inaktivierungen minimiert werden. Ein Teil dieser Arbeit war folglich die Synthese von symmetrischen Gemcitabin-TriPPP_{ro}-Verbindungen. Diese Verbindungen sollen anschließend in Proliferationsuntersuchungen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Tumorwachstum untersucht werden.

6.3.2 Synthese des Gemcitabinmonophosphats

Die Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132** wurde auf drei verschiedene Arten betrieben. Zuerst wurde wiederum die Fm-Amiditroute gewählt, da diese Route bisher gute Resultate geliefert hat (s. **Abbildung 107**).

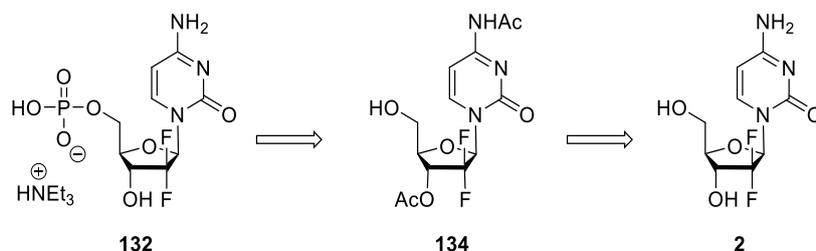


Abbildung 107: Retrosyntheseschema der Gemcitabinmonophosphatsynthese über die Fm-Amiditroute.

Bei dieser Syntheseroute besteht der letzte Schritt aus der Kopplung des 3'-acetylgeschützten Gemcitabins **134** und Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) sowie der Entfernung der Schutzgruppen. Durch Verwendung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie kann die 3'-Hydroxylgruppe von Gemcitabin (**2**) selektiv mit einer Acetylgruppe versehen und damit geschützt werden, dadurch können beim Kopplungsschritt Nebenreaktionen verhindert werden. Das 3'-acetylgeschützte Gemcitabin **134** wurde ausgehend von Gemcitabin (**2**) dargestellt, indem zunächst an der 5'-Hydroxylgruppe eine TBS-Schutzgruppe, dann eine Acetylgruppe an der 3'-Hydroxylgruppe eingeführt wurden und anschließend im nächsten Schritt die TBS-Gruppe selektiv entfernt wurde.

Die Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132** über die Fm-Amiditroute ist in **Abbildung 108** dargestellt.

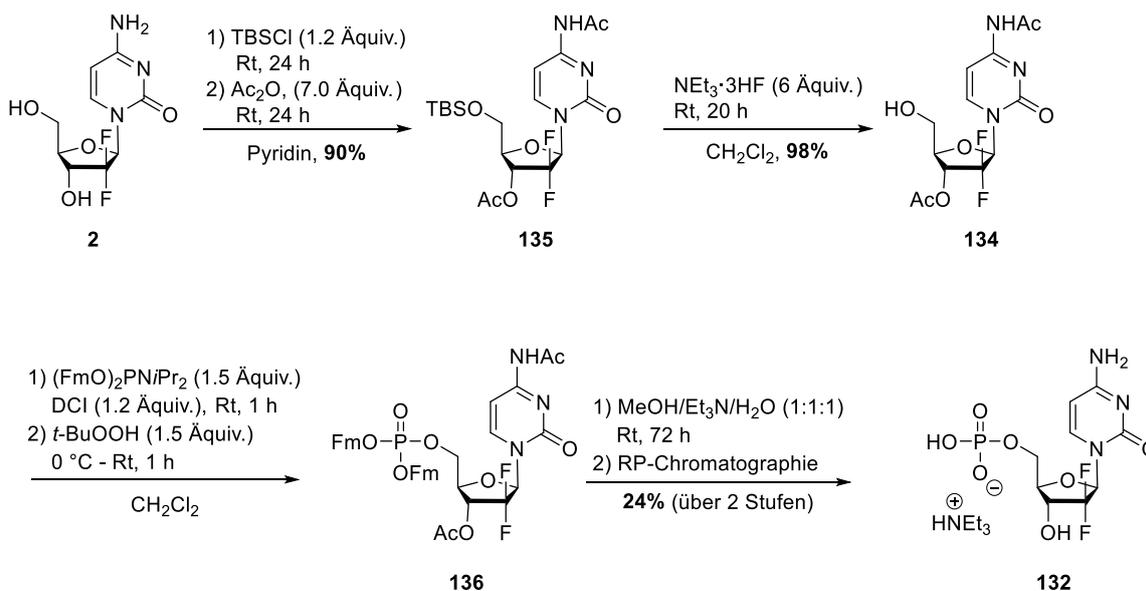


Abbildung 108: Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132** über die Fm-Amiditroute.

Für das Anbringen der beiden Schutzgruppen wurde Gemcitabin (**2**) in Pyridin gelöst und mit TBSCl 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da die 5'-Hydroxylgruppe reaktiver ist und nur ein geringer Überschuss von TBSCl verwendet wurde, wurde sichergestellt, dass die TBS-Schutzgruppe nur in der 5'-Position eingeführt wurde. Anschließend wurde Essigsäureanhydrid zugegeben und erneut 24 Stunden gerührt. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung wurde das doppelt geschützte Gemcitabin **135** in 90% Ausbeute erhalten. Für das Entfernen der TBS-Schutzgruppe wurde das doppelt geschützte Gemcitabin **135** in Dichlormethan gelöst und mit Triethylamin-Trihydrofluorid als Fluoriddonor versetzt. Nach 20-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde Kieselgel zum Beenden der Reaktion zugegeben, dadurch konnte überschüssiges Fluoridreagenz abreagieren. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das 3'-acetylgeschützte Gemcitabin **134** in einer Ausbeute von 98% erhalten. Das 3'-acetylgeschützte Gemcitabin **134** wurde anschließend in Dichlormethan mit Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidit (**76**) versetzt. Als Aktivator wurde DCI ($c = 0.25$ M in Dichlormethan) zugegeben und nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde *tert*-Butylhydroperoxid ($c = 5.50$ M in *n*-Decan) für die Oxidation zugefügt. Es wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte durch automatisierte NP-Chromatographie, da dadurch ein genauer und stetiger Gradient angewendet werden konnte. Trotzdem konnte das Fm-geschützte Monophosphat **136** nicht rein dargestellt werden, da sowohl Produkt als auch Verunreinigungen sich über viele Fraktionen gezogen haben und eine vollständige Abtrennung der Verunreinigungen zu hohen Ausbeuteverlusten geführt hätte. Es wurde an dieser Stelle darauf verzichtet, das Fm-geschützte Monophosphat **136** vollständig zu reinigen, da die Abspaltung der Schutzgruppen trotzdem möglich ist. Zur Entfernung der Schutzgruppen wurde das geschützte Monophosphat **136** zunächst eine Stunde bei

Raumtemperatur in einer Methanol/Triethylamin-Mischung (1:1 v:v) gerührt, anschließend wurde das gleiche Volumen Wasser zugegeben und es schloss sich Rühren für 72 Stunden an. Gemcitabinmonophosphat **132** konnte nach anschließender automatisierter RP-Chromatographie lediglich in einer Ausbeute von 24% über die beiden letzten Stufen erhalten werden. Die geringe Ausbeute lässt sich dadurch erklären, dass das Produkt bei der letzten Säulenchromatographie über viele Fraktionen verschmiert war. Dadurch kam es durch Überlagerungen mit Verunreinigungen zur Bildung von Mischfraktionen, die nicht weiter gereinigt werden konnten. Über die Fm-Amiditroute konnte das Gemcitabinmonophosphat **132** in einer Gesamtausbeute von 53% erhalten werden.

Da die Ausbeute im letzten Schritt der Fm-Amiditroute gering war, wurde versucht auch auf anderem Wege das Monophosphat **132** darzustellen. Es sollte versucht werden, das Monophosphat **132** in einer Phosphorylierungsreaktion direkt aus Gemcitabin (**2**) zu synthetisieren und damit die aufwendige Schutzgruppenstrategie zu umgehen (s. **Abbildung 109**).

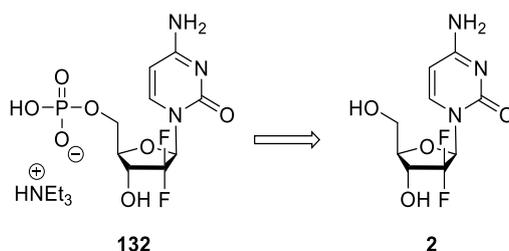


Abbildung 109: Retrosyntheseschema der direkten Phosphorylierungsreaktion für die Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132**.

Eine bewährte Methode für die Herstellung von Monophosphaten in einer direkten Phosphorylierungsreaktion ist die Methode nach SOWA und OUCHI.¹²⁵ Bei dieser Syntheseroute wird in einem ersten Schritt Phosphorylchlorid, Pyridin und Wasser (Stoffmengenverhältnis 2:2:1) bei 0 °C in Acetonitril gelöst, dabei wird das Phosphorylierungsreagenz *in situ* gebildet (s. **Abbildung 110**).

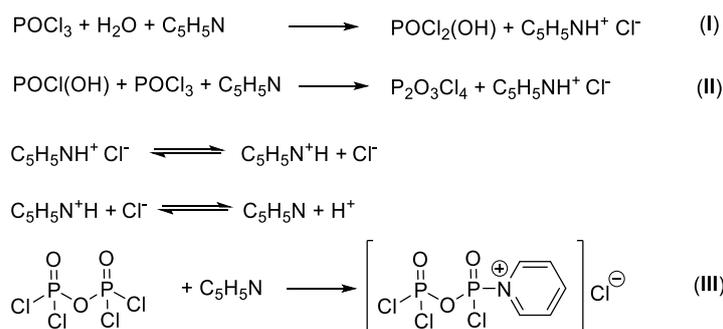


Abbildung 110: *in situ*-Generierung des Phosphorylierungsreagenzes Trichlorpyrophosphopyridiniumchlorid (III).¹²⁵

Phosphorylchlorid wurde durch Wasser zur Dichlorphosphorsäure (I) hydrolysiert. Diese Hydrolyse erfolgte nur partiell, da mit einem Unterschuss Wasser gearbeitet wird. Anschließend wurde die Dichlorphosphorsäure durch eine Reaktion mit Phosphorylchlorid in das Tetrachlorpyrophosphat (II) überführt. Für den letzten Schritt der Bildung des aktiven Phosphorylierungsreagenzes wurde zunächst Pyridin aus Pyridiniumchlorid durch Abspaltung von HCl regeneriert, anschließend erfolgte eine Reaktion des Tetrachlorpyrophosphats mit Pyridin zum Trichlorpyrophosphopyridiniumchlorid (III). Nach Bildung des Phosphorylierungsreagenzes erfolgte die Zugabe des Nucleosids für die Synthese des Nucleosidmonophosphats.

Die dargestellte Synthesemethode von Nucleosidmonophosphaten nach SOWA und OUCHI¹²⁵ sollte für die Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132** verwendet werden (s. **Abbildung 111**).

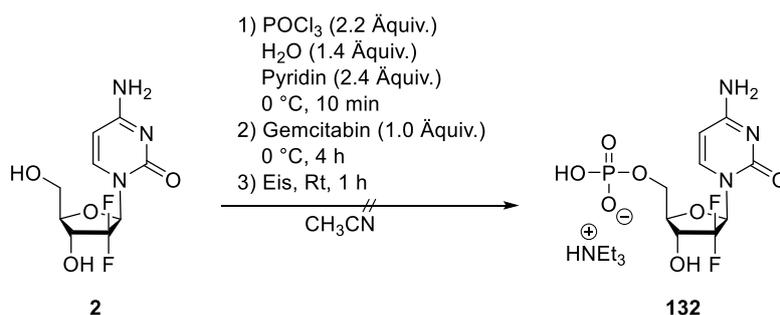


Abbildung 111: Versuchte Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132** via Sowa und Ouchi.

Für diese Phosphorylierungsreaktion wurde Phosphorylchlorid in Acetonitril gelöst und bei 0°C tropfenweise mit Wasser und Pyridin versetzt. Es wurde zehn Minuten bei 0°C gerührt, dabei bildete sich, wie im vorherigen Absatz beschrieben, das Phosphorylierungsreagenz. Es folgte die Zugabe von Gemcitabin (**2**) und 4-stündiges Rühren bei 0°C . Für die Hydrolyse des Produkts wurde die Reaktionslösung auf Eiswasser gegossen und wiederum eine Stunde gerührt. Die anschließende Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat diente der

Neutralisierung der Reaktionslösung. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach automatisierter RP-Säulenchromatographie konnte nur das Edukt Gemcitabin (**2**) zurückerhalten werden.

Eine andere Möglichkeit und im Arbeitskreis mittlerweile als Reaktion für die direkte Synthese des Monophosphats aus dem Nucleosid etabliert ist die YOSHIKAWA-REAKTION (s. **Abbildung 112**). In **Kapitel 6.1.6.1** wurde der Mechanismus der Reaktion bereits erläutert.

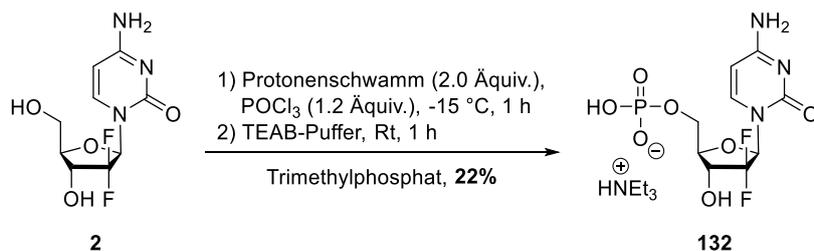


Abbildung 112: Synthese des Gemcitabinmonophosphats **132** via YOSHIKAWA-REAKTION.

Die Edukte Gemcitabin (**2**) und Protonenschwamm wurden zunächst im Vakuum getrocknet, damit die Reaktion unter möglichst trockenen Bedingungen stattfinden konnte. Anschließend wurden sie mit Trimethylphosphat versetzt und auf -10 °C gekühlt. Es folgte die tropfenweise Zugabe von Phosphorylchlorid bei -10 °C. Dann wurde eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Dabei kam es zur Bildung des Phosphordichloridats (s. **Kapitel 6.1.6.1**). Die Reaktionsverfolgung erfolgte mittels RP-HPLC. Der Endpunkt der Reaktion war erreicht, als die Zunahme der Nebenproduktesignale schneller erfolgte als die Abnahme des Eduktpeaks. Anschließend wurde TEAB-Puffer zugegeben, wodurch das gebildete Phosphordichloridat zum Monophosphat **132** hydrolysiert wurde. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass es sich bei den Gegenionen um Triethylammoniumionen handelt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und Gemcitabinmonophosphat **132** durch automatisierte RP-Chromatographie mit einem Gradienten aus TEAB-Puffer (0.05 M) und Acetonitril gereinigt. Gemcitabinmonophosphat **132** wurde in einer Ausbeute von 24% erhalten. Die geringe Ausbeute kann auch hier durch die problematische Reinigung mittels Säulenchromatographie begründet werden. Es war ein Verschmieren des Produkts zu beobachten, dadurch kam es ebenfalls zu einer Überlagerung mit Verunreinigungen, die nur unter großem Ausbeuteverlust abgetrennt werden konnten. Außerdem wurde durch die HPLC-Reaktionsverfolgung festgestellt, dass sich bereits Nebenprodukte gebildet hatten, obwohl das Edukt noch nicht vollständig verbraucht war, dadurch ging ebenfalls Produkt verloren.

6.3.3 Synthese der symmetrischen *H*-Phosphonate

Für die Darstellung der symmetrischen Gemcitabin-TriPPP_{ro}-Verbindungen **56** mussten zunächst die symmetrischen *H*-Phosphonate **137** synthetisiert werden (s. **Abbildung 113**).

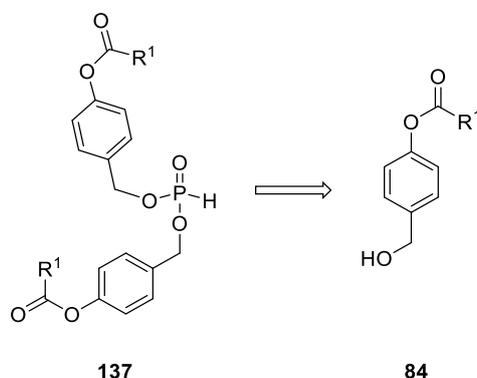


Abbildung 113: Retrosynthetische Darstellung der symmetrischen *H*-Phosphonate **137**.

Die Darstellung der symmetrischen *H*-Phosphonate **137** sollte ausgehend von DPP (**82**) erfolgen. In DPP (**82**) sollten durch Substitutionen mit den 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoaten **84** die Phenylsubstituenten ausgetauscht und dadurch das symmetrische *H*-Phosphonat **137** erhalten werden.

Die Synthese der symmetrischen *H*-Phosphonate **137** erfolgte ähnlich wie die Synthese der unsymmetrischen *H*-Phosphonate **65** durch eine Umesterung mit DPP (**82**) im basischen Milieu (s. **Abbildung 114**).

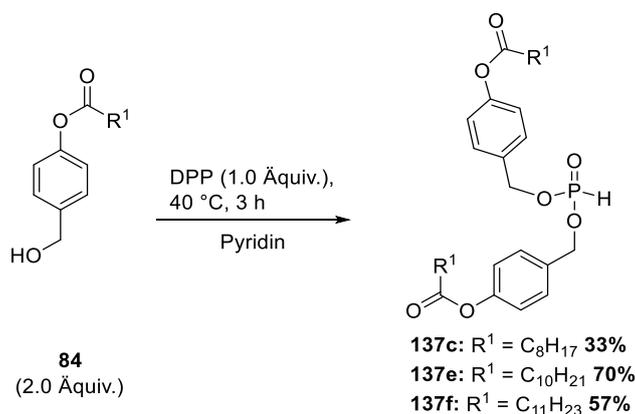


Abbildung 114: Synthese der symmetrischen *H*-Phosphonate **137**.

Zunächst wurde DPP (**82**) in Pyridin gelöst und anschließend mit 2.0 Äquivalenten 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoat **84** versetzt. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei 40 °C

gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Um sicherzustellen, dass kein Pyridin mehr vorhanden war, wurde zweimal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Die vollständige Entfernung von Pyridin war sehr wichtig, da das *H*-Phosphonat anschließend aus Methanol umkristallisiert wurde und dies nur erfolgreich war, wenn kein Pyridin mehr vorhanden war. Die symmetrischen *H*-Phosphonate **137** konnten in mittleren bis guten Ausbeuten von 33-70% erhalten werden.

6.3.4 Synthese der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen

Die Darstellung der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** sollte ebenfalls über die *H*-Phosphonatroute erfolgen (s. **Abbildung 115**).

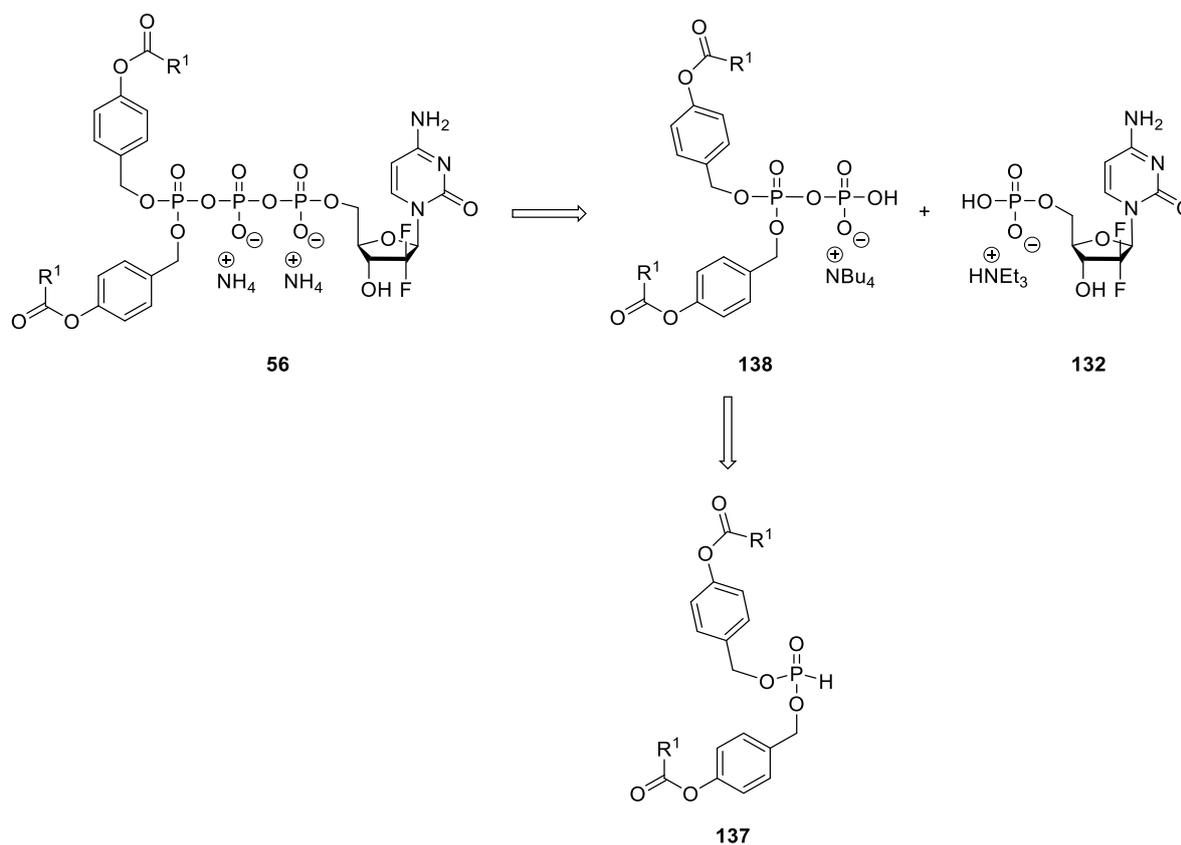


Abbildung 115: Retrosyntheschema der Gemcitabin-TriPPPro-Synthese.

Für die Synthese der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** musste im letzten Reaktionsschritt das Pyrophosphat **138** mit dem Gemcitabinmonophosphat **132** gekoppelt werden. Dafür mussten die symmetrischen *H*-Phosphonate **137** zunächst in die entsprechenden Pyrophosphate **138** überführt werden.

Die Synthese der Pyrophosphate **138** ausgehend von den *H*-Phosponaten **137** ist in **Abbildung 116** dargestellt.

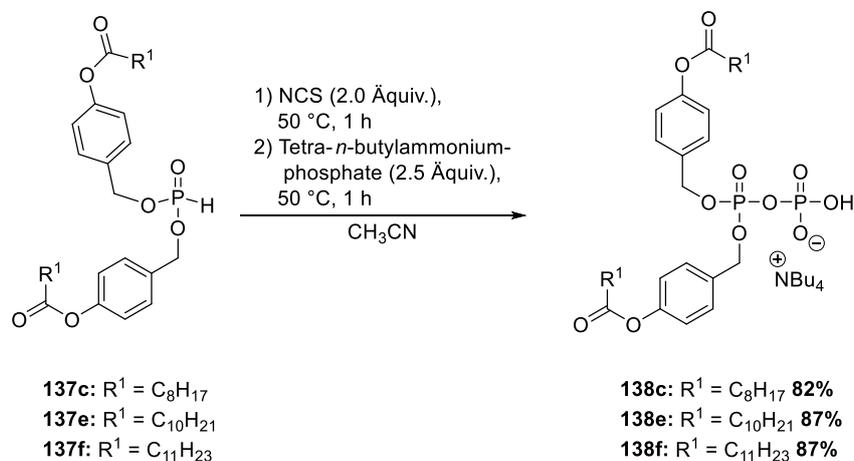


Abbildung 116: Synthese der symmetrischen Pyrophosphate **138**.

Die symmetrischen *H*-Phosphonate **137** wurden in Acetonitril gelöst und mit 1-Methylimidazol eine Stunde bei 50 °C gerührt, dadurch erfolgte die Aktivierung mit NCS. Anschließend wurde Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.40$ M in Acetonitril) zur Reaktion gegeben und eine weitere Stunde bei 50 °C gerührt. Während diesem Reaktionsschritt kam es durch den nucleophilen Angriff von Tetra-*n*-butylammoniumphosphat zur Bildung des Pyrophosphats **138**. Die Reinigung des Pyrophosphats **138** erfolgte durch Extraktionen mit Ammoniumacetat und Wasser. Für eine schnellere Phasentrennung, die eine Hydrolyse der empfindlichen Pyrophosphate **138** verhindern sollte, wurden die Lösungen zentrifugiert. Die Pyrophosphate **138** wurden in Ausbeuten von 82-87% erhalten und aufgrund ihrer Instabilität ohne weitere Analyse direkt für die Folgereaktion eingesetzt.

Die frisch dargestellten Pyrophosphate **138** wurden im Reaktionsschritt mit Gemcitabinmonophosphat **132** zu den TriPPP-Verbindungen **56** weiter umgesetzt (s. **Abbildung 117**).

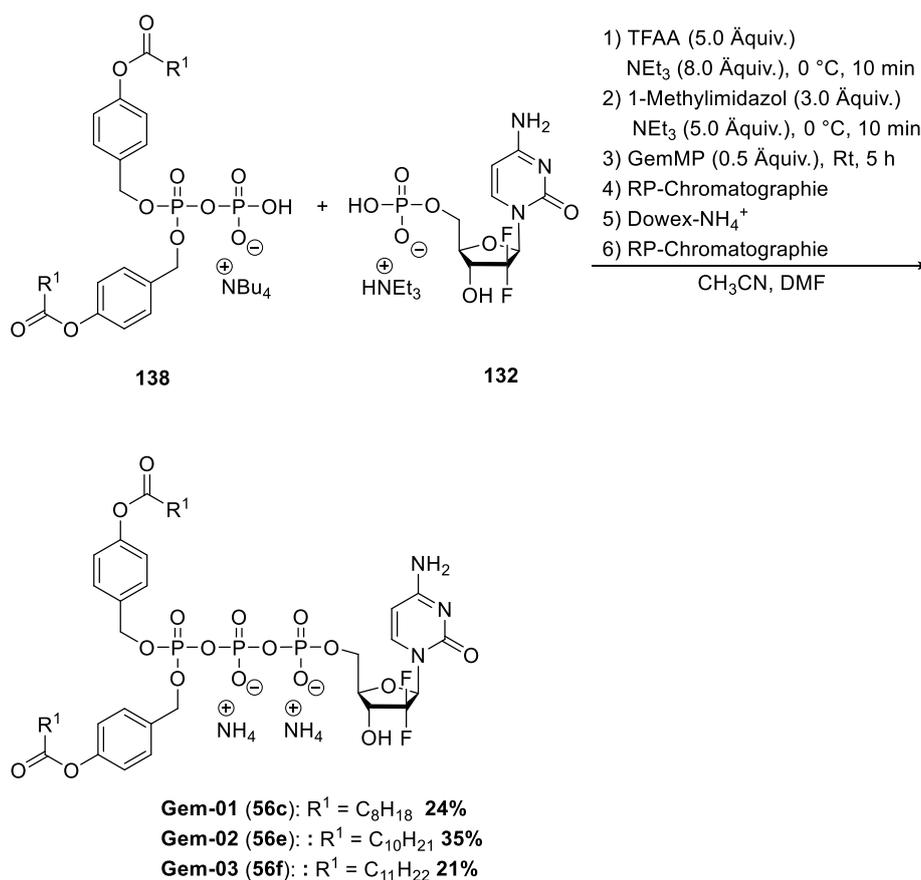


Abbildung 117: Synthese der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56**.

Das entsprechende symmetrische Pyrophosphat **138** wurde analog zu den second-generation Pyrophosphaten in **Kapitel 6.1.3** durch eine Reaktion mit TFAA bei 0 °C in Acetonitril zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Nicht verbrauchtes TFAA wurde anschließend unter vermindertem Druck und durch Coevaporieren mit Acetonitril entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in DMF gelöst und mit 1-Methylimidazol versetzt. Ein Wechsel des Lösungsmittels war notwendig, da sich das Gemcitabinmonophosphat **132** nicht ausreichend in Acetonitril löste. Durch die Reaktion mit 1-Methylimidazol wurde das Imidazolidat gebildet. Durch die Elektrophilieerhöhung des Phosphoratoms wurde der Angriff des Gemcitabinmonophosphats **132** begünstigt. Die Reaktion wurde fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Endpunkt wurde durch eine Reaktionsverfolgung via RP-HPLC (Methode B) bestimmt. Es erfolgte eine Vorreinigung mittels automatisierter RP-Chromatographie, dann wurden die Gegenionen mit einer Dowex-Kationenaustauschersäule zu Ammoniumionen gewechselt. Zur vollständigen Reinigung der TriPPPPro-Verbindungen **56** waren anschließend noch jeweils zwei weitere RP-Chromatographien notwendig. Die Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56** konnten in Ausbeuten von 21-35% dargestellt werden.

6.3.5 Synthese des Gemcitabintriphosphats

Die Darstellung des Gemcitabintriphosphats **61** sollte durch eine direkte Phosphorylierungsreaktion erfolgen (s. **Abbildung 118**).

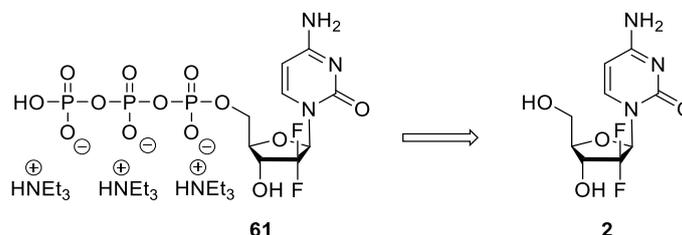


Abbildung 118: Retrosyntheschema der Triphosphatsynthese.

Bei der Synthese des BCNA-Triphosphats **60** in **Kapitel 6.1.6.1** nach der Methode von LUDWIG und ECKSTEIN^{116,145} konnte das Triphosphat **60** lediglich in einer Ausbeute von 16% und nach aufwendiger säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. Deswegen wurde nach alternativen Synthesewegen gesucht. Von MOHAMADY *et al.*¹⁴⁶ wurde eine Methode entwickelt, bei der ausgehend vom geschützten Nucleosid das 5'-Triphosphat durch eine Reaktion mit Trimetaphosphat **139** dargestellt wird (s. **Abbildung 119**).

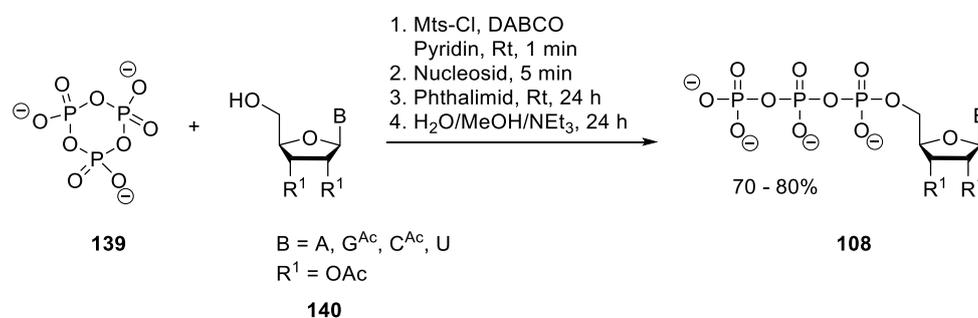


Abbildung 119: Synthese des Nucleosidtriphosphats **108** durch eine Reaktion des Trimetaphosphats **139** mit einem geschützten Nucleosid **140**.¹⁴⁶

Das Trimetaphosphat **139** wird mit Mesitylsulfonylchlorid (Mts-Cl) und 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) in Pyridin zur Reaktion gebracht und anschließend wird das geschützte Nucleosid **140** zugegeben. Durch Zugabe eines Puffers wird das Produkt **108** freigesetzt.¹⁴⁶

Es sollte zunächst versucht werden, Gemcitabintriphosphat **61** durch Reaktion mit Trimetaphosphat **139** über die Methode von MOHAMADY *et al.*¹⁴⁶ darzustellen (s. **Abbildung 120**). Das benötigte Trimetaphosphatreagens musste für die Reaktion frisch hergestellt werden. Da es

in Lösung nicht lange stabil war, wurde es über Molsieb und unter Schlenckbedingungen bei -20 °C gelagert. Das in dieser Arbeit verwendete Trimetaphosphat **139** wurde von JULIAN WITT zur Verfügung gestellt.

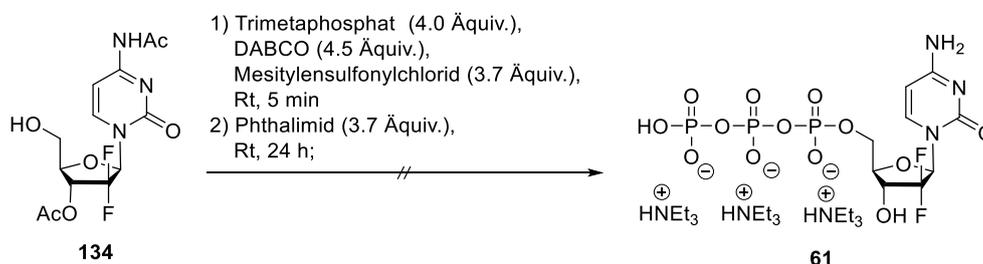


Abbildung 120: Versuchte Synthese des Gemcitabintriphosphats **61** über die Trimetaphosphatrouten.

Trimetaphosphat (**139**, $c = 0.5$ M in Pyridin) wurde mit DABCO und Mesitylsulfonylchlorid versetzt. Nach kurzer Durchmischung wurde das 3'-acetylgeschützte Gemcitabin **120** hinzugefügt und vier Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte die Zugabe von Phthalimid, anschließend wurde die Reaktionsmischung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Für die Beendigung wurde Triethylammoniumacetatpuffer zugegeben und dann mit Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und durch Gefriertrocknung vom Wasser befreit. Der erhaltene Rückstand wurde in einer Wasser/Methanol/Triethylamin-Mischung (10:22:3 v:v:v) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels erfolgten mehrere automatisierte RP-Säulenchromatographien. Das Produkt **61** konnte dabei nur in sehr geringen Mengen erhalten werden. Es wurde hauptsächlich das Edukt **134** wiedergewonnen.

Als nächstes sollte nun die YOSHIKAWA-REAKTION (s. **Kapitel 6.1.6.1**) versucht werden (s. **Abbildung 121**).^{115,116,119} Damit konnte bereits erfolgreich das BCNA-Triphosphat **60** dargestellt werden, wenn auch in einer geringen Ausbeute.

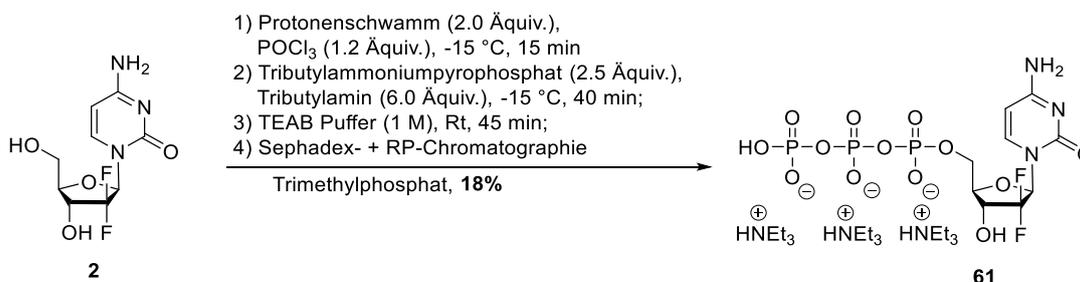


Abbildung 121: Synthese des Gemcitabintriphosphats **61** via YOSHIKAWA-REAKTION.

Für die Reaktion wurden zunächst Gemcitabin (**2**) und Protonenschwamm im Vakuum getrocknet, dadurch sollte restliche Feuchtigkeit entfernt und Nebenreaktionen mit Phosphorylchlorid verhindert werden. Anschließend wurden die beiden Substanzen in Trimethylphosphat gelöst und bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ tropfenweise mit Phosphorylchlorid versetzt. Durch die niedrige Temperatur und die langsame Zugabe sollte eine Mehrfachreaktion mit Phosphorylchlorid vermieden werden. Es wurde 15 Minuten bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Bei diesem Reaktionsschritt wurde das Phosphordichloridat gebildet, welches im nächsten Schritt durch Zugabe von Tributylammoniumpyrophosphat und Tributylamin zum Triphosphat **61** reagiert. Die Reaktion wurde mittels RP-HPLC verfolgt. Der Endpunkt der Reaktion war nach 40 Minuten bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht, ab diesem Zeitpunkt nahm die Bildung der Nebenprodukte stärker zu als die Bildung des Produkts **61**. Zur Hydrolyse wurde TEAB-Puffer (1M) zugegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. In diesem Reaktionsschritt erfolgte ebenfalls der Austausch der Gegenionen zu Triethylammoniumionen. Es waren mehrere Reinigungsschritte über automatisierte Sephadex- und RP-Chromatographien notwendig, damit das Gemcitabintriphosphat **61** rein erhalten werden konnte. Die Ausbeute der Reaktion betrug lediglich 18%. Der Grund dafür liegt in den vielen notwendigen Chromatographieschritten, die durchgeführt werden mussten, um das Produkt sauber zu erhalten.

6.3.6 Synthese des Gemcitabindiphosphats

Die Synthese des Gemcitabindiphosphats **59** soll über eine Variante der YOSHIKAWA-REAKTION erfolgen.¹²² Diese Reaktion konnte bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt werden, beispielsweise bei der erfolgreichen Synthese des BCNA-Diphosphats **58** (s. **Abbildung 122**).

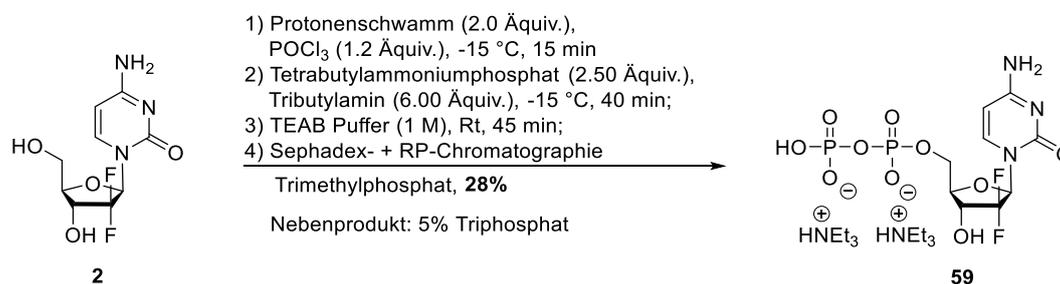


Abbildung 122: Synthese des Gemcitabindiphosphats **59** via YOSHIKAWA-REAKTION.

Vor Reaktionsbeginn wurden Gemcitabin (**2**) und Protonenschwamm im Vakuum getrocknet. Die beiden Edukte wurden anschließend in Trimethylphosphat gelöst, bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Phosphorylchlorid versetzt und 15 Minuten bei dieser Temperatur gerührt, dabei bildete sich das Phosphordichloridat. Durch Zugabe von Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.40\text{ M}$ in

Acetonitril) und Tributylamin im nächsten Reaktionsschritt wurde das Phosphordichloridat zum Diphosphat **59** umgesetzt. Die Reaktion wurde mittels RP-HPLC verfolgt. Als Endpunkt der Reaktion wurde der Zeitpunkt festgelegt, ab dem sich Nebenprodukte bildeten. Bei der YOSHIKAWA-REAKTION ist es einfacher das Edukt abzutrennen als die Nebenprodukte, deswegen wird die Reaktion beendet, wenn sich Nebenprodukte bilden und nicht wenn das Edukt vollständig umgesetzt wurde. Nach dem Reaktionsende wurde TEAB-Puffer zugegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. In diesem Reaktionsschritt wurde das Produkt hydrolysiert und die Gegenionen zu Triethylammoniumionen getauscht. Die anschließende Reinigung des Produkts erfolgte über mehrfache automatisierte Sephadex- und RP-Chromatographien. Das Gemcitabindiphosphat **59** konnte durch Verwendung der YOSHIKAWA-REAKTION in einer Ausbeute von 28% erhalten werden. Bei dieser Reaktion wurde ebenfalls das Gemcitabintriphosphat **61** als Nebenprodukt erhalten, die Ausbeute lag bei 5%. Der Grund für die Bildung des Triphosphats **61** wurde in **Kapitel 6.1.6.2** beschrieben.

6.3.7 Hydrolyse der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen

Die dargestellten Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** sollten ebenfalls auf ihre chemische und enzymatische Stabilität sowie den Einfluss eines CEM/0-Zellmediums untersucht werden. Da diese TriPPPro-Verbindungen **56** zwei spaltbare AB-Maskierungseinheiten besitzen, unterscheidet sich der erwartete Hydrolyseverlauf von den bisher in dieser Arbeit untersuchten second-generation TriPPPro-Verbindungen **53** und **55** (s. **Abbildung 123**).

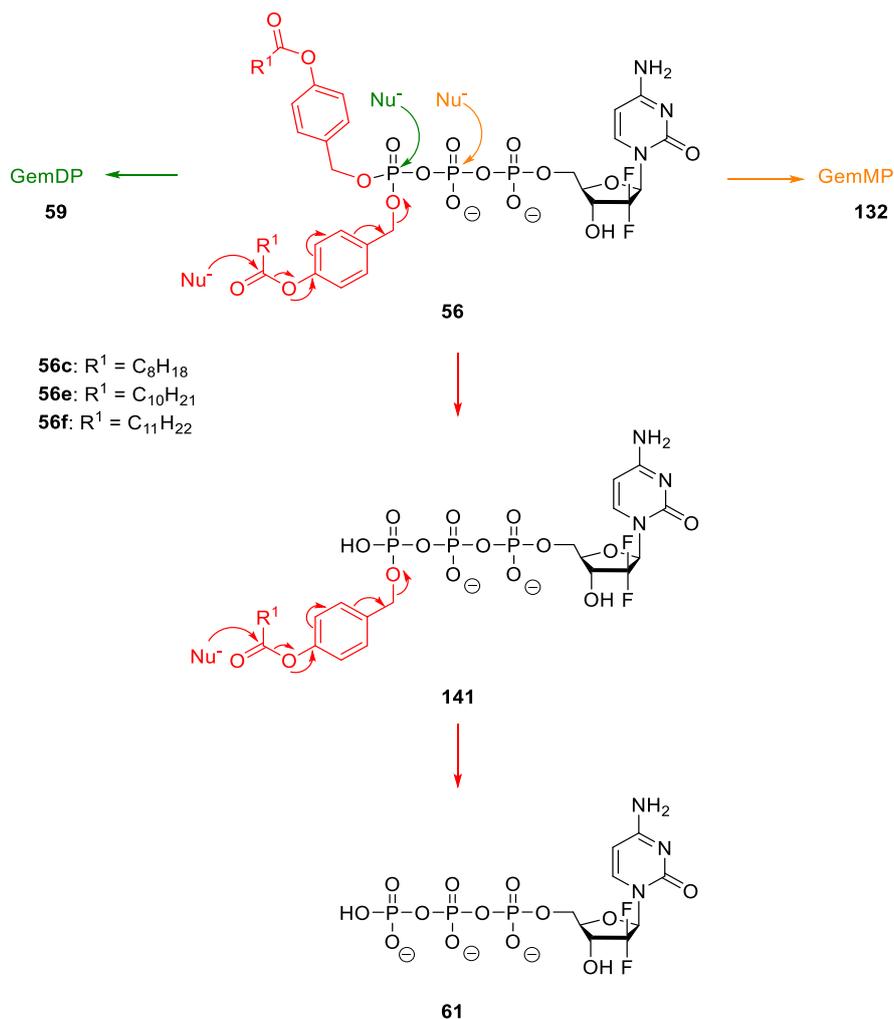


Abbildung 123: Erwarteter Hydrolyseverlauf der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56**.

Bisherige Studien von GOLLNEST⁷¹, REIMER⁶⁹ und WITT¹¹⁴ haben gezeigt, dass die Hydrolyse der symmetrischen TriPPPPro-Verbindungen hauptsächlich zu dem Angriff des Nucleophils auf die Acyloxyfunktion der AB-Maskierungseinheit führt (roter Weg). Anschließend wird die Maskierungseinheit durch Elektronenpaarverschiebungen abgespalten, wobei das monomaskierte Intermediat **141** erhalten wird. Da auch hier eine Maskierungseinheit vorhanden ist, kann diese ebenfalls von einem Nucleophil angegriffen und abgespalten werden. Durch die Entfernung der zweiten Maskierungseinheit wird dann das Triphosphat **61** freigesetzt. Jedoch kann das Nucleophil auch bei den symmetrischen TriPPPPro-Verbindungen **56** die Phosphoranhydridbindungen des Prodrugs **56** angreifen, wodurch das Diphosphat **59** (grüner Weg) bzw. das Monophosphat **132** (orangener Weg) gebildet werden können.

6.3.7.1 PBS-Hydrolyse

Für die Bestimmung der chemischen Stabilität wurde die Hydrolyse in PBS-Puffer durchgeführt. Das genaue Vorgehen entspricht dem in **Kapitel 6.1.7.1** vorgestellten Ablauf. In **Tabelle 14** sind die errechneten Halbwertszeiten für die Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56** dargestellt. Bei den symmetrischen TriPPPPro-Verbindungen **56** können zwei Halbwertszeiten berechnet werden. Die erste Halbwertszeit berücksichtigt die Abspaltung der ersten AB-Maskierungseinheit und die zweite Halbwertszeit die Abspaltung der zweiten AB-Maske.

Tabelle 14: Übersicht der ermittelten Halbwertszeiten der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56**.

TriPPPPro-Verbindung	Gem-01	Gem-02	Gem-03
Verbindung	56c	56e	56f
R ₁	C ₈ H ₁₇	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃
PBS t _{1/2} (1) [h]	19	20	17
PBS t _{1/2} (2) [h]	115	99	87

Die Stabilität der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56** ist etwas geringer als die von GOLLNEST⁷¹ und WITT¹¹⁴ ermittelten Werte für symmetrische BCNA- **53** oder 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** (Halbwertszeiten BCNA: 26 – 45 Stunden, 5-FdU: 37 Stunden). Dies deckt sich mit der Beobachtung von GOLLNEST,⁷¹ dass eine Aminofunktion in der Baseneinheit die Halbwertszeit verkürzt.

Die Stabilität der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen Gem-01 (**56c**, C₈H₁₇-Maske) und Gem-02 (**56e**, C₁₀H₂₁-Maske) liegt in einem ähnlichen Bereich. Bei Gem-03 (**56f**, C₁₁H₂₃-Maske) liegt die geringste Stabilität von allen untersuchten Prodrugs vor. Bereits bei der PBS-Hydrolyse der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen wies das Prodrug mit einer C₁₁H₂₃-Maskierung die geringste Stabilität auf. Bei den drei untersuchten Prodrugs **56** wurde zunächst das monomaskierte Intermediat **141** und anschließend das Triphosphat **61** freigesetzt. Der stufenweise Ablauf der Hydrolyse von der TriPPPPro-Verbindung **56** zum Triphosphat **61** kann in den Chromatogrammen beobachtet werden. So sinkt zunächst die Konzentration des Prodrugs **56** und der Peak der monomaskierten Verbindung **141** wächst. Ist die eingesetzte TriPPPPro-Verbindung **56** fast vollständig abgebaut worden, nimmt auch der Peak der monomaskierten TriPPPPro-Verbindung **141** ab, da ab diesem Zeitpunkt dessen Hydrolyse im Vergleich zu dessen Bildung überwiegt. Gleichzeitig steigt der Triphosphatpeak.

Bei Gem-03 (**56f**) kommt es offensichtlich zur Bildung von Mizellen, dies würde die Verkürzung der Halbwertszeit erklären und wurde bereits bei den Hydrolysen der BCNA- **53** und 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** mit längerer Alkylkette beobachtet. Die vorhandenen Nucleophile können durch die Mizellenbildung leichter an den Phosphoranhydridbindungen angreifen, wodurch das Prodrug schneller abgebaut und die Halbwertszeit verkürzt wird. Ein weiteres Indiz für die Mizellenbildung ist, dass die Diphosphatmenge mit steigender Kettenlänge ansteigt. So liegt der Anteil an Diphosphat **59** im Vergleich zur monomaskierten TriPPPro-Verbindung **141** bei Gem-01 (**56c**) bei 10-13%, bei Gem-02 (**56e**) bei 10-16% und bei Gem-03 (**56f**) bei 14-22%. Der Diphosphatanteil der symmetrischen Prodrugs **56** ist kleiner als bei den second-generation TriPPPro-Verbindungen **53** und **55**, da auch die Halbwertszeiten geringer sind und es somit schneller zur Abspaltung der Maskierungseinheit kommt. Bereits der Vergleich der einzelnen Hydrolysen (PBS, PLE, CEM/0) bei BCNA-06 (**53fz**) hat gezeigt, dass eine Verkürzung der Halbwertszeit zu einem geringeren Einfluss der Spaltung der Phosphoranhydridbindung und dadurch zu weniger Diphosphatbildung führt.

