



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Synthese von acyclischen Phosphonat-Diphosphat-Prodrugs

Synthesis of acyclic phosphonate-diphosphate prodrugs

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften

Von

Giuliano Armando Kullik

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2023

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universität Hamburg im Institut für Organische Chemie am Fachbereich Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Chris Meier im Zeitraum vom April 2019 bis Dezember 2022 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem

Datum der Disputation: 03.02.2023

Datum der Druckfreigabe: 06.02.2023

Meinem Großvater Edwin Kullik.

„Beim Erforschen und Versuchen hört man auch die Frömmsten fluchen“

Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	6
3 Einleitung	10
4 Kenntnisstand	12
4.1 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)	12
4.2 Viren, opportunistische Infektionen und Tumore	14
4.3 Strategien in der antiretroviralen Therapie	15
4.4 Prodrugs – das Umgehen von pharmakologischen Hürden	29
5 Aufgabenstellung	35
6 Resultate und Diskussion	38
6.1 Synthese des (<i>R</i>)-PMPA-Mono- und Diphosphates sowie der (<i>R</i>)-PMPA-Diphosphat Prodrugs	38
6.2 Biochemische Analyse der (<i>R</i>)-PMPA-Derivate	51
6.3 Synthese der (<i>S</i>)-HPMP-Derivate	70
6.4 Synthese der (<i>S</i>)-HPMP-Diphosphate	86
6.5 Synthese von acyclischen Nucleosidmono- und triphosphat-Analoga	88
6.6 Synthese der (<i>S</i>)-HPMP-TriPPPro-Verbindungen und deren modifizierten Diphosphate	100
6.7 Biochemische Analyse der (<i>S</i>)-HPMP-Prodrugs	110
7 Experimenteller Teil	131
7.1 Allgemeines	131
7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)	139
7.3 Synthesen	143
8 Gefahrstoffverzeichnis	252
9 Literaturverzeichnis	262
10 Danksagung	268
11 Eidesstattliche Erklärung	269

Abkürzungsverzeichnis

3TC	2'-Desoxy-3'-thiacytidin, Lamivudin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir
abs.	Absolut
AcOH	Essigsäure
ACV	Acyclovir
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination und Toxizität
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Acyclische Nucleosid-phosphonate
ANPp	Acyclische Nucleosid-phosphonate Phosphat
ANPpp	Acyclische Nucleosid-phosphonate Pyrophosphat
Äquiv	Äquivalente
ART	Antiretrovirale Therapie
AZT	3'-Azidothymidin, Zidovudin
ber.	berechnet
bzw.	beziehungsweise
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD-4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CH ₃ CN	Acetonitril
CMV	Cytomegalievirus.
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4
<i>cycloSal</i>	cyclosaligenyl
d	Dublett
d4T	Stavudin
DAD	<i>diode array detector</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie

DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	Dublett vom Dublett
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHPA	(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)Adenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonucleoinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dt	Dublett vom Triplett
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EE	Essigsäureethylester
Et ₃ N	Triethylamin
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
Fm	Flourenylmethyl
FTC	2',3'-Didesoxy-5-fluor-3'-thiacytidin, Emtricitabin
GCV	Ganciclovir
gef.	gefunden
GMP	Guanosindmonophosphat
gp120	Glycoprotein 120
gp41	Glycoprotein 41
h	Heptett
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie, <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatographie</i>
(S)-HPMP	[3-hydroxy-propan-2-yl]oxy-methylphosphonsäure
(S)-HPMPA	Andenin-[3-hydroxy-propan-2-yl]oxy-methylphosphonsäure

(S)-HPMPC	Cidofovir
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
konz.	Konzentriert
m	Multipllett
m/z	Masse zu Ladungsverhältniss
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MeOD	Deuteromethanol
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIN	Mathematik, Informatik, Naturwissenschaften
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NNRTI	Nicht Nucleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitor
NRTI	Nucleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitor
NtRTI	Nucleotidische Reverse-Transkriptase Inhibitor
p	Pentett
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCV	Penciclovir
PE	Petrolether
PLE	<i>Pig liver reesterase</i>
PMEA	Adefovir
PMEApp	Adefovir-Pyrophosphat
(<i>R</i>)-PMPA	Tenofovir
ppm	<i>parts-per-million</i>
q	Quartett
quant.	Quantitativ

R_f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	Ribonucleoinsäure
RP18	<i>reversed Phase</i> , C18 modifiziert
RP8	<i>reversed Phase</i> , C8 modifiziert
R_t	Retentionszeit
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SIV	<i>Simiane Immundefizienz-Virus</i>
t	Triplett
TAF	Tenofovir-Alafenamid
TBAA	<i>tetra-n-Butylammoniumacetat</i>
TDF	Tenofovir-Disoproxil
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFV	Tenofovir
THF	Tetrahydrofuran
TK1	Thymidinkinase 1
TK2	Thymidinkinase 2
TOF	<i>time of flight</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vol%	Volumenprozent
WHO	<i>world health organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
δ	chemische Verschiebung
v	Wellenzahl

1 Zusammenfassung

Virale Infektionen oder viral induzierte Erkrankungen im Allgemeinen können der Auslöser für globale Krisen sein. Insbesondere wird dies durch das 2019 erstmals aufgetretene SARS-CoV-2 Virus und die damit einhergegangene weltweite pandemische Lage, welche zu großen wirtschaftlichen und sozialen Problemen bzw. Krisen geführt hat, deutlich. Dieser Umstand betont ebenfalls das Gewicht der ständigen Forschung an neuen antiviralen Wirkstoffen oder deren Wirksamkeit, beispielsweise durch die Anwendung neuer Prodrug-Technologien.

Ein Grundstein in der antiviralen Therapie sind die acyclischen Nucleosid-Phosphonate (ANPs). Diese Wirkstoffe wurden von der Arbeitsgruppe um HOLÝ in den 1980ern entwickelt. Derzeit werden drei ANPs klinisch angewendet: Tenofovir **7**, als TDF **6a** oder TAF **6b** vor, nach und während einer HIV-Infektion; Adefovir **8**, als Adefovir-Dipivoxil bei einer Hepatitis B Infektion sowie Cidofovir **9** gegen eine Reihe an DNA-Virusinfektionen, wie das Cytomagalievirus, Herpes-, aber auch Pockenviren.

Sowohl geringe Nebenwirkungen, eine hohe Toleranz gegenüber Mutationen als auch die hohe Potenz machen die drei genannten, aber auch die ANPs im Allgemeinen zu einer vielversprechenden Wirkstoffklasse. Einige Prodrugs dieser Wirkstoffklasse, wie Adefovir-Dipivoxil, TDF **6a** und TAF **6b** sind durch ihre hohe Potenz in der klinischen Anwendung bereits fest etabliert worden. Das ANP wird bei diesen Prodrugs erst im Zytosol freigesetzt, wonach jedoch zwei weitere enzymatische Phosphorylierungsschritte benötigt werden, um das von der entsprechenden Polymerase nutzbare Substrat zu erhalten. Das Ziel dieser Arbeit war die Darstellung von ANP-Diphosphat Prodrugs, durch die eine direkte Freisetzung des aktiven ANP-DP, sowie des ANP-DP mit einer γ -Alkylmodifikation im Zytosol erreicht werden kann. Dafür wurde das (*R*)-PMPA als Modell und später diverse HPMP-Derivate genutzt.

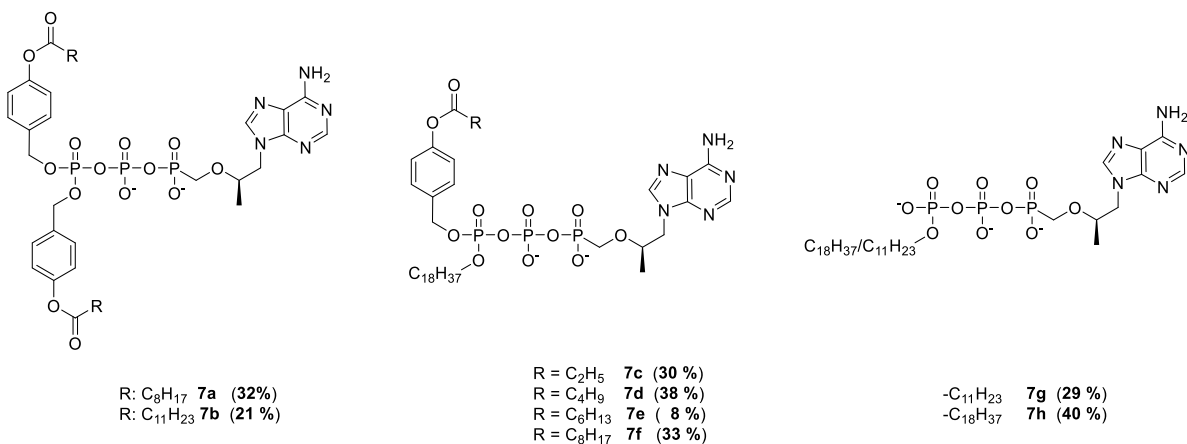


Abb. 1: Die erfolgreich dargestellten (*R*)-PMPA-TriPPPro-Verbindungen **7a-f** bzw. die zwei γ -alkylmodifizierten PMPA-Diphosphate **7g** und **7h**.

Für die Synthese wurde das von MEIER *et al.* entwickelte TriPPPro-Konzept erfolgreich angewendet. Es konnten die gewünschten (*R*)-PMPA-Diphosphat Prodrugs in Ausbeuten von 8 % bis 40 % dargestellt werden. Einen wichtigen Faktor stelle dabei die Wahl des Gegenion des Monophosphats, genauer gesagt in diesem Fall des Phosphonats dar. Während mit Triethylammonium als Gegenion kein vollständiger Umsatz beobachtet werden konnte, wurde bei Tetra-*n*-Butylammonium als Gegenionen bereits nach zwei Stunden ein vollständiger Umsatz bei der Reaktionsverfolgung mittels RP-HPLC beobachtet.

Bei den Hydrolysestudien mit den entsprechenden (*R*)-PMPA Verbindungen wurde eine gute chemische Stabilität in PBS-Puffer beobachtet sowie eine suffiziente Aktivierung der TriPPPro-Verbindungen mit PLE als Modellenzym. In Zellextrakten wurde zwar ebenfalls eine Aktivierung der TriPPPro-Verbindungen beobachtet, jedoch wurden auch unerwartet hohe Signalintensitäten für das entsprechende PMPA-MP detektiert. Eine Hydrolyse der Verbindung in PBS-Puffer mit Calcium- sowie Magnesiumionen konnte diese Ergebnisse reproduzieren. Eine tiefergehende Untersuchung dieser Hydrolysen mit ¹⁸O-isotopenreichem Wasser und einer Analyse mithilfe eines ESI-TOFs bestätigte den Verdacht, dass es zu einem nucleophilen Angriff auf das β -Phosphat und damit zu einer Spaltung der Phosphorsäure-anhydrid Bindung kommt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde angestrebt, TriPPPro-Verbindungen mit einer Methylengruppe zwischen dem γ - sowie β -Phosphat darzustellen. Diese TriPPPro-Verbindungen sollten gegenüber dieser Art von chemischer Hydrolyse inert sein und dennoch von Polymerasen als Substrat erkannt werden. Bei den durchgeführten Synthesen konnte zwar das maskierte β - γ -Methylenpyrophosphat detektiert werden, jedoch konnte dies nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden, wodurch eine finale Synthese zu der entsprechenden TriPPPro-Verbindung nicht möglich war.

Mithilfe von *Primer Extension Assays* wurden die Substrateigenschaften der verschiedenen PMPA-DPs untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl das PMPA-DP, als auch das PMPA-Methylen-DP ein Substrat für die HIV-RT sind. Für die PMPA-DPs mit einer γ -Alkylmodifikation konnte dies ebenfalls festgestellt werden.

Durch antivirale Assays der Arbeitsgruppe um DOMINIQUE SCHOLS in der KU Leuven konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Hier zeigten alle dargestellten Verbindungen eine antivirale Aktivität. Besonders hervorzuheben sind hier die Verbindungen **7d**, **7e** und **7h** mit EC₅₀-Werten zwischen 67 nM bis 27 nM in HIV-2 TK⁻ infizierten Zellen.

Des Weiteren wurden die für die Synthese der (S)-HPMP-TriPPPro-Verbindungen benötigten (S)-HPMP-Derivate erfolgreich über ein modifiziertes Syntheseprotokoll von BRODFUEHRER in Ausbeuten von 18 % bis 35 % über vier Stufen dargestellt werden. Hierbei wurden die Synthesebedingungen jedoch lediglich bei der Synthese des (S)-HPMPCs optimiert. Durch Optimierung wäre vermutlich auch bei den weiteren Derivaten eine Verbesserung der Ausbeute möglich.

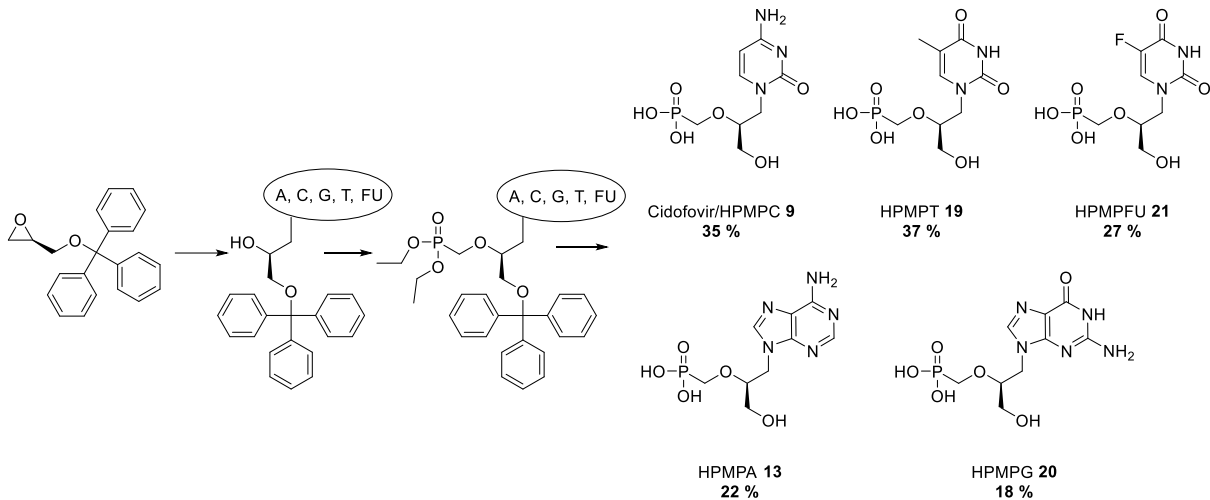
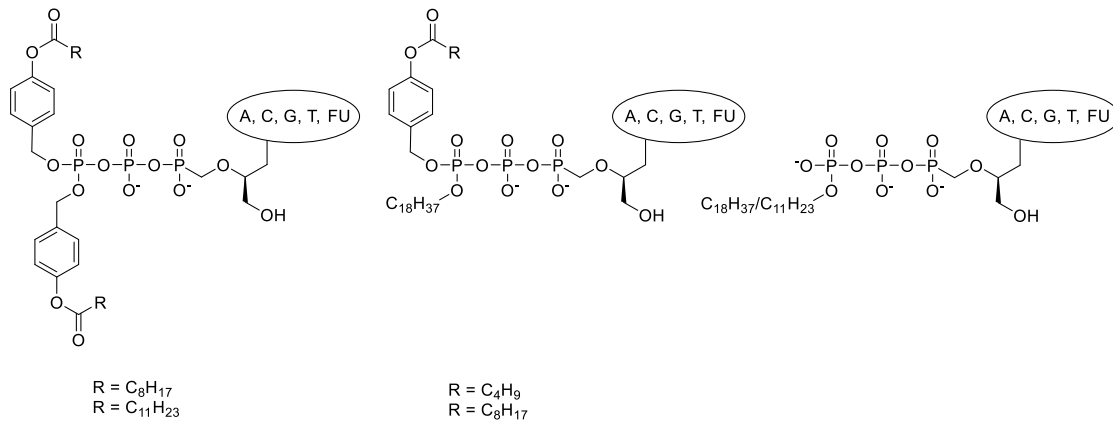


Abb. 2: Synthese der fünf HPMP-Derivate **9**, **13**, **19**, **20** sowie **21**. Die Ausbeute ist die Gesamtausbeute bezogen auf die vier Syntheseschritte.

Anschließend wurden aus den fünf HPMP-Derivaten, mit den Nucleobasen Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin sowie 5-Floururacil, die entsprechenden TriPPPro-Verbindungen dargestellt. Dies gelang für alle Derivate in Ausbeuten von 6 % bis 71 %. Für die Synthese der γ -alkylmodifizierten HPMP-Diphosphate führte die Entschützung der Cyanoethyl-Schutzgruppe mit Tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid teilweise zu Problemen. Hier konnte hauptsächlich bei den HPMPA und HPMPG-Derivaten eine nahezu vollständige Hydrolyse der TriPPPro-Verbindung beobachtet werden. Daher wurde für diese Derivate die nicht nucleophile Base DBU unter Ausschluss von Feuchtigkeit genutzt. Dadurch konnte die Reaktionszeit von 24 Stunden auf nur zwei Stunden reduziert, die Isolation der Produkte vereinfacht und die Ausbeute im Vergleich zu den anderen HPMP-Derivaten gesteigert werden.

Nach der erfolgreichen Synthese der HPMP-TriPPPro-Verbindungen wurden auch diese auf ihre chemische Stabilität in PBS-Puffer sowie enzymatische Aktivierung in Zellextrakten untersucht. Dabei zeigten alle getesteten Verbindungen eine mindestens ausreichende chemische Stabilität in PBS-Puffer. Auch wurde eine effiziente enzymatische Aktivierung der Prodrugs in Zellextrakten beobachtet. Jedoch fiel hierbei auf, dass die Signalintensitäten bei zwei bestimmten Maskenkombinationen (Bis-C11AB sowie C8AB-C18) auf einem

gleichbleibenden, niedrigen Niveau lagen. Durch weitere Untersuchungen konnte hier als Ursache zum einen die Probenaufbereitung, zum anderen jedoch auch die unspezifische Bindung dieser Prodrugs an zelluläre Proteine ermittelt werden.



	C	T	FU	A	G
Bis-C8AB	41%	26%	42%	25%	20%
Bis-C11AB	36%	15%	10%	9%	43%
C4AB-C18	33%	17%	30%	38%	20%
C8AB-C18	23%	49%	6%	59%	15%
γ-C11	47%	20%	25%	71%	37%
γ-C18	43%	59%	27%	58%	27%

Abb. 3: Synthese der verschiedenen HPMP-TriPPPPro-Verbindungen **a**, **b**, **d**, **f** sowie **g**.

Dabei zeigte sich, dass ein Fällen der Proteine aus Zellextrakten mit dem doppelten Volumen an Acetonitril statt Methanol für zukünftige Untersuchungen vorgezogen werden sollte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen gut an humanes Serum Albumin, genauer gesagt generell an Plasmaproteine bindet. Dieser Effekt könnte für diese Prodrugs jedoch von Vorteil sein, da diese über einen Transportweg, der ursprünglich für langkettige Fettsäuren genutzt wird, in das Zytosol gelangen könnten und damit nicht nur auf passive Diffusion angewiesen sind.

In *Primer Extension Assays* konnte für die HPMP-DPs mit einer natürlichen Nucleobase gezeigt werden, dass als Substrat für die HIV-RT fungieren können, jedoch bei Anwesenheit aller natürlichen dNTPs kaum in den neuen DNA-Strang inkorporiert werden. Im Gegensatz dazu sind sie nur schlechte, wenn nicht sogar keine Substrate für die humane DNA-Polymerase γ . Dies deutet auf geringe zytotoxische Eigenschaften dieser Verbindungen hin. Die HPMPFU-DPs waren hier für keine der getesteten Polymerasen ein Substrat.

In antiviralen Assays, ebenfalls von der Arbeitsgruppe um DOMINIQUE SCHOLS durchgeführt, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Keines der getesteten Verbindungen zeigte eine Aktivität gegenüber HIV-infizierten Zellen. Jedoch ist anzumerken, dass die getesteten Verbindungen über nicht mehr messbare oder hohe zytotoxische Werte verfügen. Dies zeigt

ebenfalls die gute Verträglichkeit der ANPs, genauer gesagt deren geringe toxische Wirkungen.

Weiterhin ist dies eine gute Grundvoraussetzung für die weiteren antiviralen Assays mit den HPMP-Derivaten gegen DNA-Viren wie Herpes-, Pocken- sowie Cytomegalieviren. Jedoch werden die Substanzen auch gegen das neuartige SARS-CoV-2 Virus und Influenzaviren getestet.

2 Abstract

Viral infection and diseases are still a mayor issue after decades of intensive research. Furthermore, the last pandemic induced by a new SARS-CoV-2 Virus remarkably shows the influence of this on global economy and society. Therefore, constant search of new antivirals and prodrug systems to enhance existing antivirals potency is still a key step to prevent future issues.

In the range of antivirals, the acyclic nucleoside-phosphonates (ANP) are a key class of antivirals. Since three of them form the foundation of antiviral therapy in clinic. For hepatitis B infections, Adefovir **6** is used as Adefovir-Dipivoxil. Tenofovir **7** is used as TDF **6a** or TAF **6b** and is currently the backbone in therapy of HIV-infections. While Cidofovir **9** is used against plenty of DNA viruses such as cytomegalovirus and smallpox.

Nonetheless, the currently applied prodrugs release neat ANPs inside cells, requiring at least two phosphorylation steps for the formation of the active ANP-diphosphate form. Therefore, the aim of this work is to use the TriPPPro approach of the MEIER working group to synthesize ANP-Diphosphate prodrugs as well as γ -modified ANP-diphosphates.

Starting with (*R*)-PMPA as a model substance, synthesizing the first series of six (*R*)-PMPA-TriPPPro compounds with yields in the range of 8 % up to 40 % was successful. Furthermore, the usage of tetra-*n*-Butylammonium as a counterion led to full conversion within two hours, in contrast to up to five hours with triethylammonia as a counterion.

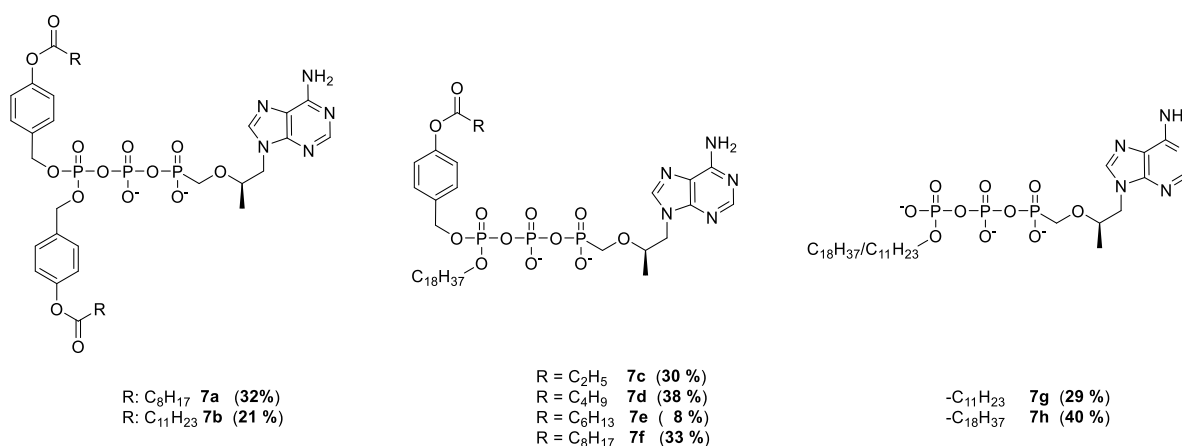


Figure 1: Successfully synthesized (*R*)-PMPA-TriPPPro compounds **7a-f** and γ -alkylmodified PMPA-diphosphates **7g** and **7h**.

In hydrolysis studies performed in PBS-buffer, pig liver esterase as well as cell extracts, these TriPPPro-compounds showed a sufficient chemical stability and enzymatic activation. Nonetheless, in cell extracts more (*R*)-PMPA monophosphate could be detected than expected. Therefore, hydrolysis studies in PBS-buffer with bivalent ions were performed. Here,

the results of the hydrolysis studies in cell extracts could be validated, indicating that bivalent ions have an influence in hydrolysis. Thus, using ^{18}O -Isotope rich water, the hydrolysis was repeated using ESI-TOF to analyze the obtained fragments. Here, fragments resulting of a nucleophilic attack on β -phosphate were obtained, indicating that this was the main hydrolysis pathway in presence of bivalent ions.

To overcome this hurdle, the synthesis of a PMPA-TriPPPPro compound with a methylene group between β - and γ -phosphate was the aim. Even though the corresponding masked methylene pyrophosphate was successfully synthesized, it could not be isolated. Therefore, it was not possible to synthesize the corresponding methylene (*R*)-PMPA-TriPPPPro compound.

In addition, using primer extension assays, it was shown that all synthesized (*R*)-PMPA-diphosphates are substrates for HIV-RT but not for human DNA polymerase γ indicating low cytotoxicity. This is in good agreement with the good safety profile of (*R*)-PMPA used in clinic. Moreover, these results correspond with antiviral data obtained by DOMINIQUE SCHOLS and co-workers in KU Leuven. In these assays all compounds show antiviral activity, especially **7d**, **7e** and **7h** with EC_{50} -values between 67 nM up to 27 nM in HIV-2 TK⁻ infected cells. Moreover, none of the tested compounds show cytotoxicity, which corresponds with the primer extension assays as well as the safety profile.

Next, the for the synthesis of desired TriPPPPro-compounds required HPMP-derivatives were synthesized successfully with a modified synthesis method published by BRODFUEHRER in yields of 18 % up to 35 % over four steps. Nonetheless, only for HPMPPC **9** there was an optimization of the synthesis performed resulting in a potential increase in yields performing similar effort on remaining derivatives.

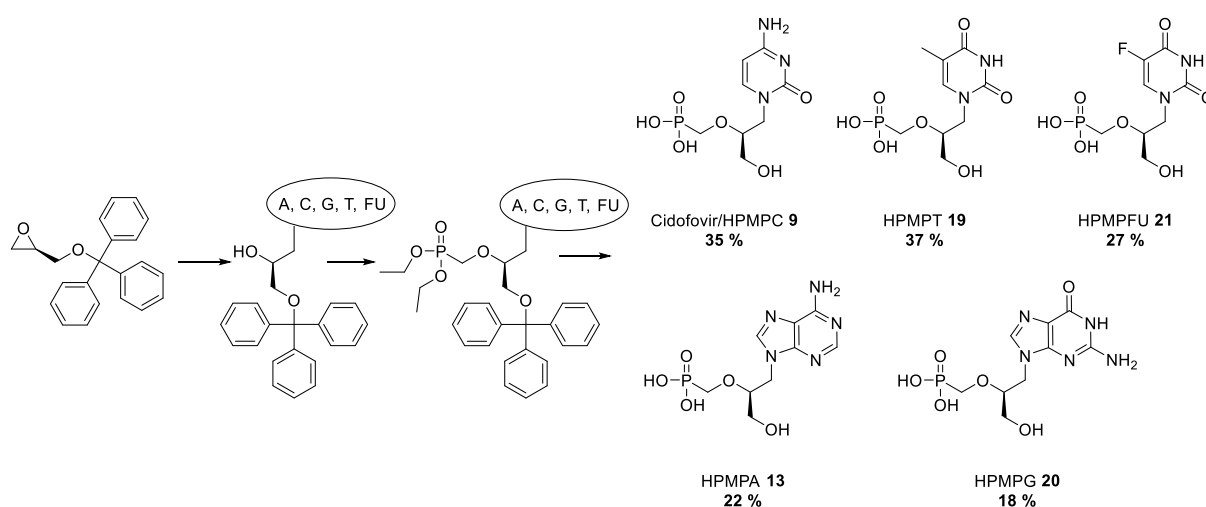
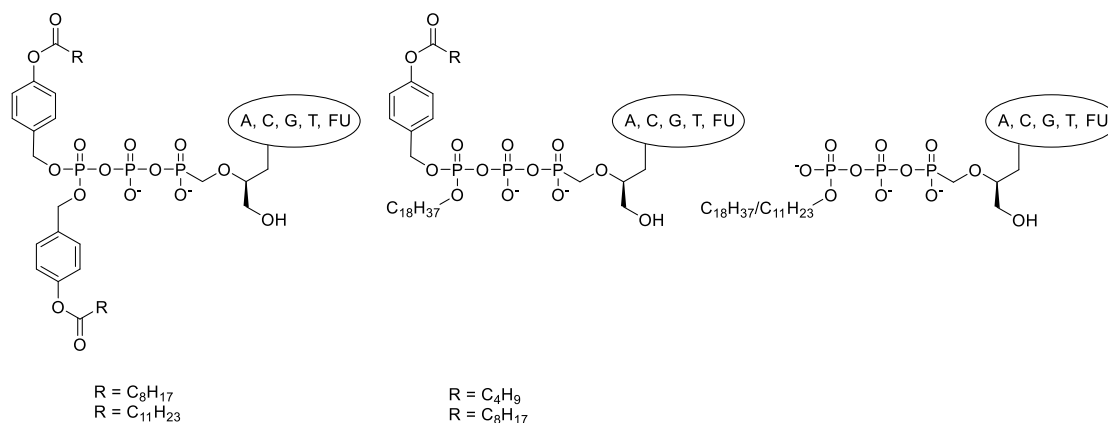


Figure 2: Synthesis of HPMP-derivatives **9**, **13**, **19** and **20** using all four natural nucleobases and 5-fluoruracil **21**.