Für den Abbau des Intermediats **141** zum Triphosphat **61** kann die zweite Halbwertszeit bestimmt werden. Dafür wird die Hydrolyse des Intermediats **141** nach vollständigem Verbrauch des Prodrugs **56** betrachtet. Die zweiten Halbwertszeiten der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** sind mit 87-115 Stunden um den Faktor 5-6 größer als die entsprechenden ersten Halbwertszeiten. Nach Abspaltung der ersten AB-Maskierungseinheit liegt an der γ -Phosphatgruppe eine zusätzliche negative Ladung vor, dadurch wird der Angriff auf die zweite Maskierungseinheit erschwert und dieser findet langsamer statt. Bei den zweiten Halbwertszeiten der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** ist ein eindeutiger Trend zu erkennen, je länger der Alkylrest ist, desto schneller wird die Verbindung hydrolysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** zur Bildung der monomaskierten TriPPPro-Verbindung **141** führt und aus dieser Verbindung selektiv das Triphosphat **61** freigesetzt wird. Der Verlauf der Hydrolyse folgte somit dem postulierten Ablauf aus **Abbildung 123**. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Studien von GOLLNEST⁷¹, REIMER⁶⁹ und WITT¹¹⁴ überein, die bereits symmetrische TriPPPro-Verbindungen von anderen Nucleosiden untersucht haben.

Für eine genauere Betrachtung des Verlaufs soll nun die Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) analysiert werden. In **Abbildung 124** sind die erhaltenen Chromatogramme dargestellt.

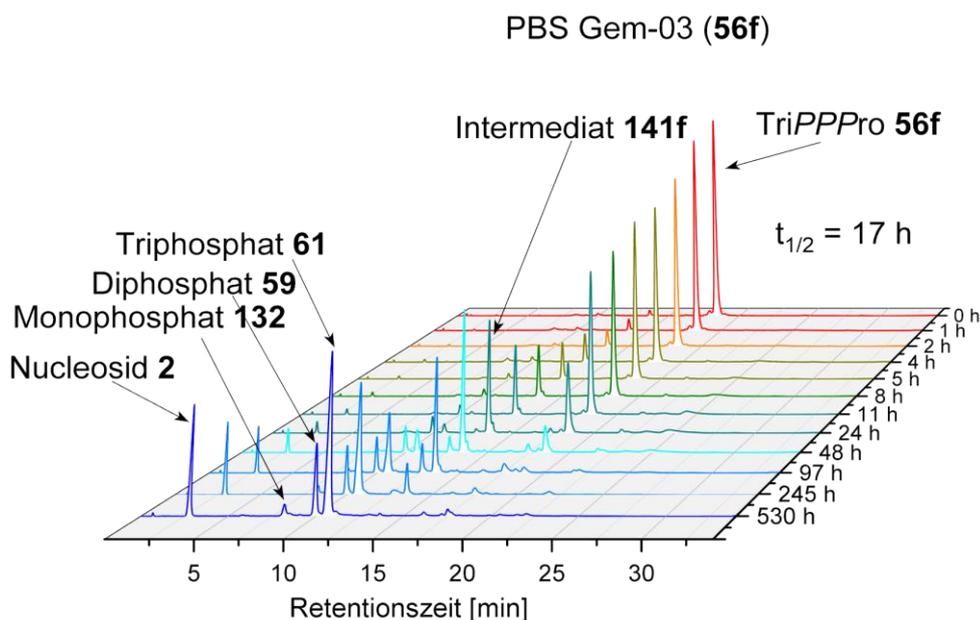


Abbildung 124: Darstellung des Hydrolyseverlaufs von Gem-03 (**56f**) in PBS-Medium.

Die Konzentration des Prodrugs **56f** nimmt von Beginn an kontinuierlich ab. Bei den bisher untersuchten second-generation BCNA- **53** und 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** kam es aufgrund der höheren Stabilität in PBS erst nach mehreren Stunden zu einer Abnahme der Prodrugkonzentration. Zu Beginn der Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) wird ausschließlich die monomaskierte TriPPPro-Verbindung **141f** gebildet. Nach vier Stunden ist außerdem ein kleiner Diphosphatpeak **59** zu erkennen. Dessen Konzentration steigt zunächst nur langsam an, es kommt also nur bei einem kleinen Teil des Prodrugs **56f** zum Bruch der Phosphoranhydridbindung. Die monomaskierte TriPPPro-Verbindung **141f** stellt im ersten Teil das Hauptprodukt der Hydrolyse dar. Da diese Verbindung noch eine abspaltbare Maskierungseinheit aufweist, kommt es nach 24 Stunden zur Freisetzung des Triphosphats **61**. Das Prodrug **56f** wird im weiteren Verlauf vollständig abgebaut und ist nach 97 Stunden verbraucht. Die Konzentration der monomaskierten TriPPPro-Verbindung **141f** steigt währenddessen weiter an und hat bei 48 Stunden den höchsten Wert. Anschließend überwiegt der Abbau der Verbindung zum Triphosphat **61** und die Konzentration sinkt. Der Anteil des Triphosphats **61** steigt bis zum vollständigen Verbrauch der monomaskierten TriPPPro-Verbindung **141f** an. Nach 530 Stunden Inkubationszeit ist das Intermediat **141f** aufgebraucht und das Triphosphat **61** ist nun das Hauptprodukt der Hydrolyse. Es kommt ebenfalls zur Bildung einer geringen Menge Monophosphat **132** und einer beachtlichen Menge Nucleosid **2**. Das Monophosphat **132** wird wahrscheinlich durch die Hydrolyse des Diphosphats **59** gebildet, dafür würde die geringe Konzentration sprechen. Der Ursprung des Nucleosids **2** konnte nicht ermittelt werden, es ist allerdings zu erkennen, dass es gleichzeitig mit dem Abbau der monomaskierten Verbindung **141f** gebildet wird, ein Zusammenhang würde folglich nahe liegen.

Für eine genaue Analyse des Verlaufs der PBS-Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) ist in **Abbildung 125** der Verlauf der Konzentration der einzelnen Verbindungen dargestellt.

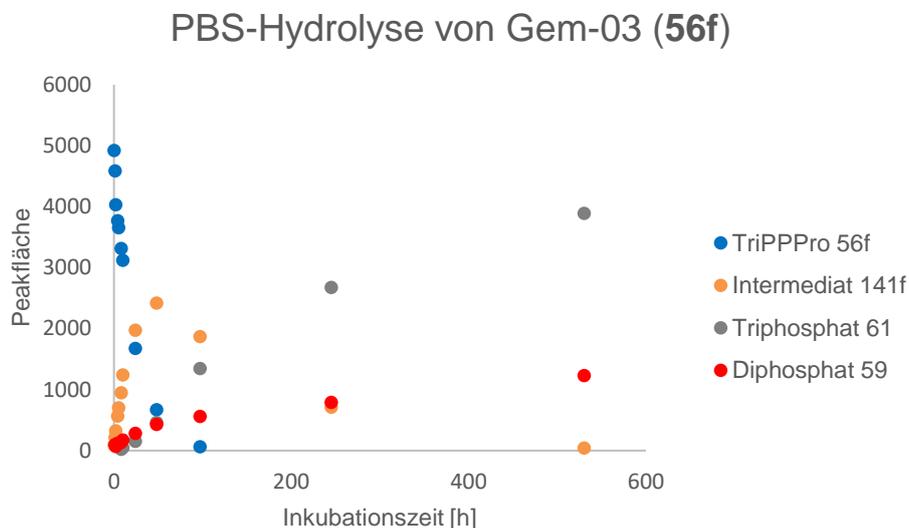


Abbildung 125: Graphische Darstellung der PBS-Hydrolyse von Gem-03 (**56f**).

Für die Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) in PBS geht aus dieser Darstellung hervor, dass das Prodrug **56f** bereits zu Beginn rasch und innerhalb von knapp 100 Stunden vollständig abgebaut wird. Gleichzeitig steigt die Konzentration der monomaskierten TriPPPPro-Verbindung **141f** in den ersten 47 Stunden stark an. Anschließend überwiegt der Abbau zum Triphosphat **61** und der Anteil der monomaskierten Verbindung **141f** sinkt. Die Triphosphatkonzentration nimmt ab 47 Stunden konstant zu und stellt nun das Hauptprodukt der Hydrolyse dar. Das Diphosphat **59** wird zunächst aus dem Prodrug **56f** gebildet, dies lässt sich an dem starken Konzentrationsanstieg zu Beginn der Hydrolyse beobachten. Die langsame Konzentrationszunahme des Diphosphats **59** im späteren Verlauf der Hydrolyse deutet auf eine hohe Stabilität des Triphosphats **61** in PBS-Puffer hin, wodurch nur wenig Diphosphat **59** freigesetzt wird. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung des Monophosphats **132** und Nucleosids **2** verzichtet. In dieser Abbildung ist anhand der vorhandenen Konzentrationsmaxima gut zu erkennen, dass das Prodrug **56f** zunächst zum Intermediat **141f** und dieses anschließend zum Triphosphat **61** umgesetzt wird. Der Verlauf der Hydrolyse folgte somit dem in **Abbildung 123** dargestellten Mechanismus.

6.3.7.2 PLE-Hydrolyse

Durch die Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) im PLE-Medium soll der Einfluss des Enzyms auf die Stabilität der symmetrischen TriPPPPro-Verbindung untersucht werden (s. **Tabelle 15**). Es sollte analysiert werden, ob das Enzym eine schnellere Abspaltung der Maskierungseinheiten und damit eine schnellere Freisetzung des Triphosphats bewirkt.

Tabelle 15: Halbwertszeiten der Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56** bei der PBS- und PLE-Hydrolyse.

TriPPPPro-Verbindung	Gem-01	Gem-02	Gem-03
Verbindung	56c	56e	56f
R ₁	C ₈ H ₁₇	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃
PBS t _{1/2} (1) [h]	19	20	17
PBS t _{1/2} (2) [h]	115	99	87
PLE t _{1/2} (1) [h]	-	-	6.4

In **Tabelle 15** sind die errechneten Halbwertszeiten der PBS-Hydrolyse und die Halbwertszeit von Gem-03 (**56f**) im PLE-Medium dargestellt. Das Prodrug wird durch das Enzym fast dreimal so schnell abgebaut. Eine Bestimmung der zweiten Halbwertszeit war bei der PLE-Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) nicht möglich, da die Konzentration der monomaskierten TriPPPPro-Verbindung bis zum Ende noch angestiegen ist. Die Hydrolyse von Gem-03 (**56f**) in PLE soll nun genauer betrachtet werden (s. **Abbildung 126**).

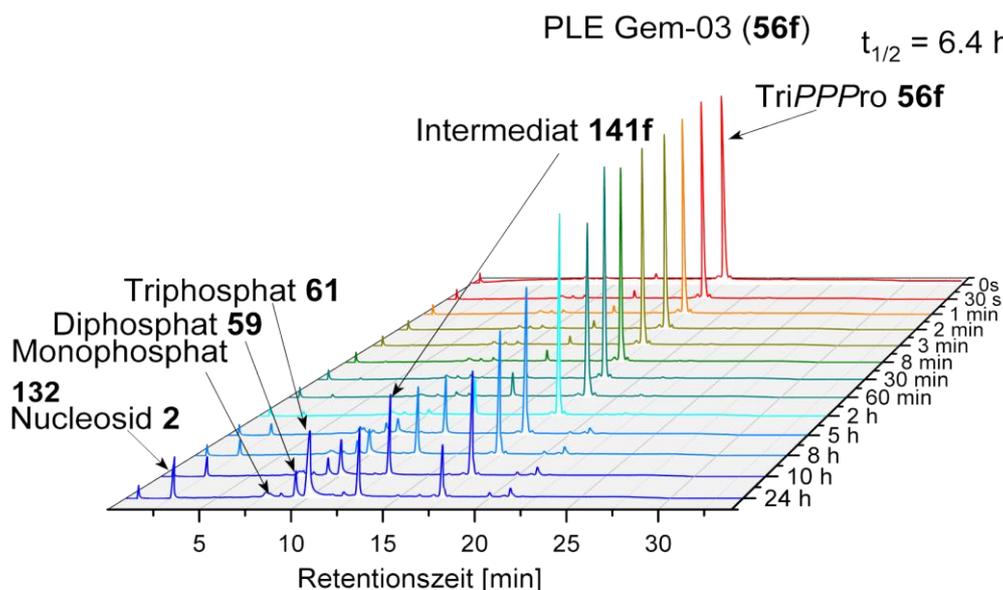


Abbildung 126: PLE-Hydrolyse von Gem-03 (**56f**).

Der bereits in der Nullprobe vorhandene Anteil an Intermediat **141f** stammt aus einer Zersetzung der TriPPPPro-Verbindung **56f** während der Lagerung und konnte aufgrund der geringen Konzentration vernachlässigt werden. Während des gesamten Hydrolyseverlaufs ist eine eindeutige Abnahme der Prodrugkonzentration und gleichzeitige Freisetzung der monomaskierten TriPPPPro-Verbindung **141f** zu beobachten. Nach fünf Stunden ist außerdem bereits ein Triphosphatpeak zu erkennen. Durch den Einfluss des Enzyms wird der Abbau des Intermediats **141f** zum Triphosphat **61** ebenfalls beschleunigt. Der Anteil der Prodrugkonzentration sinkt konstant, innerhalb der betrachteten 24 Stunden wird es allerdings nicht vollständig abgebaut. Die Konzentration des Intermediats **141f** steigt noch bis zu zehn Stunden Inkubationszeit an, anschließend überwiegt dessen Abbau und der Anteil sinkt. Die Konzentration des Triphosphats **61** steigt an und bildet nach 24 Stunden das Hauptprodukt. Der Verlauf der Hydrolyse folgt dem Mechanismus aus **Abbildung 123**, er ist allerdings im Vergleich zum PBS-Medium beschleunigt. Es ist auch hier ein kleiner Anteil von Di- **59** und Monophosphat **132** zu erkennen, dessen Ursprung konnte nicht eindeutig geklärt werden, da beide erst später gebildet wurden und somit aus mehreren Verbindungen entstehen könnten. Auch bei dieser Hydrolyse kommt es zur Bildung des Nucleosids **2**. Eine Freisetzung aus der monomaskierten Verbindung **141f** wie bei der PBS-Hydrolyse könnte auch hier der Ursprung dieser Verbindung **2** sein.

6.3.7.3 Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakten

Für eine realistische Darstellung des Verhaltens von Gem-03 (**56f**) im biologischen Umfeld wurde die Verbindung in CEM/0-Zellextrakten inkubiert. Das Vorgehen entspricht dabei den in **Kapitel 6.1.7.3** beschriebenen Verfahren. In **Abbildung 127** ist der Verlauf der CEM/0-Zell-extrakthydrolyse dargestellt.

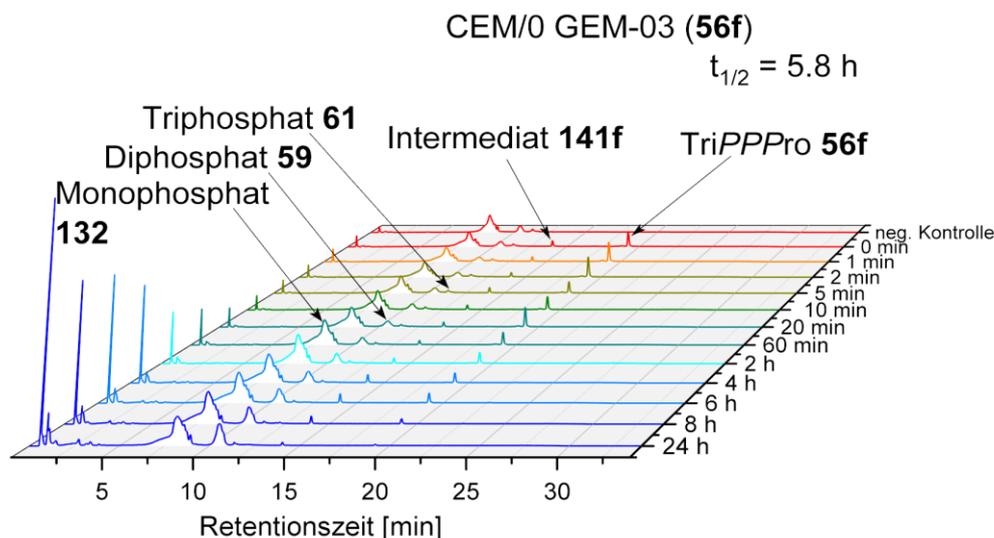


Abbildung 127: Hydrolyseverlaufs von Gem-03 (**56f**) im CEM/0-Zellextrakten.

Die verwendete Substanz war aufgrund einer längeren Lagerung bereits zu einem Teil in das Intermediat **141f** gespalten worden. Die Konzentration von Gem-03 (**56f**) sinkt bei der Zellextrakthydrolyse schneller als in den vorhergehenden Hydrolysen. Die berechnete Halbwertszeit liegt bei 5.8 Stunden. Gleichzeitig steigt auch die Konzentration des Intermediats **141f** schneller an. Das Prodrug **56f** wird bei der Hydrolyse hauptsächlich in das Intermediat **141f** überführt. Nach sechs Stunden beginnt dessen Konzentration allerdings zu sinken, da ab diesem Zeitpunkt die Verbindung schneller zum Triphosphat **61** abgebaut als sie nachgebildet wird. Die Konzentration des Triphosphats **61** steigt während der gesamten Hydrolyse langsam an. Die Signale von Diphosphat **59** und von Monophosphat **132** werden von Zellbestandteilen überlagert, wodurch eine genaue Bestimmung der Konzentration verhindert wird. Es ist allerdings gut zu erkennen, dass deren Konzentrationen schneller ansteigen als die des Triphosphats **61**. Vermutlich stellt auch das Monophosphat **132** am Ende das Hauptprodukt der Hydrolyse dar.

6.3.7.4 Hydrolyse des Gemcitabindiphosphats und -triphosphats

Die Hydrolysen in PBS und PLE sollten ebenfalls von Gemcitabindiphosphat **59** und -triphosphat **61** durchgeführt werden. Dadurch sollte die Stabilität dieser Verbindungen bei den Hydrolysen der TriPPPro-Verbindungen und Zellproliferationstests ermittelt werden können.

Es wurde festgestellt, dass die Stabilität dieser Verbindungen in PBS-Puffer sehr hoch ist. Die Halbwertszeit des Diphosphats **59** liegt bei 2310 Stunden. Es konnte während der Hydrolyse erst nach über 200 Stunden eine Abnahme der Verbindungskonzentration beobachtet werden, gleichzeitig wurde nur ein sehr kleiner Teil Monophosphat **132** gebildet. Die Stabilität des Triphosphats **61** ist mit einer Halbwertszeit von 3466 Stunden ebenfalls sehr hoch. Die Konzentration des Triphosphats **61** nahm über die gesamte Hydrolyse nur geringfügig ab, es wurde folglich nur wenig Diphosphat **59** gebildet. Im Anschluss wurden PLE-Hydrolysen durchgeführt, damit der Einfluss des Enzyms auf die Stabilität der Verbindungen analysiert werden konnte. Für das Diphosphat **59** wurde dabei eine Halbwertszeit von 231 Stunden berechnet. Es wurde nur eine sehr geringe Abnahme des Diphosphatanteils beobachtet und aufgrund einer zu geringen Konzentration kein Produkt detektiert. Die PLE-Hydrolyse des Gemcitabintriphosphats **61** lieferte ebenfalls eine sehr hohe Halbwertszeit von 139 Stunden. Obwohl der Triphosphatanteil **61** nur leicht zurückging, konnte die Bildung des Gemcitabindiphosphats **59** beobachtet werden. Ein Vergleich der Halbwertszeiten in PBS- und PLE-Medium zeigt einen großen Einfluss von PLE auf die Stabilität der Verbindungen **59** und **61**, die Hydrolyse findet unter Enzymbeteiligung deutlich schneller statt.

Die hohe Stabilität von Gemcitabindiphosphat **59** und -triphosphat **61** legt nahe, dass sie während der bereits durchgeführten Hydrolysen der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** sowie bei den Proliferationsuntersuchungen stabil sind und die Ergebnisse nicht beeinflussen.

6.3.7.5 Fazit der Hydrolysen der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen

Bei allen untersuchten Verbindungen wurde die Gemcitabin-TriPPPro-Verbindung **56** zur monomaskierten TriPPPro-Verbindung **141** und anschließend zum Triphosphat **61** hydrolysiert. Der Verlauf folgte somit dem in **Abbildung 123** postulierten Mechanismus. Bei der PBS-Hydrolyse war kein Einfluss der Kettenlänge auf die Stabilität zu beobachten. Es konnte allerdings mit steigender Kettenlänge vermehrt Mizellenbildung und die Freisetzung des Diphosphats **59** beobachtet werden. Durch die Hydrolyse im PLE-Medium konnte die Freisetzung des Triphosphats **61** beschleunigt werden. Dabei spielte die Spaltung zum Diphosphat **59** keine Rolle. Überraschend waren die Ergebnisse der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindung **56** im CEM/0-Zellextrakt. Hier wurde ebenfalls der Abbau des Prodrugs **56** zum Intermediat **141** und anschließend zum Triphosphat **61** beobachtet, allerdings war der

erhaltene Diphosphatanteil **59** höher. Dessen Konzentration konnte aufgrund einer Signalüberlagerung mit Zellbestandteilen nicht eindeutig bestimmt werden. Die Hydrolysen von Diphosphat **59** und von Triphosphat **61** ergaben sowohl für das PBS- als auch für das PLE-Medium sehr hohe Stabilitäten und es wurde nur beim Triphosphat **61** ein geringer Abbau beobachtet. Der Abbau vom Diphosphat **59** oder vom Triphosphat **61** sollte also weder bei den Hydrolysen der TriPPPPro-Verbindungen **56** noch bei den Zelltests eine Rolle spielen.

6.4 Zellproliferationstests der Gemcitabin- und 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen

Die Proliferationsstudien der Gem- und 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen wurden von PROF. DR. UDO SCHUMACHER und SIMON REMUS am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt. Auf diese Weise sollte die Wirksamkeit und eine eventuelle Verbesserung der in dieser Arbeit dargestellten TriPPPPro-Verbindungen im Vergleich zu Gemcitabin (**2**) untersucht werden. Es wurde die XTT-Methode verwendet.

Durch das Vorliegen von Zellschädigungen ist die betroffene Zelle nicht mehr in der Lage den für ihre Funktionen und ihr Wachstum benötigten Energiehaushalt aufrechtzuerhalten. Die metabolische Aktivität einer Zelle kann somit genutzt werden, um ihre Vitalität oder zytotoxische Effekte nachzuweisen. Auf diesem Prinzip beruht die XTT-Methode. Durch die Oxidation von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ zu NAD(P)^+ wird das farblose Salz XTT (**142**) hauptsächlich durch mitochondriale Dehydrogenasen unversehrter Zellen zum orangenen wasserlöslichen Formazan (**143**, s. **Abbildung 128**) reduziert. Durch Messung der Absorption des gebildeten Farbstoffes **143** kann die Anzahl lebender Zellen ermittelt werden. Als Vergleichssubstanz dienen die Zellen, die nur mit Medium und nicht mit Testsubstanz behandelt wurden, deren Substratumsetzung kann somit als maximal betrachtet werden (100%-Referenz).¹⁴⁷

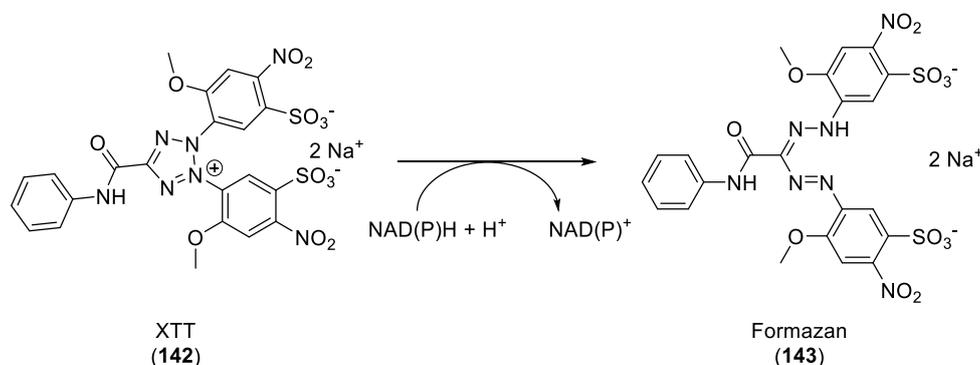


Abbildung 128: Reduktion von XTT (**142**) zu Formazan (**143**) durch Oxidation von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ zu NAD(P)^+ als Grundlage der XTT-Methode.

Für die Analyse der Wirksamkeit der Gem- **56** und 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** wurden folgende Zelllinien verwendet: BxPC3, Paca-5061 (Pankreaskarzinom), HT29 (Kolonkarzinom) und Ovarcar 3, SKOV-3 (Ovarialkarzinom). Es wurde das XTT-basierte Assaykit der Firma Böhlinger verwendet und von allen Experimenten eine Zwölf-fachbestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden in Trypsin/EDTA kultiviert und in ein 96-well plate überführt. Durch Vorversuche konnte die optimale Zellzahl ermittelt werden, diese liegt für HT29 bei $4 \cdot 10^4/\text{mL}$ und bei $10 \cdot 10^4/\text{mL}$ für die restlichen Zelllinien. Durch Vorversuche konnte beobachtet werden, dass FBS mit den zu untersuchenden Verbindungen reagiert, weswegen FBS-freie Medien (RPMI, McCoy's oder TUM) verwendet wurden. Die im Medium gelöste Testverbindung wurde zwei Stunden inkubiert, dann mit FBS versetzt und anschließend 72 Stunden inkubiert. Es folgte die Zugabe der XTT-Lösung und nach sechs Stunden wurde die erhaltene Absorption bei 450 nm vermessen. Die Kontrollexperimente wurden auf die gleiche Weise behandelt, allerdings wurde hier anstatt der Testverbindung das verwendete Medium eingesetzt. Die Kontrollexperimente wurden als 100%iges Zellüberleben betrachtet und die erhaltenen Absorptionswerte der untersuchten Zellen als prozentuales Überleben.

Die in dieser Arbeit hergestellten Gem- **56** und 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** zeigen kaum cytotoxische Wirkung im Vergleich zum Gemcitabin (**2**). Lediglich für die Zelllinie BxPC3 konnte für die Gem-TriPPPPro-Verbindungen **56** ein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Die anderen untersuchten Zelllinien waren nicht ausreichend sensitiv, damit mehr als 50% der Zellen durch den Einsatz der Gem-TriPPPPro-Verbindungen **56** absterben konnten. Auch bei BxPC3 war Gemcitabin (**2**) die wirksamste Verbindung. Ihr IC_{50} -Wert war um den Faktor 3-6-mal geringer als bei den untersuchten TriPPPPro-Verbindungen **56** (s. **Tabelle 16**).

Tabelle 16: Übersicht der IC_{50} -Werte der Gem-TriPPPPro-Verbindungen **56** in BxPC3.

Verbindung	IC_{50} [μmol]
Gemcitabin (2)	0,07
Gem-01 (56c)	0.2 – 0.3
Gem-02 (56e)	0.3 – 0.4
Gem-03 (56f)	0.2 – 0.3

Die beiden 5-FdU-TriPPPPro-Verbindungen **55** zeigten keinen großen Effekt auf das Zellwachstum der betrachteten Zelllinien, lediglich bei der Kolonkarzinomzelllinie HT29 konnte für die Verbindungen ein IC_{50} -Wert errechnet werden. Hier entsprach der IC_{50} -Wert von 5-FdU-01 (**55bz**) in etwa dem Wert von Gemcitabin (**2**, s. **Tabelle 17**). Für hohe Konzentrationen konnten für 5-FdU-01 (**55bz**) sogar größere zytotoxische Effekte beobachtet werden als bei Gemcitabin (**2**).

Tabelle 17: Übersicht der IC₅₀-Werte 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen **55** in HT29.

Verbindung	IC ₅₀ [μmol]
Gemcitabin (2)	3 - 4
5-FdU-01 (55bz)	3 - 4
5-FdU-02 (55gy)	8 - 9

Insgesamt betrachtet konnte für die in dieser Arbeit synthetisierten TriPPPro-Verbindungen **55** und **56** keine Verbesserung der Aktivität im Vergleich zu Gemcitabin (**2**) beobachtet werden. Die betrachteten Verbindungen **55** und **56** sind zytotoxisch. Ihre Wirksamkeit ist teilweise sogar mit der von Gemcitabin (**2**) vergleichbar, weswegen die Verbindungen in Zweitlinien-therapien Anwendung finden könnten.

In den durchgeführten Zellexperimenten, kann die geringe Aktivität von Gemcitabin (**2**) und der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56** darin begründet sein, dass Gemcitabin (**2**) nicht in der Lage ist die Zellmembran zu passieren, der Transporter nur wenig vorliegt und außerdem alle untersuchten Verbindungen schnell metabolisiert werden.^{1,9}

6.5 Versuchte Synthese einer C18Gem-TriPPPro-Verbindungen

6.5.1 Prodrugkonzept von Gemcitabin: C18Gem

Die durchgeführten Proliferationsassays zeigten eine geringe Aktivität des Gemcitabins (**2**) und der synthetisierten Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen **56**. Auch im klinischen Einsatz führt die geringe Aktivität zu Schwierigkeiten. Trotzdem handelt es sich bei Gemcitabin (**2**) um die Goldstandardtherapie bei Pankreaskarzinomen, mit ihr gelang eine Verbesserung der Lebensqualität und der Überlebenschancen.^{1,15} Aufgrund der schlechten Effizienz werden verbesserte Therapien benötigt, damit bestehende Probleme überwunden und eine bessere Behandlung ermöglicht werden können. Ein großes Hindernis für einen effizienten Einsatz in der Tumorbehandlung ist die schnelle Inaktivierung. Gemcitabin (**2**) wird über das Enzym Cytidinesaminase in den inaktiven Metaboliten 2',2'-Difluordesoxyuridin (**131**) hydrolysiert. Die geringe Stabilität führt zu einer niedrigen Halbwertszeit von Gemcitabin (**2**) im menschlichen Körper, diese liegt bei 8-17 Minuten. Dadurch muss eine hohe Dosis verabreicht werden, um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration am Wirkort zu erzielen.^{1,15,148} Ein weiterer Grund für die geringe Effizienz von Gemcitabin (**2**) liegt in seiner Hydrophilie. Bei Pankreaskarzinomen sind die Zellen oft von einer sehr dichten und komplexen Membran umgeben. Gemcitabin (**2**) ist als Nucleosidanalogen für den Transport in die Zelle auf Nucleosidtransporter angewiesen. Konkret handelt es sich dabei um hENT1. Dieser Membrantransporter ist in Pankreaskarzinomzellen in 65% der Fälle unterrepräsentiert,

wodurch das Nucleosidanalogen **2** nicht in der Lage ist die Zellmembran zu passieren. Der Wirkstoff kommt folglich schlecht am Wirkort an, eine effektive Therapie wird dadurch verhindert.^{1,15} Nur wenn die Zellmembran zuverlässig überwunden werden kann, wird die Medikamentenverfügbarkeit und somit die Effizienz der Chemotherapie erhöht.¹ Es wurden bereits einige Studien durchgeführt, um die genannten Probleme der Behandlung mit Gemcitabin (**2**) zu beheben. Durch die Verwendung eines Prodrugs könnten die geringe Stabilität, schnelle Metabolisierung, geringe Halbwertszeit, schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien sowie die geringe Membranpermeabilität verbessert werden. In der Zelle soll Gemcitabin (**2**) freigesetzt werden, welches anschließend durch intrazelluläre Prozesse in die aktive Form, das Gemcitabintriphosphat **61** überführt wird.¹⁵

FORCINITI *et al.* und INKOOM *et al.* konnten zeigen, dass durch das Anbringen eines Stearoylsubstituenten an die 4-Aminofunktion die Aktivität von Gemcitabin (**2**) erhöht werden kann.^{1,15} Das dabei gebildete Prodrug C18Gem (**144**) ist in **Abbildung 129** gezeigt.

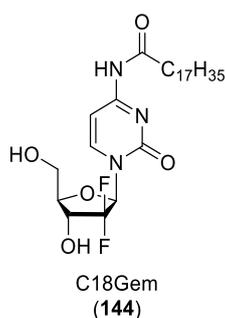


Abbildung 129: Darstellung von C18Gem (**144**).^{1,15}

CHEN *et al.*⁹ konnten beweisen, dass C18Gem (**144**) das Wachstum des Pankreastumors im PDX Mausversuch erheblich reduzieren kann. C18Gem (**144**) zeigt eine bessere Bioverfügbarkeit und es wird weniger VEGF-Rezeptor exprimiert, hinzukommt, dass die histologischen Daten keine morphologischen Veränderungen in Leber und Niere zeigen.¹ Die einzigartigen Eigenschaften von C18Gem (**144**), die für die hohe Antitumoraktivität verantwortlich sind, entstehen aufgrund von Modifikationen der polaren Natur des ursprünglichen Gemcitabins (**2**). Aufgrund dieser strukturellen Veränderungen ist C18Gem (**144**) in der Lage die Zellmembran durch passive Diffusion zu überwinden. In der Zelle kann der Stearoylrest durch Fettsäureamidhydrolasen (FAAH) abgespalten und Gemcitabin (**2**) freigesetzt werden.^{1,149} Gemcitabin (**2**) benötigt dafür den Transporter hENT1, welcher bei Pankreaskrebszellen unterrepräsentiert ist, wodurch nur wenig Wirkstoff in die Zelle gelangt. Es wird folglich eine geringe Wirkung erzielt. Wird die Notwendigkeit dieses Transporters umgangen, so kann die Konzentration des Wirkstoffs erhöht werden. Dieser Faktor begünstigt eine höhere Wirkung von C18Gem (**144**) im Vergleich zu Gemcitabin (**2**).¹ Die Gründe für die

gute Antitumoraktivität von C18Gem (**144**) liegen zum einen darin, dass das Molekül über keine freie Aminogruppe verfügt. Die Cytidindesaminase hat somit keinen Angriffspunkt und kann das Molekül nicht inaktivieren. Außerdem wird der VEGF-Rezeptor inhibiert. Dieser Rezeptor ist für die Proliferation, das Überleben, Migration und Differenzierung der Pankreaskrebszellen verantwortlich.¹

Da die Ergebnisse aus den Proliferationsuntersuchungen nicht zufriedenstellend waren, soll versucht werden, C18Gem (**144**) darzustellen und anschließend eine C18Gem-TriPPP-Verbindung zu synthetisieren. Durch die Kombination dieser beiden Prodrugkonzepte soll ein geschütztes Gemcitabintriphosphat erzeugt werden, welches weder an den Phosphoranhydridbindungen noch an der Aminogruppe angegriffen werden kann. Intrazellulär sollen anschließend sowohl die Acyloxybenzylmaskierungseinheiten als auch der Stearoylrest enzymatisch abgespalten werden. Dadurch sollte direkt das Gemcitabintriphosphat **61** erhalten werden können. Ist die Darstellung der C18Gem-TriPPP-Verbindung **146** erfolgreich, so ist es möglich, Gemcitabin (**2**) vor Desaminierung zu schützen und gleichzeitig direkt die aktive Form **61** in der Zelle freizusetzen. Die Inaktivierung der intrazellulären Phosphorylierungsschritte von Gemcitabin (**2**) könnten somit ebenfalls umgangen werden. Die geplante Synthese von C18Gem (**144**) und der C18Gem-TriPPP-Verbindung **146** ist in **Abbildung 130** dargestellt.

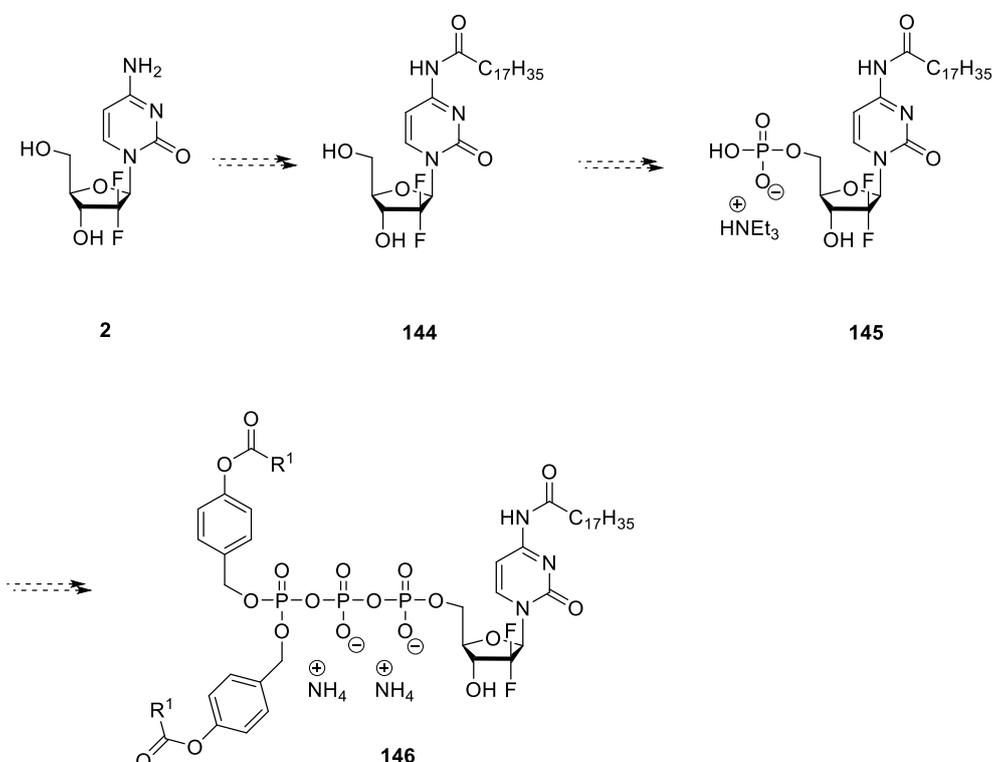


Abbildung 130: Darstellung der geplanten Syntheseroute der C18Gem-TriPPP-Verbindung **146**.

Ausgehend von Gemcitabin (**2**) sollten zunächst die beiden Hydroxylgruppen in 3'- und 5'-Position geschützt werden, anschließend sollte der Stearoylsubstituent an der 4-Aminofunktion eingeführt und die beiden Schutzgruppen wieder entfernt werden. Dadurch sollte sich das C18Gem (**144**) darstellen lassen. Ausgehend vom C18Gem (**144**) sollte das Monophosphat **145** durch eine direkte Phosphorylierungsreaktion erhalten werden. Abschließend sollte das Monophosphat **145** über die *H*-Phosphonatroute zur TriPPPPro-Verbindung **146** umgesetzt werden. In Analogie zu den symmetrischen Gemcitabin-TriPPPPro-Verbindungen **56** sollte auch hier die symmetrische C18Gem-TriPPPPro-Verbindung **146** synthetisiert werden.

6.5.2 Versuchte Synthese des C18Gem-Monophosphats

Laut Literatur¹ kann die Synthese des C18Gem (**144**) durch Anbringen von TBS-Schutzgruppen in 3'- und 5'-Position und anschließendes Einführen des Stearoylrests ausgehend von Gemcitabin (**2**) erfolgen (s. **Abbildung 131**).

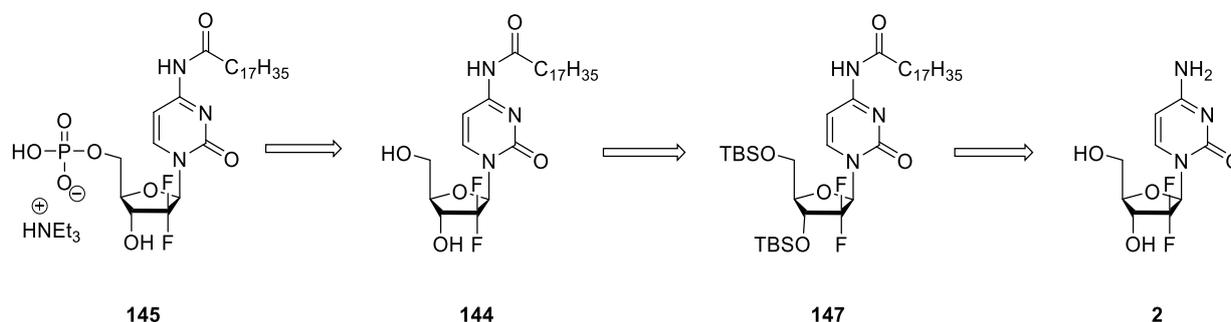


Abbildung 131: Retrosyntheseschema der C18Gem -Synthese.

Das C18Gem-Monophosphat **145** sollte in einer Phosphorylierungsreaktion ausgehend von C18Gem (**144**) synthetisiert werden. C18Gem (**144**) sollte vorher durch Entfernung der TBS-Schutzgruppen aus dem geschützten C18Gem **147** freigesetzt werden. Das geschützte C18Gem **147** sollte durch die schrittweise Einführung der TBS-Schutzgruppen und des Stearoylrestes in Gemcitabin (**2**) erhalten werden können.

Die stufenweise Synthese des C18Gem (**144**) ausgehend von Gemcitabin (**2**) ist in **Abbildung 132** dargestellt.

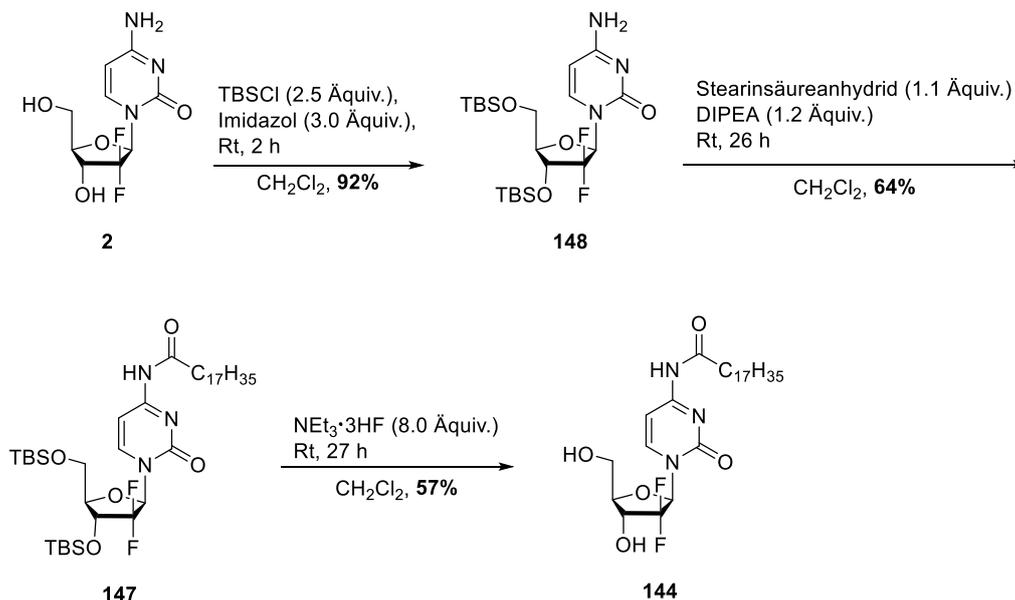


Abbildung 132: Synthese von C18Gem (**144**).

Für das Anbringen der beiden TBS-Schutzgruppen wurde Gemcitabin (**2**) in Dichlormethan gelöst und mit TBSCl und Imidazol vermengt. Damit beide Hydroxylgruppen des Gemcitabins (**2**) geschützt wurden, wurde ein Überschuss TBSCl (2.5 Äquivalente) verwendet. Nach chromatographischer Reinigung konnte das doppelt TBS-geschützte Gemcitabin **148** in einer sehr guten Ausbeute von 92% erhalten werden. Anschließend wurde das geschützte Gemcitabin **148** erneut in Dichlormethan gelöst, mit Stearinsäureanhydrid und DIPEA versetzt und 26 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. In diesem Reaktionsschritt kam es zu dem Angriff der Aminogruppe auf das Anhydrid. Dadurch konnte der Stearoylrest an der 4-Aminofunktion eingeführt werden. Das TBS-geschützte C18Gem **147** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 64% erhalten werden. Für die Entfernung der TBS-Schutzgruppen wurde Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet, da es bereits erfolgreich bei der Synthese von anderen Nucleosidanaloga eingesetzt werden konnte und es dabei nicht zu einer Zersetzung des Nucleosidanalogs gekommen ist. Das TBS-geschützte C18Gem **147** wurde in Dichlormethan mit Triethylamin-Trihydrofluorid 27 Stunden gerührt. Als das Edukt **147** komplett umgesetzt war, wurde Kieselgel zur Reaktionsmischung gegeben, damit überschüssiges Triethylamin-Trihydrofluorid abreagieren konnte. Nach einer Säulenchromatographie konnte C18Gem (**144**) in einer Ausbeute von 57% dargestellt werden. Die geringe Ausbeute kam dadurch zustande, dass für die Entfernung der TBS-Schutzgruppe wasserhaltiges Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet wurde und es durch das enthaltene Wasser zur teilweisen Abspaltung des Stearoylrests kam.

Das so dargestellte C18Gem (**144**) sollte im nächsten Reaktionsschritt zum Monophosphat **145** umgesetzt werden (s. **Abbildung 133**). Dafür sollte erneut die YOSHIKAWA-REAKTION verwendet werden, da diese Reaktion bereit mehrfach erfolgreich für die Synthese von Mono-, Di- und Triphosphaten eingesetzt werden konnte.

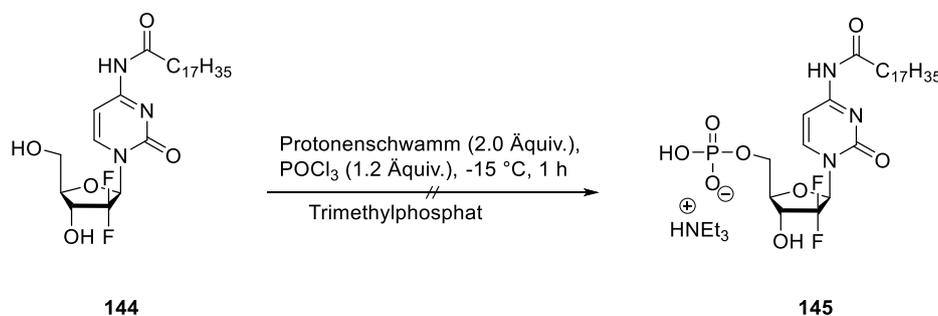


Abbildung 133: Versuchte Synthese des C18Gem-Monophosphats **145**.

Zunächst erfolgte wiederum eine Trocknung der beiden Edukte C18Gem (**144**) und Protonenschwamm im Vakuum. Anschließend wurden beide Edukte in Trimethylphosphat gelöst, auf -15 °C gekühlt und tropfenweise mit Phosphorylchlorid versetzt. Die Reaktion wurde mittels RP-HPLC (Methode B) verfolgt. Dabei konnte nur eine geringe Veränderung des Monophosphatpeaks beobachtet werden, da nach einer Stunde allerdings schon weitere Peaks im Chromatogramm sichtbar waren, wurde die Reaktion beendet. Dafür erfolgte die Zugabe von TEAB-Puffer. Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionslösung mehrfach mit Dichlormethan gewaschen, um das Trimethylphosphat zu entfernen. Nach automatisierter RP-Chromatographie konnte nur das Edukt **144** wiedergewonnen werden. Das Monophosphat **145** konnte auf diese Weise nicht synthetisiert werden. Auch eine Wiederholung der Reaktion unter Verwendung von frischem Phosphorylchlorid führte nicht zur erfolgreichen Darstellung des C18Gem-Monophosphats **145**.

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht, eine C18Gem-TriPPPro-Verbindung **146** darzustellen, da die versuchte Route zu unerwarteten Problemen geführt hat. Deswegen wurde das Vorhaben verworfen, eine C18Gem-TriPPPro-Verbindung zu synthetisieren.

6.6 Synthese einer 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung

6.6.1 Klinische Anwendung von 5-Azacytidin

5-Azacytidin (**7**) ist ein Cytidinanalogon, das in 5-Position des Pyrimidinrings ein Stickstoffatom anstelle eines Kohlenstoffatoms aufweist (s. **Abbildung 134**).^{150–156} Es handelt sich um einen nucleosidischen Antimetaboliten, der 2004 von der FDA die Zulassung für die Behandlung der myelodysplastischen Syndrome (MDS) erhielt. Seitdem wird es unter dem Handelsnamen Vidaza verkauft.^{118,150–152,154}

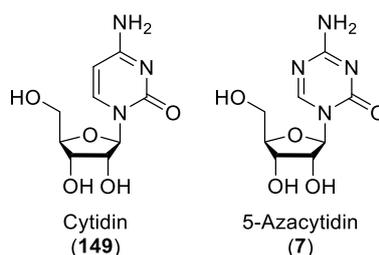


Abbildung 134: Darstellung von Cytidin (**149**) und seinem Analogon 5-Azacytidin (**7**).^{150–156}

5-Azacytidin (**7**) ist ein wichtiger Eckpfeiler, um die Behandlung von MDS zu einer echten lebensverlängernden Therapie zu entwickeln. Das myelodysplastische Syndrom (MDS) ist eine heterogene Gruppe von Knochenmarkerkrankungen, die anfangs durch eine ineffektive Blutbildung und später unausweichlich durch die Entwicklung der akuten myeloiden Leukämie charakterisiert wird. Es kann chronisch und nicht schmerzhaft sein oder eine aggressive Krebserkrankung mit einer schlechten Überlebenschance darstellen. Da MDS eher eine Erkrankung von älteren Personen ist, sind aggressive Therapien, wie eine Kombinationschemotherapie oder eine Stammzelltransplantation für die meisten Patienten unrealistisch. Deswegen ist das Interesse groß, weniger toxische Verbindungen für die Behandlung dieser Erkrankungen zu finden. Typische Symptome bei einer nicht funktionierenden Blutbildung sind Infektionen, Blutungen, blaue Flecken und Erschöpfung. Die Standardtherapie für MDS besteht aus unterstützenden Maßnahmen, wie Bluttransfusionen, der Gabe von Blutbildungssubstanzen, um den bestehenden Mangel auszugleichen, und Antibiotika, damit Infektionen vermieden werden können.¹⁵⁰ Zurzeit ist die einzige dauerhaft heilende Behandlungsmöglichkeit die Stammzellspende, allerdings ist diese für die Patienten aufgrund ihres Alters oder anderen Begleitkrankheiten oft keine Option. Deswegen herrscht ein großer Bedarf an neuen Medikamenten, die MDS medikamentös bekämpfen.^{150,151}

5-Azacytidin (**7**) ist ein Inhibitor der DNA-Methylierung. Es ist ein Pionier auf dem Gebiet der Medikamente, die als Gen-Stillerer funktionieren. Dieser Mechanismus wird durch Tumorzellen ausgebeutet, da sie durch die Hemmung der Genexpression die eigenen Gegenspieler,

die Tumorsuppressorgene, ausschalten können.¹⁵⁰ Leukämien und MDS sind durch die Hypermethylierung und die darauf folgende Unterdrückung mehrerer Gene charakterisiert, dadurch entstand das Interesse Inhibitoren der DNA-Methylierung zu entwickeln und auf diese Weise eine Strategie für die Behandlung dieser Erkrankungen zu entwickeln.¹⁵⁰

5-Azacytidin (**7**) wird nach erfolgreicher Zellaufnahme durch die Uridin-Cytidin-Kinase schrittweise zum Triphosphat phosphoryliert.^{151–153,155,156} Anschließend erfolgt der Einbau des Ribonucleotids in die RNA, wodurch es zum Abbruch des RNA-Metabolismus und der Proteinsynthese kommt.¹⁵⁵ 5-Azacytidin (**7**) ist ein Ribonucleosid, deswegen erfolgt der hauptsächlichliche Einbau in die RNA.^{151–153,156} Parallel dazu wird das 5-Azacytidindiphosphat durch die Ribonucleotidreduktase zum 5-Aza-2'-desoxycytidindiphosphat reduziert (ca. 10-20%). Dieses 2'-Desoxynucleotiddiphosphat wird zum 2'-Desoxynucleotidtriphosphat phosphoryliert und anschließend in die DNA eingebaut. Dabei kommt es zur irreversiblen Bindung an die DNA-Methyltransferase 1, wodurch eine Hypomethylierung der DNA verursacht wird. Auf diese Weise wird die DNA Hypermethylierung, die durch die Tumorzellen entsteht, rückgängig gemacht und die zuvor unterdrückten Tumorsuppressorgene werden wieder exprimiert.^{150–153,155–157} 5-Azacytidin (**7**) weist ebenfalls eine zytotoxische Wirkung auf, allerdings muss dafür eine höhere Konzentration eingesetzt werden.^{151–153,155–157} 5-Azacytidin (**7**) wird nach subkutaner Injektion rasch im Körper verteilt. Die Eliminierung durch die Cytidindesaminase erfolgt relativ schnell, dadurch liegt die Halbwertszeit bei 41 Minuten.¹⁵⁵

Es soll eine 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung synthetisiert werden, da es sich dabei um ein wichtiges Medikament bei der Behandlung von MDS handelt. Es soll herausgefunden werden, ob die 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung **57** eine Verbesserung zum bisher verabreichten Nucleosid **7** darstellt.

6.6.2 Synthese des 5-Azacytidinmonophosphats

Die Synthese der 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung **57** sollte, über die bereits in dieser Arbeit verwendete, *H*-Phosphonatroute betrieben werden. Dafür musste zunächst das 5-Azacytidinmonophosphat **150** zugänglich gemacht werden (s. **Abbildung 135**).

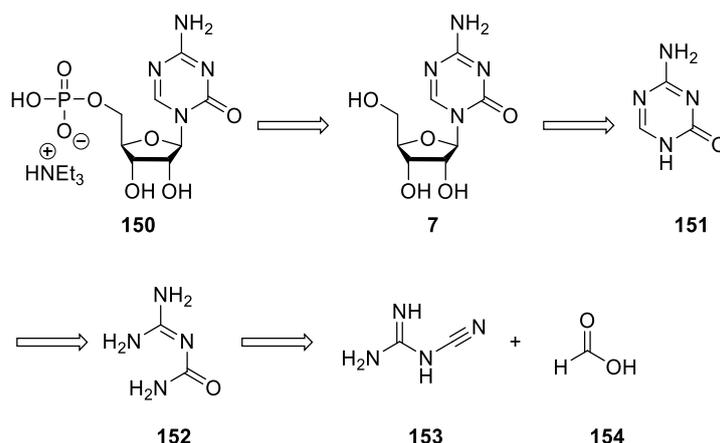


Abbildung 135: Retrosynthese des 5-Azacytidinmonophosphats **150**.

Das 5-Azacytidinmonophosphat **150** sollte in einer YOSHIKAWA-REAKTION ausgehend von 5-Azacytidin (**7**) synthetisiert werden. Das Nucleosidanalogon **7** sollte in einer Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion ausgehend von 5-Azacytosin (**151**) hergestellt werden. Die 1,3,5-Triaza-Verbindung **151** sollte in einer Ringschlussreaktion aus Guanylharnstoff (**152**) erhalten werden. Dieser sollte zuvor in einer Kondensationsreaktion aus den kommerziell erhältlichen Edukten Dicyandiamid (**153**) und Ameisensäure (**154**) gebildet werden.¹⁵⁸

Bei den ersten Versuchen 5-Azacytidin (**7**) darzustellen, wurde das 5-Azacytosin (**151**) eigens dafür hergestellt und nicht kommerziell erworben, da die Synthese kostengünstiger erfolgen konnte. Die Syntheseroute basierte auf einer Route, die von PÍSKALA¹⁵⁹ entworfen und von VUJJINI *et al.*¹⁵⁴ optimiert wurde (s. **Abbildung 136**).¹⁵⁸

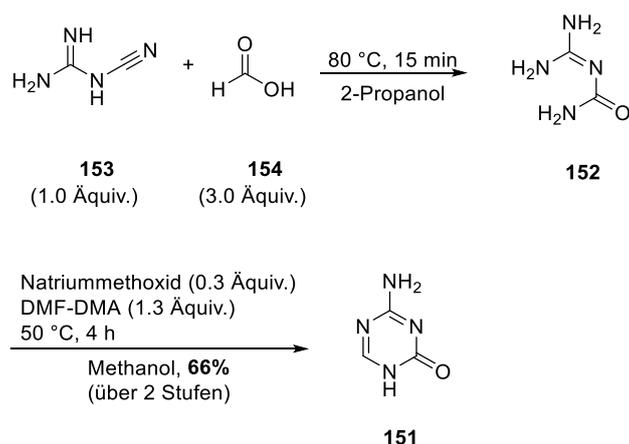


Abbildung 136: Synthese von 5-Azacytosin (**151**) nach PÍSKALA¹⁵⁹ und von VUJJINI *et al.*¹⁵⁴

Im ersten Schritt wurde Dicyandiamid (**153**) in Ameisensäure (**154**) gelöst und 25 Minuten bei 80 °C gerührt. Bei der dabei ablaufenden Kondensationsreaktion wurde der Guanylharnstoff (**152**) nach Umkristallisation aus 2-Propanol erhalten. Der anschließende Ringschluss, der die

Bildung von zwei neuen Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen enthält, erfolgte durch Reaktion mit DMF-DMA und einer katalytischen Menge Natriummethoxid in Methanol. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 Stunden bei 50 °C gerührt und anschließend wurde das erhaltene 5-Azacytosin (**151**) durch Umkristallisation aus einer Wasser-Methanol-Mischung (1:1 v:v) erhalten. 5-Azacytosin (**151**) konnte auf diese Weise in einer Ausbeute von 66% über beide Stufen dargestellt werden.¹⁵⁸

Im Vergleich zu der natürlichen Base Cytosin besitzt 5-Azacytosin (**151**) an der 5-Position anstatt einer weiteren C-H-Bindung ein Stickstoffatom. Aufgrund des zusätzlichen Stickstoffatoms ist die 1,3,5-Triazen-Verbindung (**151**) labil gegenüber Hydrolyse und weist darüber hinaus eine geringe kinetische Stabilität in sauren pH-Werten auf.^{158,160}

Die Synthese des Nucleosidanalogons **7** beruhte ebenfalls auf der Syntheseroute von VUJJINI *et al.*¹⁵⁴ (s. **Abbildung 137**). Allerdings musste die Aufarbeitung des Nucleosidanalogons, aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Triazenrings, angepasst werden.

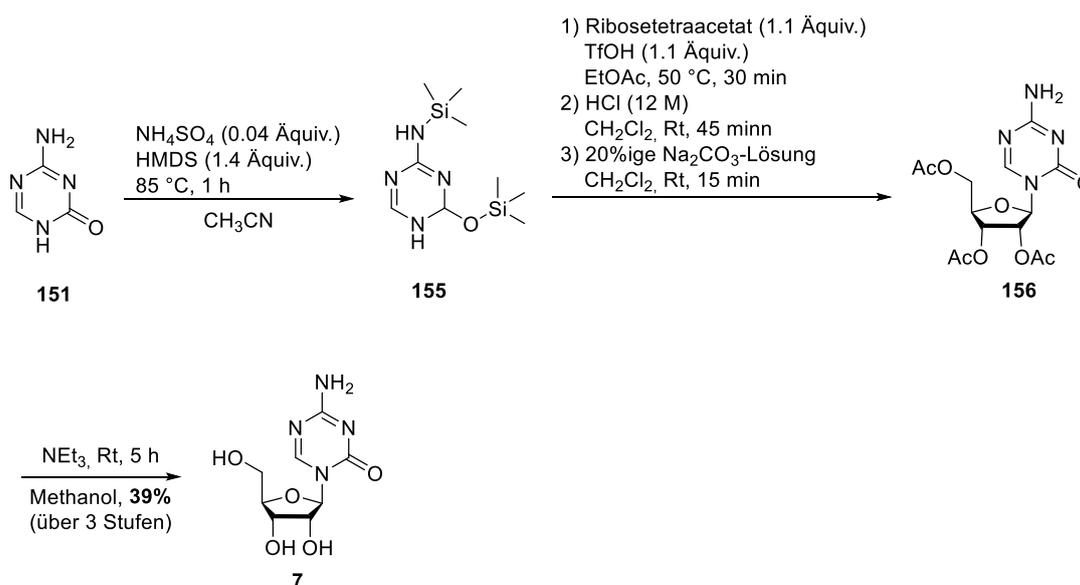


Abbildung 137: Synthese von 5-Azacytidin (**7**).

Die Knüpfung der N-glykosidischen Bindung zwischen der 1-Position der Nucleobase **151** und der 1'-Position des Kohlenstoffderivats Ribosetetraacetat sollte durch die Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion erfolgen. Für die Darstellung des Nucleosidanalogons **7** sollte der nucleophile Angriff ausgehend vom Stickstoff in 1-Position der Nucleobase **151** erfolgen. Allerdings besitzen die Hydroxylgruppe in der 2-Position und die Aminogruppe in der 4-Position ebenfalls nucleophile Aktivität, deswegen mussten diese im ersten Reaktionsschritt durch TBS-Gruppen geschützt werden, damit Nebenreaktionen vermieden werden konnten. Dafür wurde die Nucleobase **151** in Acetonitril gelöst und mit HMDS und einer katalytischen Menge

Ammoniumsulfat versetzt. Nach einstündigem Rühren bei 85 °C wurde das doppelgeschützte Triazen **155** erhalten. Durch Verwendung eines Überschusses an HMDS sollte sichergestellt werden, dass beide Positionen geschützt wurden. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und zur Reinigung des geschützten Triazens **155** zweimal mit Ethylacetat coevaporiert. Der erhaltene, schwer lösliche Feststoff wurde anschließend in Ethylacetat gelöst und bei 0 °C mit Ribosetetraacetat und Trifluormethansulfonsäure versetzt und 30 Minuten bei 50 °C gerührt. Durch den Nachbargruppeneffekt der 2'-Acetylgruppe kam es bei dieser Reaktion ausschließlich zur Bildung des β -Anomers des geschützten Nucleosid-analogons **156**.^{154,158,161} Nach erfolgter Glykosylierung wurde das Lösungsmittel entfernt, der erhaltene weiße Feststoff wurde in Dichlormethan gelöst und mit HCl (1.2 M) versetzt, dadurch konnten vorhandene Siliziumverunreinigungen abgetrennt werden. Durch Zugabe von 20%-iger K_2CO_3 -Lösung wurde das Produkt in die organische Phase extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase abgetrennt, das Lösungsmittel entfernt und zweimal mit Methanol coevaporiert. Durch Entfernen sämtlicher Wasserreste sollte sichergestellt werden, dass eine Hydrolyse des Produkts **156** verhindert werden kann.^{154,158}

Die Entschützung des Nucleosidanalogs **156** erfolgte durch basische Hydrolyse der Acetylgruppen. Dafür wurde das geschützte Nucleosidanalogs **156** vier Stunden bei Raumtemperatur in einer Triethylamin-Methanol-Mischung (1:10 v:v) gerührt. Das Nucleosidanalogs **7** wurde anschließend durch Umkristallisation aus Methanol gereinigt und konnte über drei Stufen in einer Ausbeute von 39% erhalten werden.¹⁵⁸

Die Ausbeuteverluste bei der Synthese von 5-Azacytidin (**7**) sind der Labilität des Triazenrings gegenüber hydrolytischer Spaltung geschuldet. In wässrigen Lösungen kommt es zum nucleophilen Angriff des Wassers auf das elektrophile Kohlenstoffatom der Nucleobase (in Position 6). Dadurch kommt es zur Ringöffnung des Triazenrings und anschließender irreversiblen Deformylierung, bei der das offenkettige Produkt **159** gebildet wird (s. **Abbildung 138**).^{158,160}

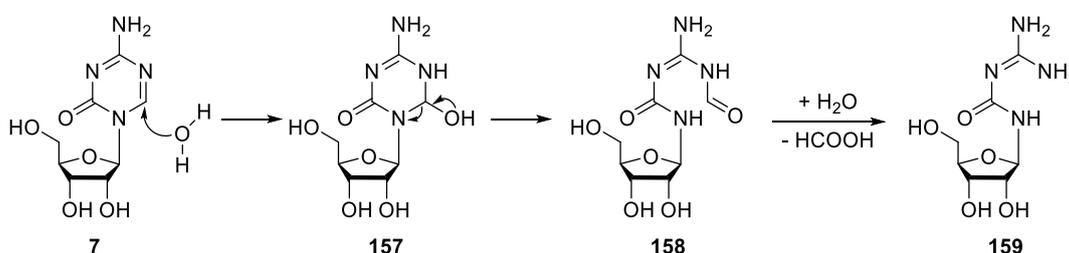


Abbildung 138: Hydrolytische Zersetzung von 5-Azacytidin (**7**).^{158,160}

Im 1H -NMR-Spektrum ist die erfolgreiche Synthese von 5-Azacytidin (**7**) eindeutig zu erkennen (s. **Abbildung 139**). Das Proton der Nucleobase H-6 liegt im erwarteten Bereich bei 8.57 ppm.

Da es keinen Kopplungspartner für das Proton gibt, handelt es sich dabei um ein Singulett-signal. Aufgrund der elektronenziehenden Effekte der benachbarten Stickstoff- und Sauerstoffatome wird der Wasserstoffkern des 1'-Wasserstoffatoms am stärksten elektronisch entschirmt, deswegen liegt dieses Signal am weitesten tieffeldverschoben im Vergleich zu den anderen Protonensignalen des Kohlenstoffrings. Aufgrund der Kupplung zum H-2' liegt das Signal des H-1' als Dublett vor. Die Protonen der Hydroxylgruppen der 2'-, 3'- und 5'-Positionen konnten aufgrund der fehlenden Kopplung zu ^{13}C -Atomen und über die Kopplung zu den Protonen am Kohlenstoffgerüst identifiziert werden und liegen im Bereich von 5.41 bis 5.01 ppm. Die weitere Zuordnung der Protonen in 2'-, 3'-, 4'- und 5'-Position erfolgte über die Kopplungskonstanten, die Kopplungen zu Kohlenstoffatomen sowie den 2D-NMR-Spektren. Zur Bestimmung des gebildeten Anomers wurde zusätzlich ein NOESY-Spektrum aufgenommen. Dabei konnte durch die Kopplung des 1'-Protons mit dem 4'-Proton über den dreidimensionalen Raum ermittelt werden, dass es sich bei dem gebildeten Produkt um das β -Anomer handelt.¹⁵⁸

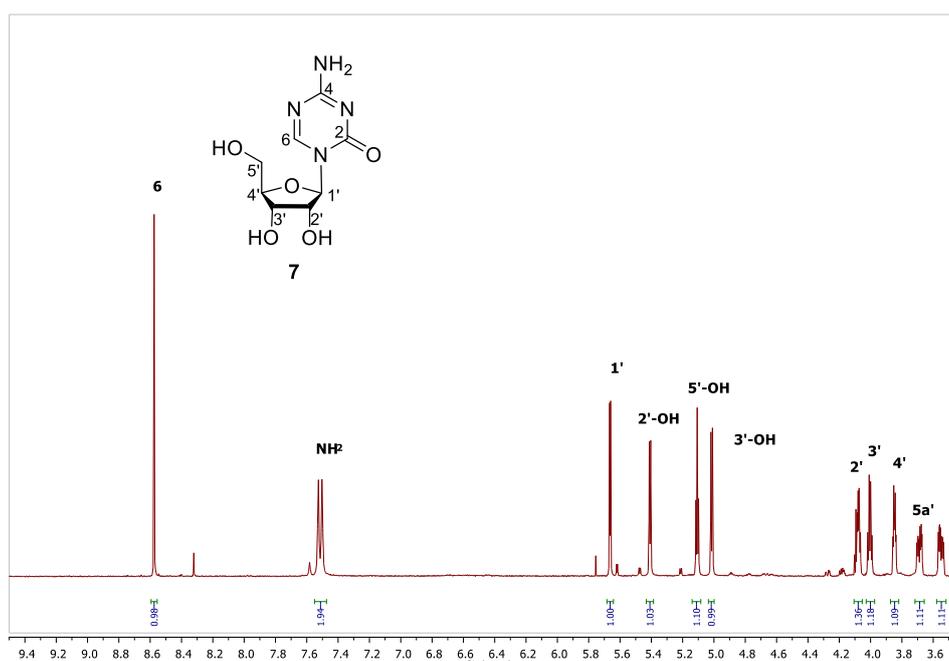


Abbildung 139: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6 , $20\text{ }^\circ\text{C}$) von 5-Azacytidin (**7**).¹⁵⁸

Die Synthese des 5-Azacytidinmonophosphats **150** sollte in einer direkten Phosphorylierungsreaktion nach der Methode von YOSHIKAWA¹¹⁹ erfolgen (s. **Abbildung 140**).

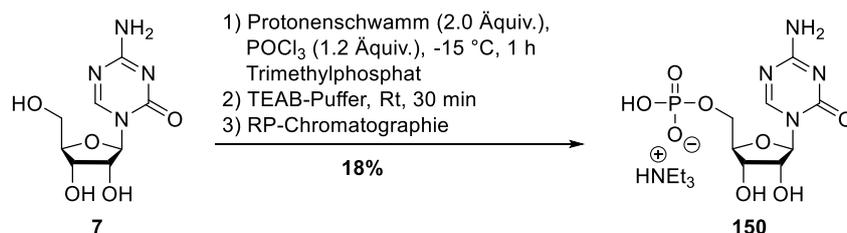


Abbildung 140: Synthese des 5-Azacytidinmonophosphats **150** via YOSHIKAWA-REAKTION.

5-Azacytidin (**7**) wurde zusammen mit Protonenschwamm im Vakuum getrocknet und anschließend in Trimethylphosphat gelöst. Die Zugabe von Phosphorylchlorid erfolgte tropfenweise bei -20 °C. Nach beendeter Reaktion wurde mit TEAB-Puffer hydrolysiert und nach Entfernung der flüchtigen Bestandteile erfolgte die Reinigung des Monophosphats **150** durch automatisierte RP18-Chromatographie. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 18% erhalten werden. Gründe für die geringe Ausbeute können die Bildung von diphosphorylierten Nucleotiden sowie eine hydrolytische Spaltung der Nucleobase während der wässrigen Aufarbeitung sein.¹⁵⁸

6.6.3 Synthese der 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung

Die Synthese der 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung **57f** sollte über die in dieser Arbeit bereits mehrfach verwendete *H*-Phosphonatroute erfolgen. Dafür musste zunächst das symmetrische *H*-Phosphonat **137f** in das Pyrophosphat **138f** überführt werden (s. **Abbildung 141**).

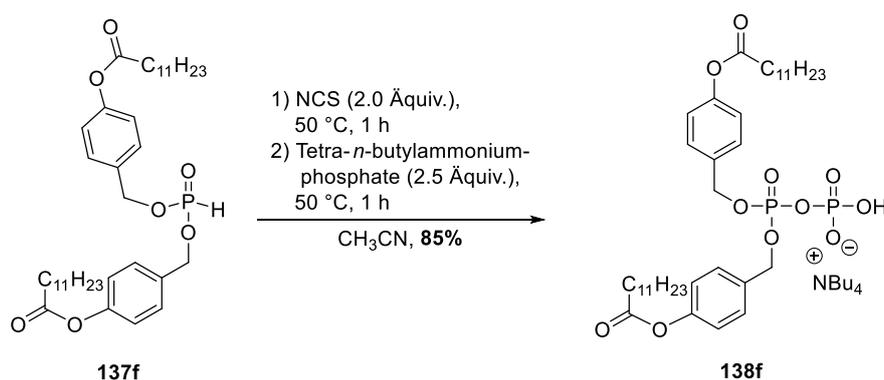


Abbildung 141: Synthese des C₁₁H₂₃-Pyrophosphats **138f**.

Das *H*-Phosphonat **137f** wurde, wie in **Kapitel 6.1.3** bereits beschrieben, durch leichtes Erwärmen in Acetonitril gelöst und mit NCS versetzt. Nach einer Stunde bei 50 °C wurde Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (*c* = 0.40 M in Acetonitril) zugegeben und erneut eine Stunde bei

50 °C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Pyrophosphat **138f** durch Extraktionen mit Ammoniumacetat und Wasser gereinigt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation beschleunigt, dadurch konnte die Hydrolyse des Pyrophosphats **138f** verhindert werden. Das Pyrophosphat **138f** konnte in 85% Ausbeute erhalten werden.¹⁵⁸

Nach der erfolgreichen Synthese des 5-Azacytidinmonophosphats **150** und des Pyrophosphats **138f** folgte nun der Kopplungsschritt zur 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung **57f** (s. **Abbildung 142**).

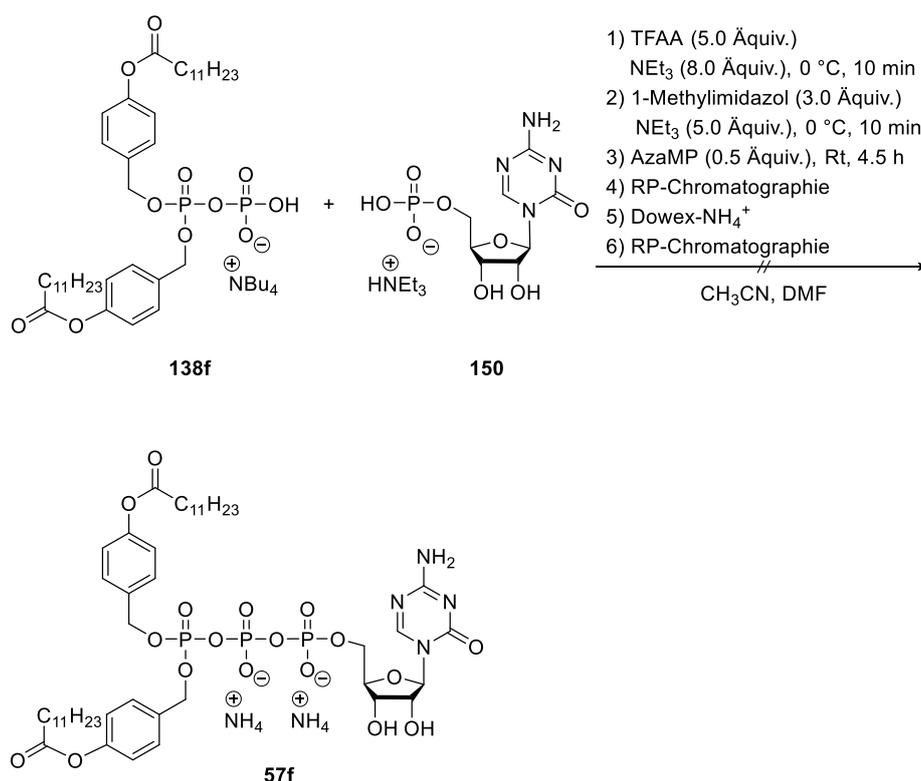


Abbildung 142: Versuchte Synthese der 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung **57f**.

Das Pyrophosphat **138f** wurde durch Reaktion mit TFAA in das gemischte Anhydrid überführt und anschließend mit 1-Methylimidazol zum Imidazolidat umgesetzt (s. **Kapitel 6.1.3**). Anschließend wurde das Monophosphat **150** zugegeben, dadurch erfolgte durch einen nucleophilen Angriff des Monophosphats **150** die Kopplung zur TriPPPPro-Verbindung **57f**. Mittels RP-HPLC-Analytik (Methode B) wurde die Reaktion verfolgt und der Endpunkt nach 4.5 Stunden festgestellt. Es folgte eine Vorreinigung über automatisierte RP-Chromatographie, ein Tausch der Gegenionen zu Ammonium über eine Dowex-NH₄⁺-Säule und eine weitere automatisierte RP-Chromatographie.¹⁵⁸

Die erfolgreiche Synthese der TriPPPPro-Verbindung **57f** konnte sowohl durch NMR- als auch MS-Analytik nachgewiesen werden, allerdings lag die Verbindung verunreinigt vor. Deswegen

schlossen sich noch weitere automatisierte RP-Chromatographien an. Leider gelang es nicht die Zielverbindung rein darzustellen, weil es während der chromatographischen Reinigung zur Zersetzung des Produkts kam. Da 5-Azacytidin hydrolyseempfindlich ist, kam es während der notwendigen Reinigungsschritte teilweise zur Spaltung der Nucleobase (s. **Abbildung 138**). Außerdem wurde die Bildung des Phosphatdiesters **160** beobachtet. GOLLNEST⁷¹ hat die partielle Hydrolyse einiger TriPPPPro-Verbindungen und die damit einhergehende Bildung des Phosphatdiesters **160** und des pyrophosphorylierten Nucleosidanalogons **161** beobachtet. Diese Spaltung konnte auch bei der 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung **57f** festgestellt werden (s. **Abbildung 143**).¹⁵⁸

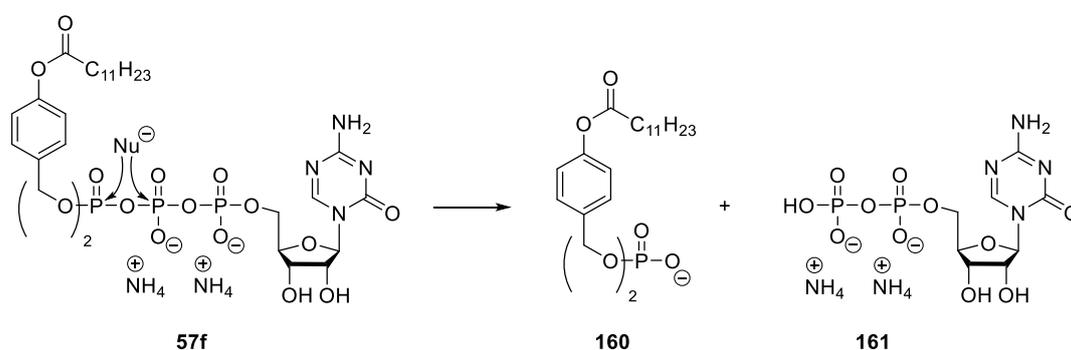


Abbildung 143: Mögliche partielle Hydrolyse der TriPPPPro-Verbindung **57f**.^{71,158}

Die partielle Hydrolyse der TriPPPPro-Verbindung **57f** wird durch einen nucleophilen Angriff auf die Phosphoranhydridbindung zwischen dem β- und γ-Phosphoratom verursacht. Dabei kommt es zur Bildung des Phosphatdiesters **160** und dem Nucleosiddiphosphat **161**. GOLLNEST⁷¹ konnte den Phosphatdiester bei seinen TriPPPPro-Verbindungen aufgrund unterschiedlicher UV-Absorptionen über automatisierte RP-Chromatographien abtrennen und dadurch die TriPPPPro-Verbindungen rein darstellen. Die Abtrennung des Phosphatdiesters **160** gelang aufgrund zu ähnlicher UV-Absorption bei der 5-Azacytidin-TriPPPPro-Verbindung nicht. Nach erneuter chromatographischer Reinigung konnte keine Produktfraktion mehr isoliert werden. Es ist also anzunehmen, dass sich die TriPPPPro-Verbindung **57f** während der aufwendigen Reinigungsschritte vollständig hydrolysierte.¹⁵⁸

7 EXPERIMENTELLER TEIL (MATERIAL UND METHODEN)

7.1 Allgemeines

Edukte und Reagenzien

Sämtliche Edukte und Reagenzien wurden vom Hersteller in Synthesqualität bezogen und ohne weitere Reinigung für die Synthese verwendet.

Lösungsmittel

- Acetonitril: CH_3CN [41.05 g/mol]; Sdp.: 82 °C; $\rho = 0.78 \text{ g/cm}_3$
- 1) absolut: aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt.
 - 2) HiPerSolv CHROMANORM[®] gradient grade, for HPLC (VWR 83639.320-2.5L).
 - 3) absolut; über Molsieb, max. 0,001% H_2O (Acros 10353732).
- Chloroform: CHCl_3 [119.38 g/mol]; Sdp.: 61 °C; $\rho = 1.48 \text{ g/cm}_3$
- 1) AnalaR NORMAPUR grade stabilisiert mit 0.6% Ethanol (VWR 22711.324).
 - 2) Euroisotop (D007H 100 mL).
- Dichlormethan: CH_2Cl_2 [84.93 g/mol]; Sdp.: 40 °C; $\rho = 1.3 \text{ g/cm}_3$
- 1) technische Qualität: bei Normaldruck destilliert.
 - 2) absolut: aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt.
 - 3) absolut: über Molsieb (Acros 10477951).
- DMF: $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$ [73.10 g/mol]; Sdp.: 153 °C; $\rho = 0.95 \text{ g/cm}_3$
absolut: über Molsieb, max. 0.005 % H_2O (Acros 10045421).
- DMSO- d_6 : $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$ [78.13 g/mol]; Sdp.: 189 °C; $\rho = 1.1 \text{ g/cm}_3$
Deutero (00905-10mL-s).
- Ethylacetat: EtOAc [84.93 g/mol]; Sdp.: 77 °C; $\rho = 0.89 \text{ g/cm}_3$
technische Qualität: bei Normaldruck destilliert.
- Methanol: CH_3OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C; $\rho = 0.79 \text{ g/cm}_3$
- 1) technische Qualität: bei Normaldruck destilliert.
 - 2) Euroisotop (D024FE).
 - 3) absolut: über Molsieb, max. 0.005% H_2O (Acros 10323442).
- Petrolether: Sdp.: 50 – 70°C
technische Qualität: bei Normaldruck destilliert.

- Pyridin: C_5H_5N , Sdp.: 152 °C
- 1) absolut: über Molsieb, max. 0.005% H_2O (Acros 10700693).
 - 2) absolut: aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) gelagert.
- THF: C_4H_8O [72.11 g/mol]; Sdp.: 66 °C; $\rho = 0.89$ g/cm³
- 1) HiPerSolv CHROMANORM® gradient grade, for HPLC (VWR28559.320-2.5L).
 - 2) absolut: aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt.
- Triethylamin: $C_6H_{15}N$ [101.19 g/mol]; Sdp.: 89 °C; $\rho = 0.72$ g/cm³
- 1) mind. 99.5 %, zur Synthese (Roth X875.3-1.0L).
 - 2) getrocknet über Calciumhydrid.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminiumfolien (Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 Nr. 818333; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt, wobei die Laufstrecke 5 cm betrug. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mittels UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Als Färbereagenz diente ein Gemisch aus 5 g Vanillin, 900 mL Methanol, 100 mL Essigsäure und 35 mL konz. Schwefelsäure.

Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Trennungen wurde Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (Kieselgel 60 M, 0.04-0.063 mm, 230-400 mesh) verwendet.

Ionenaustauschchromatographie

Zum Austausch der Kationen wurde das Ionentauscherharz Dowex 50W-X8, 50-100 mesh der Firma Sigma-Aldrich verwendet.

Automatisierte normal phase- (NP-)/reversed phase- (RP-)Chromatographie

Für die automatisierte Chromatographie wurde sowohl für die Normal- als auch die Umkehrphasenchromatographie der automatisierte puriFlash®430 der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für Normalphasentrennungen wurden self-packed Kartuschen eingesetzt, die mit Macherey-Nagel Kieselgel 60 M (siehe *Säulenchromatographie*) befüllt wurden. Für die RP-18-Chromatographie wurden Säulen von Macherey-Nagel (Chromabond® Flash RS 40 C18 ec) verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography (HPLC))

Die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer Agilent Technologies Anlage, Modell 1260 Infinity II, durchgeführt.

Software: Agilent OpenLab CDS

Pumpe: 1260 Quat Pump VL

Autosampler: 1260 Vialsampler

Detektor: 1260, Dioden Array Detector (DAD)

1260 FLD Spectra, Fluoreszenz Detektor (FLD)

Analytische Säule: EC 125/3 Nukleodur 100-5 C₁₈ ec der Firma Macherey-Nagel

Für alle HPLC-Anwendungen wurde Acetonitril des Reinheitsgrades "HPLC grade" der Firma VWR sowie Reinstwasser (Milli-Q) zum Ansetzen der Pufferlösungen verwendet

HPLC-Methoden:

Methode A: Von 0 Minuten bis 20 Minuten: TBAA-Laufpuffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80%), von 20 Minuten bis 30 Minuten: isokratisch (20% Laufpuffer, 80% Acetonitril), von 30 Minuten bis 33 Minuten: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5%), von 33 Minuten bis 38 Minuten: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C18 ec, UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 330 nm, Fluoreszenz-Detektion bei 330 nm.

Methode B: Von 0 Minuten bis 20 Minuten: TBAA-Laufpuffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80%), von 20 Minuten bis 30 Minuten: isokratisch (20% Laufpuffer, 80% Acetonitril), von 30 Minuten bis 33 Minuten: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5%), von 33 Minuten bis 38 Minuten: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C18 ec, UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 270 nm.

HPLC-Laufpuffer:

TBAA-Laufpuffer (2 mM): 3000 mL Reinstwasser wurden mit 12.8 mL einer Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in Wasser (ca. 10%) versetzt und mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.0 eingestellt.

Infrarotspektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mittels eines Bruker Alpha-P IR-Spektrometers bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 – 4000 cm⁻¹.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden in den spektroskopischen Abteilungen des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl gemessen.

¹H-NMR: Bruker Fourier 300 (300 MHz); Bruker AV 3400 (400 MHz); Bruker AV500 (500 MHz); Bruker AV3600 (600 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*₆ (δ = 2.50 ppm), MeOH-*d*₄ (δ = 4.87 ppm), CDCl₃ (δ = 7.26 ppm) und CH₃CN-*d*₃ (δ = 2.13 ppm). Die Aufnahmen erfolgten von -4 bis 16 ppm.

¹³C-NMR: Bruker Fourier 300 (75 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz), Bruker AV500 (125 MHz) Bruker AV3600 (150 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO (δ = 39.52 ppm), MeOH (δ = 49.00 ppm), CDCl₃ (δ = 77.16 ppm) Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -10 bis 200 ppm.

³¹P-NMR: Bruker AV 400 (162 MHz), Bruker AV500 (202 MHz) Bruker AV3600 (243 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard von 85%iger Phosphorsäure. Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -200 bis 300 ppm.

^{19}F -NMR: Bruker AV3600 (565 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard von Trifluoressigsäure. Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -300 bis 200 ppm.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie unter der Leitung von Dr. Maria Riedner aufgenommen. Die ESI-Massenspektren wurden mit einem Thermoquest 6224-TOF-LC/MSN Spektrometer der Marke Agilent Technologies gemessen. Die MALDI-Messungen wurden am MALDI TOF-TOF Bruker UltrafleXtreme Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

Gefriertrocknungsanlage

Wässrige Lösungen wurden mit einem Alpha 2-4 LDplus mit einem vertikalen Trockenrechen (121224) der Firma Christ lyophilisiert.

Wasseraufbereitungsanlage

Reinstwasser (Milli-Q) wurde durch ein arium® pro UV-Reinstwassersystem der Firma Sartorius gewonnen.

Zentrifuge

Für Lösungen bis 50 mL wurde eine Heraeus Primo R Zentrifuge der Firma Thermo Scientific bei 0 °C oder 4 °C und 8 000 rpm verwendet.

7.2 Synthese

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1 Synthese der Säurechloride

Unter Stickstoff als Inertgas wurde 1.00 Äquiv. der entsprechenden Säure in abs. Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 1.20 Äquiv. Oxalylchlorid und zwei Tropfen DMF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 Stunden zum Rückfluss erhitzt und dann das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde ohne Aufarbeitung zum Phenylalkanoat umgesetzt.

AAV 2 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.20 Äquiv. 4-Hydroxybenzylalkohol in abs. THF gelöst und mit 1.20 Äquiv. Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurde 1.00 Äquiv. des Säurechlorids, gelöst in abs. THF, zugegeben und die Reaktionsmischung 1.5-3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die ausgefallenen Salze abfiltriert, das Lösungsmittel des Filtrats entfernt und der erhaltene Rückstand durch eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:0 → 90:10 v:v oder PE/EE 4:1 v:v) gereinigt.

AAV 3 Synthese der γ -alkylierten und -maskierten *H*-Phosphonate

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.30 Äquiv. Diphenylphosphit (DPP) in abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 1.80 Äquiv. des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoats versetzt. Nach 15 Minuten Rühren bei -10 °C wurde 1.00 Äquiv. des Alkohols zugegeben und die erhaltene Lösung 1.5-3 Stunden bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und es folgte die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EE 4:1 v:v + 0.50% Essigsäure).

AAV 4 Synthese der 5'-O-TBS und 3'-O-Acetyl-geschützten Nucleoside

Die Synthese erfolgte unter Stickstoff als Inertgas. 1.00 Äquiv. des Nucleosids wurde in abs. Pyridin gelöst und mit 1.20 Äquiv. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann wurden 3.00 bzw. 7.00 Äquiv. Essigsäureanhydrid zugegeben und erneut 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene Rückstand in Dichlormethan gelöst. Die organische Phase wurde je zweimal mit Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgte die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EE 3:2 oder 1:1 v:v oder CH₂Cl₂/MeOH 95:5 v:v).

AAV 5 TBS-Entschützung der 5'-O-TBS und 3'-O-Acetyl-geschützten Nucleoside

1.00 Äquiv. des 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-O-acetyl-geschützten Nucleosids wurde in Dichlormethan gelöst und mit 6.00 Äquiv. Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Kieselgel, dadurch konnte überschüssiges Triethylamin-Trihydrofluorid abreagieren und die Reaktion wurde beendet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt durch eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 15:1 oder 9:1 v:v) rein dargestellt.

AAV 6 Synthese der Fm-geschützten Monophosphate durch Kupplung eines FM-geschützten Phosphoramidits mit dem Nucleosid und anschließende Entschützung des Fm-geschützten Monophosphats

Es wurde unter Stickstoff als Inertgas 1.00 Äquiv. des entsprechenden Nucleosids in abs. Dichlormethan gelöst und mit einer Lösung aus 1.50 Äquiv. Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit in 1 mL abs. Dichlormethan versetzt. Zu der erhaltenen Mischung wurden alle fünf Minuten 0.20 Äquiv. 4,5-Dicyanoimidazol (DCI, $c = 0.25 \text{ M}$ in Acetonitril) hinzugegeben, bis insgesamt 1.20 Äquiv. erreicht waren. Die erhaltene Reaktionslösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend erfolgte die Oxidation durch Zugabe von 1.50 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid ($c = 5.50 \text{ M}$ in *n*-Decan). Nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels automatisierter NP-Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 90-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend wurde unter Stickstoff als Inertgas 1.00 Äquiv. des FM-geschützten Monophosphats in einer Mischung aus Methanol und Triethylamin (1:1 v:v) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser zur Reaktionsmischung hinzugefügt und weitere 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

AAV 7 Synthese der Pyrophosphate

Die Synthese erfolgte unter Stickstoff als Inertgas. 1.00 Äquiv. des *H*-Phosphonats wurde in abs. Acetonitril gelöst und durch Erwärmen auf 50 °C vollständig gelöst. Anschließend wurden 2.00 Äquiv. *N*-Chlorsuccinimid hinzugefügt und eine Stunde bei 50 °C gerührt. Es folgte die Zugabe von 2.50 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.40 \text{ M}$ in Acetonitril), bevor erneut eine Stunde bei 50 °C gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand in Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde in ein Falcontube mit 20 mL Ammoniumacetatpuffer (1.00 M) überführt, geschüttelt und für eine schnellere Phasentrennung zentrifugiert (8 000 rpm, 4 Minuten, 0 °C). Die organische Phase wurde entnommen und in ein weiteres Falcontube mit 20 mL Wasser überführt, ebenfalls geschüttelt und zentrifugiert (8 000 rpm, 4 Minuten, 0 °C). Die organische Phase wurde erneut entnommen, über Natriumsulfat getrocknet und in einen ausgeheizten und tarierten Kolben überführt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und mit abs. Acetonitril coevaporiert. Aufgrund der Instabilität des Pyrophosphats wurde das erhaltene Produkt ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

AAV 8 Synthese der TriPPPPro-Verbindungen

Die Synthese erfolgte unter Stickstoff als Inertgas. 1.00 Äquiv. des Pyrophosphats wurde in abs. Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit einer, ebenfalls auf 0 °C gekühlten, Lösung aus 5.00 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid und 8.00 Äquiv. Triethylamin in abs. Acetonitril versetzt. Die erhaltene Lösung wurde 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Die flüchtigen Verbindungen wurden unter vermindertem Druck entfernt und es wurde mit abs. Acetonitril coevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde erneut in abs. Acetonitril bzw. abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es folgte die Zugabe von 3.00 Äquiv. 1-Methylimidazol und 5.00 Äquiv. Triethylamin bei 0 °C und zehnteiliges Rühren bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 0.50-0.70 Äquiv. des Monophosphats in abs. Acetonitril bzw. abs. DMF zugegeben und 3-5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch HPLC-Verfolgung (Methode A oder B). Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) vorgereinigt. Das Rohprodukt wurde über eine Kationenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ gegeben und erneut durch automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

AAV 9 Synthese der symmetrischen *H*-Phosphonate

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.00-1.10 Äquiv. des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoats in abs. Pyridin gelöst und mit 0.50 Äquiv. Diphenylphosphit versetzt. Die erhaltene Lösung wurde 3-4 Stunden bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und aus Methanol umkristallisiert.

7.2.2 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoate 84

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat (84a)

Die Synthese erfolgte entsprechend **AAV 2**. 2.00 g (16.1 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 25 mL abs. THF gelöst und bei 0 °C mit 2.30 mL (1.63 g, 16.1 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Zu der Reaktionsmischung wurden 1.70 mL (1.74 g, 14.5 mmol, 0.90 Äquiv.) Valeroylchlorid in 17 mL abs. THF hinzugefügt und die Lösung vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:0 → 90:10 v:v).

Ausbeute: 2.04 g (9.80 mmol, 68%) eines hellbeigen Feststoffs.

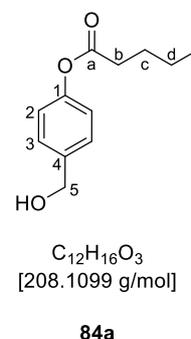
- **DC:** *R_F*-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 1:0 v:v): 0.11.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.33 (d, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, **H-3**), 7.05 (d, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, **H-2**), 5.21 (t, 1H, **OH**), 4.48 (d, ³*J*_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, **H-5**), 2.56 (t, 2H, **H-b**), 1.62 (quint, 2H, **H-c**), 1.37 (quint, 2H, **H-d**), 0.92 (t, 3H, **H-e**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 171.93 (**C-a**), 149.14 (**C-1**), 140.00 (**C-4**), 127.46 (**C-3**), 121.38 (**C-2**), 62.35 (**C-5**), 33.18 (**C-b**), 26.46 (**C-c**), 21.59 (**C-d**), 13.64 (**C-e**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3383, 2956, 2932, 2872, 1754, 1607, 1507, 1464, 1417, 1366, 1346, 1311, 1198, 1163, 1142, 1100, 1046, 1014, 940, 919, 870, 848, 811, 753, 624, 559, 503, 447, 426.

- **HRMS:** (EI, *m/z*): ber.: 208.1099, gef.: 208.096 [M].



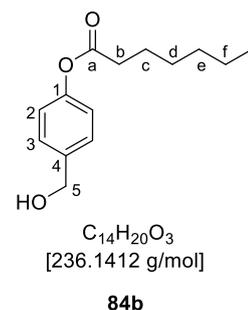
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylheptanoat (84b)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 2**. 3.00 g (24.2 mmol, 1.10 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 25 mL abs. THF gelöst und mit 3.07 mL (2.23 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurde eine Lösung aus 3.40 mL (3.26 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Heptanoylchlorid in 10 mL abs. THF hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v:v).

Ausbeute: 2.76 g (11.7 mmol, 53%) eines hellgelben Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.32.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.37 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-3**), 7.07 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-2**), 4.68 (s, 2H, **H-5**), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (dt, $^2J_{H,H} = 15.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-c**), 1.48 – 1.30 (m, 6H, **H-d**, **H-e**, **H-f**), 0.91 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, **H-g**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 172.55 (**C-a**), 150.26 (**C-1**), 138.45 (**C-4**), 128.19 (**C-3**), 121.83 (**C-2**), 64.91 (**C-5**), 34.53 (**C-b**), 31.57 (**C-c**), 28.91 (**C-d**), 25.04 (**C-e**), 22.62 (**C-f**), 14.16 (**C-g**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3378, 2955, 2929, 2859, 1754, 1607, 1507, 1459, 1417, 1377, 1296, 1196, 1163, 1141, 1101, 1042, 1014, 942, 916, 847, 811, 727, 559, 503.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 259.131, gef.: 259.124 [M+Na]⁺.

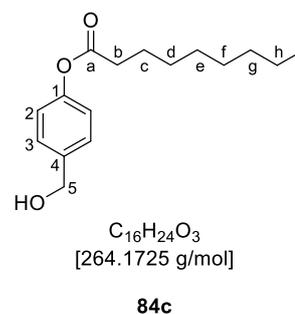
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat (**84c**)

Die Synthese erfolgte entsprechend **AAV 2**. 3.00 g (24.2 mmol, 1.10 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 30 mL abs. THF gelöst und mit 3.07 mL (2.23 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C erfolgte die Zugabe von 3.97 mL (3.89 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Nonanoylchlorid, gelöst in 10 mL abs. THF, anschließend wurde die erhaltene Lösung 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Rückstand wurde durch eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EE 4:1 v:v) gereinigt.

Ausbeute: 3.34 g (12.7 mmol, 58%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.25.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.35 (d, $^3J_{H,H} = 8.4$ Hz, 2H, **H-3**), 7.05 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-2**), 4.65 (s, 2H, **H-5**), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.80 – 1.68 (m, 2H, **H-c**), 1.46 – 1.21 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.89 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, **H-i**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.48 (**C-a**), 150.22 (**C-1**), 138.47 (**C-4**), 128.21 (**C-3**), 121.71 (**C-2**), 64.81 (**C-5**), 34.51 (**C-b**), 31.92 (**C-c**), 29.32, 29.23, 29.22, 24.92, 22.71 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 14.20 (**C-i**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3326, 2914, 2847, 1747, 1509, 1464, 1412, 1384, 1341, 1312, 1288, 1260, 1217, 1166, 1151, 1119, 1036, 1015, 949, 924, 845, 817, 760, 720, 579, 511, 488, 450, 418, 391.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 282.206, gef.: 282.277 [M+NH₄]⁺.

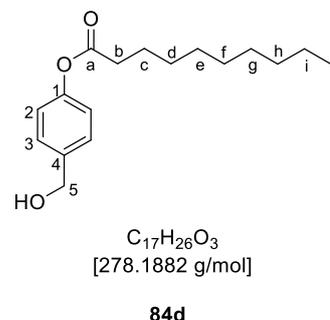
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat (84d)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 2**. 3.00 g (24.2 mmol, 1.10 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 30 mL abs. THF gelöst und mit 3.07 mL (2.23 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurde eine Lösung von 4.55 mL (4.18 g, 22.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Decanoylchlorid in 10 mL abs. THF zugegeben und die erhaltene Reaktionsmischung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (PE/EE 4:1 v:v) erhalten.

Ausbeute: 2.72 g (9.79 mmol, 45%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.34.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.38 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, **H-3**), 7.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, **H-2**), 4.69 (s, 2H, **H-5**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-c**), 1.47 – 1.22 (m, 12H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3H, **H-j**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.54 (**C-a**), 152.36 (**C-1**), 140.59 (**C-4**), 128.15 (**C-3**), 121.87 (**C-2**), 64.97 (**C-5**), 34.55 (**C-b**), 32.01 (**C-c**), 29.58, 29.56, 29.40, 29.26, 29.24, 25.09 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**), 22.82 (**C-j**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3257, 2913, 2846, 1746, 1510, 1464, 1412, 1385, 1341, 1313, 1288, 1260, 1217, 1166, 1151, 10369, 1015, 924, 845, 817, 760, 720, 579, 511.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 301.178, gef.: 301.170 [$\text{M}^+ \text{Na}^+$].