Following this, the synthesis of HPMP-TriPPP_{ro}-compounds was performed successfully using tetra-*n*-Butylammonium as a counterion, resulting in a full conversion in these reactions within two hours. Moreover, especially for γ -alkyl HPMPA and HPMPG-diphosphates, the deprotection of the cyanoethyl moiety led to decomposition of these compounds to the corresponding HPMP-derivatives. Here, using DBU as a base under dry conditions led to a full conversion within two hours, an easy workup and an enhanced yield compared to remaining γ -alkyl HPMP-diphosphates.



	C	T	FU	A	G
Bis-C8AB	41%	26%	42%	25%	20%
Bis-C11AB	36%	15%	10%	9%	43%
C4AB-C18	33%	17%	30%	38%	20%
C8AB-C18	23%	49%	6%	59%	15%
γ -C11	47%	20%	25%	71%	37%
γ -C18	43%	59%	27%	58%	27%

Figure 3: Synthesis of all HPMP-TriPPP_{ro} compounds **a**, **b**, **d**, **f** and **g** using the method of MEIER and co-workers.

Moreover, all tested compounds showed sufficient chemical stability in PBS-buffer and enzymatic activation in cell extracts. Nonetheless, for compounds carrying ether Bis-C11AB or C8AB-C18 masking units, there was only a continuous low signal detectable in cell extracts. Further investigation confirmed that using methanol to precipitate proteins of cell extracts in sample preparation caused this phenomenon to occur. This hurdle was solved by using acetonitrile as a precipitating agent. Moreover, tests with human serum albumin and plasma showed that these prodrugs bind to cellular proteins resulting in these low signal intensities. Nonetheless, this fact could be beneficial since this might be an alternative influx mechanism through transport proteins usually used for long chain fatty acids.

Using primer extension assays, it was shown that HPMP-diphosphates with a natural nucleobase are substrates for HIV-RT. Furthermore, in presence of the natural dNTPs, they seem not to be the dominant substrate. Nonetheless, they are no substrates for human DNA polymerase γ indicating low cytotoxicity. The tested HPMPFU diphosphates don't act as substrates for any polymerase tested.

These results are in good agreement with antiviral data obtained by DOMINIQUE SCHOLS and co-workers. Here all tested HPMP-compounds show no antiviral activity against HIV but, nonetheless also no remarkable cytotoxicity. With this in mind, the ongoing assays including DNA-viruses as well as SARS-CoV-2 and flu are expected to be superior.

3 Einleitung

Die erste schriftliche Erwähnung von Viren als Auslöser von Krankheiten geschah vor knapp 2000 Jahren. Bereits 50 nach der Zeitenwende beschrieb der Enzyklopädist CORNELIUS AULUS CELSUS Viren bzw. einen Virus als Auslöser der Tollwut.¹

Während im 19. Jahrhundert fast alle Pathogene wie z.B. Bakterien, Protozoen oder Pilze als Viren zusammengefasst wurden, hat sich das Wissen um die verschiedenen Pathogene zunehmend verbessert.¹

Nach der heutigen Definition sind Viren kleine 22 nm bis 300 nm große Partikel. Je nach Virusfamilie bestehen sie aus Desoxyribonucleinsäuren (DNS, *deoxyribonucleic acid* DNA) oder Ribonucleinsäuren (RNS, *ribonucleic acid* RNA), als Träger ihrer genetischen Informationen und sind umschlossen von Proteinen oder zum Teil auch Lipiden. Das Fehlen eines eigenen Stoffwechsels macht Viren zu obligaten Zellparasiten. Das bedeutet, ohne den Stoffwechsel einer Wirtszelle können sich Viren nicht vermehren.²

Im Gegensatz dazu stehen die Bakterien. Diese sind, zum Teil stark Pathogene, Mikroorganismen, die sich allerdings im Gegensatz zu Viren selbstständig vermehren können.³ Zwar sind bakterielle Infektionen auch ein Auslöser von Krankheiten, jedoch gibt es, angestoßen von der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Flemmings, hier eine große Bandbreite an Medikamenten die eine Infektion bekämpfen sollen: Die Antibiotika. Diese Entdeckung führte letztendlich zu den sogenannten Breitband Antibiotika, die gegen ganze Klassen von Bakterien effektiv wirken.⁴

Ganz im Gegensatz dazu ist die häufigste Strategie in den antiviralen Therapien ein sogenannter „*one-bug-one-drug*“ Ansatz. Es werden einzelne Wirkstoffe gegen einen Virus bzw. eine Viruserkrankung entwickelt, da jedes Virus seine Eigenheiten hat. Daher gibt es bis heute kaum bzw. kein wirkliches Breitband Virostatikum.⁵ Eine weitere gängige Strategie, virale Infektionen zu bekämpfen, ist die Entwicklung eines Vakzins. Dieses soll eine pathogene Wirkung des Virus bekämpfen indem es bereits eine körpereigene Immunantwort auslöst, wodurch eine effektive Immunantwort bei einer Virusinfektion besteht. So gibt es bereits breit eingesetzte Vakzine gegen z.B. Pocken, Tollwut, Hepatitis A und B sowie der Influenza A und B. Im letzten Beispiel, der Influenza, werden die Limitationen der Vakzine allerdings deutlich. So ist aufgrund der schnellen genetischen Evolution der Viren eine jährliche Anpassung des Vakzins auf die vorrangig beherrschenden Virusstämme nötig, um einen effektiven Schutz zu bieten.^{6,7}

Die schnelle genetische Evolution macht es jedoch nahezu unmöglich, für einige Viren ein geeignetes Vakzin zu entwickeln. Ein Beispiel hierfür ist das Humane Immundefizienz Virus (HIV).⁷ Dieses Virus sollte die größte Suche des 20. Jahrhunderts auslösen und zeigte wie wichtig die ständige Neuentwicklung von Therapien und antiviralen Wirkstoffen ist.

Alleine im Jahr 2021 stieg die Zahl der HIV-Neuinfektionen um 1.5 Millionen auf weltweit insgesamt 38.4 Millionen HIV-Infizierte Menschen.⁸ Obwohl ein Leben mit einer medikamentös behandelten und gut eingestellten HIV-Infektion möglich ist, kam es im Jahr 2021 dennoch zu weltweit knapp 650.000 Todesfällen aufgrund einer HIV-Infektion.⁸

Ein weiteres, beeindruckendes Beispiel in welchem Ausmaß Viren unser Leben und unseren Alltag beeinflussen können ist die im Jahr 2019 ausgebrochene SARS-CoV-2 Pandemie. Innerhalb von knapp drei Jahren haben sich weltweit 513 Millionen Menschen infiziert, von denen knapp 6 Millionen Menschen gestorben sind (Stand Mai 2022).⁹

Diese Pandemie hat noch einmal den Stellenwert der Entwicklung neuer Vakzine, antiviraler Wirkstoffe oder gar neuer Breitband Virostatika hervorgehoben, um auf neue Viren und gegebenenfalls eine neue Pandemie besser vorbereitet zu sein.

4 Kennntnisstand

Um neue antivirale Wirkstoffe zu entwickeln, ist es von essenzieller Bedeutung den Aufbau und Lebenszyklus eines Viruspartikels zu verstehen. Daher soll dies im Folgenden am Beispiel des sehr gut erforschten HI-Virus erläutert werden.

4.1 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

Das Humane Immundefizienz Virus (*Human Immunodeficiency Virus* HIV) gehört zu den Lentiviren aus der Familie der Retroviren. Damit besitzt das HI-Virus ein Genom aus RNA welches mithilfe des viralen Enzyms Reversen Transkriptase (RT) in DNA übersetzt, zu doppelsträngiger DNA vervollständigt und über ein weiteres Enzym, der Integrase, in das Wirtsgenome eingebaut wird.¹⁰ Dabei wird zwischen HIV Typ 1 (HIV-1) und HIV Typ 2 (HIV-2) unterschieden, die sich in ihrer Struktur und genetischen Features leicht unterscheiden. Hierbei ist HIV-1 mit 99.6% die weltweit dominierende Variante.¹¹ Das HI-Virus wird beinahe ausschließlich über den direkten Kontakt von Schleimhäuten mit infektiösen Körperflüssigkeiten übertragen. Hierbei stellt eine Bluttransfusion mit einer kontaminierten Blutkonserve ein 93 %iges Infektionsrisiko dar. Dies ist der Grund für die strikten Untersuchungen der verabreichten Blutkonserven. Mit einigem Abstand folgt die Infektion eines Embryos durch eine HIV-positive Mutter über die Nabelschnur, dabei ist allerdings anzumerken, dass diese Infektion durch eine geeignete medikamentöse Therapie auf ein sehr niedriges, wenn nicht sogar ein beinahe zu vernachlässigendes Risiko minimiert werden kann.¹²

Allerdings sind es andere Infektionswege die weltweit für die hohe Zahl an Neuinfektionen mit HIV verantwortlich sind. So ist beispielsweise der ungeschützte Geschlechtsverkehr zu 70 % bis 80 % der weltweiten Neuinfektionen verantwortlich, obwohl die Infektionswahrscheinlichkeit bei einem einfachen Kontakt bei knapp 1 % liegt. Auch der Drogenmissbrauch und das dort oft vorkommende Teilen der Injektionsnadel, hat eine etwas 1%ige Infektionswahrscheinlichkeit, jedoch liegt auch hier der Anteil der weltweiten Neuinfektionen bei etwa 10 %. Vergleichbare Wahrscheinlichkeiten wie z.B. ein Nadelstich mit einer kontaminierten Nadel von Mitarbeitenden im Gesundheitswesen machen weniger als 0.01 % der globalen Neuinfektionen aus. Die Ursache dieser geringen Quote liegt womöglich an den unterschiedlichen Handlungsmöglichkeiten der kontaminierten Personen. So sind Mitarbeitende im Gesundheitswesen oft in ein funktionierendes Gesundheitswesen eingebunden und haben so einfacheren Zugang zu Diagnostik und medikamentöser Profilaxe, wodurch das Risiko einer Infektion deutlich gesenkt werden kann.¹³

Im Weiteren soll der Lebenszyklus eines HIV-Virus beschrieben werden, um mögliche Ziele in der anti(retro)viralen Therapie aufzuzeigen.

Der Lebenszyklus des HI-Virus kann grob in zwei Abschnitte unterteilt werden. Der erste Abschnitt beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Zelle und endet mit dem Einbau der proviralen DNA in das Wirtsgenom (Abb. 4, Schritt 1 bis 5). In diesem Stadium spricht man von einem Provirus. Der zweite Abschnitt fängt mit der Transkription der proviralen DNA an und endet mit dem Ausstoßen infektiöser Viruspartikel (Abb. 4, Schritt 6 bis 11). Freie Viruspartikel haben im Blutplasma eine Halbwertszeit von 20-30 Minuten. Daher muss das freie Viruspartikel möglichst schnell eine Zelle finden. Hier spielt der CD4-Rezeptor neben den Chemokin-Rezeptoren CCR5 sowie CXCR4 eine große Rolle. Diese Rezeptorkombination ist vor allem auf den T-Helferzellen zu finden, was diesen Zelltyp besonders anfällig für einen Befall mit dem HI-Virus macht. Da die T-Helferzellen allerdings auch essenziell für eine Immunantwort des Wirtes sind und das Reifen neuer Viruspartikel letztendlich zum Zelltod führt, ist dies als Ursache für die durch das Virus erworbene Immunschwäche von HIV-infizierten Personen.^{14, 15}

Nach der erfolgreichen Fusion des Virus mit der Wirtszelle wird das virale Genom, zwei einzelne positiv-Strang RNAs, jeweils in lineare doppelsträngige DNA transkribiert. Dieser Prozess, auch reverse Transkription genannt, wird von der Reversen Transkriptase durchgeführt, welche das Virus mitbringt (Abb. 4, Schritt 2). Anschließend folgt das Enthüllen des viralen Genoms aus dem Kapsid und das Integrieren der proviralen DNA in das Wirtsgenom (Abb. 4, Schritte 3-5). In diesem Stadium wird von einem Provirus gesprochen, da die so infizierte Zelle nun als Reservoir des HI-Virus dient.¹³⁻¹⁵

Zu einem späteren Zeitpunkt folgt die Transkription der integrierten viralen DNA durch humane Polymerasen und anschließend die Bildung und Knospung neuer Viruspartikel, welche letztendlich wieder in den Wirtsorganismus freigesetzt werden. Die Viruspartikel sind initial nicht infektiös. Denn erst nach der Freisetzung der einzelnen Vironen wird eine virale Protease aktiviert die letztendlich ausschlaggebend für die Infektiosität der Viruspartikel sorgt (Abb. 4, Schritte 7-11).¹⁶

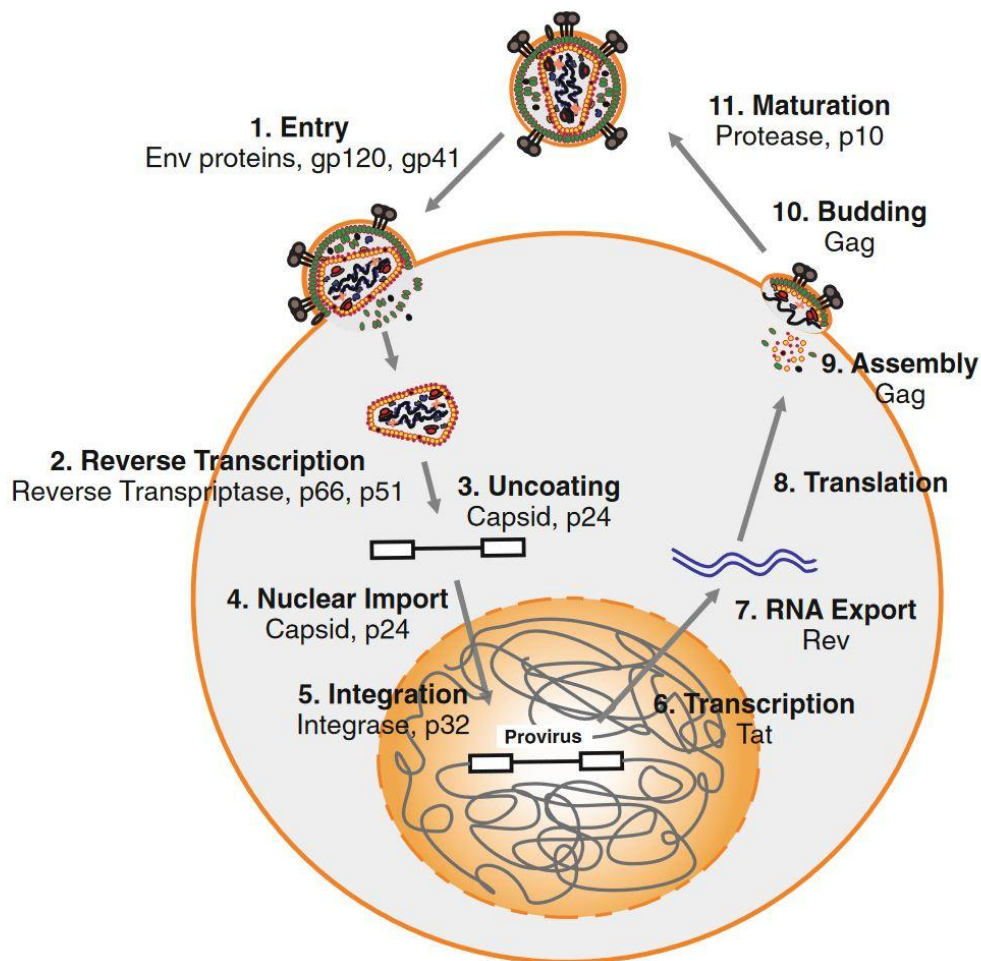


Abb. 4: Graphische Darstellung des Lebenszyklus eines HI-Virus.¹⁴

Nahezu jeder der einzelnen Stadien des Lebenszyklus kann als potentielles Target für die antivirale Therapie gesehen werden. So stellen die Oberflächenproteine ein Ziel dar, um dem Virus den Eintritt in die Wirtszelle zu verwehren, die Reverse Transkriptase um das Transkribieren in provirale DNA, die Integrase um ein Einbau in das Wirtsgenom sowie die Proteasen um das Ausreifen neuer infektiöser Viruspartikel zu verhindern.^{5, 17}

4.2 Viren, opportunistische Infektionen und Tumore

Das durch eine HIV-Infektion erworbene Immunschwächesyndrom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) ist ein prominentes Beispiel dafür, dass nicht nur die Virusinfektion an sich, sondern auch die damit einhergehenden Folgen durchaus ernst zu nehmen sind.

Die Ursache von AIDS liegt im Lebenszyklus des HI-Virus (Siehe Kapitel 4.1). Dieses Virus befällt bevorzugt Zellen, die CD4-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen, diese sind in der Regel die T-Lymphozyten oder auch T-Zellen. Diese werden Makrophagen oder Monozyten genannt, diese Zellen sind ein essenzieller Bestandteil des wirtseigenen Immunsystems.^{18, 19}

Da bei einer Reproduktion des HI-Virus die befallene Zelle nach Knospung der neuen Viruspartikel zerstört wird, hat dieses einen negativen Einfluss auf das Immunsystem. Durch die dadurch resultierende Schwächung des Immunsystems kommt es zu weiteren Erkrankungen, ausgelöst durch Erreger, die ebenso bei einer Person ohne geschwächtes Immunsystem vorhanden sind, jedoch keine Erkrankung auslösen. Bei diesem Effekt spricht man von einer opportunistischen Infektion, ausgelöst durch die Immunschwäche des Patienten. Die Begleiterscheinungen einer HIV-Infektion und dem daraus folgenden AIDS sind zahlreich und reichen von Lymphknotenschwellungen über Infektionen mit z.B. Herpes- oder dem Cytomegalievirus (CMV), Papillomaviren bis hin zu Lymphomen wie zum Beispiel Non-Hodgkin-Lymphome.¹⁵

HIV ist dabei nicht das einzige Virus, welches Lymphome und somit Krebs auslösen kann. Hier können fast alle (retro-)Viren genannt werden, die ihre virale DNA in das Genom der Wirtszelle integrieren. Dadurch stören sie die Expression von körpereigenen Enzymen oder sorgen für Punktmutationen. Weiterhin kann es durch die Expressionsmechanismen der viralen Polymerasen zur Darstellung von wirtseigenen, bereits im Genom verankerten Onkogenen kommen. Diese führen beispielweise bei knapp 40 % der HIV-infizierten Personen zu einer Krebsdiagnose, zusätzlich zu ihren opportunistischen Infektionen.²⁰

4.3 Strategien in der antiretroviralen Therapie

Ziel der antiretroviralen Therapie ist es, die Viruslast extrem zu minimieren, oder idealerweise ganz aus dem Wirtsorganismus zu entfernen. Dabei ist die Bildung von proviralen Reservoirs durch z.B. infizierte Lymphozyten bei dem HI-Virus, problematisch. Diese sind kaum bzw. gar nicht durch eine medikamentöse Therapie zu erreichen. Daher kommt es nach dem Absetzen der Medikation zu einem neuen Aufflammen der Infektion durch die rasante Bildung neuer Viruspartikel.¹⁵

Ein weiteres Problem ist die meist hohe Replikationsraten der Viren (bspw. 2×10^9 neue Viruspartikel im Fall des HI-Virus). In Kombination mit der Fehleranfälligkeit der viralen Polymerasen führt dies zu einem sehr hohen Aufkommen von Mutationen. Auch wenn viele dieser Mutationen zu einem nicht überlebensfähigen Virus führen, so reicht die reine Masse an Mutationen aus, um rein statistisch schnell resistente Virusvarianten zu bilden.¹⁴

Von dieser schnellen Resistenzbildung sind sowohl *Entry*-Inhibitoren, nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (*nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*, NRTIs), nicht nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (*non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*, NNRTIs), Integrase Inhibitoren sowie Protease Inhibitoren betroffen.

Mit allen genannten Inhibitoren ist eine Monotherapie mit den entsprechenden Präparaten möglich, jedoch wurde anschließend immer die Bildung resistenter Virusstämme beobachtet. Um das zu verhindern, wird die sogenannte hochaktive antiretrovirale Therapie (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*, HAART bzw. ART) eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Kombinationstherapie aus meist zwei NRTIs sowie entweder einem NNRTI oder einem Proteasehemmer, welche durch einen Proteasehemmer bzw. einen Integrasehemmer in ihrer Wirkung geboostert werden. Durch die Kombination dieser verschiedenen Wirkstoffe ist es für das Virus deutlich schwieriger evolutionär bevorzugte Mutationen zu selektieren. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass eine Mutation auftritt, die mehreren Wirkstoffen widersteht und gleichzeitig keine Einbußen in der Virulenz besitzt.²¹

Im weiteren Verlauf soll besonders auf die NRTIs bzw. die Nucleotid-analoge Reverse Transkriptase Inhibitoren (*nucleotide analog reverse-transcriptase inhibitors*, NtRTIs) eingegangen werden. Ein besonderer Fokus wird dabei auf den NtRTIs, deren Entwicklung und Anwendungsmöglichkeiten liegen.

4.3.1 Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren NRTI

Wie bereits erwähnt, sind die NRTIs das Rückgrat der antiretroviralen Therapie, insbesondere der HAART und daher nicht mehr wegzudenken. Die Entwicklung dieser Wirkstoffklasse begann bereits 1985, ein Jahr nach der Entdeckung des HI-Virus, als Ursache des erworbenen Immunschwächesyndroms (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS). Das erste aktive NRTI, welches für die Behandlung des HI-Virus durch die FDA zugelassen wurde, war 3'-Azidothymidin (AZT, 1). Diese wurde zufällig durch das Screening einer Substanzbank aus potentiellen antitumoralen Wirkstoffen gefunden und gilt als erster Meilenstein in der Entwicklung antiviraler Nucleosidanaloga.²²

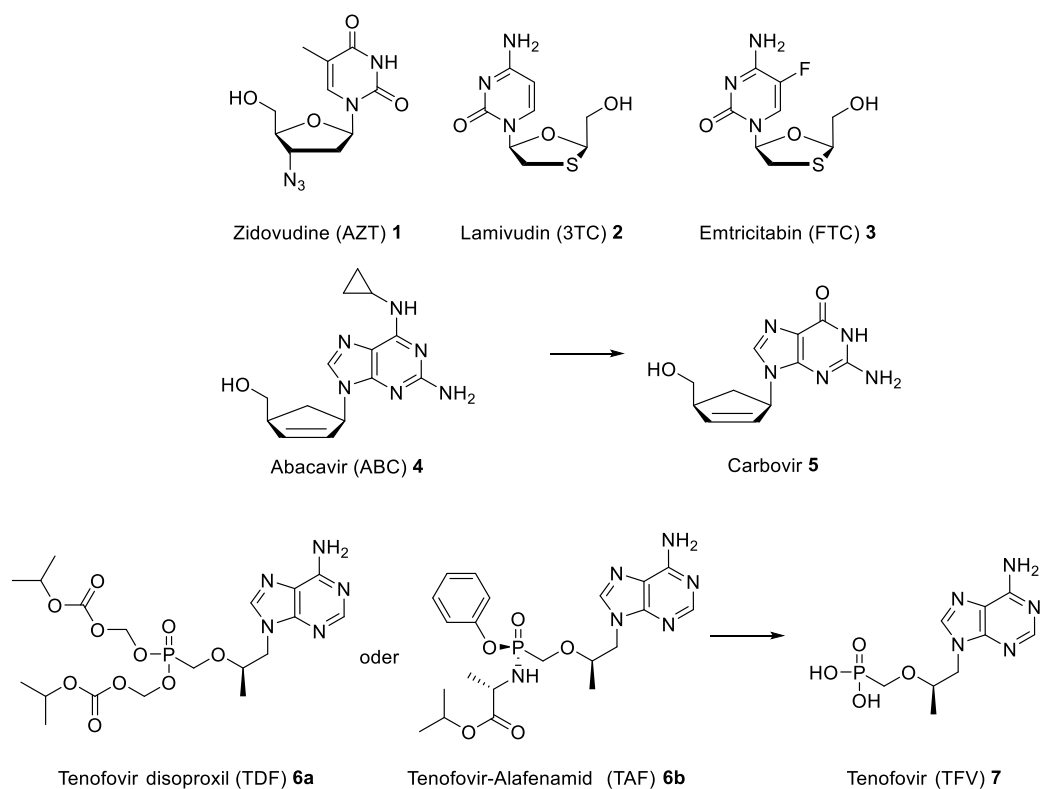


Abb. 5: Fünf Beispiele von aktuell zugelassenen NRTIs (1, 2, 3, 4 sowie 7) für die antiretrovirale Therapie.

Durch die Untersuchung des Wirkmechanismus konnte bewiesen werden, dass die Replikation des HI-Virus durch gezielte Chemotherapie kontrollierbar ist. Diese Entdeckung gilt als weiterer Meilenstein und Startschuss für die Entwicklung neuer antiretroviraler Wirkstoffe.^{22, 23}

In Abb. 5 sind vier der acht zugelassenen NRTIs (davon sieben Nucleosid- und ein Nucleotid-Analogen) für die HIV-Therapie gezeigt. Auffällig dabei ist, dass nur Abacavir (ABC) eine Modifikation an der Nucleobase trägt. Diese Modifikation wird jedoch intrazellulär enzymatisch gespalten, wodurch ABC ein Prodrug des Carbovirs (dem eigentlichen Wirkstoff) darstellt.²⁴ Daher kann gesagt werden, dass aktuell keine NRTIs mit (großen) Modifikationen an der Nucleobase eingesetzt werden. Die verschiedenen Möglichkeiten der Modifikationen für die Entwicklung neuer NRTIs sind in Abb. 6 dargestellt.