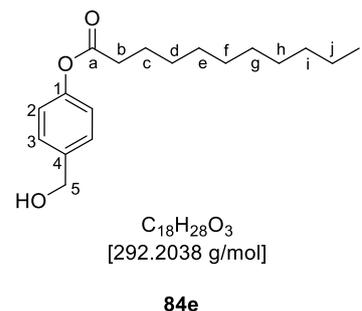
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylundecanoat (84e)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 1**. 3.00 g (16.1 mmol, 1.00 Äquiv.) Undecansäure (**87e**) wurden in 30 mL abs. Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 1.66 mL (2.45 g, 19.3 mmol, 1.20 Äquiv.) Oxalylchlorid und zwei Tropfen DMF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden zum Rückfluss erhitzt, anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Die Umsetzung zum Phenylester erfolgte gemäß **AAV 2**. 2.40 g (19.3 mmol, 1.20 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 30 mL abs. THF gelöst und mit 2.70 mL (1.96 g, 19.3 mmol, 1.20 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Zur erhaltenen Lösung wurde bei 0 °C das hergestellte Säurechlorid in 10 mL abs. THF sowie 197 mg (1.61 mmol, 0.10 Äquiv.) DMAP gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (PE/EE 4:1 v:v).

Ausbeute: 3.07 g (10.5 mmol, 65%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.31.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (300 MHz, CDCl_3): 7.38 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, **H-3**), 7.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, **H-2**), 4.68 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 2H, **H-5**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.85 – 1.62 (m, 2H, **H-c**), 1.50 – 1.25 (m, 14H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 3H, **H-k**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (75 MHz, CDCl_3): 172.55 (**C-a**), 150.30 (**C-1**), 138.48 (**C-4**), 128.19 (**C-3**), 121.84 (**C-2**), 64.94 (**C-5**), 34.54 (**C-b**), 32.04 (**C-c**), 29.70, 29.61, 29.45, 29.40, 29.26, 25.09, 22.83 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**), 14.27 (**C-k**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2952, 2913, 2846, 1747, 1510, 1464, 1411, 1386, 1254, 1217, 1167, 1151, 1036, 1015, 924, 845, 816, 759, 719, 579, 512.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): 315.194, gef.: 315.186 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

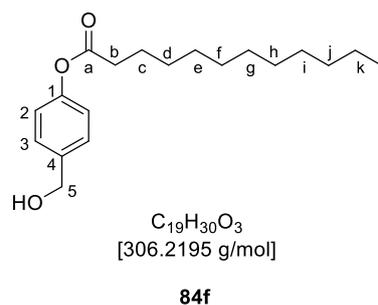
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat (**84f**)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 2**. 6.00 g (48.4 mmol, 1.20 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 35 mL abs. THF gelöst und mit 6.74 mL (4.89 g, 48.4 mmol, 1.20 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden zu der erhaltenen Lösung 9.30 mL (8.79 g, 40.3 mmol, 1.00 Äquiv.) Dodecanoylchlorid, gelöst in 25 mL abs. THF, und 492 mg (4.03 mmol, 0.10 Äquiv.) DMAP gegeben. Die erhaltene Suspension wurde 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel erhalten (PE/EE 4:1 v:v).

Ausbeute: 7.22 g (23.6 mmol, 58%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.26.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3) 7.37 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, **H-3**), 7.06 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, **H-2**), 4.67 (s, 2H, **H-5**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 15.2$, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-c**), 1.46 – 1.26 (m, 16H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 3H, **H-l**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.55 (**C-a**), 150.30 (**C-1**), 138.48 (**C-4**), 128.19 (**C-3**), 121.84 (**C-2**), 65.00 (**C-5**), 34.54 (**C-b**), 32.05 (**C-c**), 29.74, 29.60, 29.48, 29.40, 29.25, 25.09, 22.83 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**), 14.27 (**C-l**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3290, 2952, 2913, 2847, 2283, 2235, 2197, 2175, 2145, 2043, 2031, 2011, 1970, 1747, 1595, 1510, 1464, 1411, 1387, 1305, 1279, 1253, 1217, 1166, 1151, 1092, 1036, 1015, 949, 924, 904, 844, 816, 778, 752, 719, 670, 581, 513, 451, 441, 418, 400, 392.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 329.209, gef.: 329.207 [M+Na]⁺.

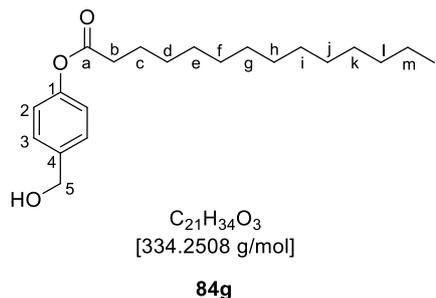
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradecanoat (**84g**)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 2**. 1.39 g (11.8 mmol, 1.10 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol (**85**) wurden in 14 mL abs. THF gelöst und mit 1.42 mL (1.03 g, 10.2 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C erfolgte die Zugabe von 2.75 mL (2.50 g, 10.2 mmol, 1.00 Äquiv.) Myristinsäurechlorid, gelöst in 5 mL abs. THF, die erhaltene Suspension wurde 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v:v).

Ausbeute: 1.10 g (3.30 mmol, 32%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_F-Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.32.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, MeOH-d₄): 7.38 (d, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, **H-3**), 7.04 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 2H, **H-2**), 4.60 (s, 2H, **H-5**), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **H-b**), 1.78 – 1.67 (m, 2H, **H-c**), 1.46 – 1.24 (m, 20H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m**), 0.90 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-n**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 172.49 (**C-a**), 150.35 (**C-1**), 138.48 (**C-4**), 128.22 (**C-3**), 121.87 (**C-2**), 64.99 (**C-5**), 34.56 (**C-b**), 32.07 (**C-c**), 29.83, 29.80, 29.75, 29.61, 29.51, 29.41, 29.26, 25.10, 22.84 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m**), 14.27 (**C-n**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3328, 2954, 2914, 2847, 1747, 1509, 1463, 1411, 1385, 1278, 1252, 1216, 1166, 1150, 1091, 1036, 1015, 925, 845, 816, 719, 579, 566, 516, 497, 397.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 357.241, gef.: 356.759 [M+Na]⁺.

7.2.3 Synthese der γ-maskierten und -alkylierten *H*-Phosphonate

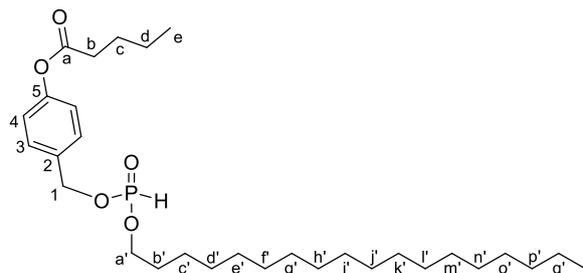
Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65az**)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.66 mL (812 mg, 3.47 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 21 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 1.00 g (4.81 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat (**84a**) in 17 mL abs. Pyridin versetzt. Es wurden 722 mg (2.67 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**) hinzugegeben und drei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 1.32 g (2.51 mmol, 94%) eines farblosen Öls.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.22.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.41 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-3**), 5.09 (d, $^2J_{H,P} = 9.5$ Hz, 2H, **H-1**), 4.14 – 3.94 (m, 2H, **H-a'**), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.79 – 1.69 (m, 2H, **H-c**), 1.69 – 1.60 (m, 2H, **H-b'**), 1.45 (dd, $^2J_{H,H} = 15.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-d**), 1.25 (s, 30H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.97 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-e**), 0.88 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 3H, **H-r'**).



$\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_5\text{P}$
[524.3631 g/mol]

65az

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.30 (**C-a**), 151.06 (**C-5**), 138.34 (**C-2**), 129.33 (**C-4**), 128.19 (**C-3**), 66.72 (d, $^2J_{C,P} = 5.5$ Hz, **C-1**), 66.20 (d, $^2J_{C,P} = 6.1$ Hz, **C-a'**), 34.24 (**C-b**), 32.06 (**C-b'**), 30.50, 30.47, 29.84, 29.71, 29.69, 29.59, 29.50, 29.24, 27.10, 25.60 (**C-c**, **C-d**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 22.83 (**C-e**), 22.38 (**C-r'**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 6.08.

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2958, 2923, 2853, 1756, 1722, 1508, 1465, 1379, 1200, 1165, 1142, 1101, 1084, 1047, 968, 920, 849, 812, 555, 506.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 547.353, gef.: 547.352 [M]⁺.

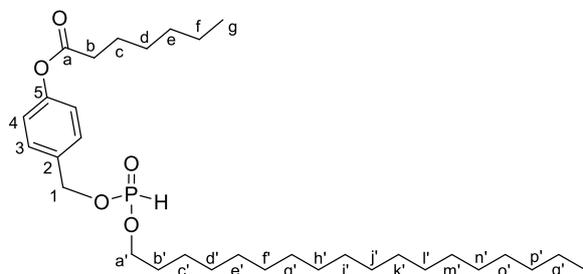
Synthese von (4-Heptanoyloxybenzyl)octadecan-H-phosphonat (**65bz**)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.58 mL (710 mg, 3.03 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Bei -10 °C wurden 991 mg (4.20 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptanoat (**84b**) in 12 mL abs. Pyridin hinzugefügt. Zu der Reaktionslösung wurden 630 mg (2.33 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**) gegeben und drei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 904 mg (1.64 mmol, 70%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 3:2 v:v): 0.87.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.40 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-3**), 5.10 (d, $^3J_{H,P} = 9.6$ Hz, 2H, **H-1**), 4.04 (dt, $^2J_{H,P} = 25.9$ Hz, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, 2H, **H-a'**), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.81 – 1.58 (m, 6H, **H-c**, **H-d**, **H-b'**), 1.47 – 1.20 (m, 34H, **H-e**, **H-f**, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.96 – 0.84 (m, 6H, **H-g**, **H-r'**).



$\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{O}_5\text{P}$
[552.3944 g/mol]

65bz

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.39 (**C-a**), 151.15 (**C-5**), 133.24 (**C-2**), 129.77 (**C-4**), 122.07 (**C-3**), 66.96 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.7$ Hz, **C-1**), 66.46 (**C-a'**), 32.07 (**C-b**), 31.56 (**C-b'**), 30.50, 29.97, 29.73, 29.67, 29.49, 29.32, 29.26, 29.13, 28.84, 25.61, 25.58, 25.01, 22.83 (**C-c**, **C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.25, 14.17 (**C-g**, **C-r'**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 7.74.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3331, 2955, 2918, 2850, 1745, 1712, 1611, 1510, 1467, 1439, 1381, 1249, 1218, 1167, 1151, 1105, 1061, 998, 925, 832, 770, 720, 515.

- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 654.522, gef.: 663.454 [$\text{M}+\text{HNEt}_3$]⁺.

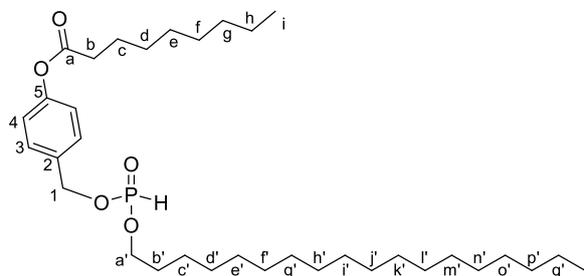
Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65cz**)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 3**. 0.16 mL (195 mg, 0.832 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 5 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 300 mg (1.16 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat (**84c**) in 4 mL abs. Pyridin versetzt. Zu der erhaltenen Lösung wurden 173 mg (0.64 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**) gegeben und 1.5 Stunden auf 40 °C erhitzt.

Ausbeute: 284 mg (0.488 mmol, 76%) eines weißen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert (PE/EE 3:2 v:v): 0.56.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.40 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 11.2$ Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 2H, **H-3**), 5.09 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 9.4$ Hz, 2H, **H-1**), 4.17 – 3.90 (m, 2H, **H-a'**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.80 – 1.69 (m, 2H, **H-c**), 1.69 – 1.60 (m, 2H, **H-b'**), 1.46 – 1.36 (m, 2H, **H-d**), 1.36 – 1.22 (m, 38H, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.88 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8, 3.7$ Hz, 6H, **H-i**, **H-r'**).



$\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{O}_5\text{P}$
[580.4257 g/mol]

65cz

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.30 (**C-a**), 151.01 (**C-5**), 133.23 (**C-2**), 129.35 (**C-4**), 122.07 (**C-3**), 66.79 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.4$ Hz, **C-1**), 66.26 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.0$ Hz, **C-a'**), 34.52 (**C-b**), 32.06 (**C-b'**), 31.94, 30.52, 30.43, 29.84, 29.82, 29.78, 29.70, 29.65, 29.54, 29.48, 29.35, 29.26, 25.60, 25.04, 22.83, 22.76 (**C-c**, **C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.26 (**C-i**), 14.21 (**C-r'**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 7.92.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3279, 2955, 2916, 2848, 1748, 1737, 1666, 1613, 1599, 1577, 1510, 1464, 1381, 1341, 1250, 1235, 1219, 1168, 1151, 1124, 1107, 1061, 998, 924, 834, 782, 770, 720, 515, 452.

- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 603.413, gef.: 603.415 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

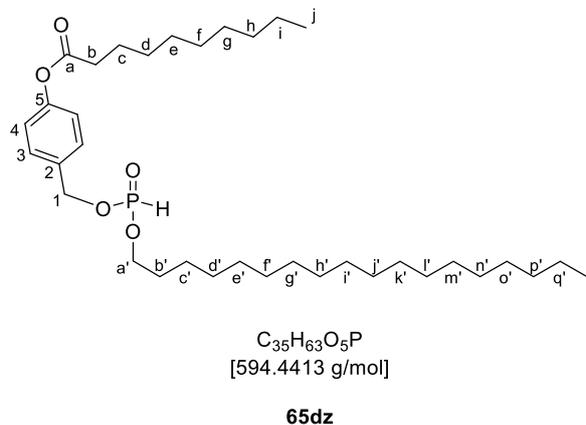
Synthese von (4-Decanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (65dz)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.49 mL (608 mg, 2.60 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 16 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 1.00 g (3.60 mmol, 1.38 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat (**84d**) in 13 mL abs. Pyridin versetzt. Es wurden noch 721 mg (2.66 mmol, 1.02 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**) zugegeben und dann zwei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 1.35 g (2.28 mmol, 88%) eines farblosen Öls.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.36.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.40 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-3**), 5.10 (d, $^3J_{H,P} = 9.6$ Hz, 2H, **H-1**), 4.09 – 3.99 (m, 2H, **H-a'**), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.83 – 1.48 (m, 6H, **H-c**, **H-d**, **H-b'**), 1.46 – 1.17 (m, 40H, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.91 (dt, $^3J_{H,H} = 11.8, 6.2$ Hz, 6H, **H-j**, **H-r'**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 173.59 (**C-a**), 155.78 (**C-5**), 131.78 (**C-2**), 128.82 (**C-4**), 121.99 (**C-3**), 67.06 – 66.74 (m, **C-1**), 66.50 – 66.19 (m, **C-a'**), 34.39 (**C-b**), 32.85 (**C-b'**), 31.94, 30.00, 29.85, 29.81, 29.75, 29.71, 29.63, 29.56, 29.51, 29.48, 29.24, 29.07, 25.89, 25.45, 24.96, 22.69 (**C-c**, **C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.06 (**C-j**, **C-r'**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 7.72.

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2923, 2853, 1755, 1712, 1508, 1466, 1416, 1375, 1200, 1166, 1140, 1106, 1046, 974, 849, 753, 703, 626, 608, 450.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 617.431, gef.: 617.430 [M+Na]⁺.

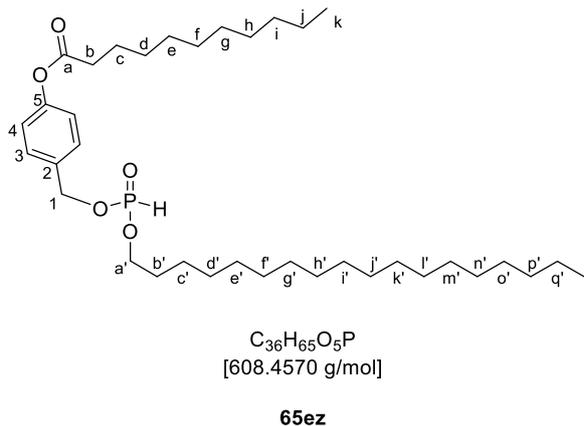
Synthese von (4-Undecanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (65ez)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 3**. 0.38 mL (463 mg, 1.98 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 12 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 800 mg (2.74 mmol, 1.8 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylundecanoat (**84e**) in 10 mL abs. Pyridin versetzt. Nach der Zugabe von 411 mg (1.52 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**), wurde die Reaktionslösung 2.5 Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 742 mg (0.812 mmol, 80%) eines farblosen Öls.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.31.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.41 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 2H, **H-3**), 5.09 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 9.5$ Hz, 2H, **H-1**), 4.07 – 3.97 (m, 2H, **H-a'**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.80 – 1.70 (m, 2H, **H-c**), 1.69 – 1.60 (m, 2H, **H-d**), 1.46 – 1.21 (m, 44H, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-b'**, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.88 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$, 1.9 Hz, 6H, **H-k**, **H-r'**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.31 (**C-a**), 151.11 (**C-5**), 133.33 (**C-2**), 129.33 (**C-4**), 128.20 (**C-3**), 66.76 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.5$ Hz, **C-1**), 66.24 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.2$ Hz, **C-a'**), 34.55 (**C-b**), 32.07 (**C-b'**), 30.51, 30.46, 29.84, 29.82, 29.80, 29.78, 29.69, 29.63, 29.60, 29.50, 29.44, 29.39, 29.24, 25.60, 25.09, 25.05, 22.82, 20.65 (**C-c**, **C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.24 (**C-k**, **C-r'**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.99.

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3335, 2954, 2917, 2850, 1753, 1714, 1645, 1509, 1465, 1412, 1383, 1364, 1243, 1220, 1166, 1152, 1140, 1087, 1031, 1012, 989, 924, 884, 852, 821, 772, 720, 694, 509, 482, 451.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 631.447, gef.: 631.447 [M+Na]⁺.

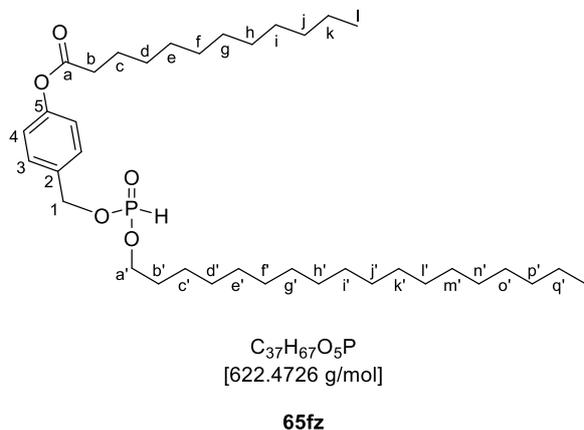
Synthese von (4-Dodecanoyloxybenzyl)octadecan-1-phosphonat (**65fz**)

Die Synthese wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 0.45 mL (552 mg, 2.36 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 14 mL abs. Pyridin gelöst. Bei -10 °C erfolgte die Zugabe von 1.00 g (3.27 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat (**84f**) in 12 mL abs. Pyridin und 490 mg (1.81 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**). Anschließend wurde die Reaktionslösung zwei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 956 mg (1.54 mmol, 85%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.27.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.40 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 2H, **H-3**), 5.10 (d, $^2J_{\text{H,P}} = 9.6$ Hz, 2H, **H-1**), 4.02 (m, 2H, **H-a'**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.80 – 1.58 (m, 4H, **H-c**, **H-d**), 1.46 – 1.21 (m, 46H, **H-e**, **H-f**,



H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-b', H-c', H-d', H-e', H-f', H-g', H-h', H-i', H-j', H-k', H-l', H-m', H-n', H-o', H-p', H-q'), 0.88 (td, $^3J_{H,H} = 6.9, 1.4$ Hz, 6H, **H-l, H-r')**.

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.33 (**C-a**), 151.12 (**C-5**), 133.29 (**C-2**), 128.21 (**C-4**), 121.80 (**C-3**), 66.86 (d, $^2J_{C,P} = 5.4$ Hz, **C-1**), 66.35 (d, $^2J_{C,P} = 6.2$ Hz, **C-a'**), 34.54 (**C-b**), 32.04 (**C-b'**), 30.49, 30.44, 29.84, 29.81, 29.79, 29.78, 29.73, 29.69, 29.62, 29.59, 29.49, 29.47, 29.39, 29.24, 25.58, 25.05, 22.82, 20.86 (**C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-c', C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j', C-k', C-l', C-m', C-n', C-o', C-p', C-q')**), 14.24 (**C-l, C-r')**.

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 9.07.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 2956, 2918, 1849, 1753, 1713, 1509, 1470, 1417, 1385, 1293, 1267, 1246, 1233, 1222, 1167, 1151, 1110, 1080, 1051, 1039, 1025, 1014, 1004, 995, 926, 890, 866, 841, 810, 719, 627, 608, 530, 513, 481, 450.

- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 640.506, gef.: 633.156 [$\text{M}+\text{NH}_4^+$]⁺.

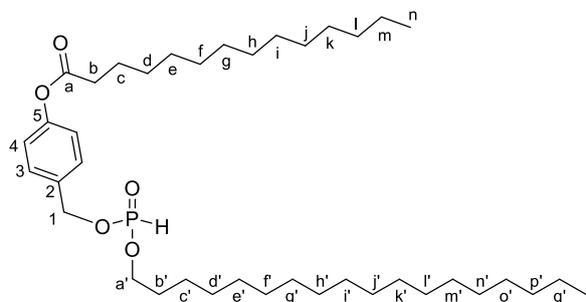
Synthese von (4-Tetradecanoyloxybenzyl)octadecan-H-phosphonat (65gz)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.41 mL (506 mg, 2.16 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 13 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 1.00 g (2.99 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradecanoat (**84g**) in 11 mL abs. Pyridin und 449 mg (1.66 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung zwei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 905 mg (0.837 mmol, 84%) eines weißen Feststoffs.

- **DC**: R_F -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.32.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, CDCl_3): 7.41 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-4**), 7.14 – 7.07 (m, 2H, **H-3**), 5.09 (d, $^3J_{H,P} = 9.4$ Hz, 2H, **H-1**), 4.09 – 3.96 (m, 2H, **H-a'**), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.79 – 1.71 (m, 2H, **H-c**), 1.68 – 1.61 (m, 2H, **H-b'**), 1.45 – 1.38 (m, 2H, **H-d**), 1.37 – 1.23 (m, 48H, **H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-c', H-d', H-e', H-f', H-g', H-h', H-i', H-j', H-k', H-l', H-m', H-n', H-o', H-p', H-q')**), 0.88 (m, 6H, **H-n, H-r')**.



$\text{C}_{39}\text{H}_{71}\text{O}_5\text{P}$
[650.5039 g/mol]

65gz

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 172.32 (**C-a**), 151.03 (**C-5**), 134.23 (**C-2**), 129.32 (**C-4**), 121.15 (**C-3**), 66.74 (d, $^2J_{C,P} = 5.3$ Hz, **C-1**), 66.22 (d, $^2J_{C,P} = 6.1$ Hz, **C-a'**), 34.49 (**C-b**), 32.07 (**C-b'**), 30.50, 29.85, 29.82, 29.79, 29.74, 29.71, 29.64, 29.61, 29.50, 29.40, 29.26, 25.61, 25.06, 22.84 (**C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-c', C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j', C-k', C-l', C-m', C-n', C-o', C-p', C-q')**), 14.20 (**C-n, C-r')**.

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.97.

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3298, 2956, 2916, 2849, 1753, 1509, 1470, 1415, 1382, 1304, 1278, 1247, 1218, 1167, 1149, 1112, 1080, 1051, 1040, 1026, 1013, 995, 925, 841, 813, 753, 719, 692, 530, 514, 497.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 673.494, gef.: 673.494 [M]⁺.

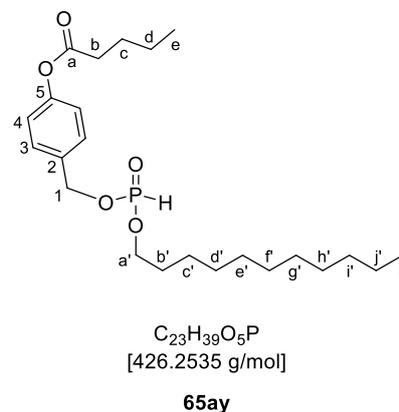
Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)undecan-*H*-phosphonat (65ay)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.33 mL (406 mg, 1.74 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 19 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 500 mg (2.40 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat (**84a**) in 9 mL abs. Pyridin und 230 mg (1.33 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Undecanol (**83y**) versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend zwei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 453 mg (912 μmol, 68%) eines farblosen Öls.

- **DC:** R_F-Wert (PE/EE 4:1 v.v): 0.16.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 7.41 (d, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, **H-4**), 7.09 (d, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, **H-3**), 5.09 (d, ³J_{H,P} = 9.5 Hz, 2H, **H-1**), 4.11 – 3.96 (m, 2H, **H-a'**), 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, **H-b**), 1.79 – 1.69 (m, 2H, **H-c**), 1.69 – 1.60 (m, 2H, **H-b'**), 1.49 – 1.39 (m, 2H, **H-d**), 1.37 – 1.23 (m, 16H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, **H-e**), 0.88 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-k'**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl₃): 172.24 (**C-a**), 151.07 (**C-5**), 138.39 (**C-2**), 129.33 (**C-4**), 122.09 (**C-3**), 66.76 (d, ²J_{C,P} = 5.4 Hz, **C-1**), 66.24 (d, ²J_{C,P} = 6.3 Hz, **C-a'**), 34.26 (**C-b**), 32.04 (**C-b'**), 30.47, 29.80, 29.73, 29.69, 29.62, 29.46, 29.34, 29.24, 27.02, 25.60, 22.82, 22.36, 20.65 (**C-c**, **C-d**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**), 14.24 (**C-e**), 13.85 (**C-k'**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 8.98.

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 2956, 2916, 2849, 1754, 1723, 1680, 1509, 1489, 1464, 1384, 1313, 1250, 1216, 1199, 1167, 1148, 1062, 998, 923, 833, 811, 780, 719.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 449.243, gef.: 449.242 [M+Na]⁺.

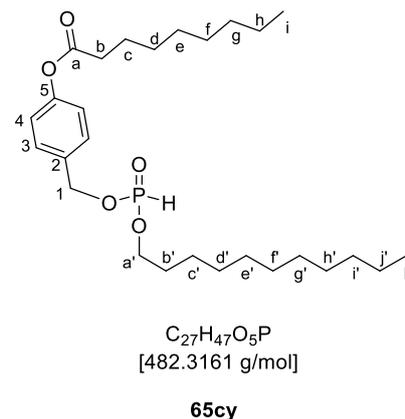
Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)undecan-*H*-phosphonat (65cy)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.26 mL (320 mg, 1.37 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 15 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 500 mg (1.89 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat (**84c**) in 7 mL abs. Pyridin versetzt. Nach der Zugabe von 181 mg (1.05 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Undecanol (**83y**), wurde die Reaktionslösung 2.5 Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 362 mg (0.714 mmol, 71%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.29.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.38 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4**), 7.07 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-3**), 4.69 (s, 2H, **H-1**), 4.02 (dt, $^3J_{H,P} = 15.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, 2H, **H-a'**), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (dt, $^2J_{H,H} = 15.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.69 – 1.61 (m, 2H, **H-c**), 1.45 – 1.37 (m, 2H, **H-d**), 1.37 – 1.27 (m, 24H, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 0.92 – 0.86 (m, 6H, **H-i**, **H-k'**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.35 (**C-a**), 150.31 (**C-5**), 138.39 (**C-2**), 129.40 (**C-4**), 121.78 (**C-3**), 66.76 (d, $^2J_{C,P} = 5.4$ Hz, **C-1**), 66.24 (d, $^2J_{C,P} = 6.3$ Hz, **C-a'**), 34.28 (**C-b**), 31.43 (**C-b'**), 29.74, 29.67, 29.63, 29.47, 29.36, 29.26, 28.78, 24.70, 22.66 (**C-c**, **C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**), 13.98 (**C-i**, **C-k'**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.95.

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2958, 2926, 2856, 1757, 1713, 1509, 1465, 1379, 1363, 1200, 1166, 1142, 1101, 1083, 970, 920, 850, 827, 555, 508.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 528.296, gef.: 529.194 [$\text{M}+2\text{Na}^+$]⁺.

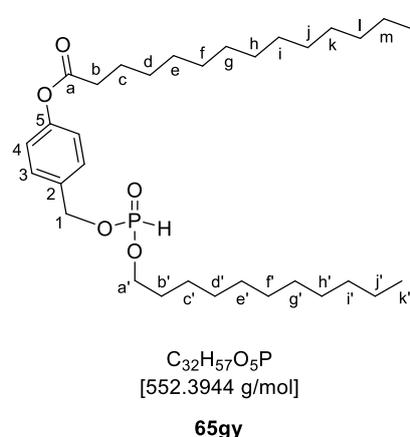
Synthese von (4-Tetradecanoyloxybenzyl)undecan-H-phosphonat (**65gy**)

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 3**. 0.41 mL (506 mg, 234 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 30 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 1.00 g (2.99 mmol, 1.80 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradodecanoat (**84g**) in 10 mL abs. Pyridin und 286 mg (1.66 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Undecanol (**83y**) vermischt. Die Reaktionslösung wurde anschließend drei Stunden bei 40 °C gerührt.

Ausbeute: 720 mg (1.38 mmol, 78%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EE 4:1 v:v): 0.33.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.18 (dd, $^3J_{H,H} = 8.4, 7.5$ Hz, 2H, **H-4**), 6.83 – 6.76 (m, 2H, **H-3**), 5.05 (d, $^3J_{H,P} = 9.6$ Hz, 2H, **H-1**), 4.07 – 3.93 (m, 2H, **H-a'**), 2.52 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.77 – 1.57 (m, 4H, **H-b'**, **H-c**), 1.45 – 1.17 (m, 36H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 0.85 (t, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 6H, **H-n**, **H-k'**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.37 (**C-a**), 151.01 (**C-5**), 141.90 (**C-2**), 129.53 (**C-4**), 122.02 (**C-3**), 66.2 (**C-1**), 65.3 (**C-a'**), 34.46 (**C-b**), 31.99 (**C-b'**), 31.97, 30.41, 29.74, 29.71, 29.66, 29.61, 29.56, 29.54, 29.53, 29.42, 29.39, 29.32, 29.17, 29.15, 25.51, 24.97, 22.75 (**C-c**, **C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**), 14.15 (**C-n**, **C-k'**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.98.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 2955, 2915, 2848, 1748, 1676, 1489, 1472, 1385, 1313, 1250, 1218, 1197, 1168, 1150, 127, 1092, 1062, 1030, 998, 924, 834, 812, 780, 771, 719.

- **HRMS**: (ESI^+ , m/z): ber.: 570.428, gef.: 570.428 [$\text{M}+\text{NH}_4^+$] $^+$.

7.2.4 Synthese des bicyclischen Nucleosidanalogons

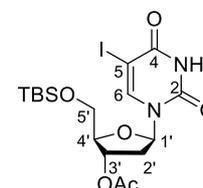
Synthese von 5-Iod-3'-O-acetyl-5'-O-tert-butyl-dimethylsilyl-2'-desoxyuridin (72)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 4**. Es wurden 3.00 g (8.48 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Iod-2'-desoxyuridin (**73**) in 42 mL abs. Pyridin gelöst und mit 1.53 g (10.2 mmol, 1.20 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und später mit 2.40 mL (2.60 g, 25.4 mmol, 3.00 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Das Rohprodukt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE/EE 3:2) erhalten.

Ausbeute: 2.68 g (5.25 mmol, 62%) eines weißen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert (PE/EE 3:2 v:v): 0.55.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 11.77 (s, 1H, **NH**), 8.00 (s, 1H, **H-6**), 6.09 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6, 5.7$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.15 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, **H-4'**), 3.83 (qd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, 2H, **H-5'**), 2.37 – 2.15 (m, 2H, **H-2'**), 2.06 (s, 3H, **OAc**), 0.90 (s, 9H, **-Si(CH₃)₃**), 0.13 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, 6H, **-Si(CH₃)₂**).



$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{IN}_2\text{O}_6\text{Si}$
[510.0683 g/mol]

72

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 170.04 (**q-OAc**), 160.47 (**C-4**), 150.05 (**C-2**), 143.70 (**C-6**), 84.68 (**C-1'**), 84.57 (**C-4'**), 74.45 (**C-3'**), 70.20 (**C-5**), 63.18 (**C-5'**), 37.30 (**C-2'**), 25.95 (**-Si(CH₃)₃**), 20.81 (**OAc**), 18.07 (**-Si(CH₃)₃**), -5.26, -5.38 (**-Si(CH₃)₂**).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3201, 3084, 2952, 2927, 2882, 2853, 1718, 1684, 1611, 1437, 1410, 1388, 1249, 1205, 1120, 1106, 1075, 1022, 1002, 956, 922, 828, 812, 781, 750, 673, 648/, 592, 541, 416.

- **HRMS**: (ESI^+ , m/z): ber.: 533.058, gef.: 533.058 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

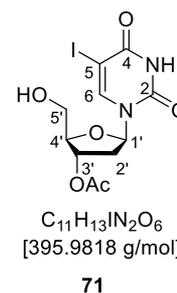
Synthese von 5-Iod-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin (71)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 5**. 2.68 g (5.25 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Iod-3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyl-dimethylsilyl-2'-desoxyuridin (**72**) wurden in 55 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 5.1 mL (5.07 g, 31.48 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Das Rohprodukt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) erhalten.

Ausbeute: 1.70 g (4.28 mmol, 82%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v:v): 0.70.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.53 (s, 1H, **H-6**), 6.24 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 8.3, 5.8 Hz, 1H, **H-1'**), 5.31 (d, ³ $J_{H,H}$ = 6.2 Hz, 1H, **H-3'**), 4.12 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 5.0, 2.7 Hz, 1H, **H-4'**), 3.81 (t, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, 2H, **H-5'**), 2.41 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.33 (m, 1H, **H_b-2'**), 2.09 (s, 3H, **OAc**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 172.17 (**q-OAc**), 162.73 (**C-4**), 152.00 (**C-2**), 147.02 (**C-6**), 87.07 (**C-1'**), 86.74 (**C-4'**), 76.44 (**C-3'**), 68.72 (**C-5**), 62.81 (**C-5'**), 39.03 (**C-2'**), 20.85 (**OAc**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3520, 3185, 6042, 1711, 1660, 1607, 1453, 1300, 1288, 1242, 1202, 1189, 1098, 1063, 1023, 985, 956, 941, 894, 880, 837, 772, 612, 601, 554, 436, 415.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 418.972, gef.: 418.973 [M+Na]⁺.

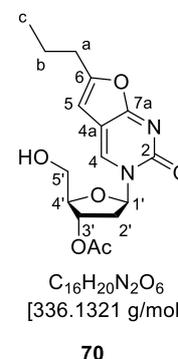
Synthese von 3-(3'-O-Acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro-[2,3-d]-pyrimidin-2-on (**70**)

In Stickstoffschutzgasatmosphäre wurde 1.00 g (2.52 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Iodo-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin (**71**) in 13 mL DMF gelöst und mit 291 mg (0.252 mmol, 0.10 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und 0.75 mL (515 mg, 7.56 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Pentyn versetzt. Als sich die entstandene Suspension aufgelöst hatte und eine klare Lösung vorlag, wurden 96.0 mg (0.504 mmol, 0.20 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 0.81 mL (619 mg, 4.79 mmol, 1.90 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylethylamin hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte die Zugabe von 96.0 mg (0.504 mmol, 0.20 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 11.6 mL (8.41 g, 83.1 mmol, 33 Äquiv.) Triethylamin. Danach wurde die Reaktionsmischung 24 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt worden war, erfolgte die Reinigung des Rohproduktes durch mehrere Säulenchromatographien an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 und EE/MeOH 40:1).

Ausbeute: 697 mg (2.07 mmol, 82%) eines beigen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v:v): 0.31.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, MeOH-d₄): δ 8.80 (s, 1H, **H-4**), 6.42 (s, 1H, **H-5**), 6.35 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 9.1, 7.4 Hz, 1H, **H-1'**), 5.33 (dt, ³ $J_{H,H}$ = 6.1, 2.0 Hz, 1H, **H-3'**), 4.28 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 5.8, 3.0 Hz, 1H, **H-4'**), 3.88 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 27.3, 12.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.2 Hz, 2H, **H-5'**), 2.79 – 2.66 (m, 3H, **H-a**, **H_a-2'**), 2.30 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 14.2 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 7.0, 5.1 Hz, 1H, **H_b-2'**), 2.12 (s, 3H, **OAc**), 1.83 – 1.70 (m, 2H, **H-b**), 1.03 (t, ³ $J_{H,H}$ = 7.4 Hz, 3H, **H-c**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, MeOH-d₄): δ 169.98 (**C-7a**), 163.02 (**C-6**), 150.44 (**C-2**), 140.24 (**C-4**), 110.1 (**C-5**), 102.07 (**C-6**), 84.87 (**C-1'**), 84.04 (**C-4'**), 74.70 (**C-3'**), 61.31 (**C-5'**), 54.90 (**C-2'**), 36.79 (**C-a**), 20.79 (**OAc**), 21.4 (**C-b**), 13.8 (**C-c**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3365, 3086, 2917, 2869, 2850, 1730, 1668, 1622, 1559, 1491, 1466, 1382, 1344, 1246, 1220, 1197, 1180, 1159, 1134, 1089, 1077, 1036, 1010, 993, 883, 850, 782, 696, 682, 596, 452.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 359.122, gef.: 359.123 [M+Na]⁺.

7.2.5 Synthese des BCNA-Monophosphats

Synthese von Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit (76)

Unter Stickstoffschutzgasatmosphäre wurden 2.64 g (13.5 mmol, 1.00 Äquiv.) Dichloro-N,N-diisopropylphosphoramidit in 41 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Lösung aus 5.43 g (27.0 mmol, 2.00 Äquiv.) 9-Fluorenylmethanol und 3.95 mL (2.87 g, 28.4 mmol, 2.10 Äquiv.) Triethylamin in 52 mL abs. THF bei 0 °C. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 20 Stunden gerührt, der dabei entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 200 mL Ethylacetat und 200 mL 0.5 M Phosphatpuffer versetzt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit je 200 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 6.86 g (13.2 mmol, 98%) eins gelben Öls.

- **DC:** R_F-Wert (PE/EE 1:1 v:v): 0.29.

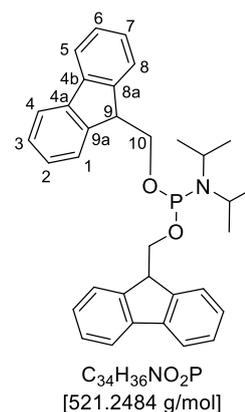
- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.81 – 7.68 (m, 4H, **H-1**, **H-8**), 7.69 – 7.61 (m, 4H, **H-4**, **H-5**), 7.44 – 7.32 (m, 4H, **H-3**, **H-6**), 7.32 – 7.23 (m, 4H, **H-2**, **H-7**), 4.18 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, **H-9**), 4.03 – 3.96 (m, 2H, **H_a-10**), 3.81 (dt, ³J_{H,H} = 9.9, 7.3 Hz, 2H, **H_b-10**), 3.72 – 3.60 (m, 2H, **-CH(CH₃)₂**), 1.13 (dd, ³J_{H,H} = 26.2, 6.8 Hz, 12H, **-CH(CH₃)₂**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 145.06, 144.79 (**C-8a**, **C-9a**), 141.50, 141.39 (**C-4a**, **C-4b**), 127.53, 127.49 (**C-2**, **C-7**), 126.96, 126.93 (**C-3**, **C-6**), 125.57, 125.33 (**C-4**, **C-5**), 119.95, 119.88 (**C-1**, **C-8**), 66.04 (d, ²J_{C,P} = 17.1 Hz, **C-10**), 49.36 (**C-9**), 43.24, 43.12 (**-CH(CH₃)₂**), 24.78, 24.71 (**-CH(CH₃)₂**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 146.20.

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 2964, 2925, 2865, 1716, 1683, 1611, 1477, 1448, 1395, 1363, 1236, 1183, 1154, 1127, 1102, 1065, 1006, 973, 938, 917, 884, 859, 780, 756, 735, 668, 642, 621, 589, 549, 517, 425.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 539.282, gef.: 538.251 [M+NH₄]⁺.



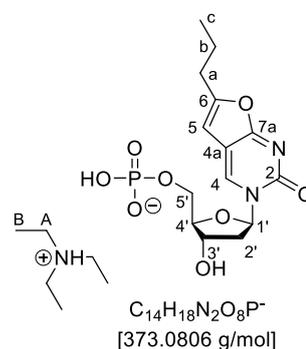
76

Synthese von 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat als Triethylammoniumsalz (**66**)

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt. 1.56 g (4.64 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-(3'-O-Acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on (**70**) wurden in 70 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit einer Lösung aus 3.63 g (6.96 mmol, 1.50 Äquiv.) Bis-O-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (**76**) in 10 mL CH₂Cl₂ versetzt. Zu der Lösung wurden 22.3 mL (822 mg, 5.56 mmol, 1.20 Äquiv.) DCI (c = 0.25 M in Acetonitril) gegeben. Die Oxidation erfolgte mit 1.26 mL (627 mg, 6.96 mmol, 1.50 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (c = 5.50 M in *n*-Decan). Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgte die Reinigung durch automatisierte Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH, 0-5% Vol., 0-30 min, Flussrate 20 mL/min). Das erhaltene geschützte Monophosphat **77** wurde in 10 mL Methanol und Triethylamin (1:1 v:v) gelöst. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden 5 mL H₂O zugegeben.

Ausbeute: 1.04 (2.78 mmol, 60%) eines farblosen Öls.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, MeOH-*d*₄): 8.95 (s, 1H, **H-4**), 6.52 (s, 1H, **H-5**), 6.35 (t, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **H-1'**), 4.50 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.9, 4.3 Hz, 1H, **H-3'**), 4.21 (ddd, ²*J*_{H,H} = 11.4 Hz, ³*J*_{H,P} = 4.4 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.6 Hz, 1H, **H_a-5'**), 4.15 – 4.11 (m, 2H, **H-4'**, **H_b-5'**), 3.20 (q, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 6H, **H-A**), 2.67 (t, ³*J*_{H,H} = 7.7 Hz, 2H, **H-a**), 2.55 (ddd, ²*J*_{H,H} = 13.6 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.2, 4.7 Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.26 (dt, ²*J*_{H,H} = 13.6 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **H_b-2'**), 1.74 (h, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **H-b**), 1.31 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 9H, **H-B**), 1.01 (t, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, **H-c**).



66

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (126 MHz, MeOH-*d*₄): 173.09 (**C-7a**), 160.71 (**C-6**), 156.91 (**C-2**), 138.92 (**C-4**), 109.83 (**C-4a**), 101.52 (**C-5**), 89.52 (**C-1'**), 88.36 (**C-4'**), 71.33 (**C-3'**), δ 65.09 (d, ²*J*_{C,P} = 5.1 Hz, **C-5'**), 47.80 (**C-A**), 42.65 (**C-2'**), 30.94 (**C-a**), 21.37 (**C-b**), 14.45 (**C-c**), 9.19 (**C-B**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, MeOH-*d*₄): 1.19.

- IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3364, 2708, 2508, 2223, 1666, 1619, 1576, 1476, 1439, 1392, 1341, 1169, 1058, 919, 782, 637, 523, 463.

- HRMS: (ESI⁺, m/z): ber.: 373.081, gef.: 373.074 [M]⁺.

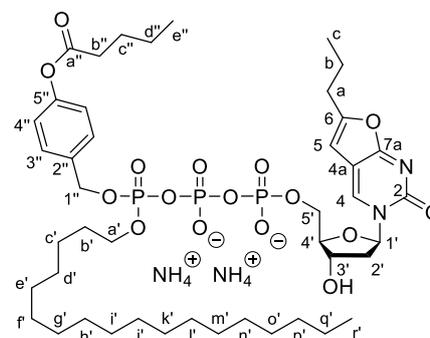
7.2.6 Synthese der BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53az**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91az** erfolgte nach **AAV 7**. 500 mg (0.954 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65az**) wurden in 15 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 255 mg (1.91 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid (NCS) und 5.96 mL (2.38 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 514 mg (0.831 mmol, 87%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53az** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 8 mL Acetonitril gelöst und mit 0.59 mL (872 mg, 4.15 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.93 mL (672 mg, 6.64 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.58 mL (420 mg, 4.15 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.20 mL (205 mg, 2.49 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 155 mg (0.415 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 8 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 171 mg (0.175 mmol, 42%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.91 (s, 1H, **H-4**), 7.37 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.04 (d, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.24 – 5.16 (m, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, $^3J_{H,H} = 10.4, 5.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.40 – 4.27 (m, 2H, **H-5'**), 4.16 – 4.04 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 14.0, 6.9$ Hz, 2H, **H-a**), 2.58 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.53 (dt, $^3J_{H,H} = 6.3, 2.9$ Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.25 (dt, $^2J_{H,H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H_b-2'**), 1.74 – 1.68 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.59 (dt, $^2J_{H,H} = 11.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.50 – 1.41 (m, 4H, **H-c'**, **H-d''**), 1.35 – 1.21 (m, 28H, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 1.02 – 0.95 (m, 6H, **H-c**, **H-e''**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, **H-r'**).



$\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[974.3871 g/mol]

53az

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 174.02 (**C-a''**), 173.20 (**C-7a**), 160.51 (**C-6**), 156.88 (**C-2**), 151.44 (**C-5''**), 140.40 (**C-4**), 135.0 (**C-2''**), 130.34 (**C-4''**), 122.59 (**C-3''**), 109.95 (**C-4a**), 101.87 (**C-5**), 89.47 (**C-1'**), 88.07 (d, $^3J_{C,P} = 8.9$ Hz, **C-4'**), 70.89 (**C-3'**), 70.24 (d, $^2J_{C,P} = 6.1$ Hz, **C-1''**), 69.83 (d, $^2J_{C,P} = 6.1$ Hz, **C-a'**), 66.0 (d, $^2J_{C,P} = 7.7$ Hz, **C-5'**), 42.29 (**C-2'**), 34.76 (**C-b''**), 33.08 (**C-b'**), 31.26, 31.21, 30.96, 30.95, 30.80, 30.76, 30.73, 30.67, 30.48, 30.30, 28.08, 26.55, 23.67, 23.24, 21.40 (**C-a**, **C-b**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**), 14.40, 14.07, 13.92 (**C-c**, **C-r'**, **C-e''**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.71 (d, $^2J_{P,P} = 19.2$ Hz, **P- α**), -13.02 (d, $^2J_{P,P} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.78 (t, $^2J_{P,P} = 16.3$ Hz, **P- β**).

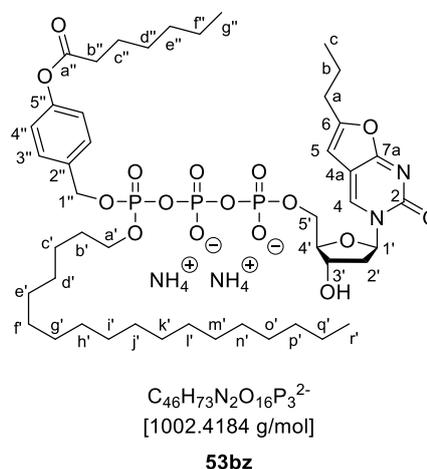
- **HRMS:** (MALDI⁺, m/z): ber.: 976.402, gef.: 975.403 [M].

Synthese von (4-Heptanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53bz**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91bz** erfolgte nach **AAV 7**. 500 mg (0.905 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Heptanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65bz**) wurden in 14 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 242 mg (1.81 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 5.7 mL (2.26 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 459 mg (0.708 mmol, 78%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53bz** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 7 mL Acetonitril gelöst und mit 0.50 mL (744 mg, 3.54 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.79 mL (573 mg, 5.67 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.49 mL (358 mg, 3.54 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.17 mL (174 mg, 2.13 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 132 mg (0.354 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 8 mL Acetonitril zugegeben und 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 85.7 mg (85.5 μ mol, 24%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.90 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (d, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (d, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, 2H; **H-3''**), 6.59 (d, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, ³*J*_{H,H} = 5.8 Hz, 1H, **H-1'**), 5.20 (d, ²*J*_{H,P} = 8.1 Hz, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, ³*J*_{H,H} = 10.3, 5.1 Hz, 1H, **H-3'**), 4.34 (dd, ³*J*_{H,P} = 24.6 Hz, ²*J*_{H,H} = 10.5 Hz, 2H, **H-5'**), 4.10 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, ³*J*_{H,H} = 13.6, 6.6 Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **H-b''**), 2.55 – 2.50 (m, 1H, **H-a-2'**), 2.30 – 2.21 (m, 1H, **H-b-2'**), 1.76 – 1.67 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.59 (dt, ²*J*_{H,H} = 14.3 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, **H-b'**), 1.43 (dt, ³*J*_{H,H} = 18.5, 5.6 Hz, 2H, **H-d''**), 1.34 – 1.25 (m, 34H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**, **H-e''**, **H-f''**), 0.99 (td, ³*J*_{H,H} = 7.4, 2.7 Hz, 3H, **H-c**), 0.93 (t, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-g''**), 0.90 (t, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-r'**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 173.99 (**C-a''**), 173.00 (**C-7a**), 159.04 (**C-6**), 156.85 (**C-2**), 152.29 (**C-5''**), 138.94 (**C-4**), 135.28 (**C-2''**), 130.35 (**C-4''**), 122.83 (**C-3''**), 109.89 (**C-4a**), 101.87 (**C-5**), 89.43 (**C-1'**), 87.05 (d, ³*J*_{C,P} = 27.4 Hz, **C-4'**), 71.63 (**C-3'**), 70.93 (d, ²*J*_{C,P} = 2.6 Hz, **C-1''**), 70.27 (**C-a'**), 61.54 (**C-5'**), 42.31 (**C-2'**), 35.05 (**C-b''**), 33.12 (**C-b'**), 32.67 (**C-a**), 31.25, 30.95, 30.82, 30.81, 30.77, 30.73, 30.67, 30.48, 30.29, 30.26, 29.87, 26.54, 25.94, 23.72, 23.59, 21.39, 20.82, 18.05 (**C-b**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**), 14.44, 14.39, 13.93 (**C-c**, **C-r'**, **C-g''**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.67 (d, ²*J*_{P,P} = 19.5 Hz, **P- α**), -12.89 (d, ²*J*_{P,P} = 16.6 Hz, **P- γ**), -23.66 (t, ²*J*_{P,P} = 18.6 Hz, **P- β**).