Der eigentliche Wirkmechanismus der NRTIs ist daher auf eine Modifikation des Zuckers zurückzuführen. So hat keins der in Abb. 5 gezeigten NRTIs eine 3'-Hydroxyfunktion, was in letzter Konsequenz nach dem Einbau des NRTIs in den neu synthetisierten DNA-Strang durch die HIV-RT zu einem sofortigen Kettenabbruch führt. Zudem gibt es die Möglichkeit, weitere Heteroatome wie z.B. ein Schwefelatom einzuführen, wie es die Beispiele 3TC 2 und FTC 3 zeigen. Diese beiden NRTIs haben zusätzlich eine nicht natürliche L-Konfiguration was zu einer Deformation des DNA-Stranges führen kann.^{25, 26}

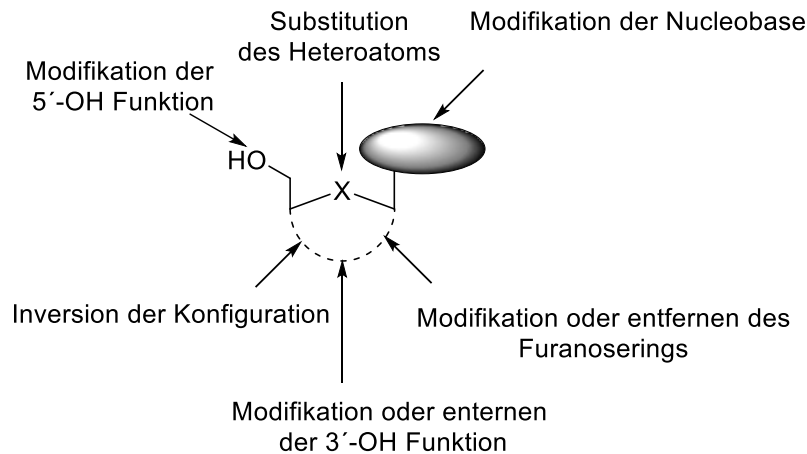


Abb. 6: Mögliche Ansätze zur Modifikation für die Entwicklung neuer NRTIs.²⁷

Unabhängig von ihrer Darreichungsform, z.B. oral oder intravenös, müssen die NRTIs in das Zytoplasma der infizierten Zellen, um ihre eigentliche Wirkung zu entfalten. Dies geschieht hauptsächlich über passive Diffusion durch die Zellmembran bzw. teilweise auch gezielt durch Transportproteine in der Zellmembran. Die Zellaufnahme spielt eine große Rolle bei der Entwicklung der NRTIs, da diese aufgrund ihrer Struktur hydrophil sind, was die passive Diffusion durch die Zellmembran verhindert. Daher ist der Transport über so genannte *Carrier*-Proteine besonders erstrebenswert, da diese Proteine teilweise in der Lage sind bereits die Monophosphate der entsprechenden Verbindungen in die Zelle zu transportieren.^{28, 29}

Im Zytoplasma angekommen, unterliegen die NRTIs dem Metabolismus der Zelle. Um ihre antivirale Wirkung entfalten zu können, müssen die NRTIs zu den entsprechenden Triphosphaten über zelleigene Enzyme phosphoryliert werden. Die NRTIs werden erst zum Mono-, anschließend zum Di- und letztendlich zum Triphosphat phosphoryliert. Die Umsetzung zum Monophosphat wird hauptsächlich über nur vier Kinasen, der cytosolischen Desoxycytidin Kinase (dCK), der Thymidinkinase 1 (TK1), der Thymidinkinase 2 (TK2) sowie der mitochondrialen Desoxyguanosin Kinase durchgeführt. Dadurch sind die NRTIs häufig aufgrund ihrer Substrateigenschaften von diesen vier Kinasen abhängig bzw. in ihrer Wirkung limitiert. AZT 1 ist dabei ein besonders gutes Beispiel für die Korrelation von Phosphorylierung und Aktivität. So ist AZT 1 in Thymidinkinase *knock-out* Zellen, also Zellen die keine Thymidinkinasen besitzen bzw. produzieren können, nicht aktiv, da es schlicht nicht monophosphoryliert wird.²²

Die Phosphorylierung zum Monophosphat stellt demnach eine Engstelle in der Aktivierung der NRTIs dar, da die Kinasen für die weiteren Phosphorylierungsschritte meistens deutlich weniger selektiv sind.

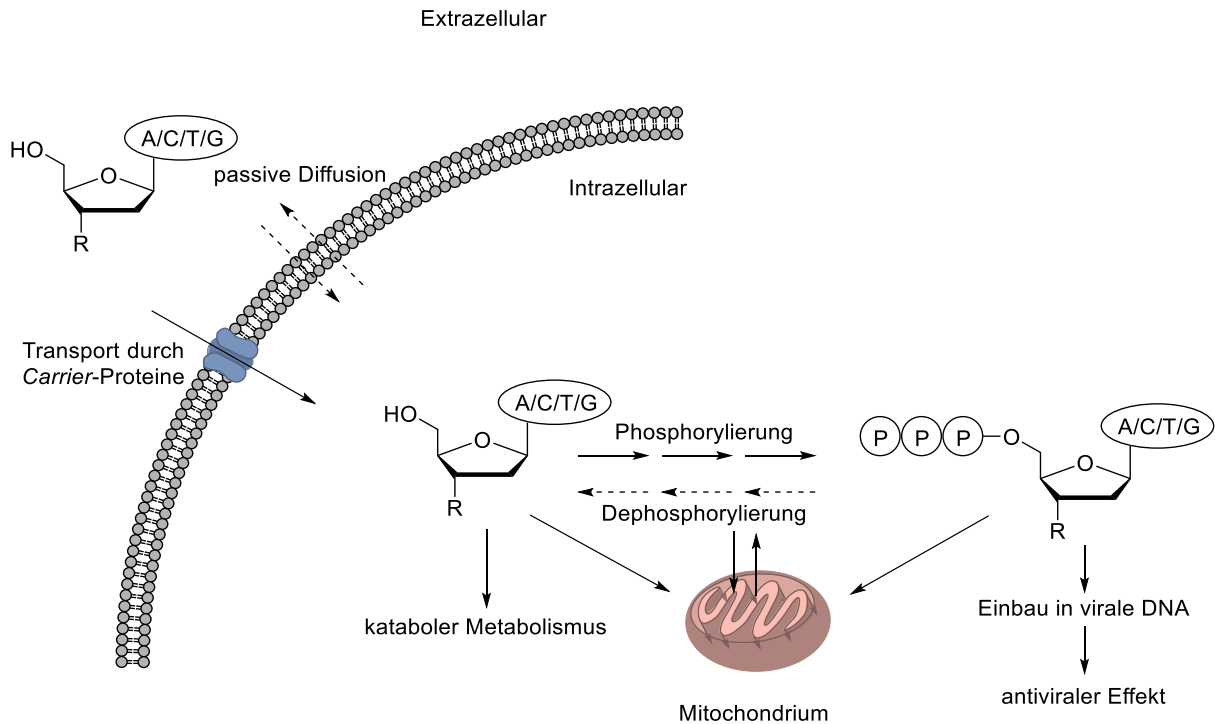


Abb. 7: Schema über die generellen für NRTIs relevanten Vorgänge für den Transport in das Zytosol sowie die Intrazellulären metabolischen Mechanismen die zu einer antiviralen Aktivität bzw. ihren toxischen Nebenwirkungen führen können.³⁰

Die NRTIs unterliegen allerdings nicht nur dem anabolen, sondern auch dem Zellstoffwechsel. Das wichtigste Beispiel dafür sollte die Dephosphorylierung der NRTI Di- und Triphosphate sein. So kann jede Phosphorylierungsstufe durch entsprechende Phosphatasen wieder in die nächst niedrigere Phosphorylierungsstufe umgewandelt werden. Von besonderer Bedeutung ist die Dephosphorylierung von den NRTI-Monophosphaten zu den eigentlichen NRTIs. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die NRTIs dem zellulären Nucleosid Katabolismus unterliegen, bei dem hauptsächlich die *N*-glycosidische Bindung zwischen der Nucleobase und dem Glycon gespalten werden, wodurch die NRTIs nicht mehr als Wirkstoff zur Verfügung stehen.²⁶

Zuletzt können die NRTIs sowie die verschiedenen Metaboliten auch in das Mitochondrium diffundieren. Dort sind einige Triphosphate Substrate für die humane DNA-Polymerase γ , eine DNA-abhängige DNA Polymerase. Wird durch diese Polymerase z.B. AZT-Triphosphat in die DNA eingebaut führt dies dazu, dass keine neue mitochondriale DNA gebildet werden kann und in letzter Konsequenz zum Verlust des Mitochondriums. Dies führt zu Nebenwirkungen wie einer Acidose, Pankreatitis, Hepatitis oder genereller Muskelschwäche.³¹⁻³⁴

Tenofovir **7** besitzt keinen Furanosering und zählt damit zu den acyclischen Nucleosidanaloga. Durch das Fehlen des Glycons gibt es keine *N*-glycosidische Bindung, die durch Enzyme gespalten werden können. Tenofovir **7** trägt nur eine Alkylkette mit einem Phosphonat an der

Nucleobase. Dieses Phosphonat ist durch seine Kohlenstoff-Phosphor-Bindung stabil gegenüber katabolen Prozessen oder chemischer Hydrolyse. Aufgrund dieser Eigenschaften ist Tenofovir **7** kein Vertreter der NRTIs, sondern ein NtRTI, also der Nucleotid-analoge Reverse Transkriptase Inhibitoren.²⁶

4.3.2 Nucleotid-analoge Reverse Transkriptase Inhibitoren (NtRTI)

Die drei prominentesten Beispiele für NtRTIs sind Adefovir (PMEA, **8**), Tenofovir ((*R*)-PMPA, **7**) sowie Cidofovir ((*S*)-HPMPC, **9**) und sind in Abb. 8 dargestellt.

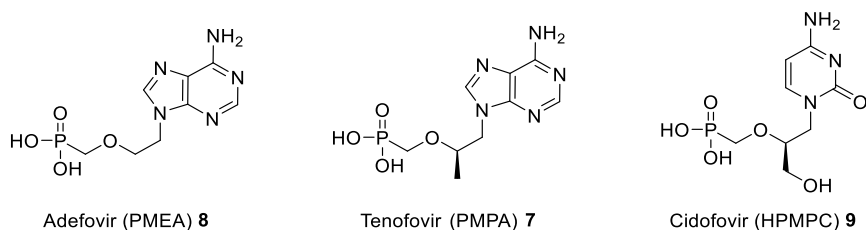


Abb. 8: Die drei prominentesten Beispiele der NtRTIs, die acyclischen Nucleosid-Phosphonate (ANPs) PMEAs **8**, (*R*)-PMPA **7** und (*S*)-HPMPC **9**.

Das Besondere an diesen Verbindungen ist, dass sie als stabile Monophosphate anzusehen sind. Durch ihre Kohlenstoff-Phosphor-Bindung kann das Phosphonat nicht mehr enzymatisch oder chemisch gespalten werden. Weiterhin haben sie kein Glycon, sondern einen Alkylrest, der über eine *N*-Alkylierung an die Nucleobase stabil gebunden ist. Aufgrund dieser Merkmale werden diese Art von Verbindungen auch als acyclische Nucleosid-Phosphonate (ANP) zusammengefasst. Jedes der in Abb. 8 gezeigten ANPs wird bereits mit Erfolg in der antiviralen Therapie eingesetzt.

4.3.2.1 Acyclische Nucleosid-Phosphonate (ANP)

Begonnen hat die Entwicklung der ANPs durch die Entdeckung der antiviralen Aktivität von (*S*)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenin (DHPA) **10**. Dieses Molekül besitzt, analog wie z.B. Acyclovir, kein Glycon und hat damit eine minimalistische Struktur. Dennoch zeigte diese Verbindung eine gute antivirale Aktivität gegenüber einer Vielzahl von DNA und RNA Viren. Dieses Molekül besitzt ein Stereozentrum, welches einen Einfluss auf die Aktivität besitzt. So imitiert das *S*-Enantiomer die Form des natürlichen D-Glycons und ist damit das aktivere der beiden Enantiomere. Gleichzeitig konnte von DE CLERCQ gezeigt werden, dass die *N*-Alkylierung stabil gegenüber der Adenindesaminase oder Adenosindesaminase ist. Zudem zeigte sich, dass durch die Anwesenheit von DHPA sogar die Desaminierung von Adenosin oder Adenosin Arabinosid verhindert werden konnte. Gleichzeitig zeigte sich, dass ein

sekundäres Kohlenstoffatom statt der *N*-glycosidischen Bindung für mehr Flexibilität sorgt und somit ein breiteres antivirales Spektrum ermöglicht.³⁵

Ein weiterer Baustein bei der Entwicklung der ANPs war die Entdeckung der antiviralen Aktivität der Phosphonessigsäure **11**. Diese zeigte eine antivirale Wirkung gegenüber z.B. Herpesviren. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden von HOLÝ erste Vorläufer der ANPs, wie z.B. 5'-Desoxyuridin-5'-phosphonsäure **12** dargestellt. Eine Kombination aus Uridin und der Phosphonessigsäure **11**. Dieses Phosphonat zeigte die erwartete Stabilität gegenüber Phosphatasen und stellte damit ein *proof-of-concept* dar. Es zeigte jedoch kaum bzw. keine antivirale Aktivität.^{36, 37}

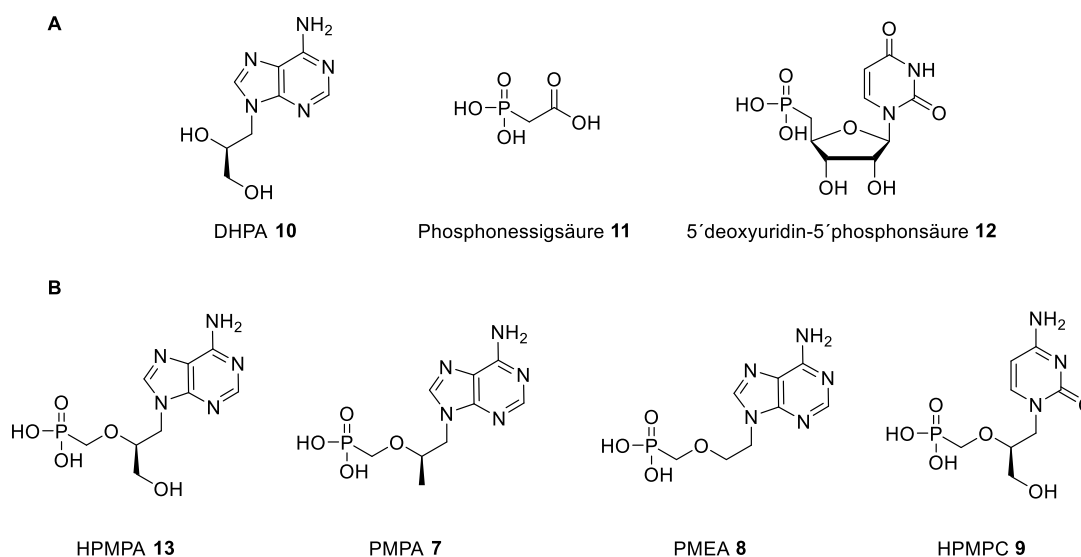


Abb. 9: Die wichtigsten Zwischenschritte auf dem Weg zur Entwicklung der ANP (**A**) sowie die ersten daraus entwickelten und eingesetzten ANPs (**B**).

Letztendlich war es der Wunsch, eine katabolisch stabile, isopolare und möglichst isosterische Variante des DHPA-Monosphosphates darzustellen, der den Startpunkt der ANPs setzte. Dabei war die Überlegung den labilen Phosphorester durch ein stabiles Phosphonat nach Vorbild der Phosphonessigsäure zu ersetzen. Als möglicher Kandidat wurde dafür ein Phosphonomethylether ausgewählt. Dieser Baustein wurde vorher auf seine Zytotoxizität überprüft und anschließend wurde der Phosphonomethyl-Baustein mit dem ungeschützten DHPA gekuppelt. Dies führte zu einem racemischen Gemisch von den entsprechenden 2'- sowie 3'-Regioisomeren, welches jedoch eine antivirale Aktivität zeigte. Von diesen vier möglichen Vorläufern zeigte nach einer regio- und stereoselektiven Synthese das (*S*)-Enantiomer des 2'-Regioisomers die eigentliche antivirale Aktivität, das (*S*)-HPMPA **13**.³⁸

Nach der erfolgreichen Synthese des (*S*)-HPMPA **13** und dem Beweis der breiten antiviralen Aktivität folgte die Synthese von zwei einfacheren ANPs, darunter eins ohne Stereozentrum. Dies war die Geburtsstunde von (*R*)-PMPA **7** bzw. von PMEAs **8**.⁴⁰

Eine weitere Testreihe war die Synthese der (*S*)-HPMP-Reihe mit den drei übrigen Nucleobasen. Hierbei war besonders das (*S*)-HPMPC **9**, welches Cytosin als Nucleobase trägt, von großem Interesse. Diese Verbindung zeigte durchweg eine gute antivirale Aktivität gegenüber DNA-Viren, insbesondere gegen das Cytomegalievirus (CMV).³⁹

4.3.2.2 Wirkmechanismus des ANPs

Wie vermutliche alle NRTIs, fungieren auch die NtRTIs inklusive der ANPs als Substrate für die HIV-RT welche nach dem Einbau in die neu synthetisierte virale DNA zu einem Kettenabbruch oder einer Deformation führen.

Analog zu den NRTIs müssen auch die ANPs zu den entsprechenden Triphosphat-analoga phosphoryliert werden. Dies geschieht über die im Zytosol befindlichen Kinasen. Jedoch besteht der große Vorteil darin, dass die ANPs an sich schon ein Monophosphat darstellen. Dadurch wird die häufigste Engstelle, das Phosphorylieren zum Monophosphat, umgangen. Die ANPs werden meistens über AMP oder GMP Kinasen zu ihren Monophosphaten (dem Diphosphat-Analogen) phosphoryliert, während das ANP-Monophosphat über Nucleosid Diphosphat Kinasen zum ANP-Diphosphat, dem eigentlichen Triphosphat-Analogen, phosphoryliert wird. Dies macht die ANPs vor allem unabhängig von der viral exprimierten Thymidin Kinasen und damit potentiell aktiv gegen eine größere Bandbreite an Viren.⁴¹⁻⁴³

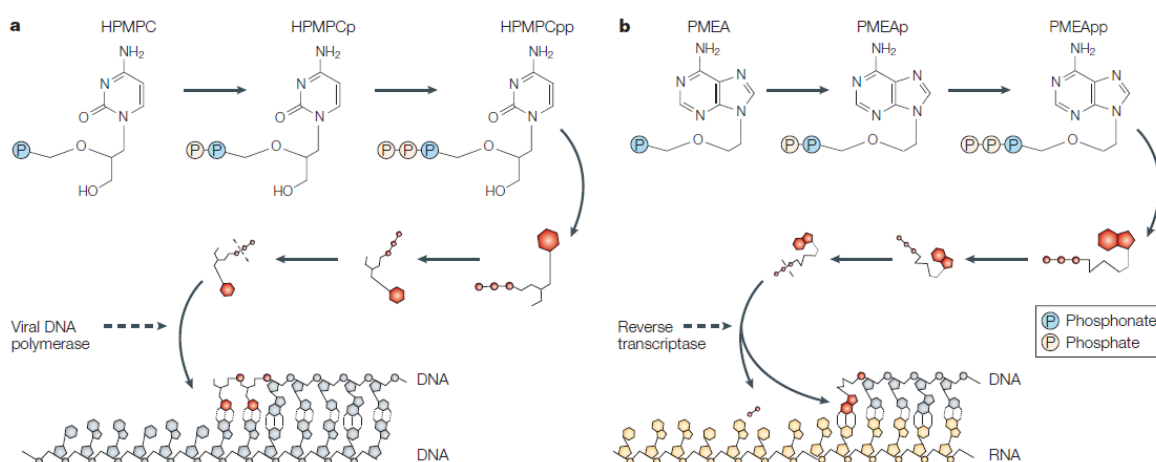


Abb. 10: Wirkmechanismus der ANPs an den Beispielen von (*S*)-HPMPC **9** (a) und PMEAs **8** (b).⁴⁴

Bei dem Wirkmechanismus der ANPs muss man zwischen den drei Varianten 2-Phosphonomethoxyethyl- (PME), 2-Phosphonomethoxypropyl- (PMP) sowie 3-Hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl- ((S)-HPMP) unterscheiden. Dabei kommt es nach dem Einbau eines PME- oder PMP-Derivates aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe zu einem sofortigen Kettenabbruch. Wohingegen bei den (S)-HPMP-Derivaten ein einfacher Einbau in den neu synthetisierten Strang noch keinen direkten Kettenabbruch zur Folge hat. Allerdings kommt es, aufgrund des fehlenden rigiden Rings, häufig zu einer Deformation des neuen DNA-Stranges. Durch diese Deformation wird unabhängig davon, ob noch einmal (S)-HPMPC-Diphosphat in unmittelbarer Nähe eingebaut wird, die Strangverlängerung deutlich verlangsamt.^{45, 46}

Kommt es jedoch, z.B. aufgrund der Sequenz, zu einem doppelten Einbau eines (S)-HPMP-Derivates direkt hintereinander so ist die Deformation des neuen DNA-Stranges so groß, dass es zu einem Kettenabbruch kommt.⁴⁵

Somit lässt sich zusammenfassen, dass der Wirkmechanismus der ANPs, wie bei allen NRTIs, der Kettenabbruch der neuen viralen DNA ist. Dieser wird entweder durch das Fehlen der Hydroxyfunktion erreicht (z.B. PME A **8** und (R)-PMP A **7**) oder durch die Deformation des DNA Stranges aufgrund der höheren Freiheitsgrade (z.B. (S)-HPMPC **9**).

4.3.2.3 Wirkspektrum der ANPs

Die acyclischen Nucleosid-Phosphonate haben ein großes Wirkspektrum, was über alle drei angewendeten ANPs eine Vielzahl an DNA und RNA Viren umschließt. Um dieses breite Wirkspektrum zu verstehen, ist es hilfreich die Unterschiede zwischen den acyclischen Nucleosidanaloga Ganciclovir **14** und dem ANP Cidofovir **9** herauszuarbeiten.

Wie in Kapitel 4.3.2.2 bereits beschrieben, stellen die ANPs bereits acyclische Monophosphatanaloga dar wohingegen die acyclischen Nucleosidanaloga nach der Zellaufnahme phosphoryliert werden müssen. Dies geschieht entweder über die Enzyme der Wirtszelle oder, wie im Fall der acyclischen Nucleosidanaloga, über spezielle in dem viralen Genom kodierte Kinasen, wie die Thymidin Kinase für Herpesviren oder Protein Kinasen bei dem Cytomegalievirus. Aufgrund dieser Abhängigkeiten ist es für die acyclischen Nucleosidanaloga unmöglich, eine Wirkung gegenüber Viren zu entfalten, die entweder diese Kinasen nicht kodieren oder aufgrund von Resistenzbildungen, diese nicht mehr produzieren.⁴⁷

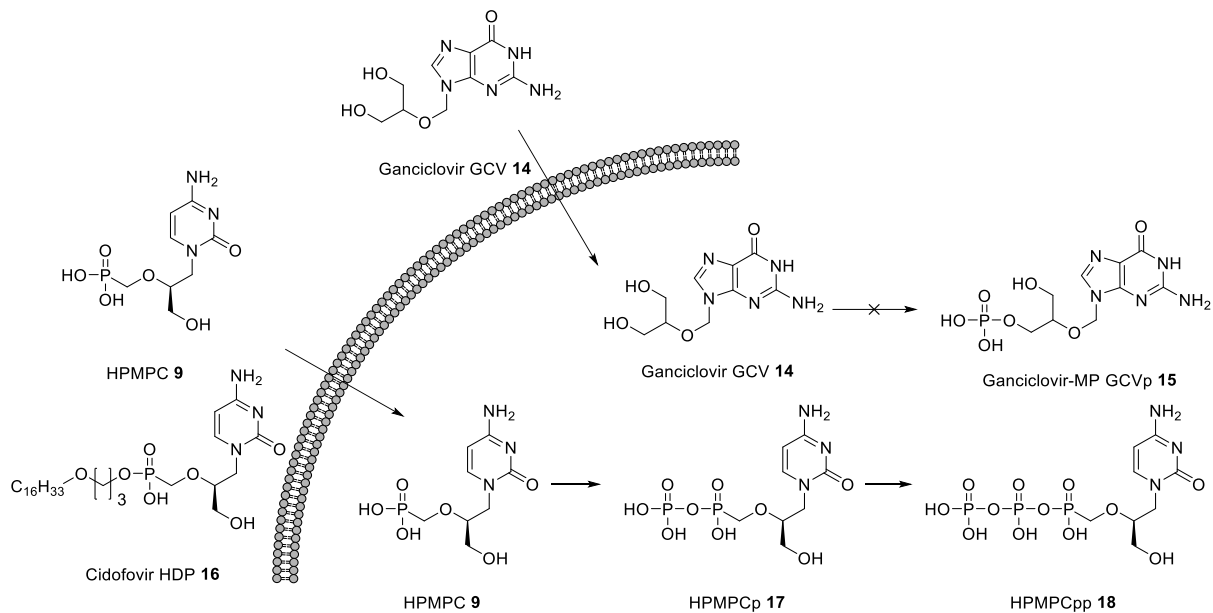


Abb. 11: Vorteile der ANPs gegenüber der acyclischen Nucleosidanaloga an den Beispielen Ganciclovir und Cidofovir ((S)-HPMPC) in einer Thymidin Kinase Defizit Zelle.

Die ANPs können so entweder direkt zum Diphosphat oder über das Monophosphat zum Diphosphat phosphoryliert werden. Die Enzyme, die diese Phosphorylierungsschritte durchführen, sind meistens wirtszelleigene Enzyme und können so nicht durch die Replikation oder Mutation des Virus beeinflusst werden (siehe Seite 22).

Diese Fähigkeit, von den viralen Kinasen unabhängig zu sein, eröffnet das breite Wirkspektrum der ANPs. So sind sie nicht nur gegen die Virusstämme aktiv, die aufgrund von Mutationen keine Kinase exprimieren, sondern auch gegen Viren, die gar nicht erst solche Kinasen in ihrem Genom kodieren. (S)-HPMPC hat eine antivirale Aktivität gegenüber allen Herpes-, Adeno-, Polyoma-, Papiloma-, Pocken- und Parapoxviren. Wohingegen PMEA hauptsächlich gegenüber Retro-, Herpes- sowie Hepadnaviren (auch als Hepatitisviren bekannt) und (R)-PMPA vor allem gegenüber Retroviren sowie Hepadnaviren aktiv ist. Die Aktivitäten sind in Tab. 1 zusammengefasst.^{39, 46, 48-50}

Auffällig ist dabei, dass (S)-HPMPC 9 gegen nahezu alle DNA-Viren eine antivirale Aktivität zeigt. Dies ist besonders interessant, da es damit ein möglicher Kandidat für ein Breitband-Virostatikum ist. Besonders die antivirale Aktivität gegenüber den Pockenviren hat in den letzten Jahren für Aufmerksamkeit gesorgt. So zeigt (S)-HPMPC 9 nicht nur eine gute antivirale Aktivität gegenüber nahezu jedem Pockenstamm, sondern kann auch als Kurzzeitprophylaxe nach einer mutmaßlichen Infektion angewendet werden. Dieser Umstand macht (S)-HPMPC besonders im Hinblick auf die immer noch bzw. immer wieder kehrende abstrakte Terrorgefahr interessant. Daher gibt es auch Überlegungen für potentielle Anschläge mit Biowaffen, (S)-HPMPC 9 bzw. das Prodrug Cidofovir HDP 16 zu bevorraten.^{51, 52}

Tab. 1: Zusammenfassung des Wirkspektrums der drei klinisch genutzten ANPs, (S)-HPMPC, PMEA sowie (R)-PMPA.

Virus Klasse	Virus Typ	Cidofovir 9 ((S)-HPMPC)	Adefovir 8 (PMEA)	Tenofovir 7 ((R)-PMPA)
DNA Viren	Polyomaviren	x		
	Papillomaviren	x		
	Pockenviren	x		
	Parapoxviren	x		
	Adenoviren	x		
	Herpesviren	x	x	
	Hepadna- bzw. Hepatitisviren	x	x	x
RNA Viren	Retroviren (z.B. HIV und SIV)		x	x

4.3.2.4 Klinische Anwendung der ANPs

In der klinischen Anwendung werden von PMEA **8** sowie (R)-PMPA **7** die Prodrugs sowie das (S)-HPMPC als solches eingesetzt. Dies hat bei PMEA **8** sowie (R)-PMPA **7** den Vorteil, dass sie oral, also als Tablette, verabreicht werden können, wohingegen (S)-HPMPC **9** entweder intravenös oder als Gel bzw. Creme Anwendung findet.