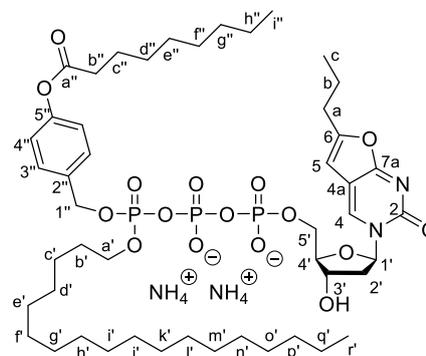
- **HRMS:** (MALDI, *m/z*): ber.: 1004.433, gef.: 1003.458 [M].

Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53cz**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91cz** erfolgte nach **AAV 7**. 300 mg (0.517 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65cz**) wurden in 8 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 138 mg (1.03 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.23 mL (1.29 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Pyrophosphat wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 335 mg (0.496 mmol, 96%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53cz** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 5 mL Acetonitril gelöst und mit 0.35 mL (521 mg, 2.48 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.55 mL (401 mg, 3.97 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.35 mL (251 mg, 2.48 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.12 mL (122 mg, 1.49 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 93 mg (0.248 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 5 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 105 mg (0.101 mmol, 41%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.87 (s, 1H, **H-4**), 7.37 (d, $^3J_{H,H} = 10.8$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.02 (d, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.54 (s, 1H, **H-5**), 6.30 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.24 – 5.08 (m, 2H, **H-1''**), 4.58 – 4.48 (m, 2H, **H-3'**), 4.33 (dd, $^3J_{H,P} = 29.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 9.5$ Hz, 2H, **H-5'**), 4.11 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 1H, **H-b''**) 2.55 – 2.48 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.23 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.73 (dt, $^3J_{H,H} = 15.0$, 7.4 Hz, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.68 (dd, $^2J_{H,H} = 14.9$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-b'**), 1.49 – 1.29 (m, 40H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**), 0.96 (d, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 3H, **H-c**), 0.91 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 6H, **H-r'**, **H-i''**).



$\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[1030.4497 g/mol]

53cz

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.72 (**C-a''**), 173.03 (**C-7a**), 160.64 (**C-6**), 156.79 (**C-2**), 152.34 (**C-5''**), 138.88 (**C-4**), 134.92 (**C-2''**), 130.44 (**C-4''**), 122.81 (**C-3''**), 109.91 (**C-4a**), 101.80 (**C-5**), 89.47 (**C-1'**), 88.02 (**C-4'**), 70.91 (**C-3'**), 70.38 (d, $^2J_{C,P} = 5.7$ Hz, **C-1''**), 69.5 (**C-a'**), 66.07 (d, $^2J_{C,P} = 3.2$ Hz, **C-5'**), 42.30 (**C-2'**), 35.03 (**C-b''**), 33.00 (**C-a**), 30.92, 30.82, 30.81, 30.37, 30.31, 30.19, 25.97, 23.72, 21.36 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**), 14.44, 13.91 (**C-c**, **C-r'**, **C-i''**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.42 (d, $^2J_{P,P} = 29.1$ Hz, **P- α**), -13.01 (d, $^2J_{P,P} = 11.8$ Hz, **P- γ**), -22.63 – -23.96 (m, **P- β**).

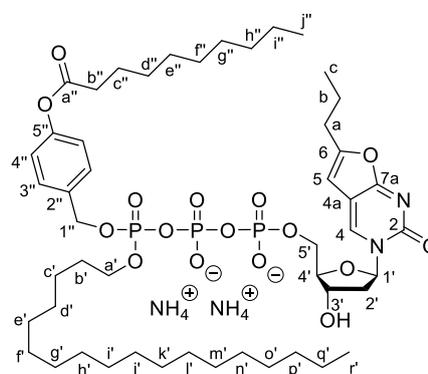
- **HRMS:** (MALDI, m/z): ber.: 1031.457, gef.: 1031.332 [M].

Synthese von (4-Decanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53dz**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91dz** erfolgte nach **AAV 7**. 500 mg (0.841 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Decanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65dz**) wurden in 13 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 225 mg (1.68 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 5.30 mL (2.10 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 178 mg (0.258 mmol, 87%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53dz** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 2 mL Acetonitril gelöst und mit 0.18 mL (271 mg, 1.29 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.29 mL (209 mg, 2.06 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.18 mL (131 mg, 1.29 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.06 mL (64 mg, 0.774 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 48 mg (0.129 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 2 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 29.3 mg (28.1 μ mol, 22%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.91 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.20 (d, $^3J_{H,P} = 8.3$ Hz, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, $^3J_{H,H} = 10.4$, 5.1 Hz, 1H, **H-3'**), 4.34 (dd, $^3J_{H,P} = 26.9$ Hz, $^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, 2H, **H-5'**), 4.14 – 4.06 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 13.9$, 6.8 Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.53 (dd, $^2J_{H,H} = 9.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.6$ Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.25 (dt, $^2J_{H,H} = 16.7$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, 1H, **H_b-2'**), 1.77 – 1.67 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.60 (dd, $^2J_{H,H} = 22.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 9.0$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.42 (dd, $^3J_{H,H} = 13.4$, 9.3 Hz, 2H, **H-d''**), 1.39 – 1.24 (m, 40H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (td, $^3J_{H,H} = 7.0$, 4.5 Hz, 6H, **H-r'**, **H-j''**).



$\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[1044.4653 g/mol]

53dz

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.76 (**C-a''**), 172.96 (**C-7a**), 160.64 (**C-6**), 156.74 (**C-2**), 152.26 (**C-5''**), 138.97 (**C-4**), 135.90 (**C-2''**), 130.36 (**C-4''**), 122.80 (**C-3''**), 109.95 (**C-4a**), 101.71 (**C-5**), 90.32 (**C-1'**), 89.50 (**C-4'**), 70.80 (**C-3'**), 68.81 (**C-1''**), 65.99 (**C-a'**), 59.82 (**C-5'**), 42.30 (**C-2'**), 34.98 (**C-b''**), 33.06 (**C-a**), 30.83, 30.81, 30.77, 30.74, 30.68, 30.60, 30.49, 30.44, 30.43, 30.29, 30.19, 26.57, 26.02, 23.74, 22.49, 21.33 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**), 14.32, 13.98 (**C-c**, **C-r'**, **C-j''**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.70 (d, $^2J_{P,P} = 19.5$ Hz, **P- α**), -12.95 (d, $^2J_{P,P} = 16.9$ Hz, **P- γ**), -23.74 (t, $^2J_{P,P} = 18.0$ Hz, **P- β**).

- **HRMS:** (MALDI⁺, m/z): ber.: 1045.473, gef.: 1045.316 [M].

Synthese von (4-Undecanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53ez**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91ez** erfolgte nach **AAV 7**. 500 mg (0.822 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Undecanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65ez**) wurden in 13 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 220 mg (1.64 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 5.14 mL (2.05 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 506 mg (0.719 mmol, 87%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53ez** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 7 mL Acetonitril gelöst und mit 0.52 mL (755 mg, 3.59 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.80 mL (582 mg, 5.75 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.50 mL (364 mg, 3.95 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.17 mL (177 mg, 2.16 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 134 mg (0.359 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 7 mL Acetonitril zugegeben und 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

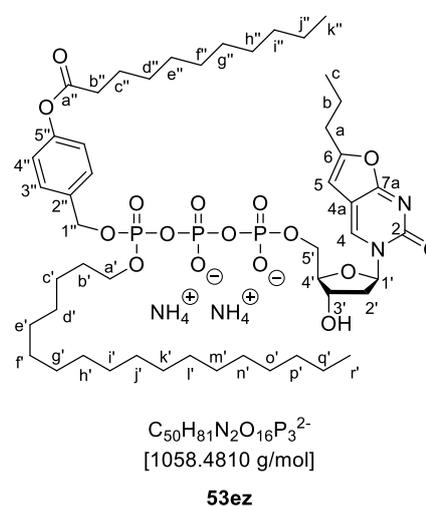
Ausbeute: 78 mg (73.7 μ mol, 21%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.91 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.2$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.7$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.20 (dd, $^2J_{H,P} = 8.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.0$ Hz, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, $^3J_{H,H} = 10.4, 5.1$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.41 – 4.29 (m, 2H, **H-5'**), 4.09 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 14.0, 6.9$ Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.55 – 2.50 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.29 – 2.20 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.78 – 1.65 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.63 – 1.52 (m, 2H, **H-b'**), 1.48 – 1.23 (m, 44H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**), 0.93 – 0.86 (m, 6H, **H-r'**, **H-k''**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.05 (**C-a''**), 172.25 (**C-7a**), 160.60 (**C-6**), 156.82 (**C-2**), 152.15 (**C-5''**), 139.05 (**C-4**), 135.19 (**C-2''**), 130.34 (**C-4''**), 122.74 (**C-3''**), 109.99 (**C-4a**), 101.87 (**C-5**), 89.43 (**C-1'**), 88.14 (**C-4'**), 70.85 (**C-3'**), 70.18 (d, $^2J_{C,P} = 2.2$ Hz, **C-1''**), 69.80 (d, $^2J_{C,P} = 6.0$ Hz, **C-a'**), 65.35 (**C-5'**), 42.25 (**C-2'**), 35.01 (**C-b''**), 33.12 (**C-a**), 30.96, 30.96, 30.83, 30.82, 30.78, 30.74, 30.71, 30.68, 30.64, 30.49, 30.47, 30.43, 30.29, 30.18, 26.54, 25.95, 23.74, 21.39 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**), 14.49, 13.89 (**C-c**, **C-r'**, **C-k''**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.71 (d, $^2J_{P,P} = 19.8$ Hz, **P- α**), -12.97 (d, $^2J_{P,P} = 16.9$ Hz, **P- γ**), -23.76 (t, $^2J_{P,P} = 18.0$ Hz, **P- β**).

- **HRMS:** (MALDI⁺, m/z): ber.: 1060.496, gef.: 1059.363 [M].

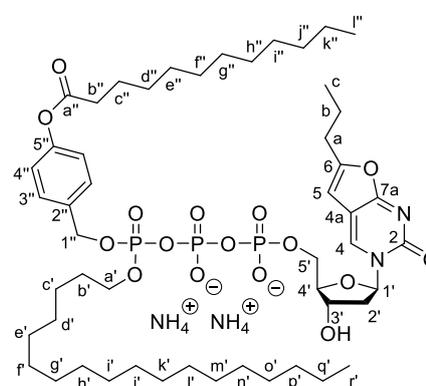


Synthese von (4-Dodecanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53fz**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91fz** erfolgte nach **AAV 7**. 500 mg (0.803 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Dodecanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65fz**) wurden in 13 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 215 mg (1.61 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 5.02 mL (2.01 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 289 mg (0.403 mmol, 50%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53fz** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.29 mL (423 mg, 2.02 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.45 mL (326 mg, 3.23 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.28 mL (204 mg, 2.02 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.10 mL (99.3 mg, 1.21 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 75.2 mg (0.202 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 4 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 54.1 mg (50.4 μ mol, 25%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.92 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (dd, $^3J_{H,H} = 8.7, 2.4$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.8$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.24 – 5.17 (m, 2H, **H-1''**), 4.56 (dd, $^3J_{H,H} = 10.3, 5.3$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.40 – 4.28 (m, 2H, **H-5'**), 4.14 – 4.05 (m, 3H, **H-4', H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 13.9, 6.8$ Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.55 – 2.50 (m, 1H, **H-a-2'**), 2.31 – 2.21 (m, 1H, **H-b-2'**), 1.76 – 1.66 (m, 4H, **H-b, H-c''**), 1.58 (dt, $^2J_{H,H} = 12.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.47 – 1.25 (m, 46H, **H-c', H-d', H-e', H-f', H-g', H-h', H-i', H-j', H-k', H-l', H-m', H-n', H-o', H-p', H-q', H-d'', H-e'', H-f'', H-g'', H-h'', H-i'', H-j'', H-k''**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 6H, **H-r', H-l''**).



$\text{C}_{51}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[1072.4966 g/mol]

53fz

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.83 (**C-a''**), 173.16 (**C-7a**), 159.89 (**C-6**), 156.30 (**C-2**), 152.34 (**C-5''**), 139.20 (**C-4**), 133.86 (**C-2''**), 130.38 (**C-4''**), 122.83 (**C-3''**), 112.60 (**C-4a**), 102.10 (**C-5**), 89.47 (**C-1'**), 87.59 (**C-4'**), 70.84 (**C-3'**), 69.82 (d, $^2J_{C,P} = 2.7$ Hz, **C-1''**), 69.25 (**C-a'**), 65.76 (**C-5'**), 42.28 (**C-2'**), 35.04 (**C-b''**), 33.09 (**C-a**), 30.96, 30.95, 30.83, 30.82, 30.78, 30.75, 30.72, 30.68, 30.63, 30.49, 30.43, 30.40, 30.29, 30.18, 29.19, 26.55, 25.97, 23.75, 21.39 (**C-b, C-b', C-c', C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j', C-k', C-l', C-m', C-n', C-o', C-p', C-q', C-c'', C-d'', C-e'', C-f'', C-g'', C-h'', C-i'', C-j'', C-k''**), 14.45, 13.93 (**C-c, C-r', C-l''**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.72 (d, $^2J_{P,P} = 19.7$ Hz, **P- α**), -12.98 (d, $^2J_{P,P} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.79 (t, $^2J_{P,P} = 18.4$ Hz, **P- β**).

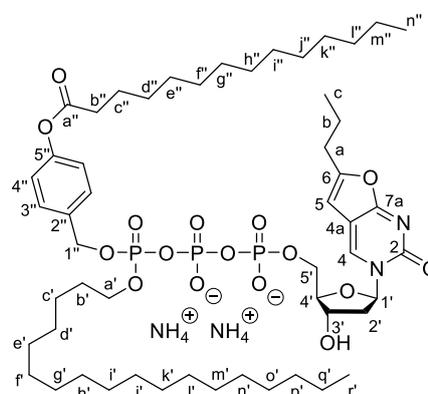
- **HRMS:** (MALDI $^+$, m/z): ber.: 1073.504, gef.: 1073.327 [M].

Synthese von (4-Tetradecanoyloxybenzyl)octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (53gz)

Die Synthese des Pyrophosphats **91gz** erfolgte nach **AAV 7**. 500 mg (0.769 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Tetradecanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65gz**) wurden in 13 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 205 mg (1.54 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 4.80 mL (1.92 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 329 mg (0.441 mmol, 57%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53gz** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.31 mL (463 mg, 2.21 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.49 mL (357 mg, 3.53 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.30 mL (223 mg, 2.21 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.11 mL (109 mg, 1.32 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 82.3 mg (0.221 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 4 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 39.5mg (35.9 μ mol, 16%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.90 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.1$ Hz, 2H, **H-4'**), 7.06 (dd, $^3J_{H,H} = 8.5, 2.6$ Hz, 2H, **H-3'**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.20 (d, $^2J_{H,P} = 8.2$ Hz, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, $^3J_{H,H} = 10.2, 5.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.34 (dd, $^3J_{H,P} = 24.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 11.3$ Hz, 2H, **H-5'**), 4.17 – 4.04 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 13.7, 7.0$ Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.55 – 2.50 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.24 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.77 – 1.66 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.62 – 1.52 (m, 2H, **H-b'**), 1.47 – 1.24 (m, 50H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**, **H-k''**, **H-l''**, **H-m''**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 6H, **H-r'**, **H-n''**).



$C_{53}H_{87}N_2O_{16}P_3^{2-}$
[1100.5279 g/mol]

53gz

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 174.03 (**C-a''**), 172.30 (**C-7a**), 160.40 (**C-6**), 156.63 (**C-2**), 152.27 (**C-5''**), 139.24 (**C-4**), 133.13 (**C-2'**), 130.57 (**C-4''**), 122.44 (**C-3''**), 110.25 (**C-4a**), 101.81 (**C-5**), 89.91 (**C-1'**), 87.89 (**C-4'**), 70.90 (**C-3'**), 70.26 (d, $^2J_{C,P} = 2.7$ Hz, **C-1''**), 69.83 (d, $^2J_{C,P} = 4.6$ Hz, **C-a'**), 65.96 (**C-5'**), 42.30 (**C-2'**), 35.13 (**C-b''**), 33.09 (**C-a**), 30.84, 30.83, 30.81, 30.78, 30.74, 30.73, 30.68, 30.62, 30.49, 30.42, 30.30, 30.18, 26.54, 25.98, 23.75, 21.40 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**, **C-k''**, **C-l''**, **C-m''**), 14.45, 13.93 (**C-c**, **C-r'**, **C-n''**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.67 (d, $^2J_{P,P} = 22.8$ Hz, **P- α**), -12.93 (d, $^2J_{P,P} = 16.1$ Hz, **P- γ**), -23.72 (d, $^2J_{P,P} = 27.7$ Hz, **P- β**).

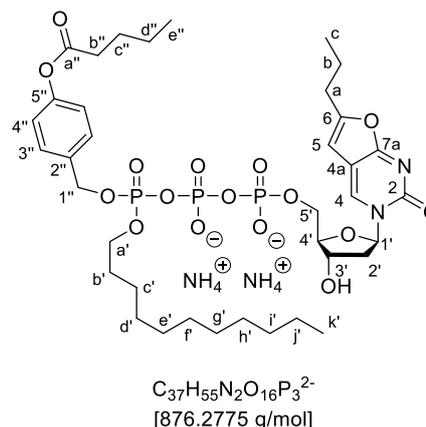
- **HRMS:** (MALDI⁺, m/z): ber.: 1101.535, gef.: 1101.348 [M].

Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)undecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53ay**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91ay** erfolgte nach **AAV 7**. 300 mg (0.605 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)undecan-*H*-phosphonat (**65ay**) wurden in 8 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 162 mg (1.21 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.18 mL (1.51 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 236 mg (0.342 mmol, 57%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53ay** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.32 mL (476 mg, 2.26 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.51 mL (367 mg, 3.62 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.32 mL (229 mg, 2.26 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.11 mL (112 mg, 1.36 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 85 mg (0.227 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 4 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 59.1 mg (67.4 μ mol, 30%) eines fluffigen, weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4) δ 8.91 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.2$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.8$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.58 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.25 – 5.17 (m, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, $^3J_{H,H} = 10.3, 5.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.34 (dd, $^3J_{H,P} = 24.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 11.7$ Hz, 2H, **H-5'**), 4.15 – 4.05 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 14.0, 6.9$ Hz, 2H, **H-a**), 2.58 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.56 – 2.50 (m, 1H, **H-a-2'**), 2.24 (m, 1H, **H-b-2'**), 1.76 – 1.65 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.59 (td, $J_{H,H} = 13.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.50 – 1.40 (m, 2H, **H-d''**), 1.37 – 1.19 (m, 16H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 1.02 – 0.96 (m, 6H, **H-c**, **H-e''**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, 3H, **H-k'**).



$\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[876.2775 g/mol]

53ay

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.18 (**C-a''**), 171.70 (**C-7a**), 159.12 (**C-6**), 155.44 (**C-2**), 150.87 (**C-5''**), 137.57 (**C-4**), 133.76 (**C-2''**), 128.93 (**C-4''**), 121.39 (**C-3''**), 108.63 (**C-4a**), 100.40 (**C-5**), 88.07 (**C-1'**), 86.68 (d, $^3J_{C,P} = 8.9$ Hz, **C-4'**), 69.49 (d, $^4J_{C,P} = 2.6$ Hz, **C-3'**), 68.81 (d, $^2J_{C,P} = 5.8$ Hz, **C-1''**), 68.41 (d, $^2J_{C,P} = 6.0$ Hz **C-a'**), 64.65 (**C-5'**), 40.88 (**C-2'**), 33.35 (**C-b''**), 31.68 (**C-a**), 29.86, 29.81, 29.55, 29.35, 29.33, 29.26, 29.08, 28.89, 26.66, 25.14, 22.34, 21.84, 19.98 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-c''**, **C-d''**), 13.04, 12.67, 12.51 (**C-c**, **C-k'**, **C-e''**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.72 (d, $^2J_{P,P} = 24.1$ Hz, **P- α**), -13.02 (d, $^2J_{P,P} = 16.2$ Hz, **P- γ**), -23.75 (d, $^2J_{P,P} = 33.1$ Hz, **P- β**).

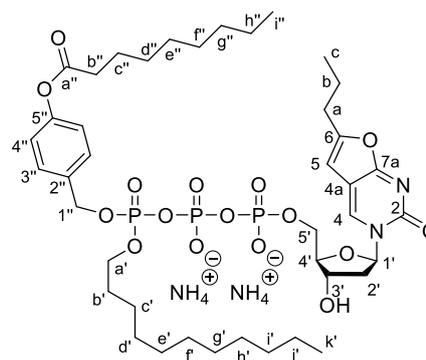
- **HRMS**: (MALDI, m/z): ber.: 877.285, gef.: 877.103 [M].

Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)undecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (53by)

Die Synthese des Pyrophosphats **91by** erfolgte nach **AAV 7**. 321 mg (0.666 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)undecan-*H*-phosphonat (**65by**) wurden in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 178 mg (1.33 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 4.20 mL (1.67 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 165 mg (0.286 mmol, 87%)). Die Synthese der TriPPPro-Verbindung **53by** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 3 mL Acetonitril gelöst und mit 0.20 mL (300 mg, 1.43 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.32 mL (232 mg, 2.29 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.20 mL (148 mg, 1.43 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.07 mL (70.4 mg, 0.858 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 53.4 mg (0.143 mmol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 3 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 30.9 mg (33.1 μ mol, 21%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.91 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.3$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (dd, $^3J_{H,H} = 8.5, 2.8$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.25 – 5.15 (m, 2H, **H-1''**), 4.55 (dd, $^3J_{H,H} = 10.3, 5.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.39 – 4.28 (m, 2H, **H-5'**), 4.16 – 4.03 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 13.9, 6.9$ Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.55 – 2.50 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.25 (dt, $^2J_{H,H} = 13.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H_b-2'**), 1.77 – 1.67 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.65 – 1.52 (m, 2H, **H-b'**), 1.35 (m, 26H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (dd, $^3J_{H,H} = 15.6, 7.0$ Hz, 6H, **H-k'**, **H-i''**).



$\text{C}_{41}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[932.3401 g/mol]

53by

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.25 (**C-a''**), 171.64 (**C-7a**), 159.11 (**C-6**), 155.47 (**C-2**), 150.92 (**C-5''**), 137.64 (**C-4**), 135.07 (**C-2''**), 128.95 (**C-4''**), 121.41 (**C-3''**), 110.02 (**C-4a**), 100.50 (**C-5**), 88.04 (**C-1'**), 86.68 (**C-4'**), 69.48 (d, $^2J_{C,P} = 2.7$ Hz, **C-3'**), 68.81 (**C-1''**), 68.42 (**C-a'**), 64.62 (**C-5'**), 46.78 (**C-2'**), 33.62 (**C-b''**), 31.69 (**C-a**), 31.59, 29.54, 29.36, 29.33, 29.27, 29.09, 28.98, 28.89, 28.77, 25.14, 24.53, 22.31, 19.99 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**), 13.02, 12.99, 12.51 (**C-c**, **C-k'**, **C-i''**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.68 (d, $^2J_{P,P} = 19.6$ Hz, **P- α**), -12.97 (d, $^2J_{P,P} = 16.8$ Hz, **P- γ**), -23.73 (t, $^2J_{P,P} = 18.1$ Hz, **P- β**).

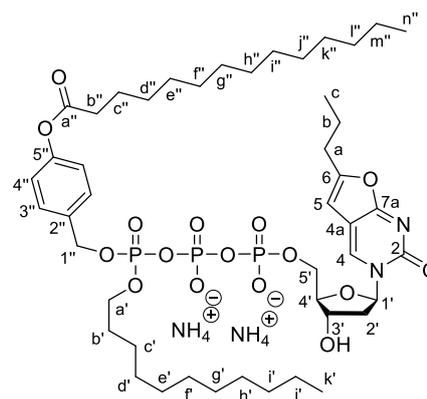
- **HRMS**: (MALDI, m/z): ber.: 933.347, gef.: 933.164 [M].

Synthese von (4-Tetradecanoyloxybenzyl)undecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**53gy**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91gy** erfolgte nach **AAV 7**. 220 mg (0.406 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Tetradecanoyloxybenzyl)undecan-*H*-phosphonat (**65gy**) wurden in 7 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 108 mg (0.811 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 2.54 mL (1.01 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 114 mg (0.175 mmol, 43%)). Die Synthese der TriPPP-Verbindung **53gy** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 2 mL Acetonitril gelöst und mit 0.13 mL (184 mg, 0.877 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.20 mL (142 mg, 1.40 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.12 mL (88.7 mg, 0.876 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.04 mL (43.2 mg, 0.526 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 32.7 mg (87.7 μ mol, 0.50 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 2 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 57.4 mg (57.3 μ mol, 65%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.92 (s, 1H, **H-4**), 7.46 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6, 2.5$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.06 (dd, $^3J_{H,H} = 8.5, 3.0$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.59 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1H, **H-5**), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.25 – 5.15 (m, 2H, **H-1''**), 4.56 (dd, $^3J_{H,H} = 10.4, 5.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.40 – 4.29 (m, 2H, **H-5'**), 4.09 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.62 (dd, $^3J_{H,H} = 14.0, 6.9$ Hz, 2H, **H-a**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.55 – 2.50 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.30 – 2.20 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.77 – 1.67 (m, 4H, **H-b**, **H-c''**), 1.62 – 1.54 (m, 2H, **H-b'**), 1.48 – 1.26 (m, 36H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**, **H-k''**, **H-l''**, **H-m''**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 8.8$ Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 6H, **H-k'**, **H-n''**).



$\text{C}_{46}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$
[1002.4184 g/mol]

53gy

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.74 (**C-a''**), 172.26 (**C-7a**), 159.88 (**C-6**), 156.88 (**C-2**), 151.90 (**C-5''**), 139.01 (**C-4**), 134.97 (**C-2''**), 130.36 (**C-4''**), 122.79 (**C-3''**), 109.44 (**C-4a**), 101.91 (**C-5**), 89.42 (**C-1'**), 87.04 (**C-4'**), 70.20 (**C-3'**), 69.06 (**C-1''**), 68.85 (**C-a'**), 65.01 (**C-5'**), 47.70 (**C-2'**), 35.07 (**C-b''**), 33.04 (**C-a**), 31.22, 30.95, 30.79, 30.77, 30.76, 30.71, 30.68, 30.60, 30.51, 30.48, 30.40, 30.31, 30.16, 26.52, 26.00, 23.76, 21.39 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**, **C-k''**, **C-l''**, **C-m''**), 14.39, 13.92 (**C-c**, **C-k'**, **C-n''**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.71 (d, $^2J_{P,P} = 20.4$ Hz, **P- α**), -13.00 (d, $^2J_{P,P} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.79 (t, $^2J_{P,P} = 18.2$ Hz, **P- β**).

- **HRMS**: (MALDI $^+$, m/z): ber.: 1004.433, gef.: 1003.458 [M] $^-$.

7.2.7 Synthese der γ -alkylierten BCNA-TriPPPro-Verbindungen

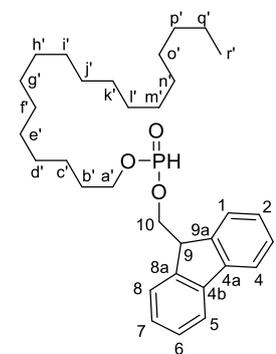
Synthese von (9*H*-Fluoren-9-yl)methyloctadecyl-*H*-phosphonat (**103z**)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.69 mL (563 mg, 2.40 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 25 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 500 mg (1.85 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**83z**) und 653 mg (3.33 mmol, 1.80 Äquiv.) (9*H*-Fluoren-9-yl)methanol (**74**) versetzt.

Ausbeute: 787 mg (1.54 mmol, 83%) eines farblosen Öls.

- **DC:** R_f -Wert (CH₂Cl₂ 100%): 0.34.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 7.78 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 2H, **H-1**, **H-8**), 7.62 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, **H-4**, **H-5**), 7.41 (dd, $^3J_{H,H} = 8.8$, 4.3 Hz, 2H, **H-3**, **H-6**), 7.36 – 7.31 (m, 2H, **H-2**, **H-7**), 4.27 (ddt, $^3J_{H,H} = 15.6$, 13.0, 6.3 Hz, 2H, **H-10**), 4.17 – 4.03 (m, 1H, **H-9**), 4.09 – 4.03 (m, 2H, **H-a'**), 1.73 – 1.64 (m, 2H, **H-b'**), 1.42 – 1.25 (m, 30H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.89 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 3H, **H-r'**).



C₃₂H₄₉O₃P
[512.3419 g/mol]

103z

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl₃): 143.01, 142.93 (**C-8a**, **C-9a**), 141.57, 141.53 (**C-4a**, **C-4b**), 128.17, 128.13 (**C-3**, **C-6**), 127.75, 127.38 (**C-2**, **C-7**), 127.32, 127.24 (**C-1**, **C-8**), 125.18, 124.84 (**C-4**, **C-5**), 67.42 (dd, $^2J_{C,P} = 20.3$, 6.1 Hz, **C-a'**), 65.32 (**C-9**), 48.17 (dd, $^2J_{C,P} = 22.1$, 6.8 Hz, **C-10**), 30.45, 29.72, 29.69, 29.67, 29.62, 29.60, 29.45, 29.24, 29.20, 25.62, 25.54, 22.81 (**C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.24 (**C-r'**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 9.04.

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3332, 2922, 2852, 1707, 1605, 1594, 1499, 1471, 1450, 1368, 1222, 1166, 1152, 1069, 1024, 972, 812, 752, 741, 691, 508.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 535.332, gef.: 535.330 [M+Na]⁺.

Synthese von γ -Octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**54z**)

Die Synthese des Pyrophosphats **104z** erfolgte nach **AAV 7**. 250 mg (0.488 mmol, 1.00 Äquiv.) (9*H*-Fluoren-9-yl)methyloctadecyl-*H*-phosphonat (**103z**) wurden in 8 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 130 mg (0.976 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.05 mL (1.22 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 250 mg (0.412 mmol, 84%)). Die Synthese der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54z** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.29 mL (433 mg, 2.06 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.34 mL (250 mg, 2.47 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.34 mL (250 mg, 2.47 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.10 mL (101 mg, 1.24 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 108 mg (0.288 mmol, 0.70 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 4 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei

Raumtemperatur gerührt. Es wurden 2 mL abs. THF zugegeben und wiederum drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es kam zu keiner Reaktion.

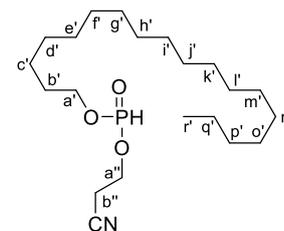
Synthese von 2-Cyanoethyloctadecyl-*H*-phosphonat (**106z**)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.46 mL (563 mg, 2.40 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 27 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 500 mg (1.85 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol (**X**) und 0.22 mL (237 mg, 3.33 mmol, 1.80 Äquiv.) 3-Hydroxypropionitril (**105**) versetzt.

Ausbeute: 567 mg (1.47 mmol, 79%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 100:0 v:v): 0.06.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.34 – 4.25 (m, 2H, **H-a''**), 4.18 – 4.02 (m, 2H, **H-a'**), 2.78 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.2 Hz, 2H, **H-b''**), 1.70 (dq, ³ $J_{H,H}$ = 12.5, 6.3 Hz, 2H, **H-b'**), 1.47 – 1.16 (m, 30H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.88 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.8 Hz, 3H, **H-r'**).



C₂₁H₄₂NO₃P
[387.2902 g/mol]

106z

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 115.44 (**CN**), 66.72 (d, ² $J_{C,P}$ = 6.1 Hz, **C-a''**), 60.01 (d, ² $J_{C,P}$ = 5.3 Hz, **C-a'**), 58.23 (**C-b'**), 32.07, 30.52, 30.46, 29.84, 29.81, 29.78, 29.70, 29.62, 29.51, 29.23, 25.59, 22.84, 20.19, 20.13 (**C-b''**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.26 (**C-r'**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 7.65.

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 2956, 2916, 2849, 1720, 1468, 1226, 1051, 974, 757.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 410.280, gef.: 410.280 [M+Na]⁺.

Synthese von γ -Octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**54z**)

Die Synthese des Pyrophosphats **107z** erfolgte nach **AAV 7**. 200 mg (0.516 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-Cyanoethyloctadecyl-*H*-phosphonat (**106z**) wurden in 11 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 138 mg (1.03 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.23 mL (1.29 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 190 mg (0.394 mmol, 76%)). Die Synthese der γ -alkylierten TriPPPro-Verbindung **54z** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.28 mL (414 mg, 1.97 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.33 mL (239 mg, 2.36 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.33 mL (239 mg, 2.36 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.09 mL (97.0 mg, 1.18 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 103 mg (0.276 mmol, 0.70 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 4 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand

über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute geschütztes Rohprodukt: 165 mg (0.197 mmol, 71%).

Entschützungsversuche:

a) Entschützung mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid

50 mg des erhaltenen Rohprodukts wurden in 1 mL Acetonitril gelöst, mit 0.15 mL Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (10% in H₂O) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei kam es zur Zersetzung des Produkts.

b) Entschützung mit Triethylamin (10 Vol.%) und DBU (10 Vol.%)

50 mg des erhaltenen Rohprodukts wurden in 0.9 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.1 mL abs. Triethylamin versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da bei der DC-Verfolgung (LM CH₃CN/H₂O 7:1) keine Umsetzung beobachtet werden konnte, wurden 0.1 mL abs. DBU zugegeben und fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt. Es wurde keine Entschützung beobachtet.

c) Entschützung mit Triethylamin (10 Äquiv.)

51.5 mg des erhaltenen Rohprodukts wurden in 0.47 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 71 µL abs. Triethylamin versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Hilfe von HPLC-Reaktionsverfolgung (Methode A) beobachtet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt über eine Kationenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ gegeben und erneut durch eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 15.7 mg (20.0 µmol, 7%) eines farblosen Feststoffs.

Die Reaktion sollte nun mit den ermittelten Entschützungsbedingungen erneut durchgeführt werden, damit die Ausbeute erhöht werden kann.

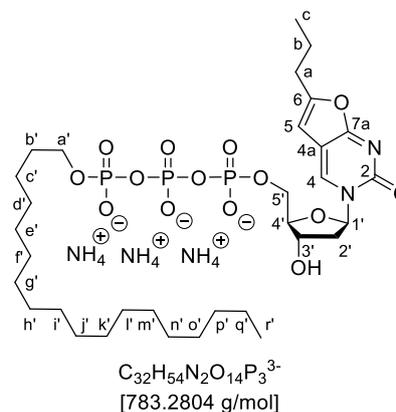
Synthese von γ -Octadecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (54z**)**

Die Synthese des Pyrophosphats **107z** erfolgte nach **AAV 7**. 200 mg (0.516 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-Cyanoethyloctadecyl-*H*-phosphonat (**106z**) wurden in 11 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 138 mg (1.03 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.23 mL (1.29 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 185 mg (0.383 mmol, 74%)). Die Synthese der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54z** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.27 mL (402 mg, 1.91 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.32 mL (232 mg, 2.29 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.32 mL (232 mg, 2.29 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.09 mL (94.3 mg, 1.15 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 100 mg (0.268 mmol, 0.70 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 5 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und es folgte eine erste

automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min). Der erhaltene Rückstand wurde in 4 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.28 mL abs. Triethylamin (10 Äquiv.) versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt über eine Kationenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ gegeben und erneut durch eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 54.1 mg (66.5 µmol, 25%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.94 (s, 1H, **H-4**), 6.62 (s, 1H, **H-5**), 6.34 – 6.28 (m, 1H, **H-1'**), 4.60 (dd, ³J_{H,H} = 10.7, 5.8 Hz, 1H, **H-3'**), 4.38 – 4.33 (m, 2H, **H-5'**), 3.98 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.66 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **H-a**), 2.59 – 2.51 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.31 – 2.24 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.78 – 1.70 (m, 2H, **H-b**), 1.63 (m, 2H, **H-b'**), 1.45 – 1.25 (m, 30H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 1.02 (dd, ³J_{H,H} = 12.6, 5.3 Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-r'**).



54z

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 172.99 (**C-7a**), 159.26 (**C-6**), 156.32 (**C-2**), 138.46 (**C-4**), 109.81 (**C-4a**), 101.09 (**C-5**), 89.38 (**C-1'**), 83.25 (**C-4'**), 70.35 (**C-3'**), 67.59 (**C-a'**), 65.37 (**C-5'**), 42.28 (**C-2'**), 33.08 (**C-a**), 30.97, 30.80, 30.79, 30.77, 30.76, 30.60, 30.47, 26.87, 23.71, 21.42, 20.82 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 14.45 (**C-c**), 13.92 (**C-r'**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): -10.78 (d, ²J_{P,P} = 19.4 Hz, **P-α**), -11.44 (d, ²J_{P,P} = 19.3 Hz, **P-γ**), -22.53 (t, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, **P-β**).

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 785.295, gef.: 785.278 [M]⁺.

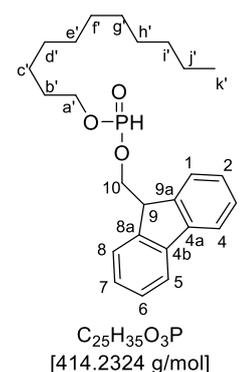
Synthese von (9H-Fluoren-9-yl)methylundecyl-H-phosphonat (103y)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 3**. 0.72 mL (884 mg, 3.78 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) wurden in 35 mL abs. Pyridin gelöst und bei -10 °C mit 500 mg (2.90 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Undecanol (**83y**) und 1.03 g (5.23 mmol, 1.80 Äquiv.) (9H-Fluoren-9-yl)methanol (**74**) versetzt.

Ausbeute: 998 mg (2.41 mmol, 83%) eines farblosen Öls.

- **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂ 100%): 0.37.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 7.82 – 7.66 (m, 2H, **H-1**, **H-8**), 7.64 – 7.54 (m, 2H, **H-4**, **H-5**), 7.41 (dd, ³J_{H,H} = 12.4, 4.7 Hz, 2H, **H-3**, **H-6**), 7.32 (dt, ³J_{H,H} = 7.9, 3.7 Hz, 2H, **H-2**, **H-7**), 4.43 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, **H-10**), 4.34 – 4.13 (m, 1H, **H-9**), 4.09 (dt, ³J_{H,P} = 13.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, **H-a'**), 1.75 – 1.64 (m, 2H, **H-b'**), 1.42 – 1.17 (m, 16H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 0.88 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, **H-k'**).



103y

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (126 MHz, CDCl₃): 143.17, 143.13 (**C-8a**, **C-9a**), 141.58, 141.54 (**C-4a**, **C-4b**), 128.17, 128.14 (**C-3**, **C-6**), 127.38, 127.36 (**C-2**, **C-7**), 127.35, 127.33 (**C-1**, **C-8**), 125.19, 125.13 (**C-4**, **C-5**), 67.48 (d, ²J_{C,P} = 5.7 Hz, **C-a'**), 66.22 (**C-9**), 48.22, 48.09 (d, ²J_{C,P} = 6.8 Hz, **C-10**), 32.07, 29.84, 29.80, 29.78, 29.69, 29.64, 29.62, 29.50, 29.26, 29.22, 22.83 (**C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**), 14.22 (**C-k'**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 9.00.

- IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3293, 2954, 2924, 2851, 1755, 1667, 1606, 1594, 1472, 1449, 1385, 1315, 1218, 1167, 1151, 1127, 1103, 1065, 998, 967, 831, 812, 782, 754, 740, 691, 671, 592, 508.

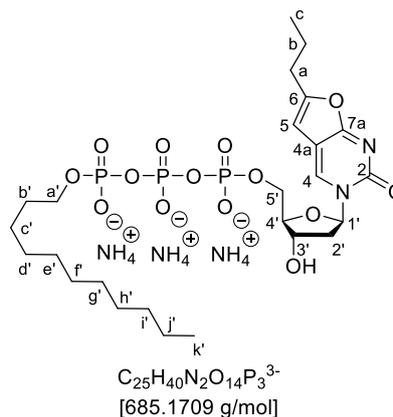
- HRMS: (ESI⁺, m/z): ber.: 437.222, gef.: 437.222 [M+Na]⁺.

Synthese von γ -Undecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**54y**)

Die Synthese des Pyrophosphats **104y** erfolgte nach **AAV 7**. 250 mg (0.604 mmol, 1.00 Äquiv.) (9H-Fluoren-9-yl)methylundecyl-*H*-phosphonat (**103y**) wurden in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 161 mg (1.21 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.77 mL (1.51 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 200 mg (0.491 mmol, 81%)). Die Synthese der γ -alkylierten TriPPPPro-Verbindung **54y** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 5 mL Acetonitril gelöst und mit 0.35 mL (516 mg, 2.46 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.41 mL (298 mg, 2.95 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.41 mL (298 mg, 2.95 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.12 mL (121 mg, 1.47 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 128 mg (0.344 mmol, 0.70 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 5 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) vorgereinigt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde in 1 mL Acetonitril gelöst, mit 0.1 mL Triethylamin versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde über eine Kationenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ gegeben und erneut durch eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 54.7 mg (79.8 μmol , 23%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.93 (s, 1H, **H-4**), 6.63 (s, 1H, **H-5**), 6.33 (t, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H-1'**), 4.56 (dd, $^3J_{H,H} = 10.4$, 5.1 Hz, 1H, **H-3'**), 4.39 – 4.28 (m, 2H, **H-5'**), 4.21 – 4.10 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.66 (t, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 2H, **H-a**), 2.58 – 2.52 (m, 1H, **H_a-2'**), 2.26 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.78 – 1.70 (m, 2H, **H-b**), 1.70 – 1.61 (m, 2H, **H-b'**), 1.41 – 1.25 (m, 16H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 1.01 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, **H-k'**).



54y

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.21 (**C-7a**), 160.70 (**C-6**), 156.95 (**C-2**), 138.94 (**C-4**), 109.64 (**C-4a**), 102.12 (**C-5**), 89.40 (**C-1'**), 88.17 (**C-4'**), 70.79 (**C-3'**), 69.67 (d, $^2J_{C,P} = 6.3$ Hz **C-a'**), 66.20 (**C-5'**), 42.10 (**C-2'**), 33.10 (**C-a**), 31.35, 31.31, 30.97, 30.74, 30.51, 30.35, 26.66, 23.75, 21.42 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**), 14.45 (**C-c**), 13.92 (**C-k'**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.62 (d, $^2J_{P,P} = 19.2$ Hz, **P- α**), -12.72 (d, $^2J_{P,P} = 16.6$ Hz, **P- γ**), -23.43 – -23.74 (m, **P- β**).

- **HRMS**: (ESI⁻, m/z): ber.: 740.280, gef.: 740.098 [$\text{M}^{2-} + 2\text{NH}_4^+$].

Synthese von γ -Undecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (**54y**)

Die Synthese des Pyrophosphats **107y** erfolgte nach **AAV 7**. 200 mg (0.692 mmol, 1.00 Äquiv.) (2-Cyanoethyl)undecyl-*H*-phosphonat (**106y**) wurden in 11 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 185 mg (1.38 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 4.32 mL (1.73 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 200 mg (0.521 mmol, 75%)). Die Synthese der γ -alkylierten TriPPP-Verbindung **54y** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 5 mL Acetonitril gelöst und mit 0.37 mL (548 mg, 2.60 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.44 mL (316 mg, 3.12 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.44 mL (316 mg, 3.12 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.13 mL (128 mg, 1.56 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 136 mg (0.365 mmol, 0.70 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 5 mL Acetonitril zugegeben und sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute geschütztes Rohprodukt: 281 mg (0.308 mmol, 84%).

Entschützungsversuche:a) Entschützung mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid

50 mg des erhaltenen Rohprodukts wurden in 0.9 mL Acetonitril gelöst, mit 0.1 mL Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (10% in H₂O) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da bei der DC-Verfolgung (LM CH₃CN/H₂O 7:1) keine Umsetzung beobachtet werden konnte, wurden erneut 0.5 mL Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (10% in H₂O) zugegeben und fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es kam dabei zur Zersetzung des Produkts.

b) Entschützung mit Triethylamin (10 Vol.%) und DBU (10 Vol.%)

50 mg des erhaltenen Rohprodukts wurden in 0.9 mL Acetonitril gelöst und mit 0.1 mL Triethylamin versetzt. Da bei der DC-Verfolgung (LM CH₃CN/H₂O 7:1) keine Umsetzung beobachtet werden konnte, wurden 0.11 mL DBU zugegeben und fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Auch dabei kam es nicht zu einer Abspaltung der Schutzgruppen.

c) Entschützung mit Triethylamin (10 Äquiv.)

168 mg des erhaltenen Rohprodukts wurden in 5 mL Acetonitril gelöst und mit 0.32 mL (2.27 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Endpunkt der Reaktion wurde via HPLC-Reaktionsverfolgung (Methode A) ermittelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels einer automatisierten Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 110 mg (0.161 mmol, 31%) eines farblosen Feststoffs.

Die Reaktion sollte nun mit den ermittelten Entschützungsbedingungen erneut durchgeführt werden, damit die Ausbeute erhöht werden kann.

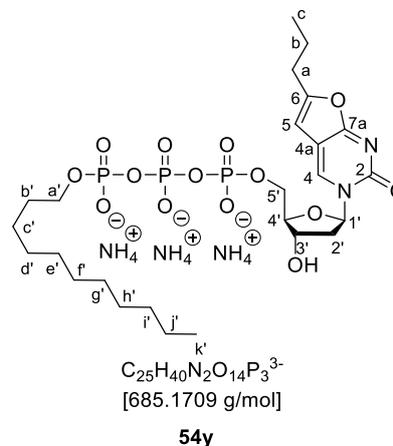
Synthese von γ -Undecyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (54y)

Die Synthese des Pyrophosphats **107y** erfolgte nach **AAV 7**. 200 mg (0.692 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-Cyanoethylundecyl-*H*-phosphonat (**106y**) wurden in 11 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 185 mg (1.38 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 4.32 mL (1.73 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (*c* = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 147 mg (0.383 mmol, 55%)). Die Synthese der γ -alkylierten TriPPP-Verbindung **54y** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 3.5 mL Acetonitril gelöst und mit 0.27 mL (402 mg, 1.91 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.32 mL (232 mg, 2.29 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.32 mL (232 mg, 2.29 mmol, 6.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 0.09 mL (94.3 mg, 1.15 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 100 mg (0.268 mmol, 0.70 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (**66**) in 5 mL Acetonitril zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und es folgte eine Reinigung über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min). Der erhaltene Rückstand wurde in 5.4 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.41 mL abs. Triethylamin (10 Äquiv.) versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Endpunkt der Entschützung wurde mittels HPLC-Reaktionsverfolgung bestimmt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde über eine Kationenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ gegeben und erneut

durch eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 57.4 mg (83.8 μmol, 31%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.95 (d, ³J_{H,H} = 1.5 Hz, 1H, **H-4**), 6.63 (d, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, **H-5**), 6.35 – 6.31 (m, 1H, **H-1'**), 4.58 (dd, ³J_{H,H} = 10.0, 5.4 Hz, 1H, **H-3'**), 4.41 – 4.31 (m, 2H, **H-5'**), 4.21 – 4.15 (m, 3H, **H-4'**, **H-a'**), 2.65 (dd, ³J_{H,H} = 11.3, 4.3 Hz, 2H, **H-a**), 2.56 – 2.51 (m, 1H, **H-a-2'**), 2.30 – 2.25 (m, 1H, **H-b-2'**), 1.77 – 1.59 (m, 4H, **H-b**, **H-b'**), 1.42 – 1.23 (m, 16H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**), 1.00 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, **H-c**), 0.89 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-k'**).



- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 173.21 (**C-7a**), 160.70 (**C-6**), 156.95 (**C-2**), 138.94 (**C-4**), 109.64 (**C-4a**), 102.12 (**C-5**), 89.40 (**C-1'**), 88.17 (**C-4'**), 70.79 (**C-3'**), 69.65 (d, ²J_{C,P} = 6.3 Hz **C-a'**), 66.20 (**C-5'**), 42.10 (**C-2'**), 33.10 (**C-a**), 31.35, 31.31, 30.97, 30.74, 30.51, 30.35, 26.66, 23.75, 21.42 (**C-b**, **C-b'**, **C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**), 14.45 (**C-c**), 13.92 (**C-k'**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): -11.88 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, **P-α**), -13.76 (d, ²J_{P,P} = 17.5 Hz, **P-γ**), -23.95 – -24.20 (m, **P-β**).