PMEA (Adefovir) findet als Adefovir-Dipivoxil Anwendung bei Hepatitis B Infektionen. Hier zeigten Studien an Tiermodellen bei einer Dosierung von 0.1 mg/kg pro Tag schon eine deutliche Reduzierung der Viruslast im Blut. Unter den gleichen Bedingungen erzielte Lamivudin (3TC) erst bei einer Dosierung von 500 mg/kg pro Tag eine leichte Verminderung der Viruslast. Dies zeigt die hohe Potenz der ANPs.⁵³⁻⁵⁵ In klinischen Studien konnte schon bei einer Gabe von 125 mg Adefovir-Dipivoxil als Einzeldosis nach 28 Tagen die Viruslast gesenkt werden. Eine tägliche Einnahme von 10 mg Adefovir-Dipivoxil zeigte bei einer HIV-1 und Lamivudin-resistenten Hepatitis B Coinfektion eine signifikante Senkung der Viruslast nach 24 Wochen. Bei dieser Dosierung sind keine signifikanten Nebenwirkungen aufgefallen, was für ein sehr gutes Wirkprofil spricht. Wobei zu erwähnen ist, dass bei einer höheren Dosis von 60 bis 120 mg pro Tag eine potentielle Nephrotoxizität festgestellt wurde, jedoch liegt diese Dosierung deutlich höher als die klinisch angewendete Dosierung.⁵⁶⁻⁵⁹

Tenofovir **7** bzw. sein Prodrugs Tenofovir-Disoproxil (TDF) **6a** oder Tenofovir-Alafenamid (TAF) **6b** ist der am meisten verschriebene Wirkstoff bei einer HIV-Infektion. Tenofovir **7** gilt als der Wirkstoff der ersten Wahl bei einer Therapie. Dabei finden sowohl TDF **6a** als auch

TAF **6b** Anwendung. Während in der pre- als auch in der postexpositions Prophylaxe nahezu ausschließlich TDF **6a** genutzt wird, wird bei der Therapie einer HIV- bzw. HBV-Infektion von Fall zu Fall entschieden. Beide Prodrugs sind als Tablette verfügbar, was besonders für die Behandlung von Patienten in Entwicklungsländern von großem Vorteil ist. In Tierexperimenten konnte bereits 24 Stunden nach der intravenösen Infektion von Makaken durch die Gabe von etwa 30 mg/kg Tenofovir eine Infektion mit SIV vermieden werden. Eine vergleichbare Dosis reduzierte die Viruslast bei SIV-Infizierten Makaken um über 99 % und schützte ungeborene Embryonen vor einer Infektion im Mutterleib.⁶⁰⁻⁶² In klinischen Studien zeigte sich eine Dosierung von 300 mg/Tag als hervorragend geeignet. Diese Dosierung sorgte in Doppelblind- und Placebo kontrollierten Studien schon nach zwei Wochen für einen sehr starken Rückgang der Viruslast im Blut. Dabei war das Sicherheitsprofil vergleichbar mit der Placebo-Kontrollgruppe, sprich: es gab, keine signifikanten Nebenwirkungen.⁶³

In einer großen, dreijährigen Studie wurden verschiedene Wirkstoffkombinationen für die HAART bei HIV-Infektionen getestet. Dabei legte zum einen das TDF **6a** als auch Stavudin (d4T) den Grundstein der jeweiligen Wirkstoffkombinationen. Das Ergebnis dieser Studie zeigte, dass die Kombination von d4T bzw. TDF **6a** mit Lamivudin sowie Efavirenz (ein NNRTI) den größten Erfolg brachten. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination mit Tenofovir **7** zu nahezu keinen Nebenwirkungen führte. Die Kombination mit d4T ist jedoch deutlich günstiger, was besonders in finanziell schwächeren Regionen von großer Bedeutung ist und zeigte nur wenige Nebenwirkungen.⁶⁴

Dabei ist anzumerken, dass die antivirale Potenz von TAF **6b** etwa hundertfach größer ist als die von TDF **6a**. Dieser unterschied kann auf das verwendete Prodrug Konzept zurückgeführt werden. TAF **6b** nutzt das von MCGUIGAN entwickelte ProTide-Konzept (Kapitel 4.4.1). Bei einer Einnahme von TDF **6a** Tenofovir wird schon im Blutplasma Tenofovir **7** in größeren Mengen freigesetzt. Wohingegen bei der Einnahme von TAF **6b** Tenofovir **7** hauptsächlich in den HIV-infizierten Zellen freigesetzt wird, wodurch bereits eine etwa zehnfach geringere Dosierung (30 mg/Tag TAF **6b** statt 300 mg/Tag TDF **6a**) den gleichen antiretroviralen Effekt erzielt. Durch die geringere Dosierung werden die bereits schon selten auftretenden Nebenwirkungen (akutes Nierenversagen bei vorbelasteten Patienten) noch einmal unwahrscheinlicher.^{65, 66}

Cidofovir bzw. (S)-HPMPC **9** zeigte in Tiermodellen ein überzeugendes Wirkprofil gegenüber allen gängigen DNA Viren die auch den Menschen befallen können. Weiterhin zeigte sich im Mausmodell, dass eine intranasale Gabe von Cidofovir als Aerosol einen Tag vor der intranasalen Infektion mit Kuhpocken eine 100 %ige Überlebensquote der Mäuse. Dies deutet

darauf hin, dass die intranasale Gabe von Cidofovir eine wirksame preexpositions Prophylaxe darstellen könnte.⁶⁷

In der klinischen Anwendung kann Cidofovir die in den entsprechenden Zell- bzw. Tierstudien gezeigt Aktivität bestätigen. So wird es erfolgreich bei einer CMV, anderen Herpesviren, Adenoviren, Polyomaviren, Hepadnaviren und auch gegen Pockenviren-Infektionen eingesetzt. Dabei kommen unterschiedliche Dosierungen und Verabreichungsformen zum Einsatz. Während die Anwendung von Cidofovir haltigen Gelen oder Cremes nebenwirkungsarm ist, ist bei der intravenösen Verabreichung von Cidofovir die dosisabhängige Nephrotoxizität der limitierende Faktor. Hier kann jedoch eine ausreichende Flüssigkeitsgabe (bevorzugt intravenös) vor, während und nach der intravenösen Gabe Abhilfe schaffen bzw. diesen Effekt deutlich reduzieren.⁶⁷

Weiterhin ist zu erwähnen, dass Cidofovirmonophosphat-Cholin eine intrazelluläre Halbwertszeit von 48 Stunden aufweist. Dadurch kann sich ein Reservoir bilden und somit eine längere antivirale Wirkung erzielt werden. Dies ist ein immenser Vorteil gegenüber z.B. den acyclischen Nucleosid-Analoga wie Acyclovir, Penciclovir oder Ganciclovir, die teilweise mehrmals täglich eingenommen werden müssen, um einen antiviralen Effekt zu erreichen. Bei Cidofovir ist eine wöchentliche Einnahme ausreichend. Dies ist ein großer Schritt zu dem Ziel der WHO, einen möglichen Wunschwirkstoff zu entwickeln, bei dem eine einmalige orale Einnahme eines Virostatikums ausreichend ist, um eine Infektion zu bekämpfen oder zu verhindern.⁶⁸

4.3.2.5 ANPs in der Krebstherapie

Wie bereits im Kapitel 4.2 erwähnt, können diverse Viruserkrankungen Auslöser für die Entstehung von Tumoren sein. So wird angenommen, dass das CMV ein Auslöser für Glioblastome (eine bösartige Raumforderung von Gewebe im Gehirn) ist. Diese Art von Tumor kann derzeit nicht vollständig geheilt werden. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten begrenzen sich hier auf eine operative Reduktion der Tumormasse zusammen mit Chemo- und Bestrahlungstherapie womit die Überlebenszeit auf knapp 15 Monate gestreckt werden kann.⁶⁹

Da Cidofovir ((S)-HPMPC **9**) bereits bei anderen Tumoren, die durch eine Viruserkrankung hervorgerufen wurden, gute Ergebnisse bei *in vivo* Experimenten gezeigt hatte und (S)-HPMPC bei einer CMV Infektion als Arzneistoff zugelassen ist, wurden die Eigenschaften für eine mögliche Therapie bei Glioblastomen getestet.^{70, 71}

Hierbei zeigten sich gute bis sehr gute Eigenschaften. So konnten schon erste *in vitro* Studien zeigen, dass durch Cidofovir der Zelltod der betroffenen Zellen ausgelöst und gleichzeitig die

Ausbreitung dieser Tumorzellen verhindert werden kann. Dies beruht unter Anderem auf einen Einbau von Cidofovir in die neu gebildete DNA, was vor allem in schnell teilenden Zellen wie z.B. Tumorzellen geschieht. Dieser Effekt konnte durch eine kombinierte Therapie von Cidofovir und ionisierender Bestrahlung verstärkt werden. Weiterhin ist es wahrscheinlich das Cidofovir nicht nur über diese zwei, sondern gleich über mehrere Wirkmechanismen die Zellen beeinflusst. Bei einer Übertragung dieser Ergebnisse auf ein *in vivo* Mausmodell konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich konnte Cidofovir fast ausschließlich im Tumorgewebe der betroffenen Mäuse nachgewiesen werden. Wodurch davon ausgegangen wird, dass es fast ausschließlich in dem betroffenen Gewebe wirkt und damit störende Nebenwirkungen vermieden werden.⁷⁰

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ANPs nicht nur ein Meilenstein in der antiviralen Therapie sind, sondern auch bei der Bekämpfung von Tumoren gute Dienste leisten.

4.3.2.6 Resistenzbildungen oder die Grenzen der ANPs

Die Achillesferse jeder antibiotischen und auch antiviralen Therapie ist das Entstehen von Resistenzen gegen den Wirkstoff. Dies ist besonders in der antiviralen Therapie ein großes Problem, da durch die hohen Reproduktionsraten der Viren auch eine hohe Mutationsrate einhergeht. Für Nucleosid- und Nucleotid-Analoga sind hier besonders Punktmutationen in den viralen Polymerasen interessant. Oft reicht hier der Austausch von einer Aminosäure aus, damit das vormals aktive Nucleosid-Triphosphat kein Substrat mehr für das virale Enzym ist.⁷²

Auch hier können die ANPs einen Vorteil ausspielen. Sie besitzen unter Anderem ein flexibles, sekundäres Kohlenstoffatom an der Bindung zur Nucleobase. Diese Flexibilität macht es möglich, sich an die Bindetasche der viralen Polymerasen besonders gut anzupassen, wodurch das Ausbilden von resistenten Varianten vermeintlich komplizierter ist, da das ANP sich der neuen Umgebung gut anpassen kann. Daher ist die Ausbildung neuer, resistenter Virusvarianten von besonderer Bedeutung. Für die ANPs konnten bei *in vitro* Studien nach einer ausreichend langen Exposition der ANPs resistenter Varianten gefunden werden. Es wird jedoch vermutet, dass diese gleichzeitig auch ihre Virulenz vermindern bzw. sogar verlieren. Weiterhin konnte die Ausbildung der *in vitro* gefundenen resistenten Varianten nur bedingt *in vivo* nachgewiesen werden und wenn, hatten sie keine bis kaum Auswirkungen bei einer weiteren Therapie mit den entsprechenden ANPs.⁶⁷

Im Gegenteil dazu konnte z.B. Cidofovir mit Erfolg gegen Ganciclovir resistente Viren eingesetzt werden, obwohl bei *in vitro* Studien festgestellt werden konnte, dass die eigentliche Wirkung vermindert sein sollte.⁷³

Abschließend ist daher zu sagen, dass auch die ANPs nicht gegen eine Resistenzbildung der verschiedenen Viren gewappnet sind. Aufgrund ihrer flexibleren, acyclischen Struktur ist es jedoch für das Virus oft nur unter Einbuße der Virulenz möglich, Resistenzen auszubilden.

4.4 Prodrugs – das Umgehen von pharmakologischen Hürden

Das wachsende Verständnis von Pathogenen, Krankheiten und Mikroorganismen sorgt für eine immer größer werdende Zahl an möglichen Zielen (auch Targets genannt) für die Wirkstoffentwicklung. Damit einher geht allerdings auch, dass die neu entwickelten oder designten Wirkstoffe oft mindestens eine Eigenschaft besitzen, die es schwer, wenn nicht sogar unmöglich macht, diesen Wirkstoff klinisch zu nutzen. In der pharmazeutischen Industrie hat es die Möglichkeit über die Formulierung die Eigenschaften der Wirkstoffe zu modifizieren. Es wird dabei versucht, über die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Bestandteile einer Tablette z.B. den Zeitpunkt der Freisetzung des Wirkstoffes oder die Löslichkeit zu beeinflussen. Diese Maßnahmen reichen jedoch nicht immer aus, um das gewünschte Wirkprofil zu erreichen.⁷⁴⁻⁷⁶

Die Lösung dieser Probleme ist oft das Überführen des Wirkstoffes in ein Prodrug. Die US Food and Drug Administration (FDA) hat in der Zeit von 2008 bis 2018 insgesamt 30 neue Prodrugs als Wirkstoffe zugelassen, was etwa 12 % der neu zugelassenen Wirkstoffe ausmacht. Insgesamt machen Prodrugs etwa 10 % der aktuellen Wirkstoffe aus (stand 2018). Dies zeigt die immense Bedeutung von Prodrugs in der modernen pharmazeutischen Industrie und damit auch in der Wirkstoffentwicklung.⁷⁷

Prodrugs sind Moleküle, die, wenig bis gar keine pharmakologische Wirkung besitzen. Erst eine Hydrolyse, entweder durch chemische, enzymatische oder beide Prozesse, setzt den eigentlichen Wirkstoff frei. Das Ziel dabei ist es, die so genannten ADMET Eigenschaften zu verbessern. ADMET steht dabei für die absorptions-, distributions-, metabolischen, exkretions- und toxikologischen Eigenschaften des Wirkstoffes. Hierbei kann es sich um eine Maske, einen Carrier, eine intramolekulare Umlagerung oder dem Trigger einer anderen strukturellen Veränderung handeln.⁷⁸

Die Ziele können dabei sehr unterschiedlich sein und hängen jeweils von der gewünschten Verabreichungsart oder dem Ort des Targets ab. So ist beispielsweise die Wasserlöslichkeit für eine intravenöse oder perorale Verabreichung unerlässlich. Diese wird oft durch das Einführen von polaren Gruppen wie beispielsweise Phosphaten oder Sulfaten bzw. deren Natriumsalze erreicht. Damit kann die Löslichkeit im wässrigen Medium teilweise um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert werden.⁷⁹

Weiterhin ist es oft wichtig, den so genannten *first-pass effect* zu reduzieren. Dieser beschreibt die Metabolisierung jeder Substanz unabhängig ihrer verabreichten Form in der Leber. Dies betrifft vor allem chemische Motive wie Phenole. Um diese vor der schnellen Metabolisierung und damit auch der Inaktivierung zu schützen, werden sie mit einer metabolisch labilen Maskierungseinheit, wie beispielsweise einem Ester, versehen.⁸⁰

Ein weiterer Vorteil von Prodrugs kann sein, dass dadurch so genannte *slow release drugs* entwickelt werden können. Diese Wirkstoffe, meistens mit einer Fettsäure verestert, binden beispielsweise unspezifisch an Albumine im Blut und werden über einen langen Zeitraum konstant freigesetzt. Dadurch ist es deutlich besser möglich, einen konstanten Wirkstoffspiegel im Blut zu erreichen, wodurch wiederum eine seltenere Einnahme des Medikamentes möglich ist. Dadurch kann das Überspringen eines Einnahmeintervalls deutlich besser gepuffert werden, was gerade bei der Dauermedikation von älteren Menschen von Vorteil ist.⁸¹

Ein weiteres Problem von Wirkstoffen ist oft das Durchdringen von natürlichen Membranen wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke oder auch einfach die Zellmembran, um in das Zytosol zu gelangen. Dies ist gerade für polare oder gar geladene Wirkstoffe (wie Nucleosid- oder Nucleotid-Analoga) ein immenses Problem. Auch hier haben sich Ester als Mittel der Wahl gezeigt, um polare Hydroxyfunktionen an Nucleosiden zu maskieren. Gleiches gilt auch für die Ladungen von Nucleotid-Analoga, wie beispielsweise den Monophosphaten oder den ANPs. Mit der Zeit haben sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Maskierungsmöglichkeiten von Nucleosid-Monophosphat-Analoga entwickelt, die auf unterschiedlichste Art und Weise das Nucleosid-Monophosphat im Zytosol freisetzen sollen.^{82, 83}

4.4.1 Prodrugs von Nucleotiden

Da es sich als Vorteil gezeigt hat bereits, die Monophosphate der Nucleosidanaloga für die antivirale Therapie einzusetzen, stellte sich dort die nächste Herausforderung: die Nucleosidmonophosphat-Analoga liegen im physiologischen pH-Bereich zweifach deprotoniert vor und tragen damit zwei negative Ladungen. Dies macht sie zwar sehr gut wasserlöslich, jedoch verhindert es die Zellaufnahme über passive Diffusion in das Zytosol. Im Laufe der Jahre haben sich mehrere Prodrugkonzepte durchgesetzt, um diese Ladungen zu maskieren. Im weiteren Verlauf soll exemplarisch auf die *cycloSal*- sowie ProTide-Technologien eingegangen werden, da sie zwei verschiedene Mechanismen bedienen.

Die ersten ProTides wurden von der Gruppe um MCGUIGAN beschrieben. ProTides sind in der Regel acyclische Nucleosid Aryl Phosphate, die mit einem Aminosäureester maskiert sind.

Dadurch sind die beiden negativen Ladungen maskiert und es ist der Verbindung möglich, passiv durch die Zellmembran zu diffundieren. Bei der Aktivierung der Prodrugs zu ihren eigentlichen Metaboliten sind die ProTides auf eine enzymatische Spaltung des Esters der Aminosäure angewiesen. Anschließend kommt es zu einem nucleophilen Angriff des Carboxylates auf das Phosphoratom wodurch das Phenol eliminiert wird. Die nun entstandene cyclische Verbindung bricht spontan wieder auf und es kommt zu einer Spaltung der Phosphoramidat Bindung, entweder ebenfalls spontan oder enzymatisch. Der Nachteil dieser Methode ist das frei werdende Phenol, was eine toxische Wirkung hat. Weiterhin kommt es bei den ProTides zu einem neuen Stereozentrum durch die zwei unterschiedlichen Substituenten am Phosphoratom.⁸⁴

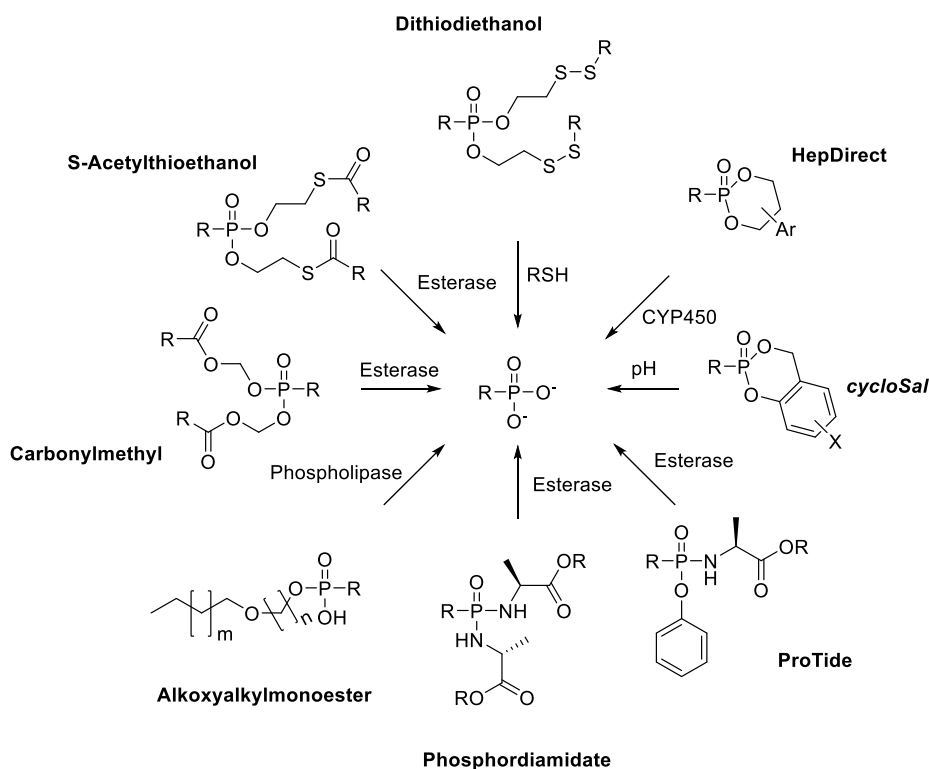


Abb. 12: Eine Auswahl Prodrug Strategien für Phosphate oder Phosphonate mit ihren Spaltungsbedingungen. Dabei steht CYP450 für das Cytochrom P450, und RSH für einen beliebigen Thiol z.B. die Aminosäure Cystein.⁷⁷

Im Gegensatz dazu steht die *cycloSal*-Technologie, die von MEIER entwickelt wurde. Auch hier handelt es sich um einen asymmetrischen Phosphatriester. Dabei werden unterschiedlich substituierte Salicylalkohole als Ausgangssubstanzen genutzt. Über die Wahl der Substituenten sowie deren Substitutionsmuster kann Einfluss auf die Hydrolyseeigenschaften der *cycloSal* Prodrugs genommen werden.⁸⁵

cycloSal-Pronucleotide sind bei ihrer Hydrolyse nicht auf Enzyme angewiesen, sondern nur auf den pH-Wert ihrer Umgebung. Kommt es zu einer Hydrolyse des phenolischen

Phosphatesters und damit zu einer Umpolung des Substituenten am Aromaten, folgt der schnelle und spontane Bindungsbruch des Benzylesters. Dieser Bindungsbruch setzt letztendlich das eigentliche Monophosphat frei. Da bei der Hydrolyse der *cycloSal*-Pronucleotide keine Enzyme benötigt werden, ist es unwahrscheinlich, dass es einen Unterschied der bei der Synthese entstehenden Diastereomere in ihrer Aktivität gibt. Dennoch ist es durch die Nutzung von chiralen Auxiliaren möglich, enantiomerenreine *cycloSal*-Pronucleotide darzustellen.^{85, 86}

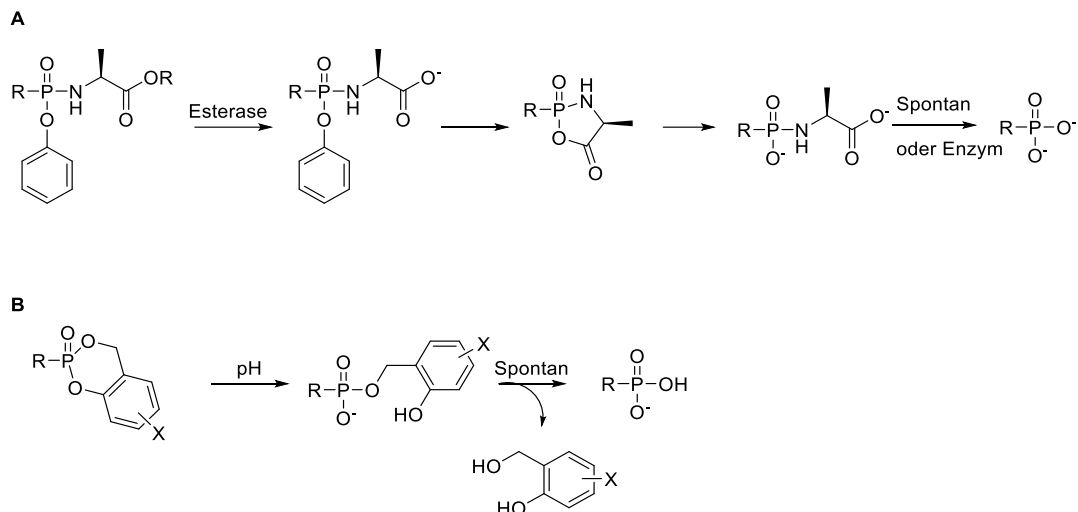


Abb. 13: Freisetzungsmechanismen der ProTides (A) und der *cycloSal*-Pronucleotide (B).

4.4.2 Prodrugs von höher phosphorylierten Nucleosid-Analoga

Zwar gibt es viele Prodrug-Systeme, die es möglich machen, bereits die Monophosphate der Nucleosidanaloga in die Zellen zu bringen, jedoch sind dann immer noch weitere Phosphorylierungsschritte notwendig, um sie in ihren eigentlich aktiven Metaboliten, das Triphosphat, zu überführen. Da diese nicht immer, jedoch teilweise auch zu Problemen führen können und damit die Aktivität der Wirkstoffe vermindern, wäre es von großem Vorteil, auch höher phosphorylierte Verbindungen in die Zelle bringen zu können.

Genau für solche Anwendungen hat MEIER die DiPPPro bzw. TriPPPro Strategie entwickelt. Hierbei werden Di- bzw. Triphosphate am β - bzw. γ -Phosphat mit zwei Acyloxybenzylmasken (AB-Masken) versehen. Diese maskieren zwar nur die negativen Ladungen am entsprechenden Phosphat, jedoch kann durch die Länge der Alkylester die Lipophilie beeinflusst werden. Dadurch ist es diesen Verbindungen möglich, auch mit zwei negativen Ladungen die Zellmembran zu durchdringen und somit ins Zytosol zu gelangen.^{87, 88}

Im Zytosol angekommen, werden die entsprechenden Alkylester gespalten, wodurch es, ähnlich wie bei den *cycloSal*-Pronucleotiden zu einer Umpolung kommt. Diese sorgt durch

eine 1,6-Umlagerung für einen spontanen Bindungsbruch des benzylichen Phosphatesters. Diese Kaskade wird für die zweite Maske wiederholt und das entsprechende Nucleosid-Di- bzw. Triphosphat wird freigesetzt.^{87, 88}

Bei vorrangegangenen Hydrolysestudien an diversen Nucleosid-DiPPPro- sowie TriPPPro Verbindungen konnte festgestellt werden, dass durch die Maskierung der Ladung des Phosphates ein nucleophiler Angriff an dem entsprechendem Phosphoratom deutlich wahrscheinlicher ist. Dadurch kann es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen, wie z.B. die Spaltung der Phosphorsäureanhydrid-Bindung, wodurch das Mono- bzw. Diphosphat freigesetzt werden würde.

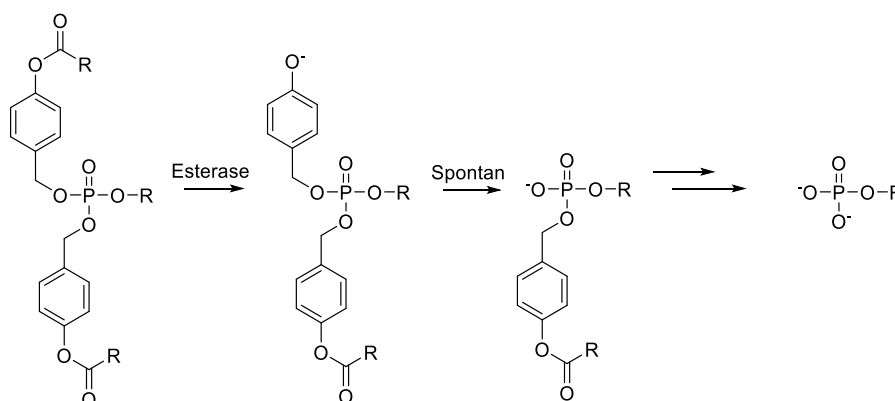


Abb. 14: Hydrolyse Mechanismus der Di- bzw. TriPPPro Verbindungen.