- **HRMS:** (ESI⁻, m/z): ber.: 740.280, gef.: 740.098 [M²⁻+2NH₄⁺].

7.2.8 Synthese des BCNA-Triphosphats

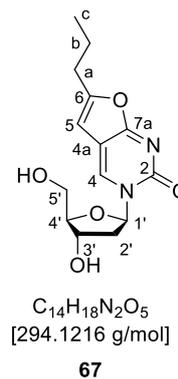
Synthese von 3-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro-[2,3-d]-pyrimidin-2-on (67)

In Stickstoffschutzgasatmosphäre wurde 1.00 g (2.83 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Iod-2'-desoxyuridin (**73**) in 14 mL abs. DMF gelöst und mit 326 mg (0.283 mmol, 0.10 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) und 0.84 mL (577 mg, 8.48 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Pentin versetzt. Die erhaltene gelbe Suspension wurde anschließend so lange gerührt, bis sich der Feststoff aufgelöst hat und eine klare Lösung vorlag. Dann erfolgte die Zugabe von 171 mg (0.565 mmol, 0.20 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 0.91 mL (694 mg, 5.37 mmol, 1.90 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylethylamin. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 171 mg (0.565 mmol, 0.20 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 13.0 mL (9.43 g, 92.2 mmol, 33.0 Äquiv.) Triethylamin und die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand chromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1) gereinigt.

Ausbeute: 374 mg (1.27 mmol, 45%) eines beigen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v:v): 0.34.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, DMSO-d₆): 8.67 (s, 1H, **H-4**), 6.43 (s, 1H, **H-5**), 6.16 (t, ³ $J_{H,H}$ = 6.2 Hz, 1H, **H-1'**), 5.27 (d, ³ $J_{H,H}$ = 4.3 Hz, 1H, **3'-OH**), 5.11 (t, ³ $J_{H,H}$ = 5.3 Hz, 1H, **5'-OH**), 4.23 (dq, ³ $J_{H,H}$ = 8.1, 4.0 Hz, 1H, **H-3'**), 3.90 (q, ³ $J_{H,H}$ = 3.7 Hz, 1H, **H-4'**), 3.71 – 3.64 (m, 2H, **H-5'**), 3.64 – 3.58 (m, 2H, **H-a**), 3.09 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 13.7, 6.6 Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.37 (ddd, ³ $J_{H,H}$ = 13.4, 6.1, 4.2 Hz, 1H, **H_b-2'**), 2.08 – 2.01 (m, 2H, **H-b**), 0.93 (t, ³ $J_{H,H}$ = 7.4 Hz, 3H, **H-c**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, DMSO-d₆): 171.21 (**C-7a**), 158.11 (**C-6**), 153.78 (**C-2**), 136.78 (**C-4**), 106.34 (**C-4a**), 99.88 (**C-5**), 88.10 (**C-1'**), 87.37 (**C-4'**), 69.67 (**C-3'**), 60.78 (**C-5'**), 45.76 (**C-2'**), 41.19 (**C-a**), 29.29 (**C-b**), 19.83 (**C-c**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 2954, 2915, 2848, 1698, 1656, 1552, 1496, 1470, 1426, 1394, 1315, 1274, 1255, 1238, 1195, 1136, 1124, 1073, 1036, 939, 890, 817, 787, 719, 688, 640, 603.

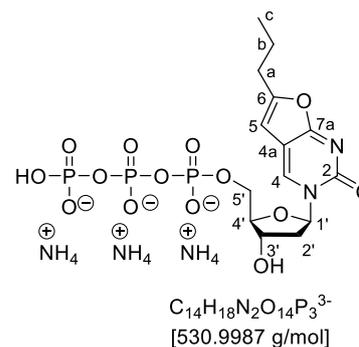
- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 317.111, gef.: 317.111 [M+Na]⁺.

Synthese von 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-triphosphat (**60**)

90 mg (0.306 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on (**67**) und 131 mg (0.612 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden 30 Minuten unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden sie unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 1.7 mL Trimethylphosphat gelöst und bei -20 °C mit 0.03 mL (56.3 mg, 0.367 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 35 Minuten bei -20 °C gerührt. Dann wurden 1.53 mL (418 mg, 0.765 mmol, 2.50 Äquiv.) Tributylammoniumpyrophosphat (c = 0.50 M in Acetonitril) und 0.44 mL (340 mg, 1.84 mmol, 6.00 Äquiv.) Tributylamin zugegeben und eine Stunde bei -20 °C gerührt. Die Endpunkte der Reaktionen wurden durch HPLC-Verfolgung (Methode A) bestimmt. Bei Raumtemperatur wurde im Anschluss TEAB-Puffer hinzugegeben und 30 Minuten gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung dreimal mit Dichlormethan gewaschen, die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen eingeengt. Es folgten mehrere automatisierte Sephadexsäulen (H₂O/TEAB-Puffer (1M), 0-100% Vol., 55 min, Flussrate 12 mL/min) sowie automatisierte Säulenchromatographien an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) für die Reinigung des Produkts. Das erhaltene Rohprodukt wurde über eine Kationenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ gegeben und abschließend noch einmal über eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 26.2 mg (49.3 μ mol, 16%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.92 (s, 1H, **H-4**), 6.69 (s, 1H, **H-5**), 6.36 (dd, $^3J_{H,H} = 8.3, 5.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.41 (d, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.46 – 4.38 (m, 2H, **H-4'**, **H_a-5'**), 4.32 (ddd, $^3J_{H,P} = 11.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.6, 2.6$ Hz, 1H, **H_b-5'**), 2.69 (dd, $^3J_{H,H} = 5.5, 1.0$ Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.65 (t, $^3J_{H,H} = 7.8$ Hz, 2H, **H-a**), 2.44 – 2.33 (m, 1H, **H_b-2'**), 1.77 – 1.67 (m, 2H, **H-b**), 1.00 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 171.96 (**C-7a**), 160.62 (**C-6**), 156.97 (**C-2**), 139.09 (**C-4**), 110.28 (**C-4a**), 102.10 (**C-5**), 89.87 (**C-1'**), 86.29 (d, $^3J_{C,P} = 9.0$ Hz, **C-4'**), 77.06 (**C-3'**), 67.08 (**C-5'**), 47.45 (**C-A**), 42.89 (**C-2'**), 30.95 (**C-a**), 21.42 (**C-b**), 13.90 (**C-c**), 9.10 (**C-B**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -10.23 (d, $^2J_{P,P} = 20.8$ Hz, **P- α**), -11.37 (d, $^2J_{P,P} = 20.7$ Hz, **P- γ**), -23.20 – -23.73 (m, **P- β**).

- **HRMS**: (ESI $^+$, m/z): ber.: 621.942, gef.: 619.334 [M+4Na] $^+$.

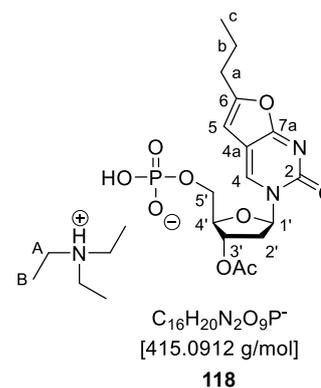
7.2.9 Synthese des BCNA-Diphosphats

Synthese von 3-(3'-O-Acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat als Triethylammoniumsalz (**118**)

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt. 100 mg (0.298 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-(3'-O-Acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on (**70**) wurden in 4.44 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit einer Lösung aus 233 mg (0.446 mmol, 1.50 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit (**76**) in 1 mL Dichlormethan versetzt. Zu der Lösung wurden 1.43 mL (42.2 mg, 0.36 mmol, 1.20 Äquiv.) DCI (c = 0.25 M in Acetonitril) zugegeben. Die Oxidation erfolgte mit 0.08 mL (40.2 mg, 0.446 mmol, 1.50 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (c = 5.5 M in *n*-Decan). Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgte die Reinigung durch automatisierte Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH, 0-5% Vol., 0-30 min, Flussrate 20 mL/min). Das erhaltene geschützte Monophosphat **77** wurde in 10 mL Methanol und Triethylamin (1:1 v:v) gelöst, nach fünf Stunden bei Raumtemperatur erfolgte die Reinigung mit einer automatisierten Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: 49.7 mg (0.120 mmol, 40%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.90 (s, 1H, **H-4**), 6.53 (s, 1H, **H-5**), 6.41 (dd, $^3J_{H,H} = 8.1, 5.7$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.40 (d, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.40 – 4.35 (m, 1H, **H-4'**), 4.18 (dddd, $^3J_{H,P} = 42.9$ Hz, $^2J_{H,H} = 11.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.4, 2.5$ Hz, 2H, **H-5'**), 3.12 (q, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 6H, **H-A**), 2.69 – 2.63 (m, 3H, **H_a-2'**, **H-a**), 2.39 (ddd, $^2J_{H,H} = 14.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 8.2, 6.1$ Hz, 1H, **H_b-2'**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**), 1.78 – 1.70 (m, 2H, **H-b**), 1.28 (t, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 9H, **H-B**), 1.01 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.26 (**C-7a**), 172.06 (**q-OAc**), 160.91 (**C-6**), 156.97 (**C-2**), 138.80 (**C-4**), 110.17 (**C-4a**), 101.51 (**C-5**),

89.72 (**C-1'**), 86.54 (d, $^3J_{C,P} = 8.9$ Hz, **C-4'**), 76.94 (**C-3'**), 65.92 (d, $^2J_{C,P} = 4.9$ Hz, **C-5'**), 47.76 (**C-A**), 40.31 (**C-2'**), 30.90 (**C-a**), 21.31 (**C-b**), 20.85 (**OAc**), 13.84 (**C-c**), 9.46 (**C-B**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): 0.72.

- **HRMS**: (ESI $^-$, m/z): ber.: 415.091, gef.: 415.101 [M] $^-$.

Synthese von 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-diphosphat (**58**)

Unter Stickstoffschutzgasatmosphäre wurden 45.0 mg (0.108 mmol, 1.00 Äquiv.) des 3'-acetylgeschützten BCNA-Monophosphats **118** in einer Mischung aus 2 mL Dichlormethan und 2 mL DMF gelöst und mit 84.8 mg (0.163 mmol, 1.50 Äquiv.) Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (**76**) versetzt. Danach erfolgte die Zugabe von 0.52 mL (15.4 mg, 0.130 mmol, 1.20 Äquiv.) DCI (c = 0.25 M in Acetonitril) über 30 Minuten. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, mit 0.03 mL (14.65 mg, 0.163 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (c = 5.5 M in *n*-Decan) vermischt und erneut 15 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der erhaltene Rückstand in 5 mL Acetonitril gelöst und mit 0.25 mL Triethylamin vermischt. Die Lösung wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt und dann das Lösungsmittel entfernt. Es folgte eine Reinigung über automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min). Das erhaltene einfachgeschützte Diphosphat **119** wurde anschließend in einem CH₃CN/H₂O-Gemisch (1:1, v:v) gelöst und nach Zugabe von 1 mL Triethylamin 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und es folgte eine weitere automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min). Es kam zur Zersetzung des Produkts **58**.

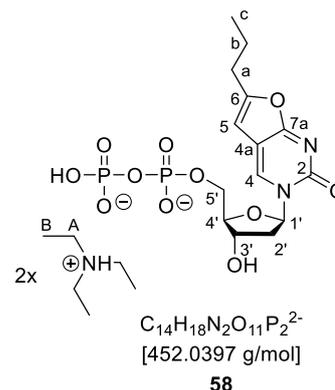
Synthese von 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on-5'-diphosphat (**58**)

51 mg (0.173 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on (**67**) und 74.0 mg (0.345 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden 30 Minuten unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die beiden Substanzen unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 1 mL Trimethylphosphat gelöst und bei -15 °C mit 0.02 mL (31.9 mg, 0.208 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten bei -15 °C gerührt. Dann erfolgte die Zugabe von 1.08 mL (147 mg, 0.434 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetrabutylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) und 0.25 mL (193 mg, 1.04 mmol, 6.00 Äquiv.) Tributylamin. Es wurde 40 Minuten bei -15 °C gerührt, dann wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit TEAB-Puffer (1M) versetzt und 45 Minuten gerührt. Der Endpunkt der Reaktion wurde mittels RP-HPLC-Verfolgung (Methode A) ermittelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung dreimal mit Dichlormethan und die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden vom Lösungsmittel befreit. Für die Reinigung des Produkts waren mehrfache automatisierte Säulenchromatographien an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) sowie mehrfache automatisierte Sephadexsäulen (H₂O/TEAB-Puffer (1M), 0-100% Vol., 55 min, Flussrate 12 mL/min) notwendig.

Ausbeute: 23.5 mg (51.8 μmol , 30%) eines farblosen Harzes.

Nebenprodukt BCNA-Triphosphat: 22.6 mg (42.6 μmol , 25%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.94 (s, 1H, **H-4**), 6.66 (s, 1H, **H-5**), 6.38 (dd, $^3J_{H,H} = 8.3, 5.5$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.44 (d, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.39 (dd, $^3J_{H,H} = 8.2, 3.9$ Hz, 2H, **H-4'**, **H_a-5'**), 4.32 – 4.25 (m, 1H, **H_b-5'**), 3.20 (q, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, 6H, **H-A**), 2.72 – 2.63 (m, 3H, **H_a-2'**, **H-a**), 2.40 (ddd, $^2J_{H,H} = 14.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 8.3, 5.9$ Hz, 1H, **H_b-2'**), 1.74 (dq, $^3J_{H,H} = 14.8, 7.4$ Hz, 2H, **H-b**), 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, 9H, **H-B**), 1.01 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-c**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.48 (**C-7a**), 160.41 (**C-6**), 156.23 (**C-2**), 138.68 (**C-4**), 110.04 (**C-4a**), 101.70 (**C-5**), 89.24 (**C-1'**), 86.85 (**C-4'**), 76.43 (**C-3'**), 63.67 (d, $^2J_{C,P} = 5.1$ Hz, **C-5'**), 48.10 (**C-A**), 40.06 (**C-2'**), 30.91 (**C-a**), 21.37 (**C-b**), 13.86 (**C-c**), 9.48 (**C-B**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -9.64 (d, $^2J_{P,P} = 19.1$ Hz, **P- α**), -10.88 (d, $^2J_{P,P} = 19.4$ Hz, **P- β**).

- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 497.011, gef.: 495.044 [M³⁺ + 2 Na]⁺.

7.2.10 Synthese des 5-FdU-Monophosphats

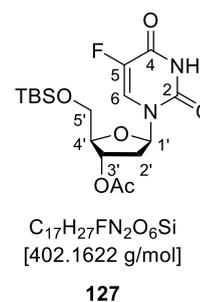
Synthese von 5-Fluor-3'-O-acetyl-5'-O-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxyuridin (**127**)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 4**. 5.00 g (20.3 mmol, 1.00 Äquiv.) 5'-Fluor-2'-desoxyuridin (**123**) wurden in 50 mL abs. Pyridin gelöst und mit 3.67 g (24.4 mmol, 1.20 Äquiv.) *tert*-Butylidimethylsilylchlorid und später mit 5.76 mL (6.22 g, 60.9 mmol, 3.00 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 v:v).

Ausbeute: 3.89 g (9.68 mmol, 48%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert (PE/EE 1:1 v:v): 0.27.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.06 (d, $^3J_{H,F} = 6.5$ Hz, 1H, **H-6**), 6.28 – 6.23 (m, 1H, **H-1'**), 5.27 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.16 (dd, $^3J_{H,H} = 4.1, 2.1$ Hz, 1H, **H-4'**), 3.95 (qd, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.3$ Hz, 2H, **H-5'**), 2.46 (ddd, $^2J_{H,H} = 14.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.7, 1.6$ Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.22 (ddd, $^2J_{H,H} = 14.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 8.3, 6.3$ Hz, 1H, **H_b-2'**), 2.09 (s, 3H, **OAc**), 0.95 (s, 9H, **-Si(CH₃)₃**), 0.16 (s, 6H, **-Si(CH₃)₂**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.04 (**q-OAc**), 159.19 (**C-4**), 150.67 (**C-2**), 141.20 (**C-5**), 125.49 (d, $^2J_{C,F} = 34.3$ Hz, **C-6**), 87.07 (**C-1'**), 86.87 (**C-4'**), 76.46 (**C-3'**), 64.81 (**C-5'**), 39.15 (**C-2'**), 26.39 (**-Si(CH₃)₃**), 20.82 (**OAc**), 19.23 (**-Si(CH₃)₃**), -5.48, -5.51 (**Si(CH₃)₂**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -168.08 (d, $^3J_{F,H} = 6.3$ Hz).

- **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3211, 3080, 2954, 2857, 1703, 1463, 1436, 1362, 1247, 1203, 1123, 1077, 1046, 1004, 972, 952, 921, 887, 828 812, 783, 752, 709, 689, 672, 553, 412.

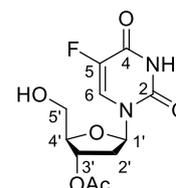
- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 425.152, gef.: 425.152 [M + Na]⁺.

Synthese von 5-Fluor-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin (126)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 5**. 3.01 g (7.48 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Fluor-3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin (**127**) wurden in 60 mL Dichlormethan gelöst und mit 7.30 mL (7.23 g, 44.86 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt.

Ausbeute: 1.59 g (5.52 mmol, 74%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** *R_F*-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v:v): 0.75.



C₁₁H₁₃FN₂O₆
[288.0758 g/mol]
126

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.25 (d, ³J_{H,F} = 6.8 Hz, 1H, **H-6**), 6.30 – 6.25 (m, 1H, **H-1'**), 5.30 (dt, ³J_{H,H} = 6.2, 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 4.10 (dd, ³J_{H,H} = 4.8, 2.7 Hz, 1H, **H-4'**), 3.81 (d, ³J_{H,H} = 2.8 Hz, 2H, **H-5'**), 2.40 (ddd, ²J_{H,H} = 14.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.8, 1.7 Hz, 1H, **H_a-2'**), 2.35 – 2.27 (m, 1H, **H_b-2'**), 2.09 (s, 3H, **OAc**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 172.14 (**q-OAc**), 159.48 (d, ²J_{C,F} = 26.2 Hz, **C-4**), 150.84 (**C-2**), 141.96 (d, ¹J_{C,F} = 232.8 Hz, **C-5**), 125.99 (d, ²J_{C,F} = 35.0 Hz, **C-6**), 86.99 (**C-1'**), 86.64 (**C-4'**), 76.55 (**C-3'**), 62.91 (**C-5'**), 38.64 (**C-2'**), 20.84 (**OAc**).

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -168.28 (d, ³J_{F,H} = 6.6 Hz).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3563, 3163, 3056, 2937, 2825, 1703, 1661, 1478, 1361, 1268, 1239, 1192, 1132, 1108, 1072, 1063, 1019, 998, 986, 972, 955, 899, 885, 828, 791, 774, 743, 652, 604, 565.

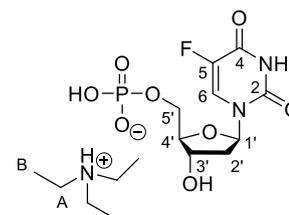
- **HRMS:** (ESI⁻, m/z): ber.: 287.068, gef.: 287.066 [M]⁻.

Synthese von Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-5-Fluor-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridinmonophosphat (125)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 6**. 500 mg (1.74 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Fluor-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin (**126**) wurden in 15 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 1.36 g (2.60 mmol, 1.50 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (**76**) in 1 mL Dichlormethan und 8.30 mL (246 mg, 2.08 mmol, 1.20 Äquiv.) DCI (c = 0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte durch die Zugabe von 0.47 mL (235 mg, 2.60 mmol, 1.50 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (c = 5.50 M in *n*-Decan). Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch automatisierte Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 0-10% Vol., 0-30 min, Flussrate 20 mL/min). Das geschützte Monophosphat **128** wurde in 20 mL einer Methanol/Triethylamin-Lösung (1:1 v:v) gelöst. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden 10 mL H₂O zugegeben.

Ausbeute: 394 mg (1.21 mmol, 70%) eines weißen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.12 (d, ³J_{H,F} = 6.6 Hz, 1H, **H-6**), 6.32 – 6.28 (m, 1H, **H-1'**), 4.49 (dd, ³J_{H,H} = 6.0, 3.9 Hz, 1H, **H-3'**), 4.08 – 4.01 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 3.17 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 6H, **H-A**), 2.34 – 2.16 (m, 2H, **H-2'**), 1.30 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 9H, **H-B**).



C₉H₁₁FN₂O₈P⁻
[325.0243 g/mol]

125

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 159.64 (d, ²J_{C,F} = 26.0 Hz, **C-4**), 150.93 (**C-2**), 141.07 (**C-5**), 126.29 (d, ²J_{C,F} = 34.6 Hz, **C-6**), 87.93 (**C-5'**), 86.73 (**C-3'**), 72.75 (**C-1'**), 65.93 (**C-4'**), 47.65 (**C-A**), 40.92 (**C-2'**), 9.20 (**C-B**).

- ¹⁹F-NMR: δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -168.77 (d, ³J_{F,H} = 6.8 Hz).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): 0.88.

- IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2956, 2946, 1702, 1662, 1466, 1399, 1356, 1263, 1241, 1162, 1047, 966, 938, 919, 838, 809, 783, 753, 730, 557, 513, 419.

- HRMS: (ESI⁻, m/z): ber.: 325.024, gef.: 325,025 [M]⁻.

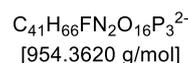
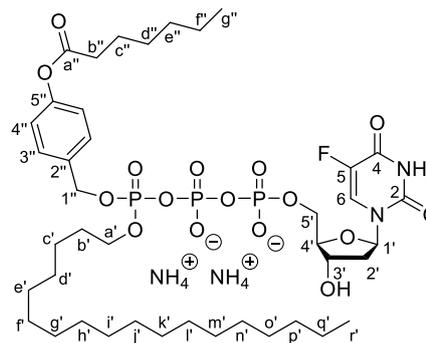
7.2.11 Synthese der 5-FdU-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von (4-Heptanoyloxybenzyl)octadecyl-5-Fluor-2'-desoxyuridintriphosphat als Ammoniumsalz (**55bz**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91bz** erfolgte nach **AAV 7**. 200 mg (0.362 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Heptanoyloxybenzyl)octadecan-*H*-phosphonat (**65bz**) wurden in 6 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 96.7 mg (0.724 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 2.3 mL (0.905 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 180 mg (0.278 mmol, 77%)). Die Synthese der 5-FdU-TriPPPro-Verbindung **55bz** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 3 mL Acetonitril gelöst und mit 0.20 mL (292 mg, 1.39 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.31 mL (225 mg, 2.22 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.19 mL (141 mg, 1.39 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.07 mL (68.5 mg, 0.834 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 3 mL abs. DMF hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 82.7 mg (0.254 mmol, 0.90 Äquiv.) 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (**125**) in 3 mL abs. DMF zugegeben und 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 111 mg (0.117 mmol, 46%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.07 (d, ³J_{H,F} = 6.6 Hz, 1H, **H-6**), 7.49 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 2H, **H-4''**), 7.08 (d, ³J_{H,H} = 10.8 Hz, 2H, **H-3''**), 6.27 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **H-1'**), 5.26 – 5.18 (m, 2H, **H-1''**), 4.59 – 4.55 (m, 1H, **H-3'**), 4.27 – 4.21 (m, 1H, **H_a-5'**), 4.20 – 4.14 (m, 1H, **H_b-5'**), 4.15 – 4.08 (m, 2H, **H-a'**), 4.03 (dd, ³J_{H,H} = 6.6, 4.3 Hz, 1H, **H-4'**), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **H-b''**), 2.26 – 2.22 (m, 2H, **H-2'**), 1.73 (dt, ³J_{H,H} = 15.1, 7.5 Hz, 2H, **H-c''**), 1.61 (dd, ²J_{H,H} = 14.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, **H-b'**), 1.42 (tt, ³J_{H,H} = 14.9, 7.4 Hz, 2H, **H-d''**), 1.34 – 1.23 (m, 34H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**, **H-e''**, **H-f''**), 1.03 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, **H-g''**), 0.90 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, **H-r'**).



55bz

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 172.35 (**C-a''**), 157.29 (**C-4**), 150.76 (**C-5''**), 150.20 (**C-2**), 135.18 (**C-5**), 130.40 (**C-2''**), 126.65, (**C-4''**) 126.49, (**C-6**), 122.82 (**C-3''**), 89.76 (**C-4'**), 86.55 (**C-1'**), 72.32 (**C-3'**), 66.61 (**C-1''**), 64.86 (**C-a'**), 63.35 (**C-5'**), 40.51 (**C-2'**), 35.10 (**C-b''**), 33.02 (**C-b'**), 32.76, 31.20, 31.17, 30.83, 30.81, 30.77, 30.74, 30.71, 30.69, 30.48, 30.31, 29.87, 26.55, 25.94, 24.78, 23.74, 23.59 (**C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**), 14.44, 14.38, 13.92 (**C-r'**, **C-g''**).

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -167.40 (d, ³J_{F,H} = 13.0 Hz).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): -11.21 (d, ²J_{P,P} = 19.0 Hz, **P-α**), -12.66 (d, ²J_{P,P} = 16.3 Hz, **P-γ**), -23.03 (t, ²J_{P,P} = 17.6 Hz, **P-β**).

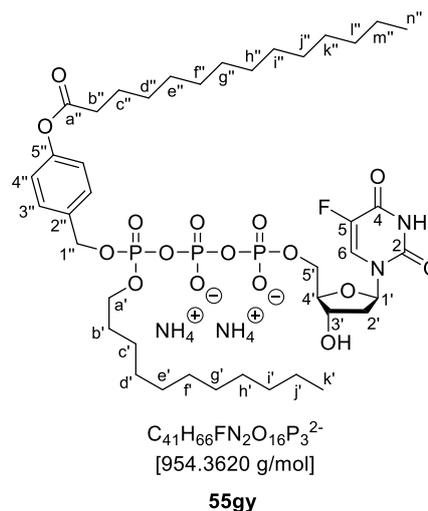
- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 955.369, gef.: 955.075 [M].

Synthese von (4-Tetradecanoyloxybenzyl)undecyl-5-Fluor-2'-desoxyuridintriphosphat als Ammoniumsalz (**55gy**)

Die Synthese des Pyrophosphats **91gy** erfolgte nach **AAV 7**. 200 mg (0.362 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Tetradecanoyloxybenzyl)undecan-*H*-phosphonat (**65gy**) wurden in 6 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 96.7 mg (0.724 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 2.30 mL (0.905 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 200 mg (0.309 mmol, 85%)). Die Synthese der 5-FdU-TriPPP-Verbindung **55gy** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 3 mL Acetonitril gelöst und mit 0.22 mL (325 mg, 1.55 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.34 mL (250 mg, 2.47 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.22 mL (156 mg, 1.55 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.07 mL (76.1 mg, 0.927 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 3 mL abs. DMF hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 45.0 mg (0.1384 mmol, 0.45 Äquiv.) 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (**125**) in 3 mL DMF zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 48.5 mg (0.0508 mmol, 37%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.08 (dd, $^3J_{H,H} = 6.6$, 1.1 Hz, 1H, **H-6**), 7.50 (d, $^3J_{H,H} = 8.4$ Hz, 2H, **H-4''**), 7.08 (d, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, 2H, **H-3''**), 6.30 – 6.24 (m, 1H, **H-1'**), 5.24 – 5.20 (m, 2H, **H-1''**), 4.58 (dt, $^3J_{H,H} = 5.8$, 3.1 Hz, 1H, **H-3'**), 4.30 – 4.21 (m, 1H, **H_a-5'**), 4.20 – 4.14 (m, 1H, **H_b-5'**), 4.11 (tq, $^2J_{H,P} = 9.9$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.3$ Hz, 2H, **H-a''**), 4.03 (s, 1H, **H-4'**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b''**), 2.27 – 2.21 (m, 2H, **H-2'**), 1.73 (dt, $^2J_{H,H} = 15.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-c''**), 1.61 (dd, $^2J_{H,H} = 14.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.42 – 1.22 (m, 36H, **H-c'**, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**, **H-k''**, **H-l''**, **H-m''**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **H-k'**, **H-n''**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 170.99 (**C-a''**), 159.63 (d, $J = 13.2$ Hz, **C-4**), 152.32 (**C-2**), 150.83 (**C-5''**), 146.50 (**C-5**), 137.59 (**C-2''**), 130.41 (**C-4''**), 126.49, (**C-6**), 122.79 (**C-3''**), 87.60 (**C-4'**), 86.59 (**C-1'**), 72.28 (**C-3'**), 69.85 (d, $^2J_{C,P} = 6.3$ Hz, **C-1''**), 66.67 (**C-a'**), 63.35 (**C-5'**), 40.56 (**C-2'**), 35.03 (**C-b''**), 33.11 (**C-b'**), 31.26, 31.21, 30.79, 30.76, 30.71, 30.69, 30.60, 30.51, 30.48, 30.40, 30.32, 30.16, 26.56, 25.97, 24.78, 23.76, 23.74, 20.72 (**C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**, **C-k''**, **C-l''**, **C-m''**), 14.47, 14.44 (**C-k'**, **C-n''**).

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -167.39 (d, $^3J_{F,H} = 13.0$ Hz).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): -11.63 (d, $^2J_{P,P} = 19.3$ Hz, **P- α**), -12.99 (d, $^2J_{P,P} = 15.5$ Hz, **P- γ**), -23.64 (t, $^2J_{P,P} = 18.2$ Hz, **P- β**).

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 955.369, gef.: 955.083 [M].

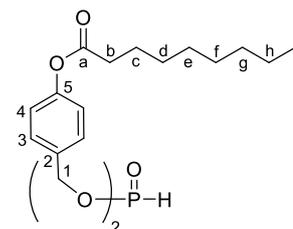
7.2.12 Synthese der symmetrischen H-Phosphonate

Synthese von Bis(4-nonanoxybenzyl)phosphonat (137c)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 9**. 1.00 g (3.79 mmol, 2.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat (**84c**) wurde in 10 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.36 mL (443 mg, 1.89 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) versetzt, anschließend wurde die Reaktionslösung drei Stunden bei 40 °C gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 354 mg (616 mmol, 33%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3) 7.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 4H, **H-4**), 7.08 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 4H, **H-3**), 5.10 – 4.97 (m, 4H, **H-1**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.75 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 15.2, 7.5$ Hz, 4H, **H-c**), 1.47 – 1.18 (m, 20H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h**), 0.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **H-i**).



$\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{O}_7\text{P}$
[574.3059 g/mol]

137c

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.29 (**C-a**), 151.20 (**C-2**), 133.08 (**C-5**), 129.40 (**C-4**), 122.10 (**C-3**), 66.85 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, **C-1**), 34.54 (**C-b**), 31.95, 29.36, 29.26, 25.06, 22.78 (**C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h**), 14.23 (**C-i**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.93.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3370, 2955, 2916, 2848, 1748, 1666, 1613, 1598, 1576, 1509, 1464, 1412, 1382, 1342, 1251, 1220, 1167, 1150, 1106, 1061, 998, 925, 895, 879, 834, 782, 770, 720, 515, 454.

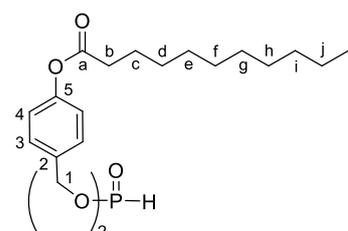
- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 592.340, gef.: 592.339 [M]⁺.

Synthese von Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat (**137e**)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 9**. 1.00 g (3.42 mmol, 2.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylundecanoat (**84e**) wurde in 10 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend wurden 0.30 mL (364 mg, 1.56 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) hinzugegeben und die Reaktionslösung drei Stunden bei 40 °C gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde zweimal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 682 mg (1.08 mmol, 70%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 4H, **H-4**), 7.08 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 4H, **H-3**), 5.12 – 4.97 (m, 4H, **H-1**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.80 – 1.70 (m, 4H, **H-c**), 1.47 – 1.21 (m, 28H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **H-k**).



$\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{O}_7\text{P}$
[630.3685 g/mol]

137e

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.30 (**C-a**), 151.16 (**C-2**), 133.1 (**C-5**), 129.69 (**C-4**), 122.11 (**C-3**), 66.92 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 2.8$ Hz, **C-1**), 34.54 (**C-b**), 32.04 (**C-c**), 29.70, 29.61, 29.45, 29.40, 29.26, 25.06, 22.83 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 14.26 (**C-k**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.79.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 2916, 2868, 2849, 1731, 1676, 1626, 1556, 1490, 1466, 1382, 1322, 1247, 1217, 1199, 1138, 1090, 1065, 1034, 993, 955, 884, 852, 810, 775, 696, 597, 453.

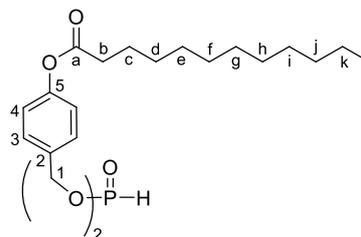
- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 653.358, gef.: 653.353 [M + Na]⁺.

Synthese von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat (137f)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 9**. 1.00 g (3.27 mmol, 2.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-dodecanoat (**84f**) wurde in 10 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.28 mL (347 mg, 1.48 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphit (**82**) versetzt. Dann wurde die Reaktionslösung drei Stunden bei 40 °C gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und zweimal mit Toluol sowie einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde anschließend aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 558 mg (847 μ mol, 57%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 4H, **H-4**), 7.08 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 4H, **H-3**), 5.11 – 4.97 (m, 4H, **H-1**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.80 – 1.69 (m, 4H, **H-c**), 1.49 – 1.19 (m, 32H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **H-l**).



$\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{O}_7\text{P}$
[658.3998 g/mol]

137f

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.30 (**C-a**), 151.17 (**C-3**), 133.09 (**C-5**), 129.66 (**C-4**), 122.11 (**C-2**), 66.88 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.0$ Hz, **C-1**), 34.53 (**C-b**), 32.05 (**C-c**), 29.74, 29.60, 29.48, 29.40, 29.25, 25.06, 22.83 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**), 14.26 (**C-l**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 8.93.

- **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3369, 3276, 2955, 2916, 2848, 1748, 1666, 1599, 1576, 1509, 1465, 1412, 1382, 1251, 1220, 1167, 1149, 1106, 1060, 998, 925, 895, 879, 834, 782, 770, 720, 515, 451.

- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 681.390, gef.: 681.385 [M + Na]⁺.

7.2.13 Synthese des Gemcitabin-Monophosphats

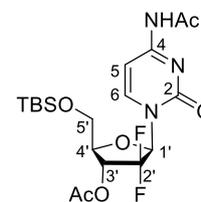
Synthese von 3'-O-acetyl-5'-O-tert-butyldimethylsilyl-2',2'-Difluordesoxycytidin (135)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 4**. 250 mg (0.950 mmol, 1.00 Äquiv.) 2',2'-Difluordesoxycytidin (**2**) wurden in 3 mL abs. Pyridin gelöst und mit 172 mg (1.14 mmol, 1.20 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und später mit 0.63 mL (679 mg, 6.65 mmol, 7.00 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 v:v).

Ausbeute: 394 mg (0.854 mmol, 90%) eines weißen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 v:v): 0.78.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d_4): 8.21 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-6**), 7.47 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-5**), 6.40 – 6.29 (m, 1H, **H-1'**), 5.49 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.30 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$, 2.6 Hz, 1H, **H-4'**), 4.06 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, **H_a-5'**), 3.91 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, 1H, **H_b-5'**), 2.19 (s, 3H, **-OAc**), 2.18 (s, 3H, **-N(H)Ac**), 0.96 (s, 9H, **-Si(CH₃)₃**), 0.15 (s, 3H, **-Si(CH₃)₃**), 0.14 (s, 3H, **-Si(CH₃)₃**).



$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}$
[461.1794 g/mol]

135

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.13 (**q-N(H)Ac**), 170.57 (**q-OAc**), 164.93 (**C-4**), 157.45 (**C-2**), 145.46 (**C-6**), 121.08 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 55.8$ Hz, **C-2'**), 98.27 (**C-5**), 86.41 (**C-1'**), 81.33 (**C-4'**), 70.58 (dd, $^2J_{\text{C,F}} = 31.0$, 16.7 Hz, **C-3'**), 62.12 (**C-5'**), 26.27 (**-OAc**), 24.58 (**-N(H)Ac**), 20.13 (**-Si(CH₃)₃**), 19.17 (**-Si(CH₃)₃**), -5.49, -5.52 (**-Si(CH₃)₂**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -115.97 (d, $^2J_{\text{F,F}} = 244.5$ Hz), -117.69 (d, $^2J_{\text{F,F}} = 236.1$ Hz).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3221, 2954, 2931, 2858, 1759, 1723, 1674, 1625, 1557, 1488, 1440, 1387, 1313, 1212, 1195, 1126, 1098, 1062, 1001, 961, 830, 810, 779, 718, 670, 593.

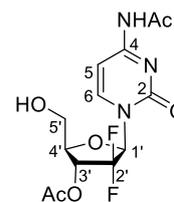
- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 462.187, gef.: 462.194 [M+H]⁺.

Synthese von 3'-O-Acetyl-2',2'-difluordesoxycytidin (**134**)

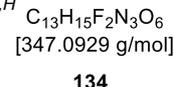
Die Synthese erfolgte nach **AAV 5**. 200 mg (0.434 mmol, 1.00 Äquiv.) 3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2',2'-difluordesoxycytidin (**135**) wurden in 6 mL Dichlormethan gelöst und mit 0.42 mL (420 mg, 2.60 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt.

Ausbeute: 143 mg (0.412 mmol, 95%) eines weißen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1 v:v): 0.79.



- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.27 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-6**), 7.49 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-5**), 6.34 (t, $^3J_{\text{H,F}} = 8.1$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.50 – 5.42 (m, 1H, **H-3'**), 4.27 – 4.21 (m, 1H, **H-4'**), 3.95 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 1H, **H_a-5'**), 3.79 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, 1H, **H_b-5'**), 2.19 (s, 3H, **-OAc**), 2.18 (s, 3H, **-N(H)Ac**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.08 (**q-N(H)Ac**), 170.70 (**q-OAc**), 164.95 (**C-4**), 157.53 (**C-2**), 146.31 (**C-6**), 122.84 (**C-2'**), 98.33 (**C-5**), 81.51 (**C-1'**), 81.49 (**C-4'**), 71.10 (dd, $^2J_{\text{C,F}} = 33.3$, 14.9 Hz, **C-3'**), 60.60 (**C-5'**), 24.57 (**-OAc**), 20.15 (**-N(H)Ac**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -115.80 (d, $^2J_{\text{F,F}} = 246.0$ Hz), -118.10 (d, $^2J_{\text{F,F}} = 238.1$ Hz).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3454, 3320, 1754, 1701, 1650, 1554, 1486, 1428, 1388, 1318, 1260, 1219, 1193, 1125, 1106, 1074, 1060, 998, 821, 785, 597, 539.

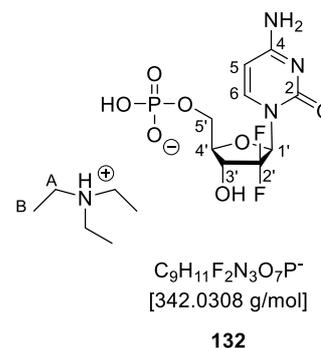
- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 348.100, gef.: 348.101 [M+H]⁺.

Synthese von 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-monophosphat (132)

Die Synthese erfolgte nach **AAV 6**. 1.00 g (2.88 mmol, 1.00 Äquiv.) 3'-O-Acetyl-2',2'-difluordesoxycytidin (**134**) wurde in 36 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 2.25 g (4.32 mmol, 1.50 Äquiv.) Bis-O-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (**76**) in 2 mL Dichlormethan und 13.8 mL (408 mg, 3.46 mmol, 1.20 Äquiv.) DCI ($c = 0.25$ M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte durch die Zugabe von 0.79 mL (389 mg, 4.32 mmol, 1.50 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid ($c = 5.50$ M in *n*-Decan). Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch automatisierte Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 0-10% Vol., 0-35 min, Flussrate 20 mL/min). Das geschützte Monophosphat **136** wurde in 20 mL einer Methanol/Triethylamin-Lösung (1:1 v:v) gelöst. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden 10 mL H₂O zugegeben.

Ausbeute: 232 mg (0.677 mmol, 24%) eines weißen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 7.95 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H-6**), 6.26 – 6.20 (m, 1H, **H-1'**), 5.98 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H-5**), 4.36 (td, ³J_{H,H} = 12.6, 8.6 Hz, 1H, **H-4'**), 4.24 (d, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, 1H, **H_a-5'**), 4.12 (ddd, ²J_{H,H} = 12.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.6, 2.5 Hz, 1H, **H_b-5'**), 3.99 (dd, ³J_{H,H} = 8.6, 2.0 Hz, 1H, **H-3'**), 3.20 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 6H, **H-A**), 1.31 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 9H, **H-B**).



- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 167.76 (**C-2**), 158.00 (**C-4**), 142.55 (**C-6**), 119.79 (**C-2'**), 96.68 (**C-5**), 85.99 (**C-1'**), 80.95 (**C-3'**), 68.47 (**C-4'**), 61.54 (d, ²J_{C,P} = 4.5 Hz, **C-5'**), 47.83 (**C-A**), 9.19 (**C-B**).

- ¹⁹F-NMR: δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -119.76 (d, ²J_{F,F} = 120.9 Hz), -120.24 (d, ²J_{F,F} = 244.7 Hz).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): 0.79.

- IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3079, 2992, 1646, 1488, 1399, 1198, 1134, 1043, 920, 834, 784, 731, 642, 594, 512, 466.

- HRMS: (ESI⁻, m/z): ber.: 342.031, gef.: 342.023 [M]⁻.

Synthese von 2',2'-Difluordesoxycytidinmonophosphat (132) via Sowa & Ouchi

Die Synthese erfolgte unter Stickstoff als Inertgas. 0.20 ml (321 mg, 2.09 mmol, 2.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid wurden in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit 24 μ L (24.0 mg, 1.33 mmol, 1.40 Äquiv.) H₂O und tropfenweise mit 0.18 mL (180 mg, 2.28 mmol, 2.40 Äquiv.) Pyridin versetzt. Die erhaltene Lösung wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt und mit 250 mg (0.950 mmol, 1.00 Äquiv.) Gemcitabin (**2**) und 1.65 mL (1.23 g, 9.50 mmol, 10.0 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde Eis für die Hydrolyse zugegeben und eine Stunde weitergerührt. Es wurde festes Ammoniumhydrogencarbonat hinzugefügt und das Lösungsmittel entfernt. Es folgte eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-50% Vol., 0-35 min, Flussrate 20 mL/min). Es wurde das Edukt Gemcitabin (**2**) reisoliert.

Synthese von 2',2'-Difluordesoxycytidinmonophosphat (**132**) via YOSHIKAWA-REAKTION

Die Synthese erfolgte unter Stickstoff als Inertgas. 500 mg (1.90 mmol, 1.00 Äquiv.) Gemcitabin (**2**) und 815 mg (3.80 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden 30 min im Vakuum getrocknet und dann in 11 mL Trimethylphosphat gelöst. Bei -15 °C erfolgte die Zugabe von 0.21 mL (2.28 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei -15 °C gerührt und dann mit TEAB-Puffer (0.05 M) versetzt. Anschließend wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es folgte eine automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel (TEAB-Puffer (0.05 M)/CH₃CN, 0-100% Vol., 0-25 min, Flussrate 20 mL/min).

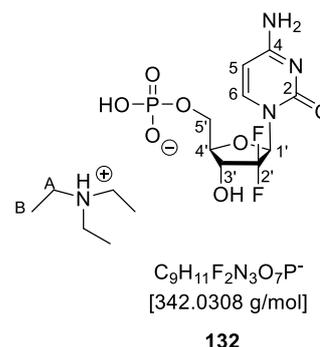
Ausbeute: 143 mg (0.417 mmol, 22%) eines weißen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 7.98 (d, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, **H-6**), 6.24 (dd, ³J_{H,F} = 13.8, 6.7 Hz, 1H, **H-1'**), 5.98 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H-5**), 4.38 (dd, ³J_{H,H} = 12.5 Hz, 1H, **H-4'**), 4.23 (d, ²J_{H,H} = 10.3 Hz, 1H, **H_a-5'**), 4.17 – 4.08 (m, 1H, **H_b-5'**), 4.04 – 3.95 (m, 1H, **H-3'**), 2.91 (d, ³J_{H,H} = 3.8 Hz, 6H, **H-A**), 1.19 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 9H, **H-B**).

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 167.76 (**C-2**), 158.00 (**C-4**), 142.55 (**C-6**), 119.79 (**C-2'**), 96.68 (**C-5**), 85.99 (**C-1'**), 80.95 (**C-3'**), 68.47 (d, ³J_{C,P} = 4.3 Hz, **C-4'**), 62.97 (**C-5'**), 47.83 (**C-A**), 9.19 (**C-B**).

- ¹⁹F-NMR: δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -119.76 (d, ²J_{F,F} = 120.9 Hz), -120.24 (d, ²J_{F,F} = 244.7 Hz).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): 1.37.



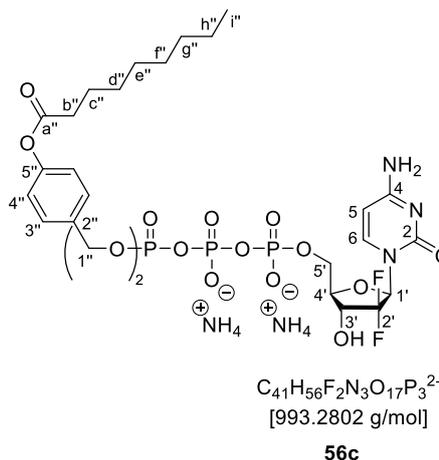
7.2.14 Synthese der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-2',2'-Difluordesoxycytidintriphosphat als Ammoniumsalz (**56c**)

Die Synthese des Pyrophosphats **138c** erfolgte nach **AAV 7**. 300 mg (0.548 mmol, 1.00 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)phosphonat (**137c**) wurden in 9 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 146 mg (1.10 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 3.40 mL (1.37 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 300 mg (0.448 mmol, 82%)). Die Synthese der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindung **56c** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.32 mL (471 mg, 2.24 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.50 mL (363 mg, 3.59 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.31 mL (227 mg, 2.24 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.11 mL (110.4 mg, 1.34 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 4 mL abs. DMF hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 98.7 mg (0.289 mmol, 0.64 Äquiv.) 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-monophosphat (**132**) in 4 mL DMF zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 69.1 mg (69.5 μmol , 24%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d_4): 8.13 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$, 2.8 Hz, 1H, **H-6**), 7.40 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$, 3.9 Hz, 4H, **H-4''**), 7.04 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$, 2.2 Hz, 4H, **H-3''**), 6.20 – 6.15 (m, 1H, **H-1'**), 6.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1H, **H-5**), 5.17 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$, 3.5 Hz, 1H, **H-3'**), 4.51 (dd, $^3J_{\text{H,F}} = 21.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 10.1$ Hz, 1H, **H-1''**), 4.44 – 4.29 (m, 2H, **H-5'**), 4.00 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 10.7$ Hz, 1H, **H-4'**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b''**), 1.77 – 1.68 (m, 4H, **H-c''**), 1.47 – 1.31 (m, 20H, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**), 0.91 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **H-i''**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d_4): 173.79 (**C-a''**), 163.98 (**C-4**), 152.37 (**C-2**), 152.06 (**C-5''**), 143.17 (**C-2''**), 137.97 (**C-6**), 130.63 (**C-4''**), 122.90 (**C-3''**), 100.4 (**C-2'**), 96.37 (**C-5**), 85.07 (**C-1'**), 81.20 (**C-4'**), 70.38 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 4.5$ Hz, **C-1''**), 68.76 (**C-3'**), 61.54 (**C-5'**), 35.03 (**C-b''**), 33.01 (**C-c''**), 30.40, 30.31, 30.19, 25.97, 23.72, 20.85 (**C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**), 14.44 (**C-i''**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d_4): -119.69 – -119.77 (m), -120.17 (s).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d_4): -11.88 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.4$ Hz, **P- α**), -13.37 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.2$ Hz, **P- γ**), -23.90 – -24.19 (m, **P- β**).

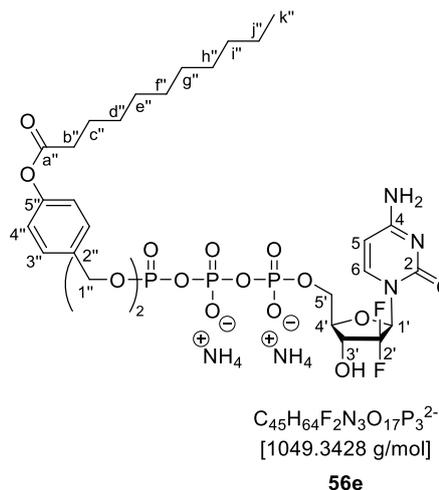
- **HRMS:** (MALDI, m/z): ber.: 994.287, gef.: 993.995 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-2',2'-Difluordesoxycytidintriphosphat als Ammoniumsalz (**56e**)

Die Synthese des Pyrophosphats **138e** erfolgte nach **AAV 7**. 300 mg (0.476 mmol, 1.00 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat (**137e**) wurden in 8 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 127 mg (0.952 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 2.98 mL (1.19 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 300 mg (0.414 mmol, 87%)). Die Synthese der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindung **56e** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.29 mL (434 mg, 2.07 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.46 mL (335 mg, 3.31 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.29 mL (209 mg, 2.07 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.10 mL (102 mg, 1.24 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 4 mL abs. DMF hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 75 mg (0.219 mmol, 0.64 Äquiv.) 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-monophosphat (**132**) in 4 mL DMF zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 79.3 mg (75.6 μmol , 35%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d_4): 8.19 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, **H-6**), 7.40 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5, 4.4$ Hz, 4H, **H-4''**), 7.04 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6, 2.4$ Hz, 4H, **H-3''**), 6.22 – 6.10 (m, 2H, **H-5**, **H-1'**), 5.17 (dd, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2$ Hz, 4H, **H-1''**), 4.52 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 13.2, 8.9$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.40 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 10.1$ Hz, 1H, **H_a-5'**), 4.34 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1, 1.8$ Hz, 1H, **H_b-5'**), 4.02 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8, 2.0$ Hz, 1H, **H-4'**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b''**), 1.79 – 1.69 (m, 4H, **H-c''**), 1.69 – 1.60 (m, 4H, **H-d''**), 1.48 – 1.30 (m, 24H, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **H-k''**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d_4): 173.65 (**C-a''**), 161.97 (**C-4**), 152.30 (**C-2**), 150.06 (**C-5''**), 144.75 (**C-2''**), 135.97 (**C-6**), 130.51 (**C-4''**), 122.83 (**C-3''**), 99.1 (**C-2'**), 95.00 (**C-5**), 85.74 (**C-1'**), 80.24 (**C-4'**), 70.38 (d, $^2J_{\text{H,P}} = 4.5$ Hz, **C-1''**), 69.39 (**C-3'**), 60.56 (**C-5'**), 35.04 (**C-b''**), 33.08 (**C-c''**), 30.71, 30.64, 30.46, 30.44, 30.19, 25.98, 23.74 (**C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**), 14.45 (**C-k''**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d_4): -120.36 (s), -120.72 – -120.87 (m).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d_4): -11.96 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.5$ Hz, **P- α**), -13.45 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.5$ Hz, **P- γ**), -24.04 – -24.33 (m, **P- β**).

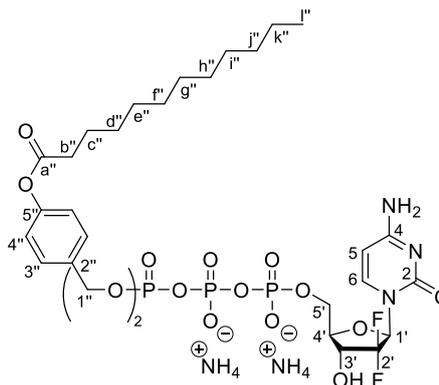
- **HRMS:** (MALDI, m/z): ber.: 1050.350, gef.: 1050.030 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-2',2'-Difluordesoxycytidintriphosphat als Ammoniumsalz (**56f**)

Die Synthese des Pyrophosphats **138f** erfolgte nach **AAV 7**. 300 mg (0.456 mmol, 1.00 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat (**137f**) wurden in 7 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 122 mg (0.911 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 2.84 mL (1.14 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 300 mg (0.398 mmol, 87%)). Die Synthese der Gemcitabin-TriPPPro-Verbindung **56f** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 4 mL Acetonitril gelöst und mit 0.28 mL (418 mg, 1.99 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.44 mL (322 mg, 3.19 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.28 mL (201 mg, 1.99 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.10 mL (98.1 mg, 1.19 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 4 mL abs. DMF hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 95.3 mg (0.279 mmol, 0.7 Äquiv.) 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-monophosphat (**132**) in 4 mL DMF zugegeben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 52.7 mg (48.9 μmol , 18%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d_4): 8.20 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1H, **H-6**), 7.41 – 7.36 (m, 4H, **H-4''**), 7.02 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$, 2.4 Hz, 4H, **H-3''**), 6.14 (m, 2H, **H-5**, **H-1'**), 5.16 (dd, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2$, 3.8 Hz, 4H, **H-1''**), 4.57 – 4.47 (m, 1H, **H-3'**), 4.43 – 4.30 (m, 2H, **H-5'**), 4.00 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.9$, 1.9 Hz, 1H, **H-4'**), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b''**), 1.78 – 1.67 (m, 4H, **H-c''**), 1.49 – 1.29 (m, 32H, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**, **H-k''**), 0.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **H-l''**).



$\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$
[1077.3741 g/mol]

56f

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d_4): 173.26 (**C-a''**), 163.97 (**C-4**), 152.36 (**C-2**), 150.28 (**C-5''**), 143.40 (**C-2''**), 138.35 (**C-6**), 130.53 (**C-4''**), 122.82 (**C-3''**), 99.7 (**C-2'**), 96.70 (**C-5**), 85.39 (**C-1'**), 81.62 (**C-4'**), 70.34 (**C-1''**), 68.66 (**C-3'**), 63.41 (**C-5'**), 35.04 (**C-b''**), 33.08 (**C-c''**), 30.75, 30.63, 30.49, 30.44, 30.19, 25.98, 23.74 (**C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**, **C-k''**), 14.45 (**C-l''**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d_4): -119.89 – -119.94 (m), -120.29 (s).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d_4): -11.97 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.8$ Hz, **P- α**), -13.43 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.2$ Hz, **P- γ**), -24.17 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 19.0$ Hz, **P- β**).

- **HRMS:** (MALDI, m/z): ber.: 1078.381, gef.: 1078.058 [M].

7.2.15 Synthese des Gemcitabintriphosphats

Synthese von 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-triphosphat (**61**)

Unter Stickstoffschutzgasatmosphäre wurden 6.91 mL (3.33 g, 3.46 mmol, 4.00 Äquiv.) Trimetaphosphat ($c = 0.5$ M in Pyridin) mit 436 mg (3.89 mmol, 4.50 Äquiv.) DABCO und 699 mg (3.20 mmol, 3.70 Äquiv.) Methansulfonylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Minute bei Raumtemperatur gerührt, dann wurden 300 mg (0.864 mmol, 1.00 Äquiv.) 3'-O-Acetyl-2',2'-difluordesoxycytidin (**137**) zugegeben. Anschließend wurde vier Minuten bei Raumtemperatur gerührt, 572 mg (3.88 mmol, 4.50 Äquiv.) Phthalimid zugegeben und erneut 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 60 mL Triethylammoniumacetatpuffer versetzt und dreimal mit 40 mL Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in 10 mL Wasser gelöst, mit 22 mL Methanol und 3 mL Triethylamin versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und es schlossen sich mehrfache automatisierte Säulenchromatographien an RP18-Kieselgel an ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min). Das Produkt wurde dabei nur in Spuren erhalten, hauptsächlich kam es zur Hydrolyse des Monophosphats **132** zum Gemcitabin (**2**).

Synthese von von 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-triphosphat (61)

100 mg (0.380 mmol, 1.00 Äquiv.) Gemcitabin (**2**) und 163 mg (0.760 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden über Nacht unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden sie unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 2 mL Trimethylphosphat gelöst und bei -20 °C mit 42.0 µL (69.9 mg, 0.456 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 90 Minuten bei -20 °C gerührt. Die Umsetzung des Nucleosids wurde durch Reaktionskontrolle an der HPLC verfolgt (Methode B). Dann wurde eine auf -20 °C gekühlte Lösung aus 2.00 mL (519 mg, 0.950 mmol, 2.50 Äquiv.) Tributylammoniumpyrophosphat (c = 0.50 M in Acetonitril) und 0.54 mL (423 mg, 2.28 mmol, 6.00 Äquiv.) Tributylamin zugegeben und zwei Stunden bei -20 °C gerührt. Die Bildung des Triphosphats wurde durch Reaktionskontrolle an der HPLC verfolgt. Im Anschluss wurden bei Raumtemperatur TEAB-Puffer hinzugegeben und 45 Minuten gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung dreimal mit Dichlormethan, die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen eingengt. Es folgten mehrere automatisierte Sephadexsäulen (H₂O/TEAB-Puffer (1M), 0-100% Vol., 55 min, Flussrate 12 mL/min) sowie mehrere automatisierte Säulenchromatographien an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min) für die Reinigung des Produkts.

Ausbeute: 33.4 mg (66.8 µmol, 18%) eines weißen, fluffigen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d₄): 8.00 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H-6**), 6.23 (t, ³J_{H,F} = 7.0 Hz, 1H, **H-1'**), 6.11 (m, 1H, **H-5**), 4.52 (td, ³J_{H,H} = 13.2, 8.9 Hz, 1H, **H-3'**), 4.43 – 4.33 (m, 2H, **H-5'**), 3.99 (dd, ³J_{H,H} = 9.0, 2.2 Hz, 1H, **H-4'**), 3.20 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 12H, **H-A**), 1.31 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 18H, **H-B**).

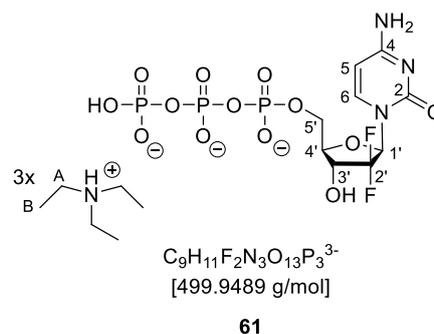
- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d₄): 167.03 (**C-4**), 157.10 (**C-2**), 148.28 (**C-6**), 123.69 (**C-2'**), 109.35 (**C-5**), 86.19 (**C-1'**), 81.01 (**C-4'**), 77.18 (**C-3'**), 58.93 (**C-5'**), 47.52 (**C-A**), 9.12 (**C-B**).

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d₄): -120.00 – -120.03 (m).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d₄): -10.32 (d, ²J_{P,P} = 20.7 Hz), -11.44 (d, ²J_{P,P} = 20.9 Hz), -23.51 – -23.81 (m).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3062, 2988, 2953, 2916, 2849, 1698, 1655, 1551, 1496, 1468, 1395, 1313, 1236, 1198, 1166, 1137, 1074, 1040, 698, 639, 472, 449.

- **HRMS:** (ESI⁻; m/z): ber.: 501.963, gef.: 501.958 [M]⁻.

**7.2.16 Synthese des Gemcitabindiphosphats****Synthese von 2',2'-Difluordesoxycytidin-5'-diphosphat (59)**

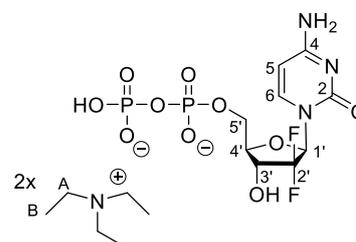
300 mg (1.14 mmol, 1.00 Äquiv.) Gemcitabin (**2**) und 489 mg (2.28 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden eine Stunde im Vakuum getrocknet. Die Reaktion erfolgte anschließend unter Stickstoffschutzgasatmosphäre. Gemcitabin und Protonenschwamm wurden in 6.3 mL Trimethylphosphat gelöst und bei -15 °C mit 0.13 mL (210 mg, 1.37 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid

versetzt, anschließend wurde die Reaktionslösung 25 Minuten bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Es folgte die Zugabe von 7.13 mL (968 mg, 2.85 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetrabutylammoniumphosphat ($c = 0.40\text{ M}$ in Acetonitril) und 1.63 mL (1.27 g, 6.84 mmol, 6.00 Äquiv.) Tributylamin. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur TEAB-Puffer (1M) zugegeben und 45 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Dichlormethan und die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen, anschließend wurden die vereinigten wässrigen Phasen eingeengt. Es folgten mehrfache automatisierte, chromatographische Reinigungsschritte über Sephadexsäulen ($\text{H}_2\text{O}/\text{TEAB-Puffer}$ (1M), 0-100% Vol., 55 min, Flussrate 12 mL/min) und über RP18-Kieselgel ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: 134.7 mg (0.320 mmol, 28%) eines weißen Feststoffs.

Nebenprodukt Gemcitabintriphosphat: 26.5 mg (53.0 μmol , 5%) eines weißen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-d_4): 7.97 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6\text{ Hz}$, 1H, **H-6**), 6.25 – 6.19 (m, 1H, **H-1'**), 6.05 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6\text{ Hz}$, 1H, **H-5**), 4.49 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 13.3, 8.9\text{ Hz}$, 1H, **H-3'**), 4.37 – 4.29 (m, 2H, **H-5'**), 3.99 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.9, 2.1\text{ Hz}$, 1H, **H-4'**), 3.19 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3\text{ Hz}$, 12H, **H-A**), 1.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3\text{ Hz}$, 18H, **H-B**).



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}_2^{2-}$
[420.9899 g/mol]

59

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-d_4): 166.99 (**C-4**), 156.99 (**C-2**), 142.74 (**C-6**), 125.89 (**C-2'**), 96.75 (**C-5**), 85.77 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 31.5\text{ Hz}$, **C-1'**), 81.02 (t, $^3J_{\text{C,F}} = 12.9\text{ Hz}$, **C-4'**), 69.85 – 69.07 (m, **C-3'**), 63.69 (**C-5'**), 47.52 (**C-A**), 9.11 (**C-B**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH-d_4): -119.52 (dd, $^1J_{\text{F,F}} = 168.7, ^3J_{\text{H,F}} = 10.6\text{ Hz}$), -120.09 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 12.2\text{ Hz}$).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-d_4): -10.09 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.4\text{ Hz}$), -11.18 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.4\text{ Hz}$).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3353, 2988, 2690, 2501, 1650, 1491, 1397, 1229, 1079, 981, 918, 837, 802, 762, 643, 594, 512.

- **HRMS**: (ESI $^-$, m/z): ber.: 491.974, gef.: 491.962 [$\text{M}+3\text{Na}$] $^+$.

7.2.17 C18Gem-TriPPPro-Verbindung

Synthese von 3',5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2',2'-difluordesoxycytidin (148)

Unter Stickstoffschutzgasatmosphäre wurden 1.00 g (3.80 mmol, 1.00 Äquiv.) Gemcitabin (**2**) in 19 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 1.43 g (9.50 mmol, 2.50 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und 776 mg (11.4 mmol, 3.00 Äquiv.) Imidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene Feststoff aus Ethylacetat umkristallisiert. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v:v).

Ausbeute: 1.72 g (3.49 mmol, 92%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert 0.87 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2 v/v).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, CDCl_3): 7.69 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **H-6**), 6.33 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 10.7$, 4.3 Hz, 1H, **H-1'**), 5.68 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **H-5**), 4.39 – 4.23 (m, 1H, **H-3'**), 3.98 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$ Hz, 1H, **H_a-5'**), 3.89 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, **H-4'**), 3.79 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 1H, **H_b-5'**), 0.94 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.90 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.11 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 12H, **-Si(CH₃)₂**).



- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 165.63 (**C-4**), 155.52 (**C-2**), 141.34 (**C-6**), 122.18 (**C-2'**), 94.57 (**C-5**), 84.40 (dd, $^2J_{\text{C,F}} = 40.7$, 22.8 Hz, **C-1'**), 81.12 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 8.9$ Hz, **C-4'**), 70.50 – 69.50 (m, **C-3'**), 60.26 (**C-5'**), 26.00, 25.84, 25.79, 25.68 (**-SiC(CH₃)₃**), -2.80, -3.43 (**-SiC(CH₃)₃**), -4.61, -5.16, -5.32, -5.35 (**-Si(CH₃)₂**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, CDCl_3): -116.10 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 12.5$ Hz), -117.28 (s).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3322, 3122, 2954, 2930, 2896, 2858, 1637, 1489, 1472, 1402, 1363, 1286, 1253, 1208, 1148, 1088, 955, 858, 833, 777, 716, 671, 595.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 492.252, gef.: 492.259 [M+H]⁺.

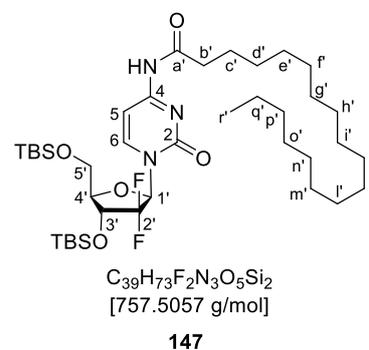
Synthese von *N*-Stearamid-3',5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2',2'-difluorodesoxycytidin (**147**)

1.70 g (3.46 mmol, 1.00 Äquiv.) 3',5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2',2'-Difluorodesoxycytidin (**148**) wurden unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 35 mL abs. Dichlormethan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2.10 g (3.81 mmol, 1.10 Äquiv.) Stearinsäureanhydrid und 0.71 mL (537 mg, 4.15 mmol, 1.20 Äquiv.) abs. DIPEA. Die Reaktionsmischung wurde kurz auf 50 °C erwärmt, damit sich die Feststoffe vollständig lösen. Anschließend wurde 26 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es erfolgten mehrere säulenchromatographische Reinigungen an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1 v:v und PE/EE 1:1 v:v).

Ausbeute: 1.67 g (2.19 mmol, 64%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert 0.77 (PE/EE 1:1 v/v).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, CDCl_3): 8.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-6**), 7.44 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **H-5**), 6.33 (dd, $^3J_{\text{H,F}} = 10.3$, 3.5 Hz, 1H, **H-1'**), 4.33 (td, $^3J_{\text{H,F}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 3.98 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 37.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.0$ Hz, 1H, **H_a-5'**), 3.81 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 11.9$, 1.9 Hz, 1H, **H-4'**), 2.43 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 10.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **H_b-5'**), 2.35 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.73 – 1.62 (m, 4H, **H-c'**, **H-d'**), 1.39 – 1.20 (m, 26H, **H-6**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.95 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.90 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3H, **H-r'**) 0.12 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$, 7.9 Hz, 12H, **-Si(CH₃)₂**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 173.54 (**C-a'**), 162.81 (**C-4**), 148.95 (**C-2**), 144.54 (**C-6**), 122.97 (**C-2'**), 96.83 (**C-5**), 84.50 (**C-1'**), 81.66 (**C-4'**), 70.50 (**C-3'**), 60.13 (**C-5'**), 37.69 (**C-b'**), 32.08, 29.85, 29.81, 29.77, 29.75, 29.72, 29.63, 29.58, 29.55, 29.51, 29.44, 29.34, 29.30, 29.17, 29.02, 25.99, 25.65, 22.84 (**C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 18.35 (**-SiC(CH₃)₃**), 18.14 (**-SiC(CH₃)₃**), 14.24 (**C-r'**), -4.63, -5.16, -5.31, -5.32 (**-Si(CH₃)₂**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, CDCl_3): -115.76 – -116.32 (m), -117.14 – -117.69 (m).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 2954, 2915, 2848, 1698, 1657, 1623, 1552, 1496, 1470, 1427, 1392, 1315, 1273, 1254, 1197, 1137, 1086, 837, 816, 782, 719.

- **HRMS**: (ESI⁺, m/z): ber.: 644.426, gef.: 644.429 [M-TBS+H⁺]⁺; ber.: 490.237, gef.: 492.250 [M-C(O)C₁₇H₃₅]⁺.

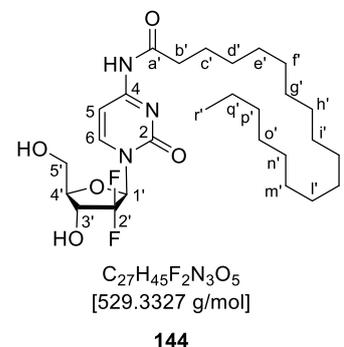
Synthese von *N*-Stearamid-2',2'-difluordesoxycytidin (**144**)

1.60 g (2.11 mmol, 1.00 Äquiv.) *N*-Stearamid-3',5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2',2'-difluordesoxycytidin (**147**) wurden unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 23 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 2.75 mL (2.72 g, 16.9 mmol, 8.00 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Nach 27 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v:v) gereinigt.

Ausbeute: 1.08 g (2.04 mmol, 96%) eines weißen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert 0.61 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 v/v).

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, DMSO-d_6): 10.97 (s, 1H, **-NH**), 8.23 (d, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, 1H, **H-6**), 7.28 (d, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, 1H, **H-5**), 6.31 (d, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 1H, **3'-OH**), 6.17 (t, $^3J_{H,F} = 7.4$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.29 (t, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, 1H, **5'-OH**), 4.24 – 4.13 (m, 1H, **H-3'**), 3.91 – 3.85 (m, 1H, **H-4'**), 3.80 (dd, $^2J_{H,H} = 12.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.5$ Hz, 1H, **H_a-5'**), 3.65 (ddd, $^2J_{H,H} = 12.7$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.8$, 3.6 Hz, 1H, **H_b-5'**), 2.18 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b'**), 1.58 – 1.43 (m, 2H, **H-c'**), 1.23 (s, 28H, **H-d'**, **H-e'**, **H-f'**, **H-g'**, **H-h'**, **H-i'**, **H-j'**, **H-k'**, **H-l'**, **H-m'**, **H-n'**, **H-o'**, **H-p'**, **H-q'**), 0.85 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **H-r'**).



- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, DMSO-d_6): 179.54 (**C-a'**), 162.8 (**C-4**), 154.28 (**C-2**), 143.9 (**C-6**), 122.23 (**C-2'**), 95.88 (**C-5**), 83.4 (**C-1'**), 79.45 (**C-4'**), 68.0 (**C-3'**), 58.72 (**C-5'**), 33.66 (**C-b'**), 31.29, 29.01, 28.99, 28.90, 28.84, 28.73, 28.70, 28.54, 28.43, 24.49, 24.34, 22.09 (**C-c'**, **C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**, **C-n'**, **C-o'**, **C-p'**, **C-q'**), 13.96 (**C-r'**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, CDCl_3): -150.80 (d, $J = 29.0$ Hz).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3349, 2954, 2915, 2848, 1698, 1656, 1552, 1496, 1470, 1426, 1394, 1315, 1275, 1255, 1238, 1195, 1136, 1124, 1073, 1034, 939, 890, 817, 787, 719, 687, 640, 603.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 530.340, gef.: 530.339 [M+H]⁺.

Synthese des *N*-Stearamid-2',2'-difluordesoxycytidin-5'-monophosphats (145)

500 mg (0.945 mmol, 1.00 Äquiv.) *N*-Stearamid-2',2'-difluordesoxycytidin (**144**) und 405 mg (1.89 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden im Vakuum getrocknet und anschließend unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 5.2 mL Trimethylphosphat gelöst. Die Reaktionsmischung wurde auf -20 °C gekühlt und mit 0.10 mL (174 mg, 1.13 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2.5 Stunden bei -20 °C gerührt. Es erfolgte eine Reaktionskontrolle via HPLC (Methode B) nach 30 Minuten und zwei Stunden, dabei konnte kein Umsatz festgestellt werden.

7.2.18 Synthese einer 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung

Synthese von 4-Aminopyrimidin-2(1*H*)-on (151)

1.90 g (22.6 mmol, 1.00 Äquiv.) Dicyandiamid (**153**) wurden in 2.6 mL (3.12 g, 67.8 mmol, 3.00 Äquiv.) Ameisensäure (**154**) suspendiert und 25 Minuten auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Der erhaltene Feststoff wurde mit 5 mL 2-Propanol aufgeschlämmt, filtriert und getrocknet. Im Anschluss wurde der Feststoff in 5 mL Methanol suspendiert und mit 366 mg (6.78 mmol, 0.30 Äquiv.) Natriummethanolat und 3.89 mL (3.48 g, 29.2 mmol, 1.29 Äquiv.) DMF-DMA versetzt. Nachdem die erhaltene Reaktionslösung 2.5 Stunden bei 50 °C gerührt wurde, wurden 10 mL H₂O (Milli-Q) zugegeben und der erhaltene Feststoff filtriert und getrocknet.

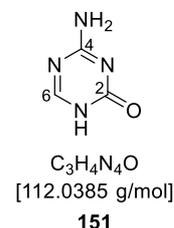
Ausbeute: 1.69 g (15.1 mmol, 67%) eines weißen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.38 (s, 1H, **NH**), 8.02 (s, 1H, **H-6**).

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 166.3 (**C-2**), 158.6 (**C-4**), 154.9 (**C-6**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3376, 3170, 2795, 2633, 1686, 1662, 1620, 1442, 1426, 1348, 1217, 1137, 982, 898, 812, 559, 450.

- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 113.042, gef.: 113.046 [M+H]⁺.



Synthese von 5-Azacytidin (7)

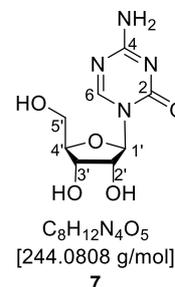
Unter Stickstoffschutzgasatmosphäre wurde 1.00 g (8.92 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Aminopyrimidin-2(1*H*)-on (**151**), 2.59 mL (2.02 g, 12.5 mmol, 1.4 Äquiv.) HMDS und 47 mg (0.357 mmol, 0.04 Äquiv.) Ammoniumsulfat in 28 mL abs. Acetonitril suspendiert und eine Stunde zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und zweimal mit abs. Ethylacetat coevaporiert. Der erhaltene Feststoff wurde in 44 mL abs. Ethylacetat suspendiert und bei 0 °C mit 3.12 g (9.82 mmol, 1.10 Äquiv.) β-D-Ribofuranose-1,2,3,5-tetraacetat und 0.87 mL (1.47 g, 9.82 mmol, 1.10 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäure versetzt. Nach 30 Minuten bei 50 °C wurde das Lösungsmittel entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 9 mL Dichlormethan gelöst, mit 1.8 mL HCl (1.2 M) versetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden von 7.5 mL K₂CO₃-Lösung (20%) zugegeben und 15 Minuten gerührt. Nach Phasentrennung und Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das

Lösungsmittel entfernt und zweimal mit abs. Methanol coevaporiert. Der erhaltene Feststoff wurde in 10 mL Methanol gelöst, mit 1 mL Triethylamin versetzt und 3.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde zur Reinigung aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 852 mg (3.49 mmol, 39%) eines weißen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert 0.13 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v).

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, DMSO-d₆): 8.58 (s, 1H, **H-6**), 7.51 (d, ² $J_{H,H}$ = 12.2 Hz, 2H, **NH₂**), 5.66 (d, ³ $J_{H,H}$ = 3.8 Hz, 1H; **H-1'**), 5.41 (d, ³ $J_{H,H}$ = 5.3 Hz, 1H, **2'-OH**), 5.11 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 5.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 5.1 Hz, 1H, **5'-OH**), 5.01 (d, ³ $J_{H,H}$ = 5.8 Hz, 1H, **3'-OH**), 4.08 (ddd, ³ $J_{H,H}$ = 4.8, 1H, **H-2'**), 4.00 (ddd, ³ $J_{H,H}$ = 5.8 Hz, 1H, **H-3'**), 3.85 (ddd, ³ $J_{H,H}$ = 5.7 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, 1H, **H-4'**), 3.69 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 12.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 5.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, 1H, **H-5'a**), 3.55 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 12.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 5.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, 1H, **H-5'b**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, DMSO-d₆): 165.8 (**C-2**), 156.3 (**C-6**), 153.2 (**C-4**), 89.3 (**C-1'**), 84.3 (**C-4'**), 73.9 (**C-2'**), 69.0 (**C-3'**), 60.1 (**C-5'**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3309, 3069, 1685, 1610, 1506, 1428, 1301, 1240, 1136, 1112, 1094, 1051, 987, 899, 853, 802, 706, 629, 579, 445.

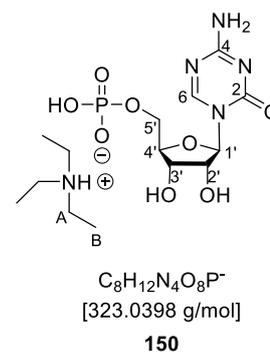
- **HRMS:** (ESI⁺, m/z): ber.: 245.084, gef.: 245.088 [M+H]⁺.

Synthese des 5-Azacytidin-5'-monophosphats (150)

258 mg (1.06 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Azacytidin (**7**) und 453 mg (2.11 mmol, 2.00 Äquiv.) Protonenschwamm wurden 30 Minuten unter Vakuum getrocknet und anschließend unter Stickstoffschutzgasatmosphäre in 5.87 mL Trimethylphosphat gelöst. Bei -10 °C wurden zu der Reaktionslösung 0.12 mL (194 mg, 1.27 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid gegeben und dann 30 Minuten bei -10 °C gerührt. Danach wurden 10 mL TEAB-Puffer hinzugefügt, es folgte 45-minütiges Rühren bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die wässrige Phase getrocknet. Zur Reinigung des Produkts folgten mehrfache automatisierte Säulenchromatographien an RP18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: 178 mg (0.419 mmol, 40%) eines farblosen Harzes.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, DMSO-d₆): 8.58 (s, 1H, **H-6**), 7.51 (d, ² $J_{H,H}$ = 12.2 Hz, 2H, **NH₂**), 5.66 (d, ³ $J_{H,H}$ = 3.8 Hz, 1H, **H-1'**), 4.07 (t, ³ $J_{H,H}$ = 4.6 Hz, 1H, **H-2'**), 4.00 (t, ² $J_{H,H}$ = 5.4 Hz, 1H, **H-3'**), 3.85 (dt, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 5.8 Hz, 1H, **H-4'**), 3.68 (dd, ² $J_{H,H}$ = 12.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, 1H, **H-5'a**), 3.55 (dd, ² $J_{H,H}$ = 12.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.1 Hz, 1H, **H-5'b**), 2.82 (q, ² $J_{H,H}$ = 7.2 Hz, 6H, **H-A**), 1.08 (t, ² $J_{H,H}$ = 7.2 Hz, 9H, **H-B**).



- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, DMSO-d₆): 165.8 (**C-2**), 156.3 (**C-6**), 153.2 (**C-4**), 89.3 (**C-1'**), 84.2 (**C-4'**), 73.9 (**C-2'**), 68.9 (**C-3'**), 60.1 (**C-5'**), 45.5 (**C-A**), 9.7 (**C-B**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, DMSO- d_6): 2.32.

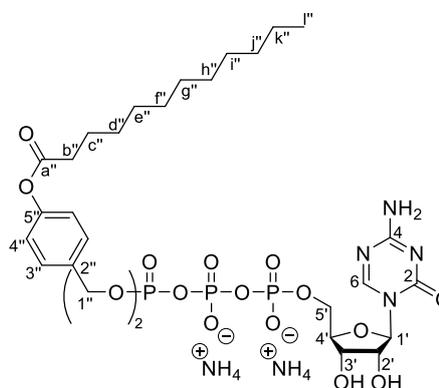
- **HRMS**: (ESI $^+$, m/z): ber.: 323.040, gef.: 322.951 [M].

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-5-Azacytidin-5'-triphosphat als Ammoniumsalz (57f)

Die Synthese des Pyrophosphats **138f** erfolgte nach **AAV 7**. 300 mg (0.456 mmol, 1.00 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat (**137f**) wurden in 7 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 122 mg (0.911 mmol, 2.00 Äquiv.) NCS und 2.84 mL (386 mg, 1.14 mmol, 2.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ($c = 0.4$ M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen umgesetzt (Ausbeute 385 mg (0.386 mmol, 85%)). Die Synthese der 5-Azacytidin-TriPPPro-Verbindung **57f** erfolgte gemäß **AAV 8**. Das zuvor dargestellte Pyrophosphat wurde für die Aktivierung in 3.5 mL abs. DMF gelöst und mit 0.27 mL (406 mg, 1.93 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.43 mL (313 mg, 3.09 mmol, 8.00 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Später wurden 0.27 mL (196 mg, 1.93 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.09 mL (95.0 mg, 1.16 mmol, 3.00 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 3.5 mL abs. DMF hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurden 140 mg (0.329 mmol, 0.85 Äquiv.) 5-Azacytidin-5'-monophosphat (**150**) in 3.5 mL abs. DMF zugegeben und 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es schlossen sich mehrere automatisierte Säulenchromatographien an RP18-Kieselgel an (H $_2$ O/CH $_3$ CN, 0-100% Vol., 30 min, Flussrate 20 mL/min), dabei kam es zur Zersetzung des Produkts.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.77 (s, 1H, **H-6**), 7.42–7.34 (m, 4H, **H-3''**), 7.08–7.01 (m, 4H, **H-4''**), 5.84 (d, $^3J_{H,H} = 3.1$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.21–5.11 (m, 4H, **H-1''**), 4.38–4.34 (m, 1H, **H-3'**), 4.33–4.25 (m, 2H, **H-5'**), 4.25–4.19 (m, 1H, **H-2'**), 4.18–4.13 (m, 1H, **H-4'**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b''**), 1.73 (p, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 4H, **H-c''**), 1.40–1.25 (m, 32H, **H-d''**, **H-e''**, **H-f''**, **H-g''**, **H-h''**, **H-i''**, **H-j''**, **H-k''**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **H-l''**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 130.5 (**C-6**), 122.8 (**C-4**), 35.0 (**C-b''**), 33.1, 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 26.0, 23.8 (**C-c''**, **C-d''**, **C-e''**, **C-f''**, **C-g''**, **C-h''**, **C-i''**, **C-j''**, **C-k''**), 14.4 (**C-l''**).



$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{P}_3^{2-}$
[753.1714 g/mol]

57f

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.47 (d, $^2J_{P,P} = 19.5$ Hz, P- α), -13.07 (d, $^2J_{P,P} = 16.3$ Hz, P- γ), -23.19 (t, $^2J_{P,P} = 17.5$ Hz, P- β).

- **HRMS**: (MALDI, m/z): ber.: 1059.386, gef.: 1059.122 [M+H] $^+$.

7.3 Hydrolysestudien

Für die Untersuchung des chemischen (PBS) sowie des enzymatischen (PLE, CEM/0 Zellextrakt) Hydrolyseverhaltens der dargestellten TriPPPro-Verbindungen sowie der Di- und Triphosphate, wurde zunächst von jeder Substanz eine 25 mM DMSO-Stammlösung angesetzt.

Für die Auswertung wurden die HPLC-Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 330 nm (BCNA, Fluoreszenz) bzw. 270 nm (5-FdU und Gemcitabin) verwendet. Die Integrale der entsprechenden Peaks wurden gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Aufgrund der geringen Konzentration kann eine Reaktion *pseudo*-erster Ordnung angenommen werden. Mithilfe des Kalkulationsprogramms Origin 2021 wurden exponentielle Ausgleichskurven ermittelt. Die Exponentialfunktion lässt sich dabei wie folgt beschreiben:

$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-kt}$$

$[A]_t$ = Konzentration zum Zeitpunkt t

$[A]_0$ = Anfangskonzentration

k = Geschwindigkeitskonstante

Aus der dadurch bestimmten Geschwindigkeitskonstante k wurde mit nachstehender Formel die Halbwertszeit $t_{1/2}$ bestimmt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

7.3.1 Hydrolysestudien in Phosphatpuffer (PBS) bei pH 7.3

Für die Hydrolysestudien in PBS-Puffer wurden 22 μL der Prodrugstammlösung (25 mM) in 300 μL Phosphatpuffer gelöst und mit 189 μL Reinstwasser (Milli-Q) und 89 μL DMSO versetzt. Die Inkubation erfolgte ohne die Verwendung eines internen Standards bei 37 °C im Thermomixer. Nach genau definierten Zeitpunkten wurden Aliquote (35 μL) der Hydrolyselösung entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Die Proben wurden einzeln aufgetaut und sofort über eine analytische RP18-HPLC (Methode A oder Methode B) analysiert, dafür wurden 30 μL der Probe injiziert.

7.3.2 Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase (PLE) in PBS

Für die Hydrolyse mit PLE in PBS-Puffer wurden zunächst 6 mM-Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen hergestellt. Anschließend wurden 40 μL der Stammlösung in 400 μL PBS-Puffer gelöst und mit 60 μL DMSO und 30 μL PLE-Lösung (100 U/mL) versetzt. Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard bei 37 °C im Thermomixer. An genau definierten Zeitpunkten wurden Aliquote (35 μL) der Hydrolyselösung entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Die Proben wurden einzeln aufgetaut und über eine analytische RP18-HPLC (Methode A oder Methode B) analysiert. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 30 μL .

7.3.3 Hydrolysestudien mit CEM/0-Zellextrakten

Die verwendeten Zellextrakte wurden von J. BALZARINI und D. SCHOLS, Katholieke Universiteit Leuven (Belgien), zur Verfügung gestellt. Für die Hydrolysen in CEM/0-Zellextrakten wurden zunächst 12.5 mM-Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen erstellt. Für die Hydrolyselösung wurden 607.1 μL des CEM/0-Zellextrakts und 121.4 μL Reinstwasser (Milli-Q) zusammengegeben und die Hydrolyse durch Zugabe von 58.3 μL der Probenstammlösung gestartet. Die Probe wurde nach kurzem Vortexen bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Es wurde zu genau definierten Zeitpunkten ein Aliquot (60 μL) entnommen, mit 120 μL Methanol versetzt, kurz gevortext und anschließend zehn Minuten auf Eis gelagert. Die Hydrolyseprobe wurde zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt und zehn Minuten bei 0 °C zentrifugiert (14 000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und durch einen Spritzenfilter (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 μm) filtriert. Die Proben wurden bis zur Analyse mittels analytischer RP-18-HPLC (Methode A oder Methode B) in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert, einzeln aufgetaut und direkt vermessen (Injektionsvolumen 60 μL).

7.4 Biologische Untersuchungen

7.4.1 Zellaufnahmestudien in CEM-SS-Zellen

Die Zellinkubationen wurden von DR. ILONA HAUBER, PROF. DR. THOMAS DOBNER und TINA MEYER am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in Hamburg durchgeführt. Dafür wurden CEM-SS-Zellen in im Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, pH 7.5, 10% fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamin) in T175-Zellkulturflaschen expandiert bis ca. 10^9 Zellen vorhanden waren. Die Zellen wurden in 20 mL des Zellkulturmediums aufgenommen und 30 Minuten, 60 Minuten oder drei Stunden mit einer Konzentration von 10 μM des Prodrugs inkubiert (37 °C, 5% CO_2 , 90% RH). Die Zellen wurden daraufhin zweimal intensiv mit PBS gewaschen, zentrifugiert, eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die erhaltene Waschlösung wurde vor der weiteren Analyse mittels RP18-HPLC (Methode A) über einen Spritzenfilter (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 μm) filtriert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 170 μL eines Methanol/Wasser-Gemisches (2:1 v:v, auf Eis gekühlt) suspendiert, zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt, zehn Minuten auf Eis gelagert und anschließend zehn Minuten zentrifugiert (14 000 rpm, 0 °C). Der Überstand wurde abgenommen und über einen Spritzenfilter (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 μm) filtriert. Beide Filtrate wurden mittels analytischer RP18-HPLC (Methode A) analysiert. Das Injektionsvolumen betrug 100 μL .

7.4.2 Zellaufnahmestudien in Krebszellen

Die Zellinkubationen in Krebszellen wurden von PROF. DR. UDO SCHUMACHER und SIMON REMUS am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für diese Zellaufnahmestudien wurden folgende Krebszelllinien verwendet: BxPC3, Paca-5061, H69AR-1, HCT116, HT29, SW620, HOS SKNSH, Mewo, MV3, Molm13, Ovar3, SKOV-3, PC3, UTSCC-2. Die Krebszellen wurden im Zellkulturmedium (RPMI-1640 für HT29, MV3, PC3, HOS SKNSH, UTSCC2, Molm13, Mewo, H69AR, BxPC3, HCT116, SW620 und Ovar3, TUM-Medium für Paca-5061 und McCoy-Medium für Skov3) in T175-Zellkulturflaschen expandiert. Es wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 10 mL Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37 °C 60 Minuten mit einer Konzentration von 10 μM inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 2 mL davon für die folgende Analytik eingefroren. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und fünf Minuten zentrifugiert (1 500 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Zellpellet in 5 mL PBS gelöst. Es erfolgte die Zellzahlbestimmung in der Neubauerkammer, danach wurde erneut fünf Minuten zentrifugiert

(1 500 rpm) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in PBS suspendiert, zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das erhaltene Zellpellet wurde sofort eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Vor der weiteren Analyse mittels RP18-HPLC (Methode A) wurde die erhaltene Waschlösung über einen Spritzenfilter (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 µm) filtriert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 170 µL eines Methanol/Wasser-Gemisches (2:1 v:v) suspendiert und zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt, zehn Minuten im Eis gelagert und anschließend zehn Minuten zentrifugiert (14 000 rpm, 0 °C). Der erhaltene Überstand wurde über einen Spritzenfilter (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 µm) filtriert und direkt mittels RP18-HPLC (Methode A) analysiert. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL.

7.4.3 Proliferationstests

Die Proliferationstests wurden von PROF. DR. UDO SCHUMACHER und SIMON REMUS am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand des XTT-basierten Assaykits der Firma Bohringer Mannheim. Alle Versuche erfolgten als Zwölfachbestimmung pro verwendeter Konzentration. Die Zellkultivierung erfolgte durch die Verwendung von Trypsin/EDTA und anschließender Überführung in ein 96-well plate. Die verwendeten Zellzahlen der Experimente betragen 4×10^4 /mL bei HCT116 bzw. 10×10^4 bei OvCar3, SKOV3, PaCa5061 und BxPC3. Die Zellen wurden 24 Stunden in Ruhe gelassen. Da Voruntersuchungen gezeigt haben, dass FBS (welches im Medium enthalten ist) die Testsubstanzen beeinflusst, wurde das FBS-haltige Medium entfernt. Es wurden 90 µL der Testsubstanz (in RPMI-, McCoys- oder FBS-freiem TUM-Medium) aufgetragen, zwei Stunden inkubiert und anschließend mit 10 µL bzw. 20 µL FBS versetzt. Nach drei Tagen Inkubationszeit wurden 50 µL XTT-Lösung zugegeben. Die Kontrollversuche wurden auf die gleiche Weise durchgeführt, allerdings wurde die Testsubstanz durch RPMI bzw. DMEM/F12 im Falle von Brustkrebszelllinien ersetzt. Nach sechs Stunden wurde die Absorption bei 450 nm am Dynatech MR 3.13 Microelisa Reader gemessen. Die Vergleichsprobe wurde für die Auswertung als hundertprozentiges Wachstum gewertet und im Vergleich dazu entspricht die Absorption der mit Testsubstanzen versetzten Zellen der Anzahl lebender Zellen.

9 LITERATURLISTE

- 1 A. Inkoom, N. Ndemazie, K. Affram, T. Smith, X. Zhu, P. Underwood, S. Krishnan, E. Ofori, B. Han, J. Trevino, E. Agyare, "Enhancing efficacy of gemcitabine in pancreatic patient-derived xenograft mouse models", *Int. J. Pharm.* **2020**, X2 100056, 1–3.
- 2 A. Z. Mirza, "Advancement in the development of heterocyclic nucleosides for the treatment of cancer - A review", *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2019**, 38, 836–857.
- 3 V. Arndt, S. Dahm, K. Kraywinkel, "Krebsprävalenz in Deutschland 2017", *Der Onkologe* **2021**, 27, 717–723.
- 4 *Zahl der Todesfälle im Jahr 2019 um 1,6 % gesunken*, [Chem. Rev. **2016**, 116, 14379–14455.](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html#:~:text=Im%20Jahr%202019%20verstarben%20in,Vorjahren%2C%20eine%20Herz%2D%2FKreislaufkrankung., zuletzt geprüft am: 9 September 2022.5 J. Shelton, X. Lu, J. A. Hollenbaugh, J. H. Cho, F. Amblard, R. F. Schinazi,)
- 6 U. Grönefeld, "Update Krebsforschung: Krebsentwicklung in Zahlen Krebs - Was ist das eigentlich?/Neue Krebstherapien Nationale Dekade gegen Krebs", dkfz, Heidelberg **2019**.
- 7 Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., "Krebs in Deutschland für 2017/2018", Berlin, 13. Auflage **2021**.
- 8 F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", *Ca. Cancer J. Clin.* **2018**, 68, 394–424.
- 9 Z. Chen, Y. Zheng, Y. Shi, Z. Cui, "Overcoming tumor cell chemoresistance using nanoparticles: lysosomes are beneficial for (stearoyl) gemcitabine-incorporated solid lipid nanoparticles", *Int. J. Nanomed.* **2018**, 13, 319–336.
- 10 a) B. Du, J. S. Shim, "Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer.", *Molecules* **2016**, 21, E965.; b) N. Jonckheere, N. Skrypek, I. Van Seuning, "Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs", *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1846, 142–151.;
- 11 J. Zhao, "Cancer stem cells and chemoresistance: the smartest survives the raid", *Pharmacol. Ther.* **2016**, 160, 145–158.
- 12 G. Kibria, H. Hatakeyama, H. Harashima, "Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system", *Arch. Pharm. Res.* **2014**, 37, 4–15.
- 13 C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, "Cancer drug resistance: an evolving paradigm", *Nat. Rev. Cancer* **2013**, 13, 714–726.
- 14 B. Ewald, D. Sampath, W. Plunkett, "Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death", *Oncogene* **2008**, 27, 6522–6537.
- 15 S. Forciniti, E. Dalla Pozza, M. R. Greco, T. M. Amaral Carvalho, B. Rolando, G. Ambrosini, C. A. Carmona-Carmona, R. Pacchiana, D. Di Molfetta, M. Donadelli, S. Arpicco, M. Palmieri, S. J. Reshkin, I. Dando, R. A. Cardone, "Extracellular Matrix Composition Modulates the Responsiveness of Differentiated and Stem Pancreatic Cancer Cells to Lipophilic Derivate of Gemcitabine", *Int. J. Mol.* **2021**, 22, 1–21.
- 16 L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet, "Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases", *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12, 447–464.
- 17 C. Périgaud, G. Gosselin, J. L. Imbach, "Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review", *Nucleosides and Nucleotides* **1992**, 11, 903–945.

- 18 A. R. Van Rompay, M. Johansson, A. Karlsson, "Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases", *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 189–198.
- 19 C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet, "Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment", *The Lancet Oncology* **2002**, *3*, 415–424.
- 20 D. Sampath, V. Ashutosh Rao, W. Plunkett, "Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs", *Oncogene* **2003**, *22*, 9063–9074.
- 21 a) P. Cano-Soldado, M. Pastor- Anglada, "Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition", *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 428–457.; b) G. Minuesa, I. Huber-Ruano, M. Pastor-Anglada, H. Koepsell, B. Clotet, J. Martinez-Picado, "Drug uptake transporters in antiretroviral therapy", *Pharmacol. Ther.* **2011**, *132*, 268–279.;
- 22 C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet, "Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies", *Leukemia* **2001**, *15*, 875–890.
- 23 D. D. Richman, "HIV chemotherapy", *Nature Reviews* **2001**, *410*, 995–1001.
- 24 C. J. McGinn, D. S. Shewach, T. S. Lawrence, "Radiosensitizing nucleosides", *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1193–1203.
- 25 a) Y. M. Rustum, R. A. Raymakers, "1-Beta-arabinofuranosylcytosine in therapy of leukemia: preclinical and clinical overview", *Pharmacol. Ther.* **1992**, *56*, 307–321.; b) H. A. Burris 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens, D. D. Von Hoff, "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial", *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 2403–2413.; c) S. B. Kaye, "Gemcitabine: current status of phase I and II trials", *J. Clin. Oncol.* **1994**, *12*, 1527–1531.;
- 26 T. S. A. Matsuda, "Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides", *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 105–111.
- 27 a) J. L. G. Juliusson, "Long-term survival following cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) therapy in previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia", *Ann. Oncol.* **1996**, *7*, 373–379.; b) J. M. Sorensen, D. A. Vena, A. Fallavollita, H. G. Chun, B. D. Cheson, "Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report", *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 458–465.; c) H. M. Bryson, E. M. Sorkin, "Cladribine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in haematological malignancies", *Drugs* **1993**, *46*, 872–894.; d) L. E. Robertson, Y. O. Huh, J. J. Butler, W. C. Pugh, C. Hirsch-Ginsberg, S. Stass, H. Kantarjian, M. J. Keating, "Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis", *Blood* **1992**, *80*, 29–36.; e) S. R. Ross, D. McTavish, D. Faulds, "Fludarabine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in malignancy", *Drugs* **1993**, *45*, 737–759.;
- 28 M. Guinan, C. Benckendorff, M. Smith, G. J. Miller, "Recent Advances in the Chemical Synthesis and Evaluation of Anticancer Nucleoside Analogues", *Molecules* **2020**, *25*, 2050.
- 29 J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, 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.
- 30 C. Meier, "Pro-Nucleotides - Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates", *Synlett* **1998**, 233–242.
- 31 N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, "Enzymatically Activated cycloSal-d4T-monophosphates: The Third Generation of cycloSal-Pronucleotides", *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658–1667.
- 32 J. Balzarini, "Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives", *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113–126.