Nach der Weiterentwicklung und Optimierung der TriPPPro-Verbindungen, gelang es ZHAO, asymmetrische TriPPPro-Verbindungen darzustellen. Hierbei zeigte sich vor allem die Kombination aus einem Alkylester sowie einer Acyloxybenzylmaske (AB) als besonders interessant. Diese Kombination besitzt nur eine spaltbare Maske, da sich der Alkylester bei Hydrolysestudien in Zellextrakt als stabil herausstellte. In *Primer Extension Assays* konnte gezeigt werden, dass auch mit einer langen Alkylkette am γ -Phosphat die entsprechenden Nucleosid-Triphosphate ein Substrat für die HIV-RT sind.⁸⁹

Letztendlich kann weiterhin über die Wahl der Kettenlängen der jeweiligen Maskierungseinheiten nicht nur die Lipophilie der einzelnen Prodrugs, sondern auch im gewissen Maße ihre chemische Stabilität gesteuert werden. So sind längere Alkylketten bei den AB-Masken stabiler gegenüber chemischer als auch enzymatischer Hydrolyse. Weiterhin sind die Alkoxy-carboxyloxybenzyl (ACB)-Masken chemisch stabiler als die entsprechenden AB-Masken, wohingegen die Alkylmodifikation quasi nicht gespalten wird. Somit ist alleine mit diesen vier verschiedenen Maskierungseinheiten eine Fülle von TriPPPro Verbindungen realisierbar. Über die Auswahl der geeigneten Maskierungseinheiten sowie der

entsprechenden Alkylkette ist es möglich, für beinahe jede Anwendung die optimale Kombination zu ermitteln.

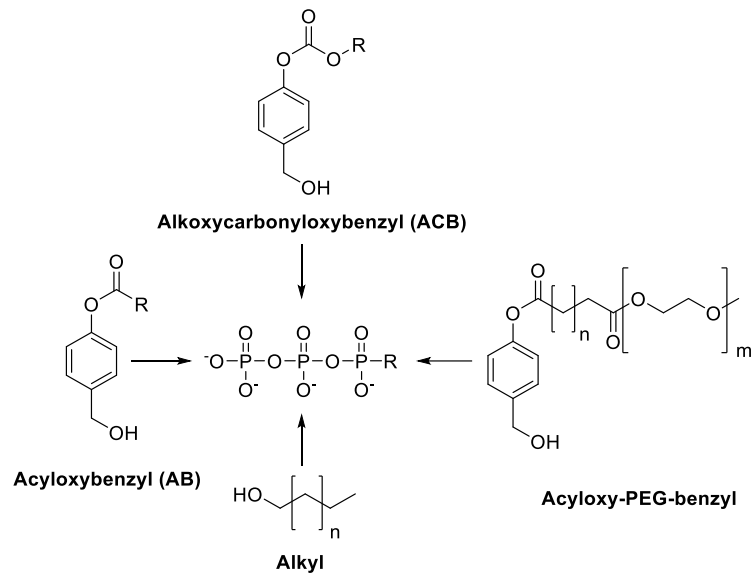


Abb. 15: Auswahl an Maskierungseinheiten für die TriPPPro-Verbindungen.

Die TriPPPro Methode ist also das Mittel der Wahl, wenn es darum gehen soll, die eigentlich aktiven Metaboliten der Nucleosid- oder Nucleotidanaloga in die Zellen zu bringen. Weiterhin ist es möglich, diese nur mit einer stabilen Modifikation am γ -Phosphat zu versehen.

5 Aufgabenstellung

Die acyclischen Nucleotid-Analoga Adefovir **8** und Tenofovir **7** sind das Fundament der antiretroviralen Therapie. Während Adefovir-Dipivoxil hauptsächlich bei Hepatitis B Infektionen genutzt wird, ist Tenofovir-Alafenamid **6b** das Mittel der Wahl bei einer Exposition oder Infektion mit dem HI-Virus. Gleichzeitig wird Cidofovir **9**, das dritte ANP, gegen nahezu alle DNA Virusinfektionen eingesetzt. Diese drei Wirkstoffe bilden also den Grundstein der aktuellen antiviralen Therapie.

Diese Verbindungen werden vor allem aufgrund ihrer geringen Zytotoxizität, ihrer hohen Resistenz gegenüber Mutationen sowie ihrer generellen guten Verträglichkeit eingesetzt.

Obwohl diese Verbindungen bereits Monophosphatanaloga darstellen, müssen sie, um ihre Aktivität zu entfalten, im Zytosol zu ihrem eigentlichen Metaboliten, dem ANP-Diphosphat, phosphoryliert werden. Zwar sind bereits von allen drei Verbindungen Prodrugs entwickelt worden, von denen seit Längerem zwei eine klinische Anwendung finden, jedoch sind noch keine Prodrugs der höher phosphorylierten Metaboliten bekannt.

Um diese Lücke zu schließen, wurde bereits in einer vorherigen Arbeit eine Reihe von Tenofovir-Diphosphat-Prodrugs dargestellt und auf ihre Eigenschaften sowie antiviralen Aktivität überprüft.⁹⁰ Dabei hatte sich die Kombination einer schnell spaltbaren bioreversiblen Maske mit einer Alkylmodifikation bzw. nur eine Alkylmodifikation am γ -Phosphat am vielversprechendsten gezeigt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, weitere asymmetrische Tenofovir-Diphosphat-Prodrugs darzustellen, um einen besseren Eindruck zu bekommen, welchen Einfluss die bioreversible Maske bzw. die entsprechende Kettenlänge hat. Die Verbindungen sollten auf ihre antivirale Aktivität überprüft und mit *Primer Extension Assays* anschließend die Verbindungen **7g** und **7h** auf ihre Substrateigenschaften, gegenüber der HIV-RT sowie der humanen DNA Polymerase γ untersucht werden.

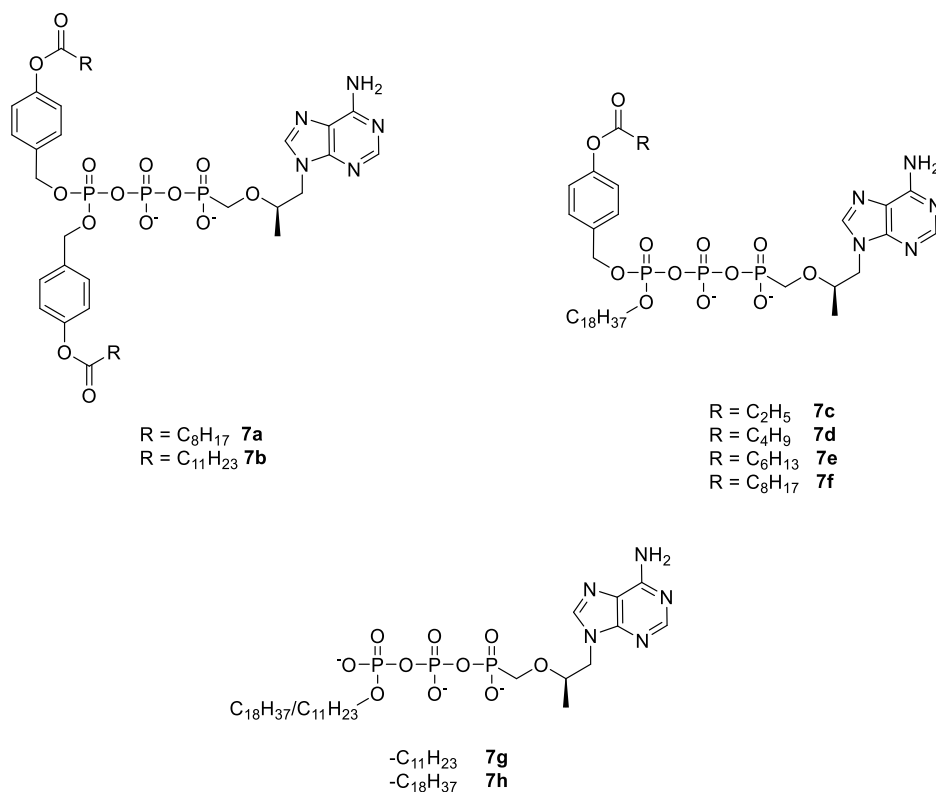


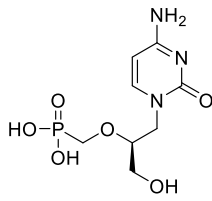
Abb. 16: Die darzustellenden Tenofovir-Diphosphate.

Aufgrund der interessanten Eigenschaften und dem breiten Wirkspektrum von Cidofovir sollte im weiteren Verlauf auch von diesem ANP die entsprechenden Diphosphat-Prodrugs dargestellt werden. Hierbei wurde sich auf zwei symmetrische und zwei asymmetrische Prodrugs mit jeweils einer γ -C18-Alkylmodifikation sowie den γ -C11 und γ -C18-Diphosphaten beschränkt.

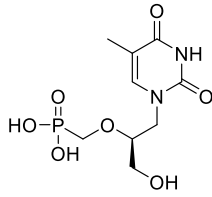
Um einen möglichen Einfluss der Nucleobase auf die Aktivität zu untersuchen, wurden auch die Derivate mit Adenosin, Guanin und Thymin als Nucleobase dargestellt und analog zu dem Cidofovir die entsprechenden Diphosphate bzw. -Prodrugs dargestellt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die antitumorale Wirkung durch das Verwenden von 5-Fluoruracil als Nucleobase verbessert werden kann. Auch von dieser Verbindung sollten die Diphosphate bzw. -Prodrugs dargestellt werden.

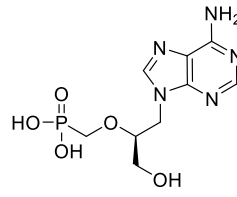
Anschließend sollten die dargestellten (S)-HPMP-Diphosphate auf ihre chemische Stabilität und ihr Verhalten in Zellextrakt untersucht werden. Auch ihre Substrateigenschaften sollten gegenüber der HIV-RT, der humanen DNA-Polymerase γ , sowie für die Cidofovir **9** bzw. den (S)-HPMPFU-Derivaten auch gegenüber der humanen DNA-Polymerase α untersucht werden.



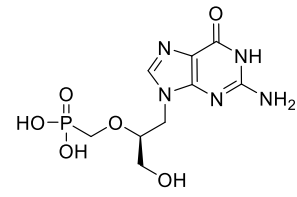
Cidofovir/HPMPC 9



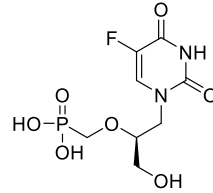
HPMPPT 19



HPMPA 13



HPMPG 20



HPMPFU 21

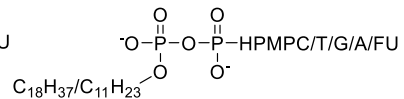
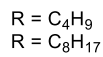
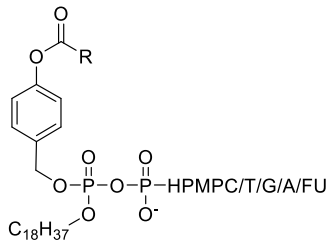
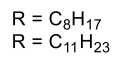
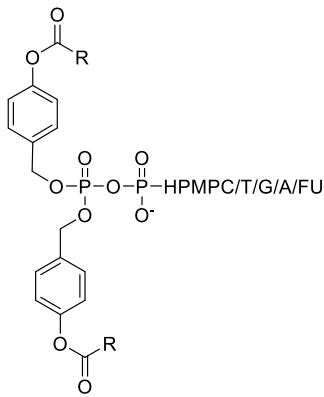


Abb. 17: Die darzustellenden (S)-HPMP-Derivate und ihre entsprechenden Diphosphate bzw. - Prodrugs.

Von allen dargestellten Verbindungen sollten in der Arbeitsgruppe um Schols an der KU Leuven (Belgien) ihre antivirale Aktivität festgestellt werden.

6 Resultate und Diskussion

(*R*)-PMPA ist ein acyclisches Nucleosid-Phosphonat mit einer breiten antiretroviralen Aktivität, welches bereits als Monophosphat-Prodrug in der antiviralen Therapie sowie der Expositionsprophylaxe große Anwendung findet.⁹¹ Dennoch sind bei dem verwendeten Prodrug (Tenofovir-Disoproxil **6**) weitere, intrazelluläre Phosphorylierungsschritte nötig, um den aktiven Metaboliten, das (*R*)-PMPA-Diphosphat, zu bilden (siehe Kapitel 4.3.2.2). Da in der Literatur noch keine Prodrugs von höher phosphorylierten ANPs beschrieben wurde, stellte dies die Motivation für folgenden Untersuchungen dar. Der Ausgangspunkt ist dabei das (*R*)-PMPA, welches in größerem Maßstab kommerziell erhältlich ist.

6.1 Synthese des (*R*)-PMPA-Mono- und Diphosphates sowie der (*R*)-PMPA-Diphosphat Prodrugs

Bei der Synthese der (*R*)-PMPA-Diphosphat Prodrugs wurde die sogenannte *H*-Phosphonat-Route gewählt. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 18 dargestellt. Hierbei wurde ausgehend von einem doppelt veresterten Phosphit (dem *H*-Phosphonat) das Pyrophosphat dargestellt, welches nach Kupplung mit dem entsprechenden ANP die gewünschte TriPPP Verbindung ergeben sollte. Im weiteren Verlauf des Kapitels soll genauer auf die einzelnen Syntheseschritte eingegangen werden. Bei dieser Arbeit wurde sich an einer früheren Arbeit aus dem Arbeitskreis von MEIER orientiert.⁹⁰

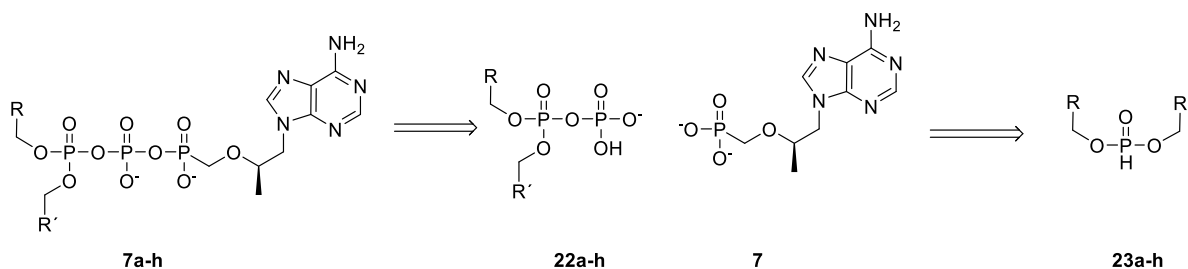


Abb. 18: Retrosyntheschema der *H*-Phosphonat Route.

6.1.1 Synthese der symmetrischen und asymmetrischen *H*-Phosphonate

Für die Synthese der verschiedenen *H*-Phosphonate wurden zuerst die entsprechenden (4-Hydroxymethyl)phenylalkanoate (AB-Masken) **26a-26e** benötigt. Die Synthese erfolgte über die Veresterung der phenolischen Hydroxylgruppe mit den entsprechenden Säurechloriden. Dabei wurde der 4-Hydroxybenzylalkohol **25** als Überschusskomponente eingesetzt, um die Bildung des doppelt veresterten Produktes zu vermeiden. Hierbei zeigte sich, dass der Einsatz von 1.20 Äquivalenten 4-Hydroxybenzylalkohol **25** sowie von 10 mol%

4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) die Ausbeute im Vergleich zu der Synthese von GOLLNEST noch einmal deutlich, auf bis zu knapp 90 % gesteigert werden konnte.⁹²

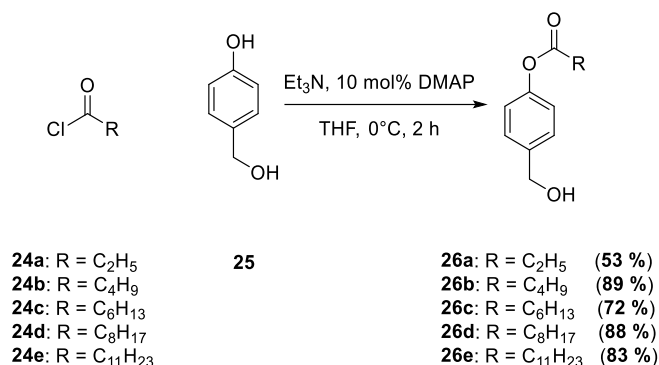


Abb. 19: Synthese der benötigten AB-Masken **26a-26e**.

Es schloss sich die Synthese der benötigten *H*-Phosphonate an. Hierbei muss zwischen den symmetrischen und den asymmetrischen *H*-Phosphonaten unterschieden werden.

Die Darstellung der symmetrischen *H*-Phosphonate erfolgte nach der Vorschrift von GOLLNEST über einen Additions-Eliminierung-Mechanismus der AB-Masken an Diphenylphosphit **27** (Abb. 20).⁸⁸

Für die symmetrischen *H*-Phosphonate wurden nach der Kristallisation aus Methanol vergleichbare Ausbeuten von ca. 60 % erreicht. Diese Synthese funktionierte zuverlässig und lieferte auch in einem großen Maßstab eine reproduzierbare Ausbeute.

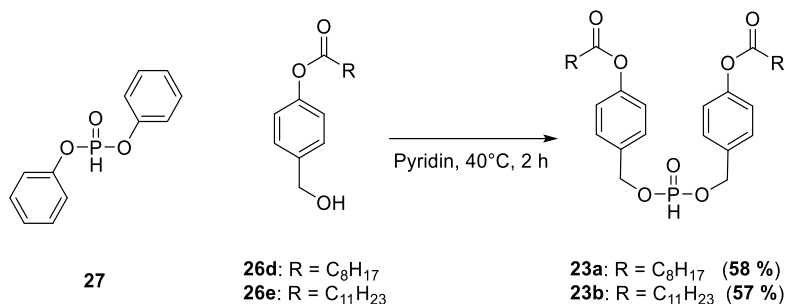


Abb. 20: Synthese der symmetrischen *H*-Phosphonate **23a** und **23b**.

Bei der Synthese der asymmetrischen *H*-Phosphonate wurde nach der Vorschrift von ZHAO gearbeitet.⁸⁹ Hierbei stellte sich heraus, dass durch die Reaktionsführung mehrere Nebenprodukte entstanden, welche zu einer komplizierten und mehrfachen säulenchromatographischen Reinigung führten. Durch eine genauere Betrachtung zeigte sich, dass der erste Reaktionsschritt (die Addition der ersten Maske) vollständig ablaufen muss, um eine Vielzahl von Nebenprodukten zu vermeiden. Dazu wurde die Reaktionstemperatur sowie -zeit angepasst. Für die AB-Alkyl-*H*-Phosphonate **23c-23f** wurde dazu die entsprechende AB-Maske äquimolar mit dem Diphenylphosphit bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion

wurde dünn-schichtchromatographisch verfolgt, nach dem vollständigen Umsatz der AB-Maske (in der Regel nach 30 Minuten) mit 1-Octadecanol **28** versetzt und eine Stunde bei 40°C gerührt (Abb. 21, oben).

Dies führte zu einer Steigerung der Ausbeute auf bis zu 68 % und damit vergleichbar mit den symmetrischen *H*-Phosphonaten. Auch die säulenchromatographische Reinigung wurde hierbei deutlich vereinfacht, wobei teilweise noch eine Kristallisation des symmetrischen, doppelt alkylierten *H*-Phosphonat durchgeführt wurde.

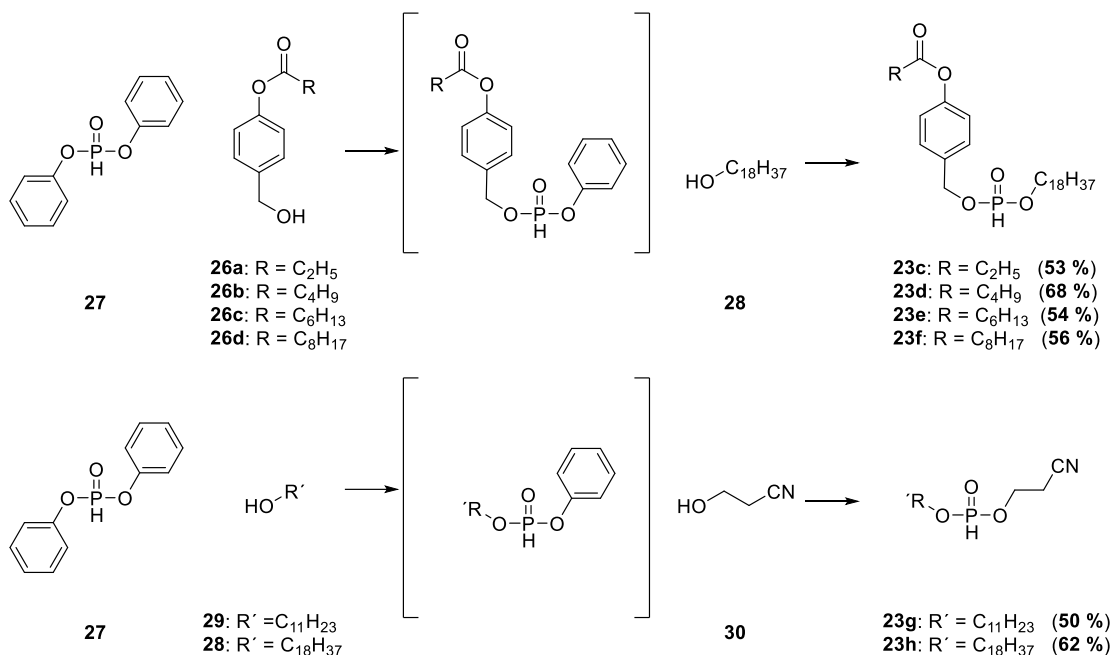


Abb. 21: Synthese der asymmetrischen AB-Alkyl-*H*-Phosphonate **23c-23f** sowie der geschützten Alkyl-*H*-Phosphonate **23g** und **23h**.

Analog wurde bei den Cyanoethyl-geschützten Alkyl-*H*-Phosphonaten verfahren. Hier wurde zuerst der entsprechende Alkohol **28** oder **29** mit dem Diphenylphosphit für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mit dem 2-Cyanoethylalkohol **30** eine Stunde bei 40°C gerührt (Abb. 21, unten). So konnten die gewünschten *H*-Phosphonate in einer Ausbeute von 50 % für **23g** und 62 % für **23h** dargestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die benötigten *H*-Phosphonate für die Synthese der gewünschten TriPPPro-Verbindungen erfolgreich dargestellt werden konnten. Dabei konnten die bestehenden Protokolle angepasst und die Ausbeuten zum Teil gesteigert werden.

6.1.2 Synthese der (*R*)-PMPA-Diphosphat-Prodrugs

Für die Synthese der (*R*)-PMPA-Diphosphat-Prodrugs wurde die im Arbeitskreis etablierte Variante von GOLLNEST genutzt. Hierzu wurde das entsprechende *H*-Phosponat **23** oxidativ mittels *N*-Chlorsuccinimid (NCS) chloriert. Das so gebildete Phosphorchloridat **31** konnte nun von Tetra-*n*-Butylammoniumphosphat nucleophil angegriffen werden, was zur Bildung des doppelt maskierten Pyrophosphats **22** führte (Abb. 22).⁹³

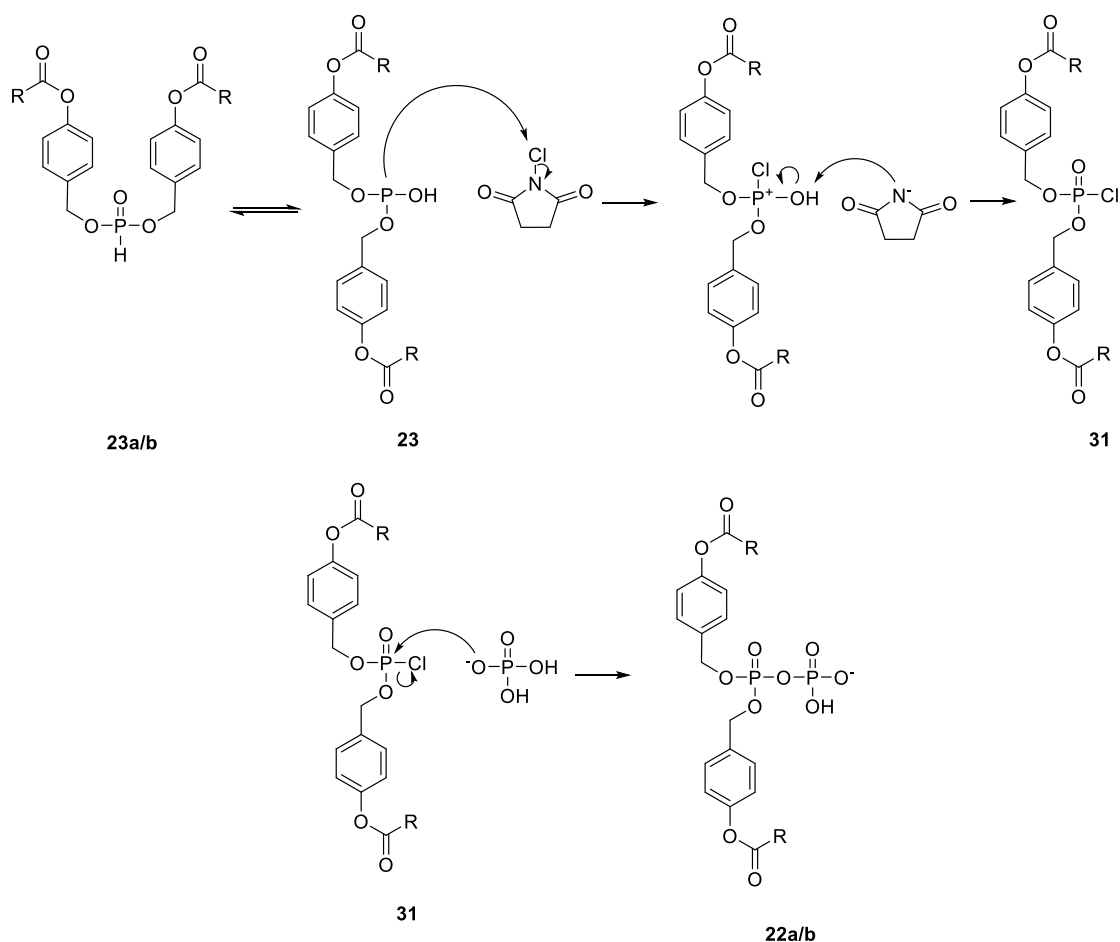


Abb. 22: Vorgeschlagener Mechanismus der Pyrophosphatsynthese.