- 33 C. Meier, C. Ducho, H. Jessen, D. Vukadinović-Tenter, J. Balzarini, "Second-Generation cycloSal-d4TMP Pronucleotides Bearing Esterase-Cleavable Sites — The "Trapping" Concept", *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 197–206.
- 34 Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, "Aryloxy Phosphoramidate Triesters: a Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells", *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779–1791.
- 35 T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, "The DiPPro Approach: Synthesis, Hydrolysis, and Antiviral Activity of Lipophilic d4T Diphosphate Prodrugs", *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762–775.
- 36 D. Farquhar, D. N. Srivastva, N. J. Kuttesch, P. P. Saunders, "Biologically reversible phosphate-protective groups", *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 324–325.
- 37 M. Arimilli, C. Kim, J. Dougherty, A. Mulato, R. Oliyai, J. P. Shaw, K. C. Cundy, N. Bischofberger, "Synthesis, in Vitro Biological Evaluation and Oral Bioavailability of 9-[2-(Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine (PMPA) Prodrugs", *Antiviral Chem. & Chemother.* **1997**, *8*, 557–564.
- 38 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(isopropoxyloxymethylcarbonyl)PMPA", *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 612–617.
- 39 L. Naesens, N. Bischofberger, P. Augustijns, P. Annaert, G. Van den Mooter, M. N. Arimilli, C. U. Kim, E. De Clercq, "Antiretroviral Efficacy and Pharmacokinetics of Oral Bis(isopropoxyloxycarbonyloxymethyl)9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)adenine in Mice", *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1568–1573.
- 40 F. Puech, G. Gosselin, I. Lefebvre, A. Pompon, A.-M. Aubertin, A. Kirn, J.-L. Imbach, "Intracellular delivery of nucleoside monophosphates through a reductase-mediated activation process", *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 155–174.
- 41 G. Valette, A. Pompon, J.-L. Girardet, L. Cappellacci, P. Franchetti, M. Grifantini, P. La Colla, A. G. Loi, C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, "Decomposition Pathways and in Vitro HIV Inhibitory Effects of Isodda Pronucleotides: Toward a Rational Approach for Intracellular Delivery of Nucleoside 5'-Monophosphates", *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1981–1990.
- 42 G. Gosselin, J.-L. Girardet, C. Périgaud, S. Benzaria, I. Lefebvre, N. Schlienger, A. Pompon, J.-L. Imbach, "New insights regarding the potential of the pronucleotide approach in antiviral chemotherapy", *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 195–208.
- 43 M. Lannuzel, D. Egron, J.-L. Imbach, G. Gosselin, C. Périgaud, "Synthesis of the tBuSATE Pronucleotide of AZT by Two Different Synthetic Approaches", *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18*, 1001–1002.
- 44 A. Routledge, I. Walker, S. Freeman, A. Hay, N. Mahmood, "Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of 4-Acyloxybenzyl bis(Nucleosid-5'-yl) Phosphates", *Nucleosides and Nucleotides* **1995**, *14*, 1545–1558.
- 45 A. Glazier, C. Kwong, J. Rose, R. Buckheit", *Antiviral Res.* **1992**, *17*, (Suppl. 1), 66.
- 46 A. Glazier, R. Buckheit, M. Yanachkova, I. Yanachkov, G. E. Wright", *Antiviral Res.* **1994**, *19*, (Suppl. 1), 57.
- 47 D. Vukadinović, N. P. H. Böge, J. Balzarini, C. Meier, ""lock-in" modified cycloSal Nucleotides – The second generation of cycloSal prodrugs", *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2005**, *24*, 939–942.
- 48 C. Meier, J. Balzarini, "Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules", *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 282–292.
- 49 C. Meier, "2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphos-phinin-2-oxides—A New Concept for Lipophilic, Potential Prodrugs of Biologically Active Nucleoside Monophosphates", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–72.
- 50 C. Meier, M. F. Ruppel, D. Vukadinovic, J. Balzarini, ""Lock-in"-cycloSal-pronucleotides - a new generation of chemical Trojan Horses?", *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, 383–394.
- 51 C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinović, J. Balzarini, "Second generation of cycloSal-pronucleotides with esterase-cleavable sites—the "lock-in"-concept", *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 89–115.

- 52 L. Weinschenk, T. Gollnest, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro Nucleoside Diphosphates of Anti-HIV Active Nucleoside Analogues", *ChemMedChem* **2015**, *10*, 891–900.
- 53 a) Y. El Safadi, V. Vivet-Boudou, R. Marquet, "HIV-1 reverse transcriptase inhibitors", *Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 723–737.; b) A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting, "Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation", *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*, 601–604.; c) A. Lavie, I. Schlichting, I. R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, R. S. Goody, "The bottleneck in AZT activation", *Nat. Med.* **1997**, *3*, 922–924.;
- 54 H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, "Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719–8722.
- 55 L. Weinschenk, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Nucleoside Diphosphate Prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-Nucleotides", *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6114–6130.
- 56 C. Meier, H. J. Jessen, T. Schulz, L. Weinschenk, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, "Rational Development of Nucleoside Diphosphate Prodrugs: DiPPro-Compounds", *Current Medicinal Chemistry* **2015**, *22*, 3933–3950.
- 57 a) K. Y. Hostetler, D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, H. van den Bosch, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine", *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2025–2029.; b) K. Y. Hostetler, L. M. Stuhmiller, H. B. Lenting, H. van den Bosch, D. D. Richman, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides.", *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6112–6117.; c) K. Y. Hostetler, S. Parker, C. N. Sridhar, M. J. Martin, J. L. Li, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, H. van den Bosch, M. F. Gardner, "Acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol: a phospholipid prodrug with activity against acyclovir-resistant herpes simplex virus.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11835–11839.; d) G. M. T. van Wijk, K. Y. Hostetler, H. van den Bosch, "Lipid conjugates of antiretroviral agents: Release of antiretroviral nucleoside monophosphates by a nucleoside diphosphate diglyceride hydrolase activity from rat liver mitochondria", *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1991**, *1084*, 307–310.;
- 58 a) D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh, "Synthesis of Nucleotide Lipophilic Prodrugs Containing Two Inhibitors Targeted Against Different Phases of the HIV Replication Cycle", *Nucleos. Nucleot.* **1995**, *14*, 783–787.; b) D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh, "Potential Lipophilic Nucleotide Prodrugs: Synthesis, Hydrolysis, and Antiretroviral Activity of AZT and d4T Acyl Nucleotides", *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 895–902.;
- 59 C. Meier, "Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs – An unsolvable task?", *Antiviral Chem. Chemother.* **2017**, *25*, 69–82.
- 60 F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, "Nucleoside Mono- and Diphosphate Prodrugs of 2',3'-Dideoxyuridine and 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridine", *ChemMedChem* **2015**, *10*, 94–106.
- 61 M.-J. Camarasa, "Prodrugs of Nucleoside Triphosphates as a Sound and Challenging Approach: A Pioneering Work That Opens a New Era in the Direct Intracellular Delivery of Nucleoside Triphosphates", *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1885–1889.
- 62 T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5255–5258.
- 63 S. Weising, V. Sterrenberg, D. Schols, C. Meier, "Synthesis and Antiviral Evaluation of TriPPPro-AbacavirTP, TriPPPro-CarbovirTP, and Their 1',2'-cis-Disubstituted Analogues", *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1771–1778.
- 64 T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals", *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8716.
- 65 a) D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh, "Synthesis of acyl pyrophosphates. Application to the synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs", *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 531–534.; b) A. Kreimeyer, F. André, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, "Transmembrane Transport of

- Adenosine 5'-Triphosphate Using a Lipophilic Cholesteryl Derivative", *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2853–2855.;
- 66 X. Tan, C. K.Chu, F.D. Boudinot, "Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: a review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics.", *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *39*, 117–151.
- 67 X. Jia, D. Schols, C. Meier, "Anti-HIV-Active Nucleoside Triphosphate Prodrugs", *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6003–6027.
- 68 X. Jia, D. Schols, C. Meier, "Lipophilic Triphosphate Prodrugs of Various Nucleoside Analogues", *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6991–7007.
- 69 I. Reimer, "3'-S-Phosphorthiolatverbrückte Oligonucleotide und Fluoreszierende Nucleotid-Prodrugs für Zellaufnahmestudien", Dissertation, Universität Hamburg **2016**.
- 70 F. Pertenbreiter, "Fluoreszenzmarkierte cycloSal- und DiPPPro-Nucleotide", Dissertation, Universität Hamburg **2013**.
- 71 T. Gollnest, "Das TriPPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nucleosidtriphosphat-Prodrugs", Dissertation, Universität Hamburg **2015**.
- 72 C. Zhao, X. Jia, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "γ-Non-Symmetrically Dimasked TriPPPPro Prodrugs as Potential Antiviral Agents against HIV", *ChemMedChem* **2021**, *16*, 499–512.
- 73 T. Nack, T. Dinis de Oliveira, S. Weber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "γ-Ketobenzyl-Modified Nucleoside Triphosphate Prodrugs as Potential Antivirals", *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 13745–13761.
- 74 X. Jia, S. Weber, D. Schols, C. Meier, "Membrane Permeable, Bioreversibly Modified Prodrugs of Nucleoside Diphosphate-γ-Phosphonates", *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11990–12007.
- 75 C. Zhao, S. Weber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Prodrugs of γ-Alkyl-Modified Nucleoside Triphosphates: Improved Inhibition of HIV Reverse Transcriptase", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 22063–22071.
- 76 C. Zhao, "Non-Symmetrically-Masked TriPPPPro Prodrugs and γ-Modified Nucleoside Triphosphate Compounds as Potential Antivirals against HIV", Dissertation, Universität Hamburg **2018**.
- 77 J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, "Differential Patterns of Intracellular Metabolism of 2',3'-Dideohydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, Two Potent Anti-human Immunodeficiency Virus Compounds", *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127–6133.
- 78 J.-S. Choi, A. J. Berdis, "Visualizing nucleic acid metabolism using non-natural nucleosides and nucleotide analogs", *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2016**, *1864*, 165–176.
- 79 a) M. D. Slugoski, A. M. Ng, S. Y. Yao, C. C. Lin, R. Mulinta, C. E. Cass, S. A. Baldwin, J. D. Young, "Substituted cysteine accessibility method analysis of human concentrative nucleoside transporter hCNT3 reveals a novel discontinuous region of functional importance within the CNT family motif (G/A)XKX3NEFVA(Y/M/F)", *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17281–17292.; b) J. S. Park, J. R. Hammond, "Cysteine residues in the transmembrane (TM) 9 to TM11 region of the human equilibrative nucleoside transporter subtype 1 play an important role in inhibitor binding and translocation function", *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 784–794.; c) R. Valdés, J. Elferich, U. Shinde, S.M. Landfear, "Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family", *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 8799–8809.;
- 80 Y. Li, P. B. Soni, Li. Liu, X. Zhang, D. C. Liotta, S. Lutz, "Synthesis of fluorescent nucleoside analogs as probes for 2'-deoxyribonucleoside kinases", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 841–843.
- 81 A. Claudio-Montero, I. Pinilla-Macua, P. Fernández-Calotti, C. Sancho-Mateo, M. P. Lostao, D. Colomer, A. Grandas, M. Pastor-Anglada, "Fluorescent Nucleoside Derivatives as a Tool for the Detection of Concentrative Nucleoside Transporter Activity Using Confocal Microscopy and Flow Cytometry", *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 2158–2166.

- 82 D. A. Berry, K. Y. Jung, D. S. Wise, A. D. Sercel, W. H. Pearson, H. Mackie, J. B. Randolph, R. L. Somers, "Pyrrolo-dC and pyrrolo-C: fluorescent analogs of cytidine and 2'-deoxycytidine for the study of oligonucleotides", *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2457–2461.
- 83 a) M. J. Robins, P. J. Barr, "Nucleic acid related compounds. 31. Smooth and efficient palladium-copper catalyzed coupling of terminal alkynes with 5-iodouracil nucleosides", *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 421–424.;
b) M. J. Robins, P. J. Barr, "Nucleic Acid Related Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides", *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1854–1862.;
- 84 J. Zhang, X. Sun, K. M. Smith, F. Visser, P. Carpenter, G. Barron, Y. Peng, M. J. Robins, S. A. Baldwin, J. D. Young, C. E. Cass, "Studies of Nucleoside Transporters Using Novel Autofluorescent Nucleoside Probes", *Biochemistry* **2006**, *45*, 1087–1098.
- 85 C. McGuigan, A. Brancale, H. Barucki, S. Srinivasan, G. Jones, R. Pathirana, A. Carangio, S. Blewett, G. Luoni, O. Bidet, A. Jukes, C. Jarvis, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, "Furano Pyrimidines as Novel Potent and Selective Anti-VZV Agents", *Antivir. Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 77–89.
- 86 C. McGuigan, C. J. Yarnold, G. Jones, S. Velázquez, H. Barucki, A. Brancale, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, "Potent and Selective Inhibition of Varicella-Zoster Virus (VZV) by Nucleoside Analogues with an Unusual Bicyclic Base", *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4479–4484.
- 87 C. McGuigan, J. Balzarini, "Aryl furano pyrimidines: The most potent and selective anti-VZV agents reported to date", *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 149–153.
- 88 J. Balzarini, R. Sienaert, S. Liekens, A. van Kuilenburg, A. Carangio, R. Esnouf, E. De Clercq, C. McGuigan, "Lack of Susceptibility of Bicyclic Nucleoside Analogs, Highly Potent Inhibitors of Varicella-Zoster Virus, to the Catabolic Action of Thymidine Phosphorylase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase", *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1140–1145.
- 89 C. McGuigan, R. N. Pathirana, M. Migliore, R. Adak, G. Luoni, A. T. Jones, A. Díez-Torrubia, M.-J. Camarasa, S. Velázquez, G. Henson, E. Verbeken, R. Sienaert, L. Naesens, R. Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini, "Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus", *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 1316–1330.
- 90 C. McGuigan, R. N. Pathirana, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, J. Balzarini, "Discovery of a New Family of Inhibitors of Human Cytomegalovirus (HCMV) Based upon Lipophilic Alkyl Furano Pyrimidine Dideoxy Nucleosides: Action via a Novel Non-Nucleosidic Mechanism", *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1847–1851.
- 91 R. Sienaert, L. Naesens, A. Brancale, E. De Clercq, C. McGuigan, J. Balzarini, "Specific Recognition of the Bicyclic Pyrimidine Nucleoside Analogs, a New Class of Highly Potent and Selective Inhibitors of Varicella-Zoster Virus (VZV), by the VZV-Encoded Thymidine Kinase", *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 249–254.
- 92 J. Balzarini, C. McGuigan, "Chemotherapy of varicella-zoster virus by a novel class of highly specific anti-VZV bicyclic pyrimidine nucleosides", *Biochim. et Biophys. Acta* **2002**, *1587*, 287–295.
- 93 C. McGuigan, H. Barucki, S. Blewett, A. Carangio, J. T. Erichsen, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, "Highly Potent and Selective Inhibition of Varicella-Zoster Virus by Bicyclic Furoypyrimidine Nucleosides Bearing an Aryl Side Chain", *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4993–4997.
- 94 R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, "Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design, Properties, and Applications", *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- 95 J. C. Pickup, F. Hussain, N. D. Evans, O. J. Rolinski, D. J. S. Birch, "Fluorescence-based glucose sensors", *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2555–2565.
- 96 R. W. Jadhav, S. M. Wagalgave, B. V. Kumbhar, R. M. Khadake, A. B. Rode, S. V. Bhosale, S. V. Bhosale, "Aminoglycoside antibiotic kanamycin functionalized tetraphenylethylene molecular probe for highly selective detection of bovine serum albumin protein", *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 11526.
- 97 J. W. Lichtman, J.-A. Conchello, "Fluorescence microscopy", *Nature Methods* **2005**, *2*, 910–919.
- 98 M. M. Stimson, M. A. Reuter, "The Fluorescence of Some Purines and Pyrimidines", *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 697–699.

- 99 J. Peon, A. H. Zewail, "DNA/RNA nucleotides and nucleosides: direct measurement of excited-state lifetimes by femtosecond fluorescence up-conversion", *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255–262.
- 100 L. Serrano-Andrés, M. Merchán, "Are the five natural DNA/RNA base monomers a good choice from natural selection?: A photochemical perspective", *J. Photochem. Photobiol.* **2009**, *10*, 21–32.
- 101 G. Wedler, "Lehrbuch der Physikalischen Chemie", WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 5. Auflage **2004**.
- 102 P. S. K. Bacia, "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy", *Methods* **2003**, *29*, 74–85.
- 103 C. McGuigan, R. N. Pathirana, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, J. Balzarini, "Discovery of a New Family of Inhibitors of Human Cytomegalovirus (HCMV) Based upon Lipophilic Alkyl Furano Pyrimidine Dideoxy Nucleosides: Action via a Novel Non-Nucleosidic Mechanism", *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1847–1851.
- 104 J. E. Baldwin, R. C. Thomas, L. I. Kruse, L. Silberman, "Rules for ring closure: ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles", *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3846–3852.
- 105 a) H. W. L. Bialy, "Total synthesis and biological evaluation of the protein phosphatase 2A inhibitor cytostatin and analogues", *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2759–2780.; b) H. W. L. Bialy, "Synthese des Proteinphosphatase-2A-Inhibitors (4S,5S,6S,10S,11S,12S)-Cytostatin", *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1819–1822.; c) Y. Watanabe, T. Nakamura, H. Mitsumoto, "Protection of phosphate with the 9-fluorenylmethyl group. Synthesis of unsaturated-acyl phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate", *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7407–7410.;
- 106 L. Weinschenk, "DiPPro-Nucleotide mit asymmetrischer Maskierung der Pyrophosphateinheit", Dissertation, Universität Hamburg **2015**.
- 107 L. A. Carpino, "The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups", *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401–407.
- 108 S. Weising, "Stereoselective synthesis of carbocyclic nucleoside analogues and their triphosphate prodrugs - Synthesis of γ -alkyl-modified nucleoside triphosphates", Dissertation, Universität Hamburg **2018**.
- 109 a) A. C. Spivey, S. Arseniyadis, "Nucleophilic Catalysis by 4-(Dialkylamino)pyridines Revisited - The Search for Optimal Reactivity and Selectivity", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5436–5441.; b) N. De Rycke, F. Couty, O. R. P. David, "Increasing the Reactivity of Nitrogen Catalysts", *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12852–12871.;
- 110 T. Schulz, "Synthese und Untersuchung von Nucleosiddiphosphat Prodrugs", Dissertation, Universität Hamburg **2011**.
- 111 Q. Xiao, J. Sun, Q. Sun, Y. Ju, Y. Zhao, Y. Cui, "Synthesis of AZT 5'-O-hydrogen phospholipids and their derivatives", *Synthesis* **2003**, *1*, 107–111.
- 112 G. A. Kullik, "Synthese von Phosphonat-Diphosphat Prodrugs am Beispiel von (R)-[2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-1-methylethoxy]methylphosphonsäure (PMPA)", Masterarbeit, Universität Hamburg **2019**.
- 113 V. Kumar, M. P. Kaushik, "tert-Butyl-N-chlorocyanamide: A Novel and Versatile Reagent in Organic Synthesis", *Synlett* **2007**, *19*, 2937–2951.
- 114 J. Witt, "Synthese fluoreszenzmarkierter TriPPPro-Verbindungen für Zellaufnahmestudien und Synthese antitumoraler TriPPPro-Prodrugs", Masterarbeit, Universität Hamburg **2019**.
- 115 K. Burgess, D. Cook, "Syntheses of Nucleoside Triphosphates", *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047–2059.
- 116 J. Ludwig, "A New Route to Nucleoside 5'-Triphosphates", *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131–133.
- 117 A. Collier, G. Wagner, "A facile two-step synthesis of 8-arylated guanosine mono- and triphosphates (8-aryl GXPs)", *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4526–4532.
- 118 M. Krecmerova, F. Seela, "9-(2-Deoxy- β -D-xylofuranosyl)adenine and 1-(2-Deoxy- β -D-xylofuranosyl)thymine: Phosphorylation and Stability", *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, *11*, 1393–1409.
- 119 M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, "A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides", *Tetrahedron* **1967**, *50*, 5065–5068.

- 120 L. Ö. T. Kovács, "Simple Synthesis of 5-Vinyl- and 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-Triphosphates", *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4525–4528.
- 121 M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, "Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, 42, 3505–3508.
- 122 R. S. Jansen, H. Rosing, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, "Facile Small Scale Synthesis of Nucleoside 5'-Phosphate Mixtures", *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2010**, 29, 14–26.
- 123 B. A. Steigenberger, "Synthese neuer Reagenzien zur Untersuchung wissenschaftlicher Fragen bezüglich der neuen epigenetischen DNA Basen", Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München **2016**.
- 124 T. Ikemoto, A. Haze, H. Hatano, Y. Kitamoto, M. Ishida, K. Nara, "Phosphorylation of Nucleosides with Phosphorous Oxychloride in Trialkyl Phosphate", *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 43, 210–215.
- 125 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.
- 126 B. Ganter, "Synthese von modifizierten T-1106-Triphosphatprodrugs als potentielle antivirale Wirkstoffe", Masterarbeit, Universität Hamburg **2020**.
- 127 J. L. Grem, "5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development", *Invest. New Drugs* **2000**, 18, 299–313.
- 128 G. A. Koning, A. Gorter, G. L. Scherphof, J. A. A. M. Kamps, "Antiproliferative effect of immunoliposomes containing 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate on colon cancer cells", *Br. J. Canc.* **1999**, 80, 1718–1725.
- 129 D. G. Power, N. E. Kemeny, "The role of floxuridine in metastatic liver disease", *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, 1015–1025.
- 130 J. V. Voorde, S. Liekens, C. McGuigan, P. G. S. Murziani, M. Slusarczyk, J. Balzarini, "The cytostatic activity of NUC-3073, a phosphoramidate prodrug of 5-fluoro-20-deoxyuridine, is independent of activation by thymidine kinase and insensitive to degradation by phosphorolytic enzymes", *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 82, 441–452.
- 131 B. E. de Oliveira, O. H. J. Amorim, L. L. Lima, R. A. Rezende, N. C. Mestnik, G. R. Leonardi, "5-Fluorouracil, innovative drug delivery systems to enhance bioavailability for topical use", *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, 61, 102155.
- 132 W.B. Parker, Y. C. Cheng, "Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil", *Pharmac. Ther.* **1990**, 48, 381–395.
- 133 D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston, "5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies", *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 330–338.
- 134 C. P. Landowski, X. Song, P. L. Lorenzi, J. M. Hilfinger, G. L. Amidon, "Floxuridine Amino Acid Ester Prodrugs: Enhancing Caco-2 Permeability and Resistance to Glycosidic Bond Metabolism", *Pharm. Res.* **2005**, 22, 1510–1518.
- 135 Y. Tsume, J. M. Hilfinger, G. L. Amidon, "Enhanced Cancer Cell Growth Inhibition by Dipeptide Prodrugs of Floxuridine: Increased Transporter Affinity and Metabolic Stability", *Mol. Pharm.* **2008**, 5, 717–727.
- 136 L. de Sousa Cavalcante, G. Monteiro, "Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer", *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 741, 8–16.
- 137 E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini, T. Mazzei, "Cellular pharmacology of gemcitabine", *Annals of Oncology* **2006**, 17, v5-v12.
- 138 Y. F. Hui, J. Reitz, "Gemcitabine: A cytidine analogue active against solid tumors", *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **1997**, 54, 162–170.
- 139 C. J. A. van Moorsel, G. J. Peters, H. M. Pinedo, "Gemcitabine: Future Prospects of Single-Agent and Combination Studies", *The Oncologist* **1997**, 2, 127–134.
- 140 V. Heinemann, Y.-Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L. W. Hertel, G. B. Grindey, "Cellular Elimination of 2',2'-Difluorodeoxycytidine 5'Triphosphate: A Mechanism of Self Potentiation", *Cancer Res.* **1992**, 52, 533–539.

- 141 D. Y. Bouffard, J. Laliberté, R. L. Momparler, "Kinetic studies on 2',2'-Difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase", *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 1857–1861.
- 142 V. W. T. R. van Haperen, G. Veerman, J. B. Vermorcken, G. J. Peters, "2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines", *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 762–766.
- 143 W. Plunkett, P. Huang, V. Gandhi, "Preclinical characteristics of gemcitabine", *Anti-Cancer Drugs* **1995**, *6*, 7–13.
- 144 L. W. Hertel, J. S. Kroin, J. W. Misner, J. M. Tustin, "Synthesis of 2-Deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-Deoxy-2,2-difluoro-D-ribofuranosyl Nucleosides", *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2406–2409.
- 145 J. Ludwig, F. Eckstein, "Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one", *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631–635.
- 146 S. Mohamady, S. D. Taylor, "Synthesis of Nucleoside Triphosphates from 2',3'-Protected Nucleosides Using Trimetaphosphate", *Org. Lett.* **2016**, *18*, 580–583.
- 147 J. Emmler, "In-vitro-Toxizität von Inhaltsstoffen aus dentalen Restaurationsmaterialien", Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München **2004**.
- 148 P. Brusa, M. L. Immordino, F. Rocco, L. Cattel, "Antitumor Activity and Pharmacokinetics of Liposomes Containing Lipophilic Gemcitabine Prodrugs", *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 195–200.
- 149 a) P. Wanganan, D. S.P. Lansakara, S. Zhu, M. Holzer, M. A. Sandoval, M. Warthaka, Z. Cui, "Just getting into cells is not enough: Mechanisms underlying 4-(N)-stearoyl gemcitabine solid lipid nanoparticle's ability to overcome gemcitabine resistance caused by RRM1 overexpression", *J. Control. Release* **2013**, *169*, 17–27.; b) G. Arreaza, "Deletion of a proline-rich region and a transmembrane domain in fatty acid amide hydrolase", *FEBS Letters* **1999**, *454*, 57–60.;
- 150 J. P. J. Issa, H. M. Kantarjian, P. Kirkpatrick, "Azacitidine", *Nature Reviews* **2005**, *4*, 275–276.
- 151 E. J. B. Derissen, J. H. Beijten, J. H. M. Schellens, "Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine", *The Oncologist* **2013**, *18*, 619–624.
- 152 E. Kaminskas, A. T. Farrell, Y.-C. Wang, R. Sridhara, R. Pazdur, "FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for Injectable Suspension", *The Oncologist* **2005**, *10*, 176–182.
- 153 P. W. Hollenbach, A. N. Nguyen, H. Brady, M. Williams, Y. Ning, N. Richard, L. Krushel, S. L. Aukerman, C. Heise, K. J. MacBeth, "A Comparison of Azacitidine and Decitabine Activities in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines", *Plos One* **2010**, *5*, e9001.
- 154 S. K. Vujjini, G. Varanasi, S. Arevelli, S. C. Kandala, S. R. Tirumalaraju, R. Bandichhor, M. Kagga, P. Cherukupally, "An Improved and Scalable Process for the Synthesis of 5-Azacytidine: An Antineoplastic Drug", *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 303–306.
- 155 E. Kaminskas, A. Farrell, S. Abraham, A. Baird, L.-S. Hsieh, S.-L. Lee, J. K. Leighton, H. Patel, A. Rahman, R. Sridhara, Y.-C. Wang, R. Pazdur, "Approval Summary: Azacitidine for Treatment of Myelodysplastic Syndrome Subtypes", *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3604–3608.
- 156 C. Flotho, R. Claus, C. Batz, M. Schneider, I. Sandrock, S. Ihde, C. Plass, C.M. Niemyer, M. Lübbert, "The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells", *Leukemia* **2009**, *23*, 1019–1028.
- 157 G. Guo, G. Li, D. Liu, Q.-J. Yang, Y. Liu, Y.-K. Jing, L.-X. Zhao, "Synthesis and Antiproliferative Activities of 5-Azacytidine Analogues in Human Leukemia Cells", *Molecules* **2008**, *13*, 1487–1500.
- 158 M. Colombo, "Synthese einer TriPPPPro-Verbindung von 5-Azacytidin als potentieller antitumoraler Wirkstoff", Bachelorarbeit, Universität Hamburg **2021**.

-
- 159 A. Pískala, "Nucleic acid components and their analogues. Synthesis of 5-Azacytosine (4-Amino-1,2-dihydro-1,3,5-Triazin-2-one) and its Methyl derivatives", *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **1967**, *32*, 3966–3976.
- 160 A. M. Schön, "Synthese chemisch modifizierter, epigenetisch relevanter Nukleoside und Oligonukleotide", Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München **2020**.
- 161 B. R. Baker, R. E. Schaub, H. M. Kissman, "Puromycin. Synthetic Studies. XV. 3'-hin0-3'-deoxyadenosine", *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5911–5915.
- 162 a) Sigma Adlrich-Katalog, <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/services>, 2022; b) GESTIS-Stoffdatenbank, <https://gestis.dguv.de/>, 2022;
- 163 Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung, *Liste der krebserzeugenden, keimzellmutagenen und reproduktionstoxischen Stoffe (KMR-Stoffe)*, Stand 08.2021, <https://publikationen.dguv.de/widgets/pdf/download/article/3517>.

10 ANHANG

Gefahrstoffverzeichnis

In der folgenden **Tabelle 18** sind Verbindungen, Reagenzien und Lösungsmittel aufgeführt, die im Rahmen dieser Promotion verwendet wurden. Diese Gefahrstoffe sind nach GHS (CLP Verordnung 1272/2008/EG) eingestuft und die entsprechenden Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen. Die GHS-Pictogramme sowie die H- und P-Sätze wurden der GESTIS-Stoffdatenbank und dem Sigma-Aldrich-Katalog entnommen.¹⁶²

Tabelle 18: Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
1- Octadecanol		319-412	273-305+351+338
1-Methylimidazol		302-311-314	280-301+312+330-303+361+353-304+340+310-305+351+338
1-Undecanol		319-410	273-305+351+338
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)-octan		228-302-315-318	210-240-241-264-270-280
2',2'-Difluordesoxycytidin		360	201-308+313
3-Hydroxypropionitril		225-300-310-331-319	210-280-302+350-304+340-305+351+338-310-330

4-Amino-1,3,5-triazin-2-on	<i>Bisher keine Einstufung nach GHS.</i>		
4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril)		318-302-335-315	280-305+351+338
4-(Dimethylamino)-pyridin		301-310-314	260-301+310-303+361+353-305+351+338-405-501
4-Hydroxybenzyl-alkohol		315-319-335	261-280-304+340-305+351+338
5-Azacytidin		302-360D	201-301+312+330-308+313
5-Fluor-2'-desoxyuridin		301	301-330+331+310
5-Iod-2'-desoxyuridin		351-361	201-202-281+308+313-405-501
9-Fluorenylmethanol	<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>		
Aceton		EU066-225-319-336	210-240-305+351+338-403+233
Acetonitril		225-332-302-312-319	210-305-351+338-403-235
Ameisensäure		226-302-314-331-EUH071	210-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338-403+233

Ammoniak (25%)		290-314-335-400	260-273-280-301+330+331-303+361+351-305+351+338
Ammoniumacetat-Lösung		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Ammoniumhydrogen-carbonat		302	301+312+330
Ammoniumsulfat		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Chlor(triisopropyl)silan		314	280-301+330+331-305+351+338
Chloroform		351-302-373-315	302+352-314
Decanoylchlorid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Dichloro- <i>N,N</i> -diisopropylphosphor-amidit		250-314	210-231+232-280-303+361+353-305+351+338-370+378
Dichlormethan		315-319-335-336-351-373	261-281-305+351+338
Dicyandiamid		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Diphenylphosphit		302-315-318-335	261-280-305+351+338

DMF		226-312+332-360D	201-280-305+351+338-308+313
DMF-DMA		225-360D-332-318-317	210-280-303+361+353-304+340+312-305+351+338-308+313
Dimethylsulfoxid		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Dodecanoylchlorid		290-314	280-305+351+338-310
Dowex 50W-X8		315-319-335	261-264-280-302+352-304+340-305+351+338-312-332+313-337+313
Essigsäure		226-314	280-305+351+338
Essigsäureanhydrid		226-302-331-314-335	210-260-280-303+361+353-305+351+338-312
Ethylacetat		225-319-336-EUH066	210-233-240-305+351+338-403+235

Heptanoylchlorid		290-314-330	280-305+351+338-310-304+340-301+330+331-303+361+353
Hexamethyldisilazan		225-302-311+331-314	210-280-301+330+331-302+352-304+340-305+351+338-308+310-403+235
Imidazol		302-314360D	260-280-301+312-303+361+353-304+340+310-305+351+338
Isopropanol		225-319-336	210-261-305+351+338
Kaliumacetat		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Kaliumcarbonat		315-319-335	261-264-271-280-302+352-305+351+338
Kaliumchlorid		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Kieselgel		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Kupfer(I)iodid		400-410-302-315-319-335	261-280-304+340-305+351+338
Magnesiumsulfat		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	

Methanol		225-331-311-301-370	210-233-280-302+352-309+310
Methansulfonylchlorid		290-301-311-330-314-317-335	280-310-305+351+338-304+340-301+330+331-303+361+353
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin		225-331-314-302-412	210-260-303+361+353-305+351+338
Natriumchlorid		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Natriumhydrogencarbonat		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Natriummethanolat		228-251-290-302-314	210-280-305+351+338-310-370+378-402+404-406
Natriumsulfat		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
<i>N</i> -Chlorsuccinimid		302-314	305+351+338-310
Nonanoylchlorid		314	208-305+351+338-310
<i>n</i> -Octadecanol		319-412	273-305+351+338

Oxalylchlorid		331-314-302- EUH014-EUH029	280-303+361+353- 305+351+338-310
PBS		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Pent-1-in		225-304-315-319- 335	210-280-301+310- 305+351+338-315
Petrolether 50-70		225-304-340-350- 361-373-412	210-201-273-281-301+310- 308+313
Phenol		301+311+331- 314-373-411	260-280-301+330+331+310- 303+361+353-304+340+310- 305+351+338
Phosphorylchlorid		300+330-314- 372-EU014- EU029	280-301+330+331-304+340- 305+351+338-308+310
Phthalimid		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Protonenschwamm		315-319-335	261-264-271-280-302+352- 305+351+338
Pyridin		225-310-EUH014	210-233-302+352
RP18-Kieselgel		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	

Salzsäure (37%)		290-314-335	260-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338
Sephadex		<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>	
Stearinsäureanhydrid		315-319-335	261-264-271-280-302+352-305+351+338
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid		228-314	210-280-305+351+338-309-310
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid in (5.5M n-Decan)		226-242-302-304-311+331-314-317-341-411	201-210-234-261-280-305+351+338
Tetradecansäurechlorid		314	280-305+351+338-310
Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)		302-315-317-319	280-302+352-305+351+338
Tetra- <i>n</i> -butylammoniumhydroxid (10% in H ₂ O)		314	210-260-303+361+353-305+351+338
Tetra- <i>n</i> -butylammoniumphosphat (c = 0.4 M in Acetonitril)		315-319	280-305+351+338

Tetrahydrofuran		225-302-319-335-351-EUH019	210-233-280-307+378-501
Toluol		225-304-315-336-361d-373	210-240-301+310+330-302+352-314-403+233
Tributylamin		302-310+330	280-301+330+331-302+352-304+340-310-332+313
Tributylammonium-pyrophosphat (c = 0.50 M in CH ₃ CN)	<i>Bisher keine Einstufung nach GHS.</i>		
Triethylamin		255-302-311+331-314-335	210-280-303+361+353-304+340-310-305+351+338-403+233
Triethylamin·Trihydrofluorid		300-310-330-314	280-303+361+353-305+351+338-310
Triethylammonium-acetatpuffer	<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>		
Triethylammonium-bicarbonatpuffer	<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>		
Trifluoressigsäure		290-331-314-412	260-273-280-303+361+353-305+351+338-312

Trifluoressigsäure- anhydrid		314-332	380-305+351+338-310
Trifluormethansulfon- säure		290-302-314-335	280-301+330+331- 303+361+353-304+340- 305+351+338-310
Trimetaphosphat (c = 0.5 M in Pyridin)	<i>Bisher keine Einstufung nach GHS.</i>		
Trimethylphosphat		302-315-319-340- 351	201-302+352-305+351+338
Undecansäure		315-319-335	261-305+351+338
Valerylchlorid		226-314-331	261-280-305+351+338-310
Zinntetrachlorid (1 M in Dichlormethan)		314-335-412	260-280-303+361+353- 304+340+310-305+351+338
β -D-Ribofuranose- 1,2,3,5-tetraacetat	<i>Kein Gefahrstoff nach GHS.</i>		

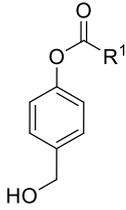
KMR-Liste

In der **Tabelle 19** sind die verwendeten KMR-Stoffe aufgelistet. Dabei wurde sich auf die KMR-Liste des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung Stand August 2021 bezogen.¹⁶³

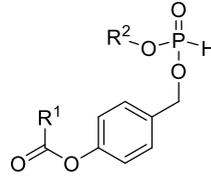
Tabelle 19: Übersicht der verwendeten KMR-Stoffe

CAS-Nummer	Substanz	Kategorie
95058-81-4	2',2'-Difluordesoxycytidin	1B
50-91-9	5-Fluor-2'-desoxyuridin	1B
320-67-2	5-Azacytidin	1B
67-66-3	Chloroform	1B
75-09-2	Dichlormethan	2
68-12-2	DMF	1B
288-32-4	Imidazol	1B
67-56-1	Methanol	2
108-95-2	Phenol	2
9032-32-4	Petrolether 50-70	2
75-91-2	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	2
109-99-9	THF	2
512-56-1	Trimethylphosphat	1B

Verbindungsübersicht

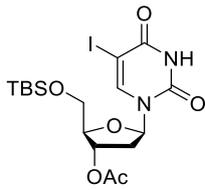


$R^1 = C_4H_9$ **84a**
 $R^1 = C_6H_{13}$ **84b**
 $R^1 = C_8H_{17}$ **84c**
 $R^1 = C_9H_{19}$ **84d**
 $R^1 = C_{10}H_{21}$ **84e**
 $R^1 = C_{11}H_{23}$ **84f**
 $R^1 = C_{13}H_{27}$ **84g**

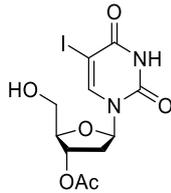


$R^1 = C_4H_9, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65az**
 $R^1 = C_6H_{13}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65bz**
 $R^1 = C_8H_{17}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65cz**
 $R^1 = C_9H_{19}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65dz**
 $R^1 = C_{10}H_{21}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65ez**
 $R^1 = C_{11}H_{23}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65fz**
 $R^1 = C_{13}H_{27}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **65gz**

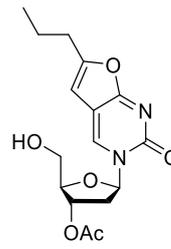
$R^1 = C_4H_9, R^2 = C_{11}H_{23}$ **65ay**
 $R^1 = C_8H_{17}, R^2 = C_{11}H_{23}$ **65cy**
 $R^1 = C_{13}H_{27}, R^2 = C_{11}H_{23}$ **65gy**



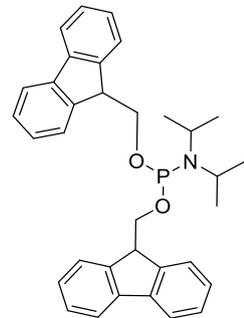
72



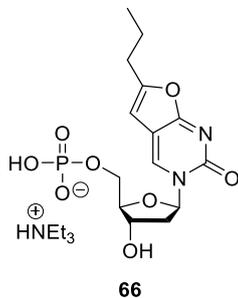
71



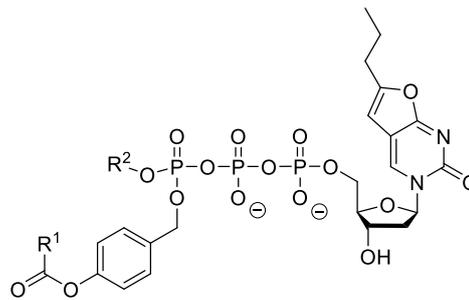
70



76

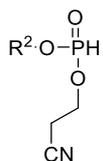


66



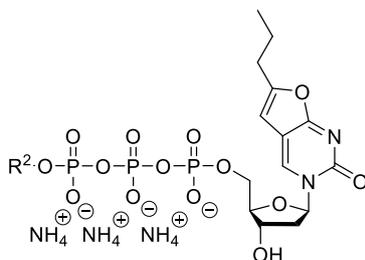
$R^1 = C_4H_9, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53az**
 $R^1 = C_6H_{13}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53bz**
 $R^1 = C_8H_{17}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53cz**
 $R^1 = C_9H_{19}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53dz**
 $R^1 = C_{10}H_{21}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53ez**
 $R^1 = C_{11}H_{23}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53fz**
 $R^1 = C_{13}H_{27}, R^2 = C_{18}H_{37}$ **53gz**

$R^1 = C_4H_9, R^2 = C_{11}H_{23}$ **53ay**
 $R^1 = C_8H_{17}, R^2 = C_{11}H_{23}$ **53cy**
 $R^1 = C_{13}H_{27}, R^2 = C_{11}H_{23}$ **53gy**



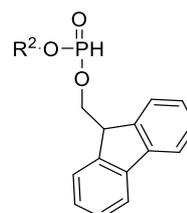
$\text{R}^2 = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$ **106z**

$\text{R}^2 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ **106y**



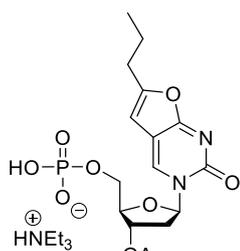
$\text{R}^2 = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$ **54z**

$\text{R}^2 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ **54y**

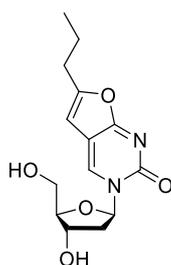


$\text{R}^2 = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$ **103z**

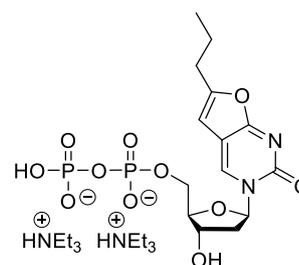
$\text{R}^2 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ **103y**



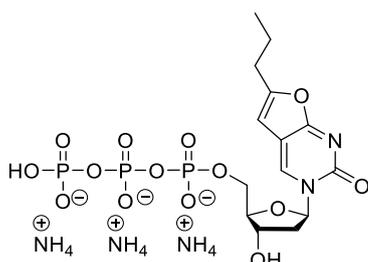
118



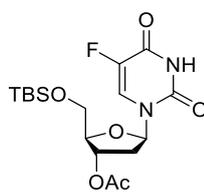
67



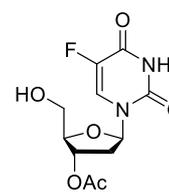
58



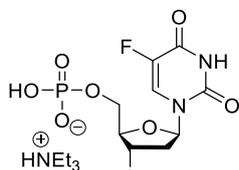
60



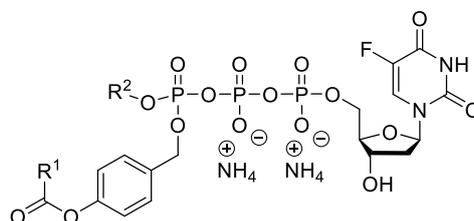
127



126

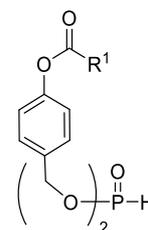


125



$\text{R}^1 = \text{C}_6\text{H}_{12}$, $\text{R}^2 = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$ **55bz**

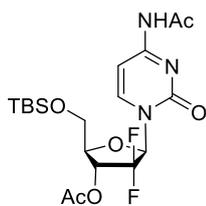
$\text{R}^1 = \text{C}_{13}\text{H}_{27}$, $\text{R}^2 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ **55gy**



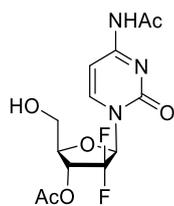
$\text{R}^1 = \text{C}_8\text{H}_{18}$ **137c**

$\text{R}^1 = \text{C}_{10}\text{H}_{21}$ **137e**

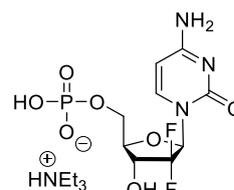
$\text{R}^1 = \text{C}_{11}\text{H}_{22}$ **137f**



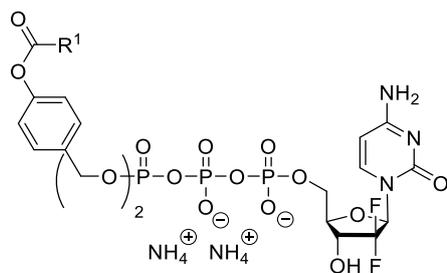
135



134



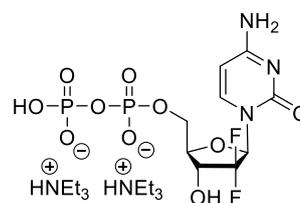
132



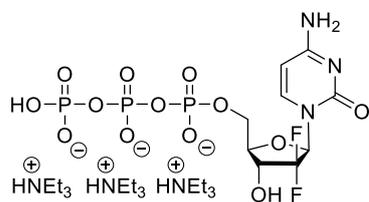
$R^1 = C_8H_{18}$ **56c**

$R^1 = C_{10}H_{21}$ **56e**

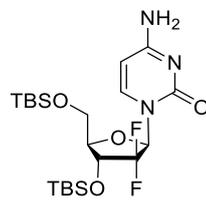
$R^1 = C_{11}H_{22}$ **56f**



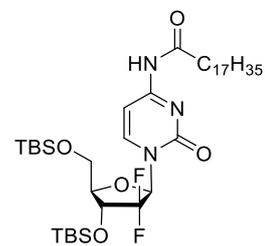
59



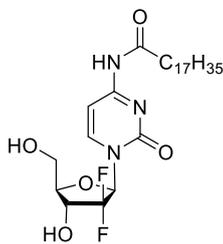
61



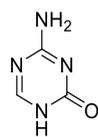
148



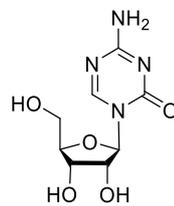
147



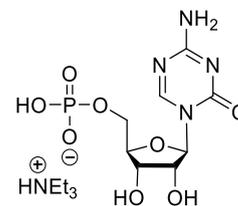
144



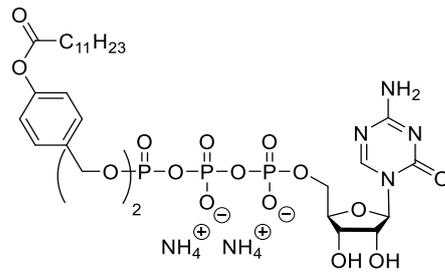
151



7



150



57f

11 DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Chris Meier möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sehr herzlich bedanken. Mein Dank gilt außerdem der interessanten Themenstellung, den vielen fachlichen Denkanstößen und der Ermöglichung der Konferenzteilnahme.

Bei Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die sehr schöne und angenehme Zusammenarbeit im Rahmen des gemeinsamen DFG-Projektes bedanken.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher möchte ich zudem für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison und Dr. Thomas Hackl danke ich sehr herzlich für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Bei Dr. Ilona Hauber, Prof. Dr. Thomas Dobner und Tina Meyer möchte ich mich für die durchgeführten Zelltests bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der MS- und NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Maria Riedner und Dr. Thomas Hackl für die Durchführung der unzähligen Messungen. Den NMR-Mitarbeitern möchte ich zudem für die vielen Messtermine, die ich für die Analyse meiner instabilen Verbindungen benötigte, danken.

Für die Unterstützung der praktischen Arbeiten möchte ich mich bei den ISP-Studenten sowie bei Jannik Kessler und Mica Colombo bedanken.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des AK Meiers bedanken, ihr habt eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen und mich sehr freundlich in Hamburg willkommen geheißen. Ich möchte mich auch für die vielen fachlichen Diskussionen, die angenehme Zusammenarbeit und lustigen Abende mit euch bedanken. Ihr habt meine Zeit in Hamburg unvergesslich gemacht, vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen aus den Laboren 525 und 524 für die angenehme Laboratmosphäre, vielen lustigen Momente und Fachdiskussionen. Bei Julian Witt und Giuliano Kullik möchte ich mich für die schöne Zusammenarbeit und die Unterstützung bei sämtlichen HPLC-Problemen bedanken.

Bei Jean-Michel Mallad und Julian Witt möchte ich mich sehr herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Additionally, I would like to thank Enda Jordan for proofreading the abstract of this thesis.

Ich möchte mich bei meiner Familie, der Familie meines Freundes und meinen Freunden für die fortlaufende Unterstützung bedanken. Besonders hervorheben möchte ich dabei die folgenden Personen: Bei Jenny und Bernhard möchte ich mich für die schöne gemeinsame

Zeit in Hamburg und die vielen gemeinsamen Mittagessen und Eistreffen bedanken. Bei meinen Dienstagsmädels Kathrin, Doro, Carina und Laura möchte ich mich für die vielen unvergesslichen und wunderschönen Abende, die insbesondere während der Coronazeit, eine willkommene Abwechslung waren, bedanken. Bei Jessy, Johannes und Buddy möchte ich mich für die Unterstützung aus der Ferne und die vielen wunderschönen, gemeinsamen Skypeabende bedanken. Bei Annemarie und Edgar möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung aus der Ferne bedanken.

Bei unserem vierbeinigen Wirbelwind Jeanne möchte ich mich für die Abwechslung beim Schreiben und die Aufmunterung in schwierigen Momenten bedanken. Du machst, dass die Sonne scheint und zauberst mir immer ein Lächeln ins Gesicht.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, Barbara und Heribert. Vielen Dank für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion, ohne euch und euren Rückhalt wäre diese Zeit nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer für mich da seid und ich mich immer auf euch verlassen kann. Auch bei meinen Schwestern, Sabine, Anna und Eva, möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Jean-Michel bedanken. Deine Unterstützung gab mir die Kraft mein Studium und meine Promotion durchzustehen. Besonderer Dank gebührt dir für die Aufmunterung, wenn im Labor mal wieder nichts funktioniert hat. Kurzum, vielen Dank für alles!

12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Ich versichere, dass dieses gebundene Exemplar der Dissertation und das in elektronischer Form eingereichte Dissertationsexemplar (über den Docata-Upload) und das bei der Fakultät (Studienbüro Chemie) zur Archivierung eingereichte gedruckte gebundene Exemplar der Dissertationsschrift identisch sind.

A handwritten signature in blue ink, reading "Maria Robueig". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Ludwigshafen, den 30.01.2023