Die Pyrophosphate **22a/b** wurden schrittweise über einen gemischten Trifluoressigsäureester und anschließend als Imidazolidat aktiviert. Hierbei sorgte ein großer Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) gleichzeitig dafür, dass noch letzte Reste an eventuell vorhandener Feuchtigkeit abgefangen wurden. Das so gebildete *N*-Methylimidazoliumsalz fungierte als Donor, welcher nucleophil vom Monophosphat oder Phosponat (in diesem Fall das (*R*)-PMPA) angegriffen werden konnte und zur Bildung der TriPPP-Verbindungen **7a-h** führte (Abb. 23).⁸⁸

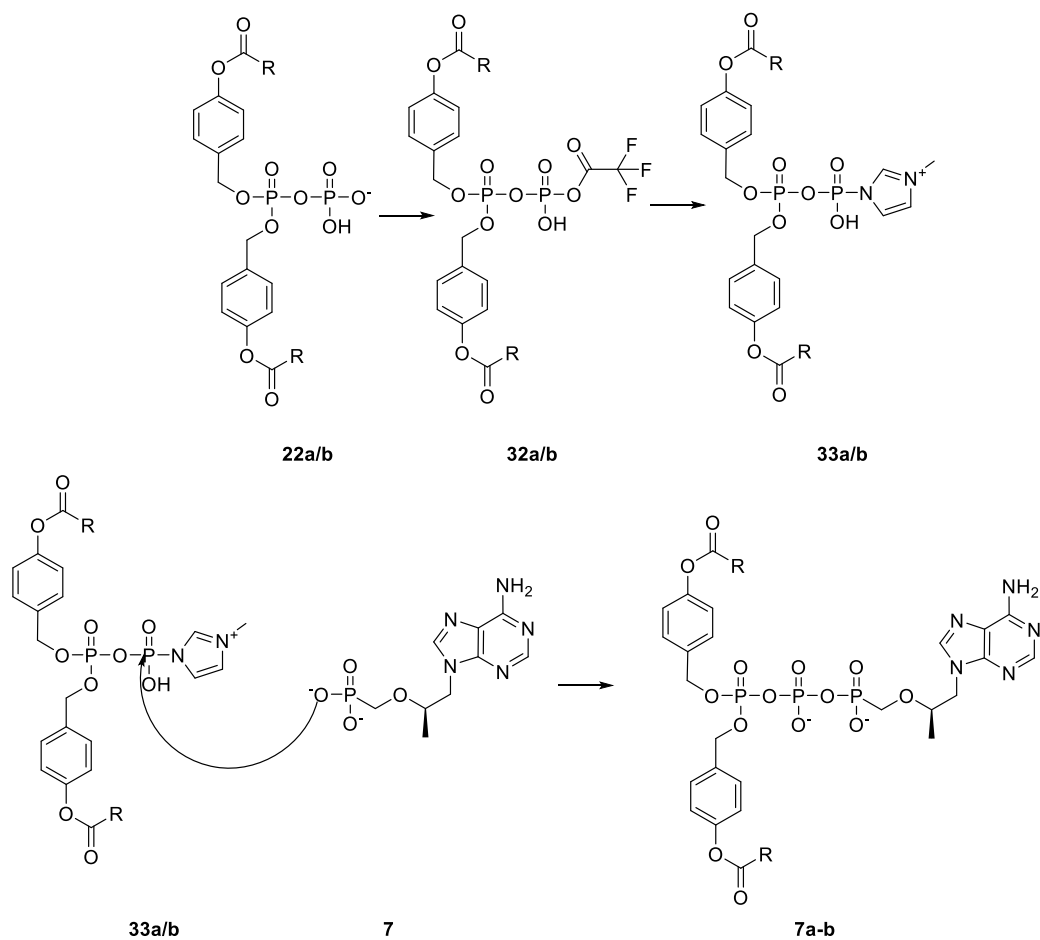


Abb. 23: Darstellung einer TriPPPro-Verbindung nach GOLLNEST über die Methode von MOHAMADY.

6.1.2.1 Synthese der symmetrischen (*R*)-PMPA-Diphosphat-Prodrugs

Für die Synthese der symmetrisch maskierten (*R*)-PMPA-TriPPPro-Verbindungen wurden die entsprechenden *H*-Phosphonate **23a** sowie **23b** in trockenem Acetonitril aufgenommen, mit NCS versetzt und für eine Stunde bei 50°C für die Verbindung **23a** und bei 60°C für die Verbindung **23b** gerührt. Die höhere Reaktionstemperatur ist der deutlich geringeren Löslichkeit des Bis-C11AB-*H*-Phosphonates **23b** geschuldet. Anschließend wurde eine 0.4 M Tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung hinzugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Die so erhaltenen Pyrophosphate wurden, wie bereits beschrieben, aktiviert und mit (*R*)-PMPA gekuppelt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Wahl der Gegenionen des (*R*)-PMPA-Salzes einen Einfluss auf die Reaktion hatte. Im Fall des Triethylammoniumsalzes wurde nie ein vollständiger Umsatz, auch bei sehr langen Reaktionszeiten und unabhängig von den eingesetzten Äquivalenten, beobachtet. Dies führte unweigerlich zu geringeren Ausbeuten. Durch den Einsatz des Tetra-*n*-Butylammoniumsalzes konnte dieses Problem umgangen werden. Hier konnte in der Regel nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden ein vollständiger

Umsatz des (*R*)-PMPA-Salzes beobachtet werden, unabhängig von der genauen Anzahl der Gegenionen.

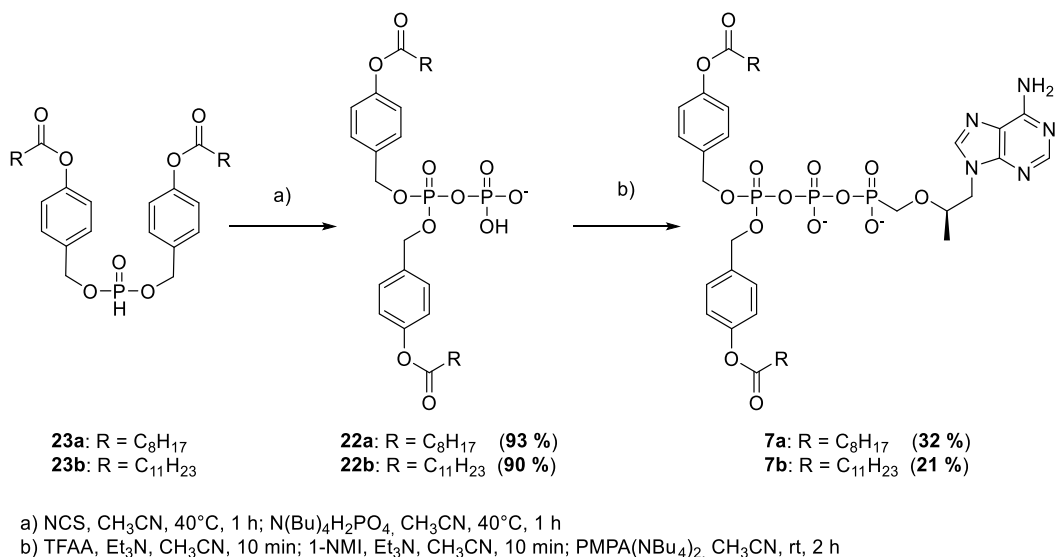


Abb. 24: Synthese der symmetrischen (*R*)-PMPA-TriPPPPro-Verbindungen **7a** und **7b**.

Die gewünschten Verbindungen **7a** und **7b** konnten über diese Methode in einer Ausbeute von 32 % für das Bis-C8AB-(*R*)-PMPA **7a** sowie 21 % für das Bis-C11-AB-(*R*)-PMPA **7b** dargestellt werden (Abb. 24). Die Ausbeuten liegen damit im erwarteten Rahmen und sind vergleichbar zu anderen Ausbeuten von TriPPPPro-Verbindungen.

An dem Beispiel des Bis-C8AB-(*R*)-PMPA-Diphosphates konnte der Einfluss des für die Synthese genutzten Monophosphats gezeigt werden. So konnte mit dem Triethylammoniumsalz in einer vorangegangenen Arbeit nur eine Ausbeute von 13 % erreicht werden.⁹⁰ Nur durch die Wahl des Tetra-*n*-Butylammoniumsalzes konnte die Ausbeute um knapp, das dreifache auf 32 % gesteigert werden. Dies könnte zum einen auf eine etwas bessere Löslichkeit des (*R*)-PMPA-Salzes zurückzuführen sein, jedoch konnte auch schon nach zwei Stunden ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Nucleophilie des tetra-*n*-Butylammoniumsalzes einen positiven Effekt auf die Reaktion ausübte.

6.1.2.2 Synthese der AB-Alkyl-maskierten (*R*)-PMPA-Diphosphat-Prodrugs

In vorangegangenen Untersuchungen von ZHAO, zeigte sich, dass eine Alkylkette, welche an dem γ -Phosphat verestert ist, die Selektivität gegenüber der HIV-RT steigern konnte.⁸⁹ Da das entsprechende Molekül dennoch unter physiologischen Bedingungen über drei negative Ladungen verfügte, zeigten sich asymmetrisch maskierte AB-Alkyl-TriPPPPro-Verbindungen als mögliche Prodrugs dieser alkylmodifizierten-Derivate, die eine bessere Zellgängigkeit

gewährleisten sollten. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte eine Reihe dieser asymmetrischen Verbindungen dargestellt werden, um einen gewissen Lipophiliebereich abzudecken und gleichzeitig einen möglichen Einfluss der AB-Maske bzw. der Länge der veresterten Alkylkette auf die Halbwertszeit abzuschätzen. Hierbei wurde analog zu den symmetrischen Prodrugs aus dem Kapitel 6.1.2.1 vorgegangen. Auch hier musste die Temperatur bei der Pyrophosphatsynthese bei dem C8AB-C18-Derivat **7f** angepasst und auf 60°C erhöht werden. Ferner stellte sich die Synthese als vergleichsweise unkompliziert dar, nachdem auch hier nur das tetra-*n*-Butylammoniumsalz genutzt wurde. Hier wurde nach zwei bis drei Stunden ein vollständiger Umsatz mittels HPLC beobachtet und die Reaktion entsprechend beendet.

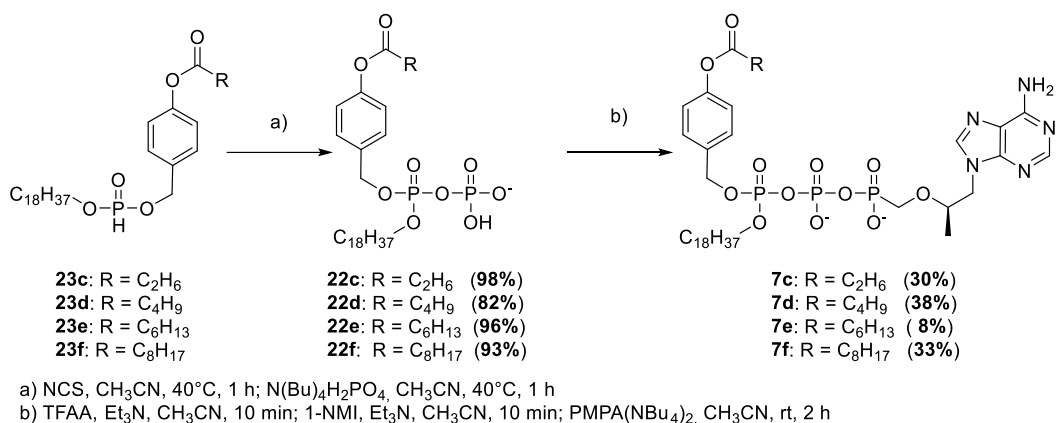


Abb. 25: Synthese der asymmetrischen AB-Alkyl-(R)-PMPA-TriPPPro-Verbindungen.

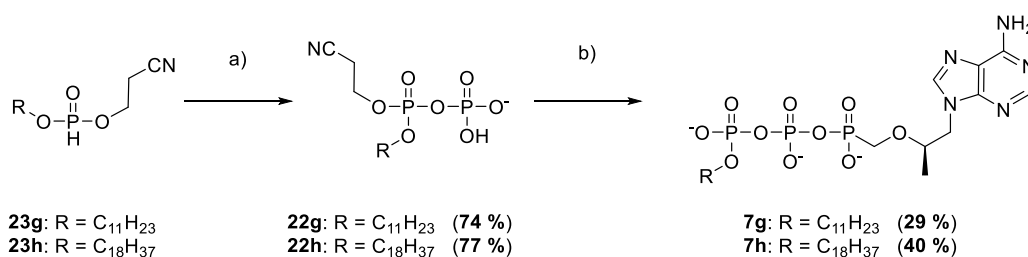
Die Ausbeuten lagen hier in einem Bereich von 8 % und 38 %, wobei hier die Verbindung **7e** einen Ausreißer mit 8 % darstellt (Abb. 25). Dies ist auf mögliche Verluste bei der Isolierung des Produktes zurückzuführen. Hierbei war ein mehrfacher Ionenaustausch und wiederholte Chromatographie notwendig, um das in der Reaktion benutzte 1-*N*-Methylimidazol abzutrennen. Eine Lösung brachte hier ein Wechsel der stationären Umkehrphase von C18 auf C8. Hierbei verschob sich die Retentionszeit des Produktes gerade so, dass eine ausreichende Trennung der beiden Substanzen möglich war.

6.1.2.3 Synthese der γ -alkylmodifizierten (R)-PMPA-Diphosphate

Als Referenzsubstanzen in den antiviralen Assays und für die folgenden *Primer Extension* Assays sollten zudem noch die γ -alkylmodifizierten (R)-PMPA-Diphosphate dargestellt werden. Dafür wurden zwei Kandidaten mit einer C18- bzw. einer C11-Aklykette ausgewählt, da diese in vorhergegangenen Untersuchungen von ZHAO die besten Eigenschaften in *Primer Extension* Assays zeigten. Für die Synthese wurde 2-Cyanoethanol als Schutzgruppe verwendet. Diese Schutzgruppe wird auch in der Phosphoramiditchemie, insbesondere bei der Synthese von Oligonucleotiden genutzt. Sie wird über einen E1cB-Mechanismus basisch

gespalten und bildet Acrylnitril als Eliminierungsprodukt, welches einfach im Vakuum entfernt werden kann. Dies ist ein Vorteil gegenüber der alternativen 9-Fluorenylmethyl (Fm-) Schutzgruppe. Diese bildet ein Dibenzofulven, einen schwer löslichen Feststoff, wodurch nachfolgende Chromatographien deutlich erschwert werden.

Die Synthese der gewünschten γ -alkylmodifizierten (*R*)-PMPA-Diphosphate erfolgte daher auf der bekannten Syntheseroute ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten **23g** sowie **23h** und lieferten die Verbindungen **7g** und **7h** in Ausbeuten von 29 % bzw. 40 % (Abb. 26).



a) NCS, CH₃CN, 40°C, 1 h; N(Bu)₄H₂PO₄, CH₃CN, 40°C, 1 h
 b) TFAA, Et₃N, CH₃CN, 10 min; 1-NMI, Et₃N, CH₃CN, 10 min; PMPA(NBu₄)₂, CH₃CN, rt, 2 h; TBAOH, rt, 24 h

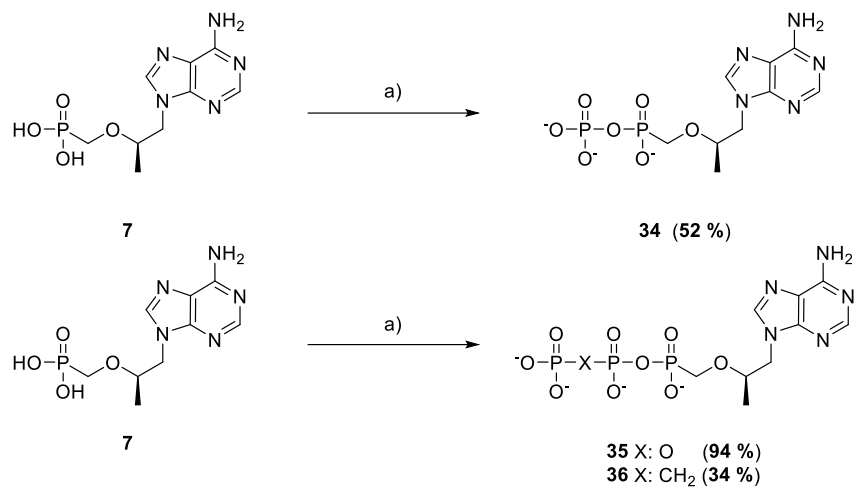
Abb. 26: Synthese von γ -alkylmodifizierten (*R*)-PMPA-Diphosphaten.

6.1.3 Synthese von (*R*)-PMPA-Mono- und Diphosphat

Da bei den geplanten Hydrolysen, besonders in CEM/0 Zellextrakten, das (*R*)-PMPA-Mono- bzw. Diphosphat entstehen konnte, sollten diese Verbindungen auf einem synthetischen Weg erschlossen werden. Dadurch wäre es möglich, diese Verbindungen gegeben falls zu coinjizieren, um die An- bzw. Abwesenheit dieser Metaboliten aufzuzeigen. Weiterhin können die Verbindungen, die den natürlichen Di- bzw. Triphosphaten entsprechen, auch im *Primer Extension Assay* genutzt werden, um die Substrateigenschaften des eigentlich aktiven Metaboliten, dem (*R*)-PMPA-Diphosphat abschätzen zu können.

Für die Synthese wurde die Methode von MOHAMADY genutzt.⁹⁴ Diese wurde bereits bei der Synthese der TriPPP_{ro}-Verbindungen genutzt und ist leicht zu handhaben. Hierbei wurde das (*R*)-PMPA in seiner kommerziell erhältlichen protonierten Form in einer Reaktionssequenz mit TFAA in das gemischte Anhydrid überführt. Anschließend wurde durch Zugabe von 1-*N*-Methylimidazol das eigentlich aktivierte *N*-Methylimidazoliumsalz gebildet. Dies wurde über eine Stunde langsam mithilfe einer Spritzenpumpe (Flussrate 0.10 mL/min) zu dem gelöstem (Pyro-)phosphatsalz getropft. Über diese Reaktionsführung sollte verhindert werden, dass es zu einer Reaktion von zwei (*R*)-PMPA-Molekülen mit einem (Pyro-)phosphat kommt. Die Reaktion wurde mittels HPLC nach einer Stunde auf ihren Reaktionsfortschritt überprüft.

Hierbei konnte bereits nach dem Zutropfen meist ein vollständiger Umsatz des PMPAs beobachtet werden. Dies führt zu dem Schluss, dass das *N*-Methylimidazoliumsalz direkt nucleophil angegriffen wurde und damit die Reaktionsführung von essenzieller Bedeutung war.



a) TFAA, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; 1-NMI, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; Phosphatsalz, CH₃CN, rt, 1 h

Abb. 27: Synthese der (*R*)-PMPA-Mono- bzw. Diphosphate mit der Methode von MOHAMADY.

Die Isolierung der gewünschten Mono- bzw. Diphosphate zeigte sich als relativ simpel. Durch ein Waschen der Reaktionslösung mit Chloroform konnte nahezu vollständig das *N*-Methylimidazol entfernt werden, welches für den Großteil der Probleme bei der TriPPPPro-Synthese in den nachfolgenden Chromatographien verantwortlich war. Dadurch konnte nach einer RP-Chromatographie, Ionenaustausch auf Ammoniumionen und einer zweiten RP-Chromatographie das gewünschte Produkt isoliert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Äquivalente an TFAA bzw. Triethylamin von Bedeutung zu sein scheinen, was sich mit den Beobachtungen von MOHAMADY deckt. Die besten Ausbeuten konnten mit 12.0 Äquivalenten Triethylamin sowie 10.0 Äquivalenten TFAA erzielt werden ((*R*)-PMPA-DP, 94%). Diese Bedingungen entsprechen der Literatur und wurden bei den weiteren Synthesen von Phosphonat-Diphosphaten angewandt.

6.1.4 Versuch der Synthese von (*R*)-PMPA-CH₂-TriPPPPro-Verbindungen

Im Kapitel 0 wird auf die Hydrolyse der zuvor dargestellten (*R*)-PMPA-Prodrugs eingegangen. Bei der Hydrolyse wurde die Vermutung angestellt, dass bei den Hydrolysen in CEM/0 Zellextrakt, neben der enzymatischen Spaltung auch die Anwesenheit weiterer Ionen (z.B. Calcium- sowie Magnesiumionen) einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Hydrolyse der Prodrugs hatte. Dabei konnte mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse festgestellt werden, dass die β-γ-Phosphorsäureanhydridbindung nucleophil angegriffen und so gespalten

wurde. Daher sollte versucht werden, diese Pyrophosphatbindung durch eine Methylengruppe zu ersetzen, um so eine ungewollte enzymatische bzw. chemische Hydrolyse zu verhindern.

Bei der Betrachtung des aus diesen Überlegungen gewünschten Moleküls ergaben sich zwei mögliche Syntheserouten. Zum einen könnte der Weg über die klassischen TriPPPPro Synthese bestritten werden. Hierzu müsste ein maskiertes Methylene-Pyrophosphat dargestellt und über die Methode von MOHAMADY mit dem (*R*)-PMPA gekuppelt werden (Abb. 28, b). Zum anderen wäre die Synthese eines doppelt maskierten Methyl-Phosphonates, welches mit einem (*R*)-PMPA-Monophosphat-Baustein gekuppelt werden müsste, der mindestens eine gute Abgangsgruppe trägt, möglich (Abb. 28, a). Denkbar wäre hierfür z.B. ein Chlorid oder ein (*R*)-PMPA-Monophosphat-Amidit.

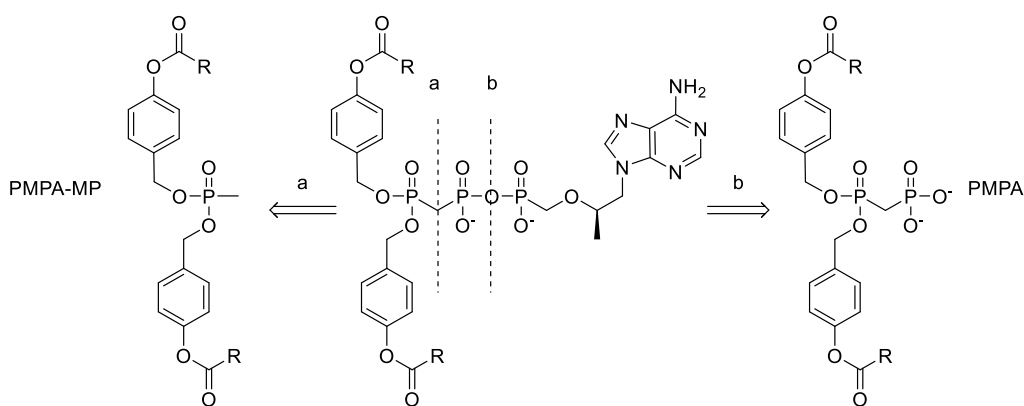


Abb. 28: Mögliche Retrosyntheseschritte für die Synthese der (*R*)-PMPA-CH₂-TriPPPPro-Verbindungen.

Aufgrund dieser Betrachtung und der Annahme, dass ein aktivierter (*R*)-PMPA-MP Baustein sehr schwierig zu handhaben wäre, wurde die Synthesestrategie ausgewählt, welche der klassischen TriPPPPro-Synthese ähnelte. Da das Edukt hierfür ebenfalls das Methyl-Phosphonat war, wäre es dennoch möglich gewesen, den zweiten Syntheseweg zu bestreiten.

Es sollte demnach mit der Synthese des doppelt maskierten Methylene-Pyrophosphates begonnen werden. Auch hier gab es zwei mögliche Synthesewege. Zum einen könnte das bereits dargestellte und vorhandene *H*-Phosphonat methyliert werden, zum anderen könnte ein maskiertes Phosphonat durch eine deprotonierte Methylphosphonsäure nucleophil angegriffen werden. Da die entsprechenden *H*-Phosphonate bereits in großen Mengen vorhanden waren, wurde damit begonnen, das gewünschte Methyl-Phosphonat darzustellen.

Dazu wurde die Vorschrift von MONTCHAMP genutzt. Das entsprechende *H*-Phosphonat wurde mit einer sterisch gehinderten Base deprotoniert und war so in der Lage, nucleophil am Methyljodid anzugreifen, was zur Bildung des gewünschten Methyl-Phosphonates führte.⁹⁵ In diesem Fall wurde das Bis-C8AB-*H*-Phosphonat **23a** in trockenem Acetonitril gelöst und mit

DBU sowie Methyljodid versetzt. Die Wahl fiel hierbei auf DBU, da durch den hohen sterischen Anspruch dieser Base eine mögliche Verseifung des Esters verhindert werden sollte. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Hier konnte bei Raumtemperatur auch nach mehreren Tagen kein Umsatz beobachtet werden. Erst nachdem die Reaktion zum Rückfluss erhitzt wurde, konnte nach 18 Stunden ein vollständiger Umsatz beobachtet und das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 23 % isoliert werden. Aufgrund der komplizierten säulenchromatographischen Reinigung durch eine Vielzahl von Nebenprodukten wurden nach weiteren geeigneten sterisch gehinderten Basen gesucht. Hier zeigte sich *n*-Butyllithium mit einer Ausbeute von 53 % am vielversprechendsten, auch wenn sich unter Verwendung dieser Base die Anzahl der Nebenprodukte nicht verringert hat. Dies ließ darauf schließen, dass es für diese Reaktion nicht auf den sterischen Anspruch der Base, sondern eher auf ihre Basizität ankam (Abb. 29, a).

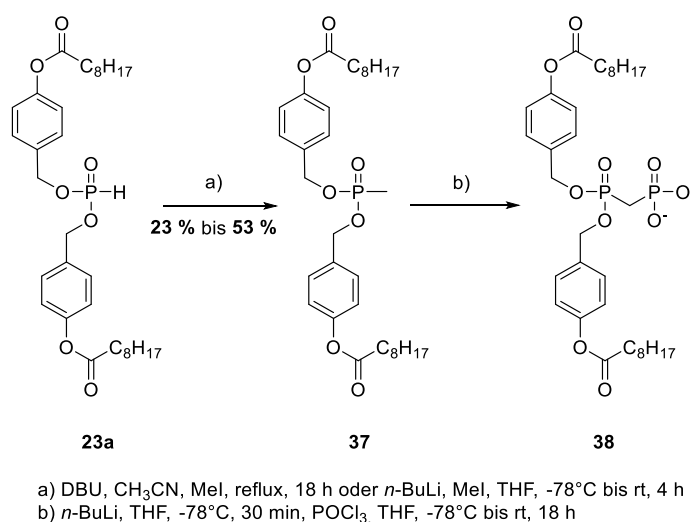


Abb. 29: Synthese des Methyl-Bis-C8AB-Phosphonates **37** und Versuch der Synthese des Bis-C8AB-Methylen-Pyrophosphates **38**.

Anschließend sollte das maskierte Methylen-Pyrophosphat dargestellt werden. Hierzu sollte die Methylgruppe wieder deprotoniert werden und so anschließend ein Phosphatbaustein mit einer geeigneten Abgangsgruppe (vorzugsweise ein Chlorid) nucleophil angreifen. Ein Problem stellten die zwei Ester-Funktionen dar. Es musste trocken und unter Zuhilfenahme einer sterisch gehinderten Base deprotoniert werden. Hierfür bieten sich Lithium-Basen wie z.B. ^tButyllithium oder LDA an. Diese Basen weisen hohe Basizität auf, sind sterisch gehindert und funktionierten gut bei tiefen Reaktionstemperaturen, was den positiven Nebeneffekt haben könnte, dass so unerwünschte Nebenreaktionen vermieden werden. So könnte die Reaktion kinetisch geführt werden, was in diesem Fall das Deprotonieren der Methylgruppe bevorzugen sollte.

Als Elektrophil wurde zum einen Phosphorylchlorid sowie das Bis(diisopropylamino)-chlorophosphin genutzt. Somit konnte zum einen ein Phosphor (III) Ansatz über die bewährte Amidchemie und zum anderen ein Phosphor (V) Ansatz über die bekannte Kupplungsstrategie der TriPPPro Synthese verfolgt werden. Es konnte auf keinem der versuchten Synthesewege das gewünschte Produkt dargestellt bzw. isoliert werden. Zwar konnte das zuvor dargestellte Methyl-Bis-C8-AB-Phosphonat **37** sowohl mit Butyllithium als auch mit LDA deprotoniert werden, jedoch konnte nach der Zugabe des Elektrophils bei -78°C kein Umsatz beobachtet werden. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 0°C zeigte kaum eine Steigerung. Es konnte nach einer gesamten Reaktionszeit von 8 Stunden kein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Das Erwärmen der Reaktion auf Raumtemperatur führte ebenfalls zu keiner Steigerung des Umsatzes. Hier konnte nur ein Zerfall des Eduktes beobachtet werden (Abb. 29, b).

Daher wurde entschieden, die Reaktion nach zwei Stunden bei -78°C auf 0°C zu erwärmen und die Reaktion nach 2-3 Stunden abubrechen, um eine Bildung von Neben- oder Zerfallsprodukten zu vermeiden. Die Reaktion wurde durch Eintragen in gesättigte Ammoniumcarbonatlösung beendet.

Im Fall des Bis(diisopropylamino)chlorophosphins als Elektrophil wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel unter der Zugabe von 5 % Triethylamin gereinigt. Die so erhaltene Fraktion zeigte weder im ^1H noch im ^{31}P -NMR-Spektrum Signale, die auf das gewünschte Produkt hindeuteten. Dieser Ansatz wurde somit verworfen.

Im Falle des Phosphorylchlorids als Elektrophil wurde die Reaktion mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer beendet, um bei der anschließenden automatisierten RP-Chromatographie eine Retention aufgrund der gesteigerten Lipophilie durch zu erhalten. Hierbei stellte die sehr unspezifische Absorption bei ca. 220 nm eine Herausforderung dar, da nicht abgeschätzt werden konnte, zu welcher Retentionszeit das Produkt eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und mittels ^1H - sowie ^{31}P -NMR-Spektroskopie analysiert. Hierbei zeigte sich in den Fraktionen mit einem Gehalt von 50 % Acetonitril, sowie den Fraktionen bei 100 % Acetonitril maximal ein Singulett im ^{31}P -NMR. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um das Edukt bzw. Zerfallsprodukte oder Ähnliches handelte. Eine genaue Analyse war aufgrund der Vielzahl an sich teilweise überlagernden Signalen im ^1H -NMR nicht möglich.

Eine Fraktion zeigte hingegen vielversprechende Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum: zwei Dubletts bei 20.87 ppm sowie 13.80 ppm mit jeweils einer Kopplungskonstante von 20 Hz. Die chemische Verschiebung deutete auf ein Phosphonat hin, die Dubletts sowie die Kopplungskonstante, dass diese beiden Phosphoratome auch miteinander koppelten. Es

konnte also davon ausgegangen werden, dass in dieser Fraktion das gewünschte Produkt, das Bis-C8AB-Methylen-Pyrophosphat vorhanden war. Es waren neben den gewünschten Signalen weitere Signale, hauptsächlich Singulets zu sehen, unter anderem auch zwei Multipletts bei -10 ppm sowie -18 ppm. Dabei könnte es sich um Pyrophosphat gehandelt haben, welches sich bei der wässrigen Aufarbeitung gebildet hatte. Zusätzlich gab es ein breites Singulett bei 24.92 ppm. Dies entspricht ungefähr der chemischen Verschiebung des Eduktes (Abb. 30).

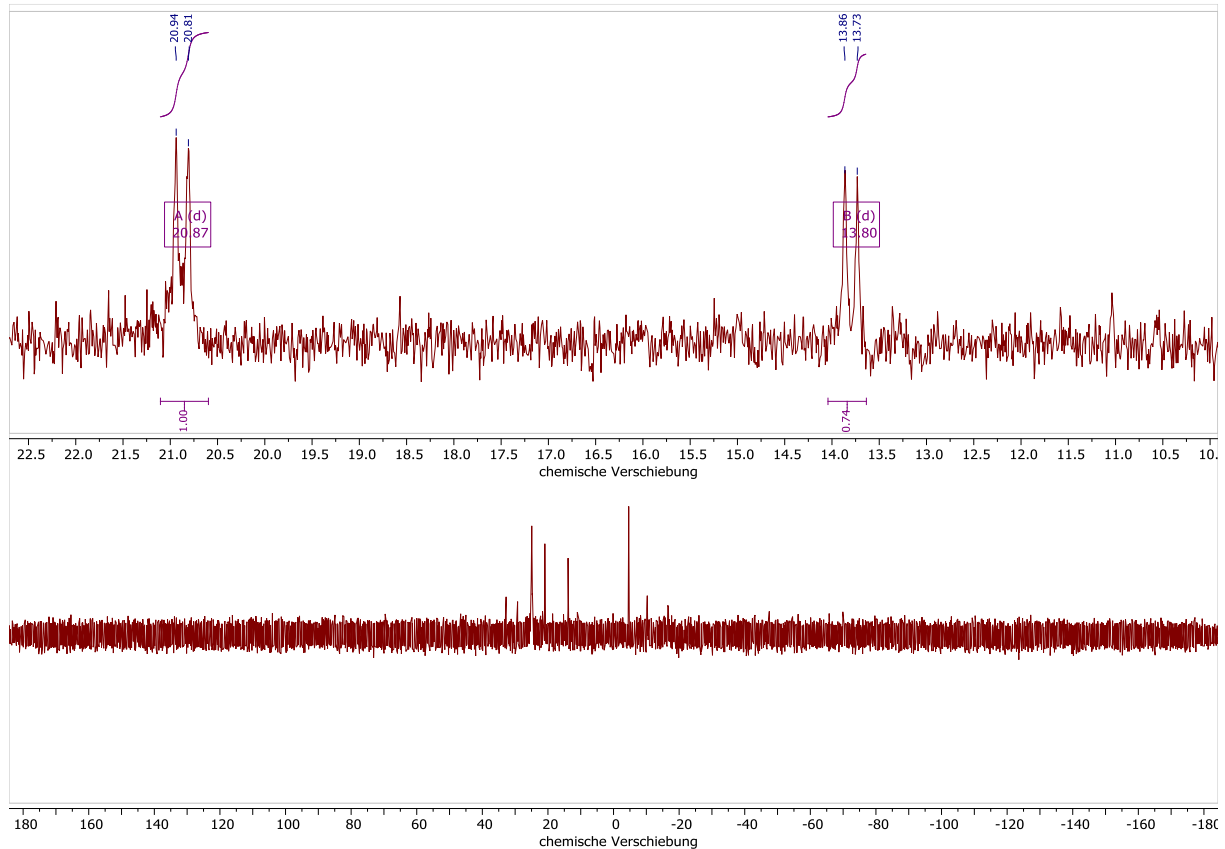


Abb. 30: ^{31}P -NMR-Spektrum der vielversprechendsten Fraktion für das Bis-C8AB-Methylen-Pyrophosphat **37**. Oben: Ausschnitt aus dem ^{31}P -NMR-Spektrum mit zwei Dubletts mit identischer Kopplungskonstante. Unten: Vollständige ^{31}P -NMR-Spektrum der Fraktion.

Es lässt sich sagen, dass über diesen Syntheseweg das gewünschte Methylen-Pyrophosphat dargestellt, jedoch nicht sauber isoliert werden konnte. Eine weitere automatisierte RP-Chromatographie nach einem vorherigen Ionenaustausch auf z.B. Tetra-*n*-Butylammonium hätte gegebenenfalls Abhilfe schaffen können. Dies würden die Retentionszeiten der unterschiedlichen Substanzen noch einmal verändern und so ggf. zu einer Trennung führen. Weiterhin könnte man ein Extrahieren der wässrigen Phase nach Beenden der Reaktion mit Chloroform versuchen, analog zu der Pyrophosphat-Synthese. Hier müsste sehr auf die Wahl der Gegenionen geachtet werden. Ein Beenden der Reaktion mit Tetra-*n*-Butylammonium-Puffer würde sich in diesem Fall anbieten. Dies würde die Lipophilie

des Methylen-Pyrophosphates wahrscheinlich genug erhöhen, um eine Extraktion mit Chloroform zu ermöglichen.

Von einer Synthese mit dem so erhaltenen, nicht komplett gereinigten Methylen-Pyrophosphat wurde abgesehen. Die potenzielle Anwesenheit des Pyrophosphates würde in der Reaktionsführung für Komplikationen sorgen. Zwar wurden die Reagenzien für die Aktivierung in einem deutlichen Überschuss hinzugegen, jedoch könnte es zu einer Reaktion des Methylen-Pyrophosphates mit dem Pyrophosphat kommen. Weiterhin wäre es möglich, dass das zugegebene (*R*)-PMPA mit dem Tetraphosphat, oder auch mit dem Pyrophosphat reagieren könnte. Diese unerwünschte Nebenreaktion würde zu Nebenprodukten führen, welche eine anschließende Isolierung des gewünschten Produktes sehr schwierig bis unmöglich machen, von einer schwierigen Reaktionskontrolle mittels HPLC durch die Anwesenheit diverser Nebenprodukte abgesehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelungen war, das gewünschte maskierte Methylen-Pyrophosphat darzustellen, jedoch nicht zu isolieren. Hier sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, die Synthese zu optimieren und so die ersten Methylen-stabilisierten TriPPPro-Verbindungen darzustellen. Diese könnten dann auf ihre Hydrolyseeigenschaften untersucht werden und wären, unter der Voraussetzung sie erfüllen die Anforderungen, eine neue Generation von stabileren TriPPPro-Verbindungen.

6.2 Biochemische Analyse der (*R*)-PMPA-Derivate

Die im vorangegangenen Kapitel 6.1 dargestellten (*R*)-PMPA-Derivate sollten auf ihre antivirale Aktivität getestet werden. Hierfür wurden die Verbindungen im Arbeitskreis von Dominique Schols an der KU Leuven (Belgien) in Zellassays auf ihre antivirale Aktivität gegenüber dem HI-Virus (IC_{50}) bzw. auf ihre Zelltoxizität (CC_{50}) untersucht. Weiterhin sollte die chemische Stabilität in PBS-Puffer bestimmt sowie die enzymatische Aktivierung in CEM/O Extrakten untersucht werden. Weiter sollte mithilfe von *Primer Extension Assays* festgestellt werden, ob das (*R*)-PMPA-Mono- und Diphosphat, sowie die γ -alkylmodifizierten Diphosphate ein Substrat für die HIV-RT sowie für die humanen DNA Polymerase γ sind.

6.2.1 Antivirale Aktivität der (R)-PMPA-Diphosphat Prodrugs

Die antiviralen Assays wurden an der KU Leuven in der Arbeitsgruppe von SCHOLS durchgeführt. Hierfür wurden CEM/0 Zellkulturen mit HIV-1, HIV-2 und HIV-2 TK⁻ Stämmen infiziert. Anschließend wurden die EC₅₀-Werte, also die Konzentration, die benötigt wird, um den HIV-induzierten zytopathischen Effekt zu inhibieren, sowie die CC₅₀-Werte, also die zytotoxische Konzentration der Substanzen in der entsprechenden Zelllinie, bestimmt.

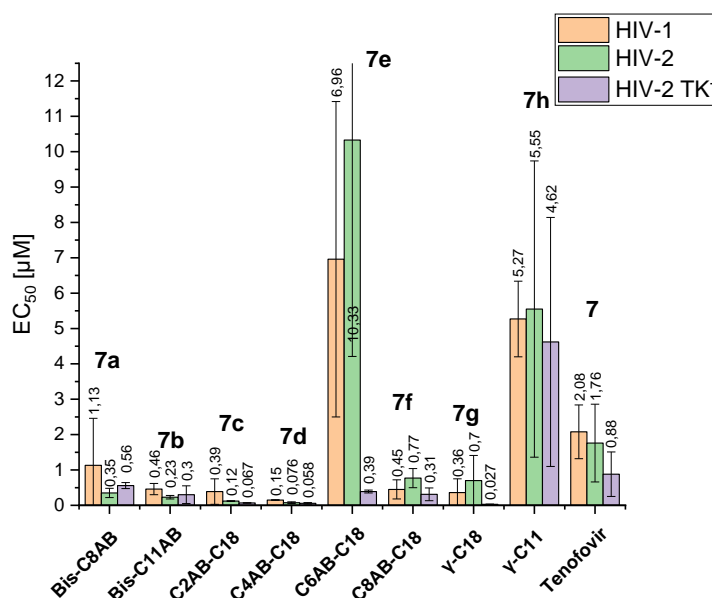


Abb. 31: Ergebnisse der HIV-Assays der (R)-PMPA-TriPPPPro-Verbindungen **7a** – **f** sowie der γ -alkylmodifizierten Diphosphate **7h** und **7g** aus der Arbeitsgruppe um SCHOLS ermittelt an HIV-infizierten CEM/0 Zellen.

Nahezu alle dargestellten PMPA-Prodrugs zeigten eine bessere anti-HIV-Aktivität als Tenofovir **7** (siehe Abb. 31). Dabei stellte sich das γ -C18-PMPA-Diphosphat **7h** als aktivste Verbindung an HIV-2 TK⁻ Zellen mit einem EC₅₀-Wert von 27 nM dar. Auch die Verbindungen **7c**, **7d** und **7f**, die asymmetrische maskierten PMPA-Prodrugs die γ -C18-PMPA-Diphosphat freisetzen, waren vergleichbar aktiv. Einzig das C6AB-C18-PMPA-Diphosphat **7e** fiel hier nicht in die Reihe. Diese Verbindung zeigte die geringste Aktivität in dem Assay, obwohl es nach Abspalten der AB-Maske die aktive Verbindung **7h** freisetzen sollte.

Weiterhin ist das γ -C11-PMPA-Diphosphat **7g** vergleichsweise inaktiv. Hier ist die Verbindung **7h**, mit einer längeren Alkylmodifikation, je nach HIV-Stamm etwa 10- bis 150-fach aktiver.

Gleichwohl lässt sich sagen, dass die getesteten Verbindungen nahezu keine zytotoxischen Effekte aufweisen. Einzig die Verbindungen **7a**, **7c** und **7d** zeigten messbare zytotoxische Konzentrationen an. Diese lagen jedoch um ein 40- bis 640-faches über den EC₅₀-Werten,

woraus sich ein Selektivitäts-Index (SI) von 40 bis 640 ergab. Damit lässt sich sagen, dass diese Verbindungen ein breites therapeutisches Fenster haben.

Um einen möglichen Hinweis zu erhalten, warum gerade die Verbindungen **7e** und **7h** die geringste Aktivität aufwiesen, wurde die relative Lipophilie mittels HPLC bestimmt und mit BCNAs aus Zellaufnahmestudien verglichen. Als Vergleichssubstanzen wurden dabei die von WITT und ROSSMEIER dargestellten TriPPPPro-Verbindungen aus bicyklischen Nucleosidanaloga (BCNA) genutzt.^{96, 97} Die genutzten BCNA-TriPPPPro-Verbindungen wurden am Effektivsten bei Zellaufnahmestudien aufgenommen, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von SCHUMACHER am UKE durchgeführt wurden. Dabei wurden sowohl Krebszellen (für die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen von WITT) sowie HIV-infizierte T-Lymphozyten (für die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen von ROSSMEIER) genutzt.

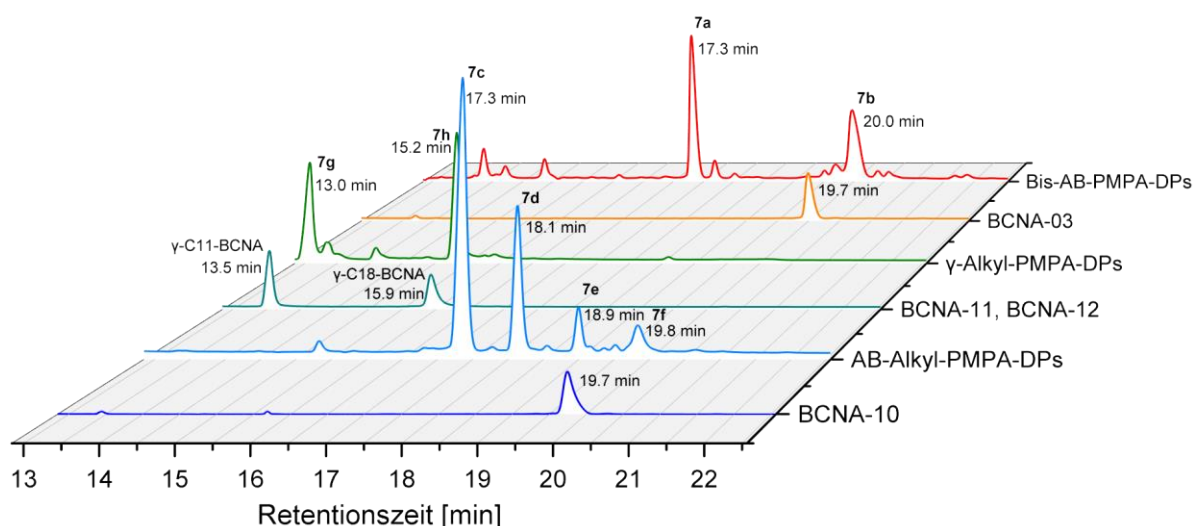


Abb. 32: Vergleich der Retentionszeiten und damit der relativen Lipophilie der PMPA-TriPPPPro-Verbindungen mit den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen von WITT und ROSSMEIER.

Die am effektivsten aufgenommenen BCNA-TriPPPPro-Verbindungen waren das BCNA-03, ein symmetrisch maskiertes Bis-C11AB-BCNA-TP sowie das BCNA-10, ein asymmetrisch maskiertes C13AB-C10-BCNA-TP. Diese beiden BCNA-TriPPPPro-Verbindungen zeigten unter den gleichen HPLC Bedingungen eine Retentionszeit von 19.7 min auf und waren damit vergleichbar Lipophil (Abb. 32). Dadurch lässt sich vermuten, dass es bei dieser relativen Lipophilie zu einer guten Aufnahme der Verbindungen in die Zelle, unabhängig des Zelltyps, führt. Unter den identischen chromatographischen Bedingungen zeigten das Bis-C11AB-PMPA-DP **7b** sowie das C8AB-C18-PMPA-DP **7f** eine nahezu identische Rotationszeit und damit relative Lipophilie (Abb. 32). Dies bedeutet, dass diese Verbindungen effektiv die Zellen aufgenommen werden sollten.

Bei den asymmetrisch maskierten PMPA-Diphosphaten entsprach die Verbindung **7f** der Lipophilie der besten BCNA-TriPPPro-Verbindungen. Zusätzlich hatten die Verbindungen **7f** und **7b** ähnliche EC₅₀-Werte und damit vergleichbar aktiv. Diese Erkenntnis würde wieder dafür sprechen, dass diese Verbindungen gut aufgenommen werden und anschließend das eigentlich aktive γ -C18-PMPA-DP oder PMPA-DP freigesetzt wird.

Auch das C6AB-C18-PMPA-Diphosphat **7e** hatte eine vergleichbare Retentionszeit zu den BCNA-TriPPPros, jedoch war diese Verbindung deutlich weniger aktiv. Durch den geringen Lipophilieunterschied, lässt sich jedoch eine verminderte Aufnahme dieser TriPPPro-Verbindung ausschließen. Zwar bestimmt nicht nur die Lipophilie die Zellaufnahme, jedoch ist diese Eigenschaft als einer der wichtigsten bei der passiven Diffusion anzusehen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die geringere Aktivität auf einer verminderten Aufnahme der Verbindung **7e** in die Zellen basiert. Vielmehr wäre es möglich, dass diese Verbindung schlichtweg langsamer enzymatisch aktiviert wird oder anderen katabolen Stoffwechselprozessen unterliegt. Dies würde bedeuten, dass mehr Substanz bei den antiviralen Assays notwendig ist, um einen Effekt zu erzielen, da im Vergleich weniger γ -C18-PMPA-DP in der gleichen Zeit freigesetzt wird.

Die aktivste Verbindung in diesem Assay, das γ -C18-PMPA-DP **7h**, ist jedoch sehr weit von der, in den Zellaufnahmen festgestellten, idealen Retentionszeit entfernt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass diese Verbindung nur über einen passiven Transport in das Zytosol gelangt. Da die Verbindung **7h** allerdings die höchste anti-HIV-Aktivität zeigt, ist es wahrscheinlich, dass es noch andere Transportmechanismen für diese Art von Verbindungen gibt, die einen schnelle und effiziente Aufnahme ermöglichen. Denkbar sind hier zum Beispiel Transmembranproteine, die sonst langkettige Fettsäuren aufnehmen.⁹⁸

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle dargestellten PMPA-Diphosphat Prodrugs eine antivirale Aktivität aufweisen, einige davon sogar im zweistelligen nanomolaren Bereich (Bsp. **7d**: 67 nM, **7e**: 58 nM und **7h**: 27 nM jeweils gegen HIV-2 TK⁻). Weiterhin konnte eine mögliche Korrelation aus relativer Lipophilie zu antiviraler Aktivität erneut aufgezeigt werden. Jedoch ist dies nicht der einzige Effekt, der sich auf die Aufnahme, genauer gesagt die antivirale Aktivität auswirkt.

6.2.2 Hydrolyse-Studien der (R)-PMPA-Prodrugs

Für Hydrolyse-Studien wurden nur die aktivsten Prodrugs (Verbindung **7d** und **7h**) sowie einige Vergleichssubstanzen ausgewählt. Es wurde das Bis-C8AB- **7a**, C4AB-C18- **7d**, C8AB-C18 **7f** sowie das γ -C18-(R)-PMPA **7h** auf ihre chemische Stabilität in PBS-Puffer sowie ihre enzymatische Aktivierung in CEM/0 Zellextrakten untersucht.

Tab. 2: Ergebnisse der Hydrolysen in PBS-Puffer und CEM/0 Zellextrakten der (R)-PMPA-Prodrugs.

	PBS		PBS mit zweiwertigen Ionen		CEM/0 ^[b]
	t _{1/2} (1)	t _{1/2} (2)	t _{1/2} (1)	t _{1/2} (2)	t _{1/2}
C4-AB-C18 7d	51 h	/	<1 h	/	130 min
C8-AB-C18 7f	24 h	/	1 h	/	201 min
Bis-C8-AB 7a	9 h	>200 h	1 h	>8 h	55 min
γ-C18 7h	>200 h	/	>8 h	/	>8h

Die Ergebnisse der Hydrolysen sind in Tab. 2 zusammengefasst. Alle getesteten Verbindungen zeigten eine ausreichende bis hohe chemische Stabilität von neun bis zu 51 Stunden in PBS-Puffer. Das γ-C18-(R)-PMPA-DP **7h** wies eine Halbwertszeit von über 200 Stunden in PBS-Puffer auf und konnte damit chemisch unter den getesteten Bedingungen als stabil angesehen werden.

Anschließend sollten die Verbindungen, die über eine spaltbare AB-Maske verfügten, als *proof of concept* mit Schweineleberesterase (PLE) hydrolysiert werden. Hierbei sollte gezeigt werden, dass zwar die spaltbare AB-Maske enzymatisch gespalten wird, die γ-Alkylmodifikation hingegen nicht. Es ergaben sich Halbwertszeiten von unter einer bis zu 129 Minuten. In Abb. 33 ist exemplarisch die PLE-Hydrolyse von C4AB-C18-(R)-PMPA **7d** gezeigt. Dabei war eindeutig zu sehen, wie die Intensität der Prodrugs **7d** in etwa im gleichen Verhältnis abnahm wie die Intensität des neu gebildeten γ-C18-(R)-PMPA **7h** anstieg.

Im Gegensatz hierzu stand die Hydrolyse in CEM/0 Zellextrakten. Dieses Modell wurde gewählt, um die zellulären Gegebenheiten zu simulieren, da es sich hierbei um das Zelllysat, der für die antiviralen Assays genutzten Zellen handelt. Daher waren in den Zellextrakten alle Proteine, Ionen und Enzyme vorhanden, jedoch war das Verhältnis dieser Konzentrationen zum Prodrug nicht vergleichbar mit den Bedingungen in den Assays. Dennoch konnte eine Hydrolyse in Zellextrakten als erste Näherung gesehen werden.

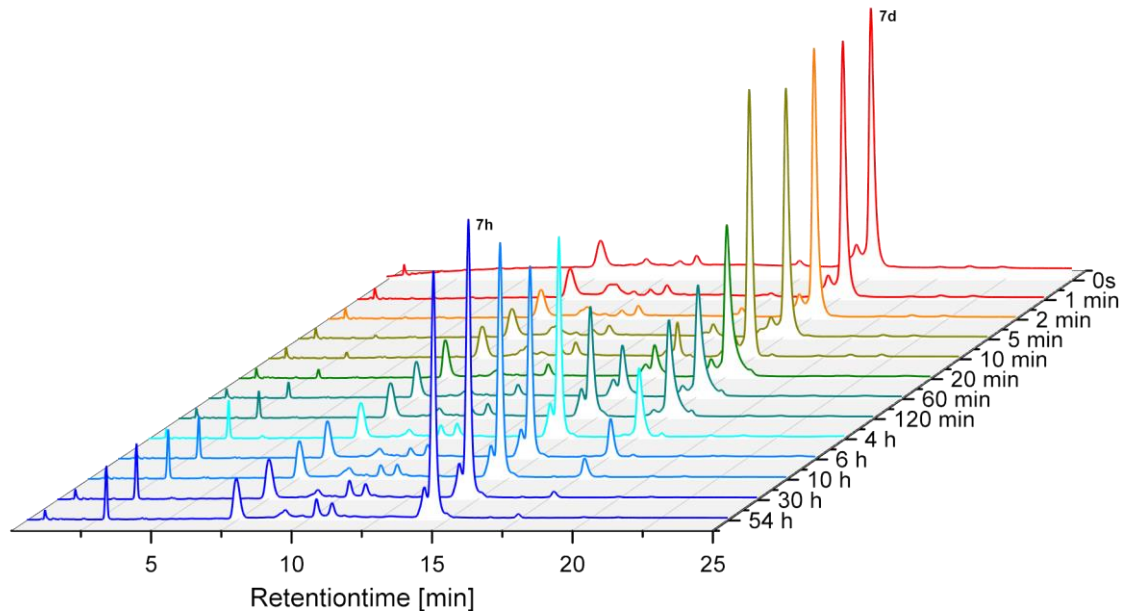


Abb. 33: PLE Hydrolyse von C4AB-C18-(R)-PMPA **7d**.

Die erhaltenen Halbwertszeiten der Hydrolysen sind ebenfalls in Tab. 2 dargestellt. Zwar konnte die hydrolytische Spaltung der Prodrugs beobachtet und eine Halbwertszeit bestimmt werden, jedoch waren die Produkte der Hydrolyse andere als erwartet. Die Ergebnisse der Hydrolyse-Studien unter verschiedenen Bedingungen am Beispiel C4AB-C18-(R)-PMPA **7d** sind in Abb. 35 zusammengefasst. Zwar konnte eine Halbwertszeit für den Zerfall des Prodrugs bestimmt werden, jedoch wurde nur wenig des zu erwartenden γ -C18-(R)-PMPA-Diphosphats **7h** detektiert. Stattdessen wurde im HPLC-Chromatogramm nahezu ausschließlich (R)-PMPA-Monophosphats oder (R)-PMPA als Produkt der Hydrolyse beobachtet. Da diese Ergebnisse im Gegensatz zu den Hydrolysen mit PLE stehen, kann eine Hydrolyse nur durch eine Esterase ausgeschlossen werden.

Es gab mehrere Ansätze, diese erhaltenen Ergebnisse zu erklären. Eine Möglichkeit wäre, dass γ -C18-(R)-PMPA **7h** gebildet wurde, dies jedoch annähernd spontan weiteren enzymatischen Prozessen unterlag und so das detektierte (R)-PMPA-Monophosphat **34** gebildet wurde. Denkbar wäre hier eine Spaltung durch Phosphorlipasen oder ähnliche Enzyme gewesen. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion müsste in einer vergleichbaren Größenordnung wie die der Spaltung der AB-Maske gelegen haben, was durchaus denkbar wäre.

Eine weitere Möglichkeit wäre der Einfluss von zweiwertigen Ionen, wie z.B. Magnesium oder Calcium. Diese Ionen sind zum größten Teil in gängigen Zellmedien zu finden und auch im Cytoplasma. Diese zweifach geladenen Ionen könnten die zwei verbliebenen negativen Ladungen des Prodrugs komplexieren und so einen nucleophilen Angriff auf das γ -Phosphat ermöglicht haben (Abb. 34). Dieser Phosphatrest stellt im Beispiel des C4AB-C18-(R)-PMPA-

Diphosphates **7d** durch die zwei Masken eine vergleichbar gute Abgangsgruppe dar. Der Mechanismus wird von allen gängigen Polymerasen bei dem Einbau der NTPs in den neu synthetisierten DNA-Strang genutzt. Dabei werden durch z.B. Magnesium-Ionen die negativen Ladungen des dNTPs komplexiert, wodurch das Spalten des Pyrophosphates ermöglicht wird.

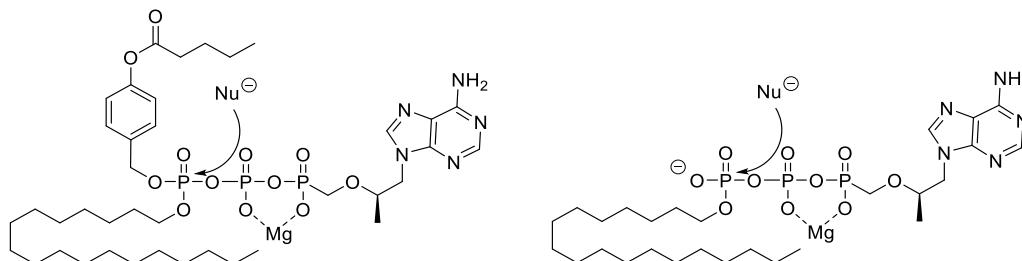


Abb. 34: Möglicher Effekt der zweiwertigen Ionen auf die Prodrugs am Beispiel von Magnesium bei einem nucleophilen Angriff.

Um den Einfluss der zweiwertigen Ionen auf die Stabilität der Prodrugs zu untersuchen, wurden die PBS-Hydrolysen wiederholt. Diesmal jedoch mit einem PBS-Puffer, der auch Calcium- sowie Magnesium-Ionen enthält, ansonsten aber dem vorher genutzten PBS-Puffer entspricht. Somit lassen sich diese beiden Hydrolysen direkt miteinander vergleichen.

Dabei ergaben sich überraschende Ergebnisse. Die Halbwertszeiten lagen nun sogar unter den Halbwertszeiten der Zellextrakt-Hydrolysen. Jedoch konnte hier das gleiche Muster an Produkten beobachtet werden. Im Fall des C4AB-C18-PMPAs **7d** konnte (*R*)-PMPA-MP **34** als Hauptprodukt der Hydrolyse identifiziert werden, was der Hydrolyse im Zellextrakt entspricht. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die γ -Phosphatgruppe bei Anwesenheit der zweiwertigen Ionen nucleophil durch z.B. ein Wasser-Molekül angegriffen wurden und sich somit das (*R*)-PMPA-Monophosphat **34** als Hauptprodukt der Hydrolyse bildete. Um einen schnellen Zerfall des γ -C18-PMPAs **7h** auszuschließen, wurde auch dieses hydrolysiert. Hierbei konnte jedoch nahezu keine Hydrolyse festgestellt werden. Nach acht Stunden konnte kein Unterschied zu der vorherigen Hydrolyse in PBS-Puffer festgestellt werden. Es konnte davon ausgegangen werden, dass das γ -C18-(*R*)-PMPA **7h** auch bei Anwesenheit der zweiwertigen Ionen chemisch stabil war.

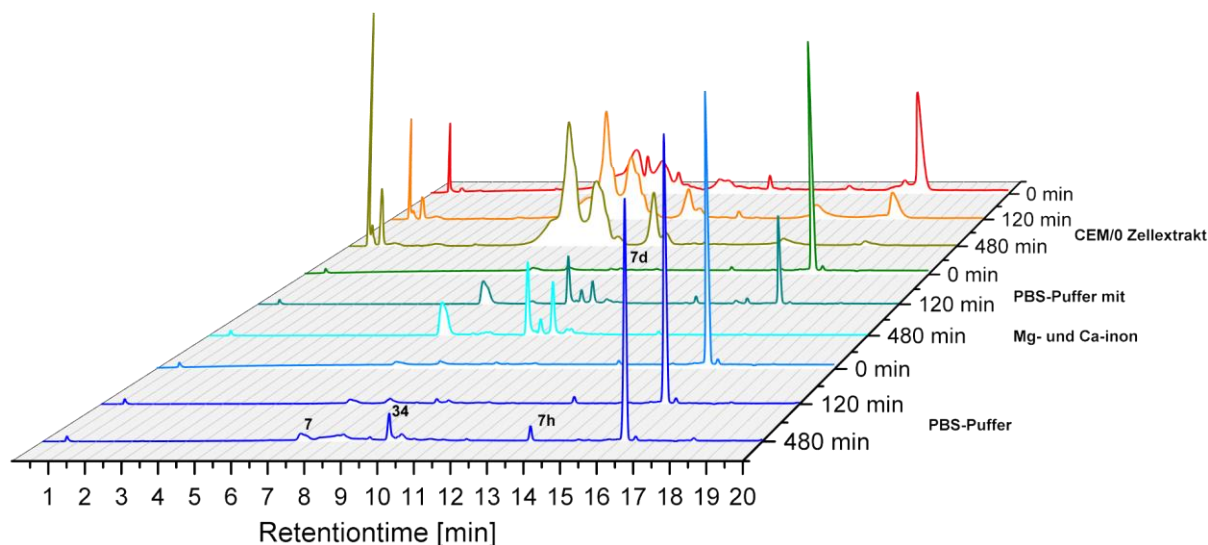


Abb. 35: Vergleich der Hydrolysen von **7d** in CEM/0 Zellextrakten, PBS-Puffer sowie PBS-Puffer mit Magnesium- sowie Calciumionen zu drei verschiedenen Zeitpunkten.

Um den angenommenen Effekt der zweiwertigen Ionen zu bestätigen, wurde die PBS-Hydrolyse mit Calcium- sowie Magnesiumionen unter der Zugabe von ^{18}O -isotop angereichertem Wasser wiederholt und die Aliquote massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurden die Aliquote über den Direkteinlass an einem ESI-TOF im negativen Modus vermessen. So sollte festgestellt werden, wo das Prodrug nucleophil angegriffen wurde. Durch die überdurchschnittlich hohe Konzentration des ^{18}O -Isotops sollten sich die Fragmente deutlich von der natürlich auftretenden Isotopenverteilung unterscheiden und so einen nucleophilen Angriff des Wassers bestätigen. Gleichzeitig könnte so eine eventuelle Fragmentierung in der Ionenquelle ausgeschlossen werden.

Die Hydrolysen wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt, mit der Ausnahme, dass ^{18}O -markiertes Wasser genutzt wurde. Dadurch ergaben sich die gleichen Ionenkonzentrationen wie bei den Hydrolysen, die mittels HPLC analysiert wurden. Es wurden auch hier die vier (*R*)-PMPA-Diphosphat Prodrugs **7a**, **7d**, **7f** und **7h** hydrolysiert. Da die Ergebnisse für die drei doppelt maskierten Prodrugs vergleichbar waren, soll im Folgenden die Hydrolyse anhand des Beispiels C4AB-C18-(*R*)-PMPA-Diphosphat **7d** diskutiert werden.

Die Hydrolyse in PBS-Puffer entsprach den Erwartungen. Hier war nach sechs Stunden noch große Mengen an C4AB-C18-(*R*)-PMPA **7d** zu sehen (Abb. 36, B). Zusätzlich konnte auch das gewünschte Produkt, das γ -C18-(*R*)-PMPA-DP **7h** nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte auch das C4AB-C18 maskierte γ -Phosphat nachgewiesen werden (m/z : 539.3507), was entweder auf eine Fragmentierung in der Ionenquelle oder auf einen nucleophilen Angriff auf das γ -Phosphat hindeutet. Gegen einen nucleophilen Angriff

sprach, dass das Isotopenmuster der Fragmente (C4AB-C18-Phosphat oder das (*R*)-PMPA-MP) nahezu der natürlichen Verteilung entsprach hatte (Vergleich von Abb. 37 **C** und **D**). Da die Proben im Direktinlass vermessen wurden, wäre eine LC-MS Methode vorzuziehen. Damit hätten die bei der Hydrolyse entstandenen Produkte über die Chromatographiemethode unterschiedliche Retentionszeiten und könnten deutlich besser von einer Fragmentierung in der Ionenquelle unterschieden werden, die dann dementsprechend über die Retentionszeit in der Chromatographie den Hydrolyseprodukten zuzuordnen wären.

Bei der Hydrolyse-Studie in PBS-Puffer mit Calcium- und Magnesiumionen konnte nach sechs Stunden hauptsächlich das gespaltene, maskierte γ -Phosphat detektiert werden (Abb. 36, A). Deckungsgleich zu der HPLC-Analyse konnte (*R*)-PMPA-MP nachgewiesen werden. Im Unterschied zu der Hydrolyse in PBS-Puffer ohne die zweiwertigen Ionen ist das Isotopenmuster deutlich von dem natürlichen zu unterscheiden (Abb. 37, **A** und **B**). Die relativ geringen Signalintensitäten können durch eventuelle Ionensuppression in der Ionenquelle, erklärt werden und unterstreichen den Vorteil einer LC-MS Methode noch einmal deutlich. Durch das Vorschalten einer Chromatographiemethode vor der massenspektrometrischen Analyse wäre nach Möglichkeit nur ein Analyt in der Ionenquelle, was eine bessere Ionisierung zur Folge haben würde. Dennoch sind die Signale mit einem Signal-zu-Rausch (S/N) Verhältnis von 11.24 für das (*R*)-PMPA-MP (m/z : 366.0374) sowie S/N 7.28 für das entsprechende ^{18}O -(*R*)-PMPA-MP (m/z : 368.0416) klar als solche zu erkennen. Gleichzeitig war die Signalintensität mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) des ^{18}O -(*R*)-PMPA-MP bei den Hydrolyse-Studien mit dem ^{18}O -Wasser deutlich größer als bei der Vergleichsprobe (Abb. 37).

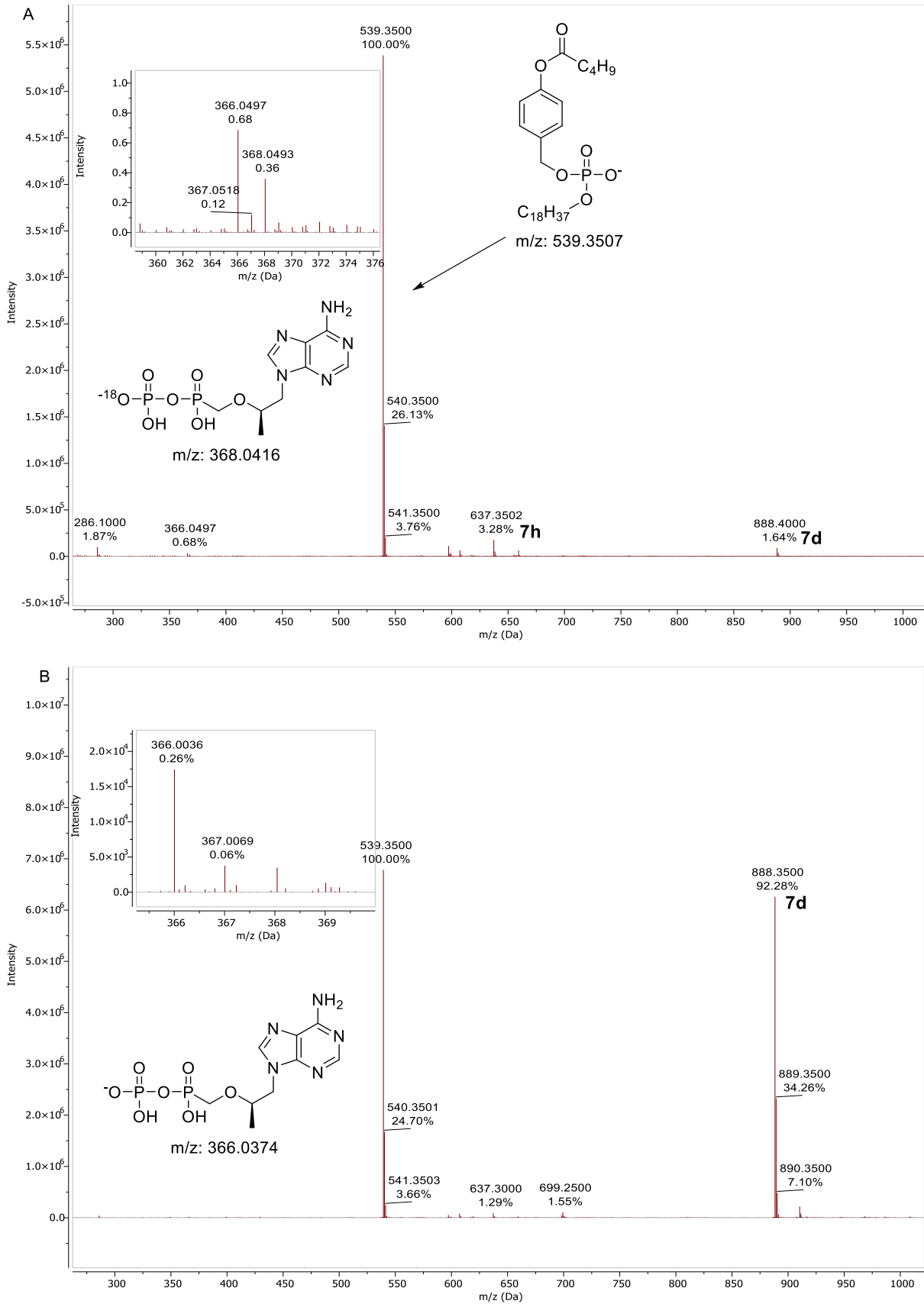


Abb. 36: Massenspektren der Hydrolysen mit ¹⁸O-Wasser von **7d** in PBS-Puffer mit Magnesium- sowie Calciumionen (A) sowie ohne zweiwertige Ionen (B) nach sechs Stunden.

Um die Vermutung, dass es sich bei den gefundenen Signalen mit der m/z von 368.0416 um ein Artefakt aus der Hydrolyse handelte, wurden die Messungen wiederholt. Dabei wurden die Hydrolyse-Studien analog zu den Vorangegangenen durchgeführt, mit der Ausnahme, dass dieses Mal kein ^{18}O -markiertes Wasser genutzt wurde. Daher wurde erwartet, dass die gleichen Fragmente in einer vergleichbaren Intensität gefunden werden. Einzig das Isotopenmuster der Signale, insbesondere des (*R*)-PMPA-MP **34**, sollte der natürlichen Verteilung entsprechen. Die Ergebnisse sind als Ausschnitt für das (*R*)-PMPA-MP **34** in Abb. 37 gezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass es bei der Hydrolyse sowohl in PBS-Puffer, mit und ohne Magnesium- bzw. Calciumionen zu einem deutlich größeren Signal führt, der dem ^{18}O -(*R*)-PMPA-MP zugeordnet werden konnte.

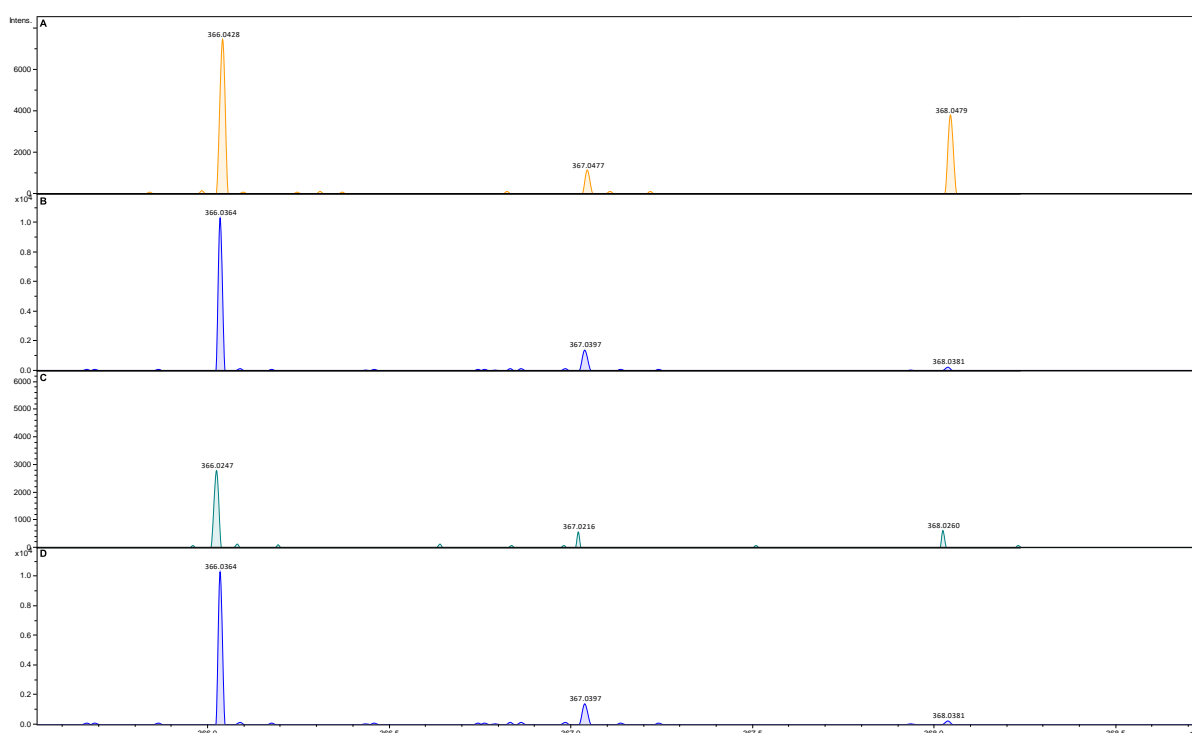


Abb. 37: Auszug aus den Massenspektren der Hydrolysen von **7d** in PBS-Puffer mit Magnesium- sowie Calciumionen sowie ohne zweiwertige Ionen nach sechs Stunden in dem Massenbereich des (*R*)-PMPA-MPs. **A**: PBS-Puffer mit zweiwertigen Ionen und ^{18}O -Wasser, **B**: PBS-Puffer mit zweiwertigen Ionen ohne ^{18}O -Wasser, **C**: PBS-Puffer ohne zweiwertigen Ionen mit ^{18}O -Wasser, **D**: PBS-Puffer ohne zweiwertigen Ionen und ^{18}O -Wasser.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse konnte angenommen werden, dass durch die Komplexbildung der negativen Ladungen durch Magnesium- bzw. Calciumionen, anders als erwartet, ein nucleophiler Angriff auf das β -Phosphat und nicht auf das γ -Phosphat durch ein Wassermolekül stattgefunden hatte. Dies führte zu den gefundenen Fragmenten des doppelt maskierten γ -Phosphates sowie des (*R*)-PMPA-MP. Da hauptsächlich am (*R*)-PMPA-MP eine unnatürlich hohe Anreicherung an ^{18}O -Isotopen durch den $[M+2]$ -Peak nachgewiesen werden

konnte, wurde angenommen, dass der Angriff an der β -Phosphatgruppe stattgefunden hatte und das doppelt maskierte γ -Phosphat als Austrittsgruppe fungierte.

Interessanterweise konnte zwar in geringen Mengen (*R*)-PMPA, jedoch kein γ - β -Pyrophosphat detektiert werden. Dies sprach dafür, dass der nucleophile Angriff hauptsächlich am β -Phosphat stattfand und somit die Bindung des γ - β -Pyrophosphates die erwartete Schwachstelle darstellte. Hier könnte das Einführen einer Methylengruppe das genannte Problem umgehen. Die so konstruierten doppelt maskierten γ - β -Methylen-TriPPP-Verbindungen könnten bezüglich ihrer Eigenschaften anhand der Wahl der Maskierungseinheiten frei modifiziert werden, wären stabil gegenüber chemischer sowie enzymatische Hydrolyse der γ - β -Bindung und hätten dennoch vergleichbare Substrateigenschaften gegenüber der HIV-RT (siehe Abb. 40, Seite 64). Sie stellen damit potenziell eine neue Generation an TriPPP-Verbindungen dar

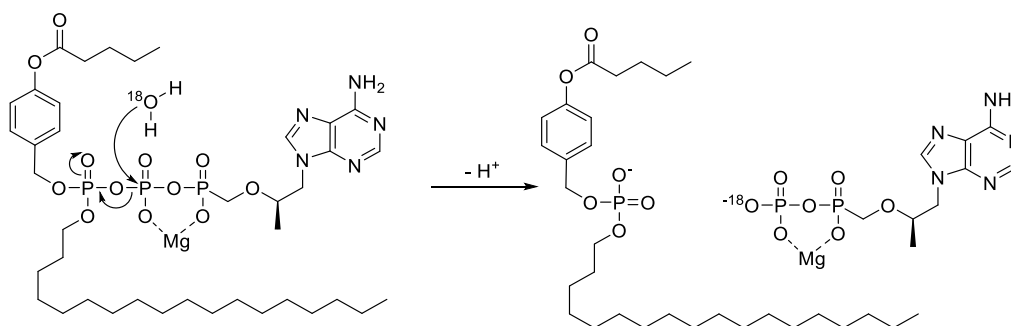


Abb. 38: Postulierter Mechanismus bei der Hydrolyse von **7d** in PBS-Puffer mit Magnesium- bzw. Calciumionen sowie ^{18}O -Wasser.

6.2.3 Primer Extension Assays

Primer Extension Assays sind eine biochemische Methode, um die Substrateigenschaften einer Verbindung gegenüber einer bestimmten Polymerase zu untersuchen. Dafür wird die zu untersuchende Verbindung zusammen mit einem z.B. fluoreszenzmarkierten Primer (dem zu verlängerndem DNA- bzw. RNA-Strang), einem Template (der Vorlage für die Verlängerung des Primers), der entsprechenden Polymerase sowie den dazugehörigen Puffern bei 35°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich dabei in der Regel nach der Aktivität der Polymerase sowie den eingesetzten Units (einer Einheit, die angibt, wie viel Substrat ein Enzym in der angegebenen Zeit verarbeitet). Anschließend wird die Polymerase durch starkes Erhitzen der Probe inaktiviert und die Ergebnisse mithilfe einer Gelelektrophorese analysiert. Da die DNA bzw. das DNA/RNA-Hybrid in der Regel doppelsträngig vorliegt, wird dem Polyacrylamidgel Harnstoff als Denaturierungsreagenz zugegeben. Dadurch ist gewährleistet, dass die DNA bzw. RNA einzelsträngig vorliegt. Durch das Anlegen einer hohen Spannung werden die

einzelsträngigen DNA- bzw. RNA-Stränge anschließend nach ihrer Größe getrennt und entsprechend der Markierung am Primer (in der Regel eine Fluoreszenzfarbstoff) analysiert.

Entsprechend seines Wirkmechanismus sollte die Inkorporation von (*R*)-PMPA in den Primer aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxyfunktion zu einem Kettenabbruch führen. Die Auflösung der Analysemethode muss dementsprechend hoch sein, um den Unterschied eines Nucleotides sichtbar zu machen. Diese Auflösung wird, analog zu z.B. einer Säulenchromatographie, durch eine längere Laufstrecke erreicht. Es wird also für die Proben, die nur (*R*)-PMPA-Diphosphate als Substrat für die Polymerasen enthalten, maximal eine +1-Bande erwartet. Wenn diese detektiert werden kann, wurde das entsprechende Molekül von der Polymerase als Substrat erkannt und der Primer verlängert.

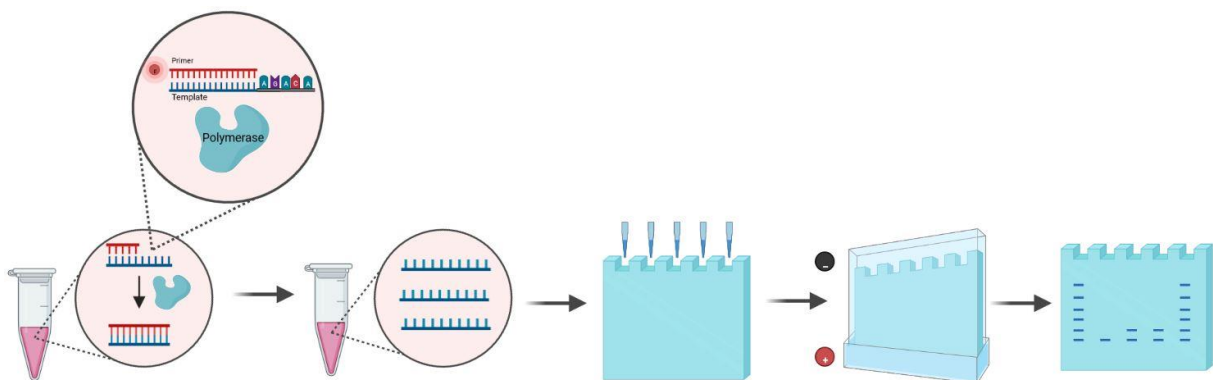


Abb. 39: Schematische Darstellung eines *Primer Extension Assays*.

Diese Methode kann, auch aufgrund ihrer Auflösung, ebenso für die Untersuchung der kompetitiven Substrateigenschaften von Nucleotidanaloga gegenüber ihren natürlichen Varianten genutzt werden. Dafür können die Verbindungen zusammen mit z.B. allen natürlich vorkommenden dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit der entsprechenden Polymerase inkubiert werden. Dabei können unterschiedliche Ergebnisse erwartet werden. Wenn die zu untersuchende Verbindung ein besseres Substrat für die Polymerase ist, wird für die (*R*)-PMPA-Diphosphate nur die +1-Bande erwartet, da keine Strangverlängerung mehr möglich ist. Wenn das Substrat schlechtere Eigenschaften hat, als die natürlichen dNTPs wird eine volle Strangverlängerung erwartet, was bei dem verwendeten Design des Templates einer +5-Bande entspricht, also den Einbau von fünf Nucleotiden. Je nach verwendetem Nucleosid bzw. Nucleotid sind jedoch auch Zwischenstufen mit einer +2, +3 sowie +4 Bande möglich, sollte es durch Deformationen oder ähnliche Effekte zu einem verzögerten Abbruch kommen sollte.

Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, werden bei jedem Assay drei Vergleichsproben durchgeführt: eine Positivkontrolle, in der alle natürlichen dNTPs vorliegen, sowie die entsprechende Polymerase (hier wird eine komplette Strangverlängerung erwartet),

eine Negativkontrolle, in der alle dNTPs sowie Puffer vorhanden sind, nur keine Polymerase (hier wird keine Verlängerung erwartet, es ist nur der Primer sichtbar) sowie eine +1-Kontrolle. In dieser +1-Kontrolle ist die Polymerase sowie das natürliche Analogon zu der zu untersuchenden Verbindung (bspw. dATP bei (R)-PMPA) vorhanden. Hier kann, je nach Polymerase, maximal eine Verlängerung um ein Nucleotid durchgeführt werden und es ist die +1-Bande zu erkennen. Mit diesen drei Kontrollen kann die Aktivität der Polymerase, ein unerwünschter Effekt durch z.B. verunreinigte Puffer oder Ähnliches ausgeschlossen sowie die notwendige Auflösung überprüft werden.

Mithilfe von *Primer Extension Assays* sollte überprüft werden, ob das (R)-PMPA-Diphosphat sowie die γ -alkylmodifizierte (R)-PMPA-Diphosphate Substrate für die HIV-RT und der humanen Polymerase γ waren. Dabei war vor allem die humane DNA-Polymerase γ von Interesse. Diese Polymerase kommt nur im Mitochondrium vor und ist zu einem großen Teil für den zytotoxischen Effekt von Nucleosid- oder Nucleotidanaloga verantwortlich, da sie diese in die mitochondriale DNA integrieren kann. Es wurde erwartet, dass die γ -alkylmodifizierte (R)-PMPA-Diphosphate ein Substrat für die HIV-RT waren, nicht jedoch für die humane Polymerase γ . Dies würde im Idealfall dafür sorgen, dass die Zytotoxizität noch einmal drastisch sinkt und damit ein noch breiteres therapeutisches Fenster eröffnen. Für die Assays wurde das Protokoll von WEBER verwendet.⁹⁹ Die Ergebnisse der Polymerasereaktionen wurden mithilfe eines denaturierenden Polyacrylamid-Gels getrennt und die entstandenen Fragmente wurden mittels Fluoreszenz analysiert.

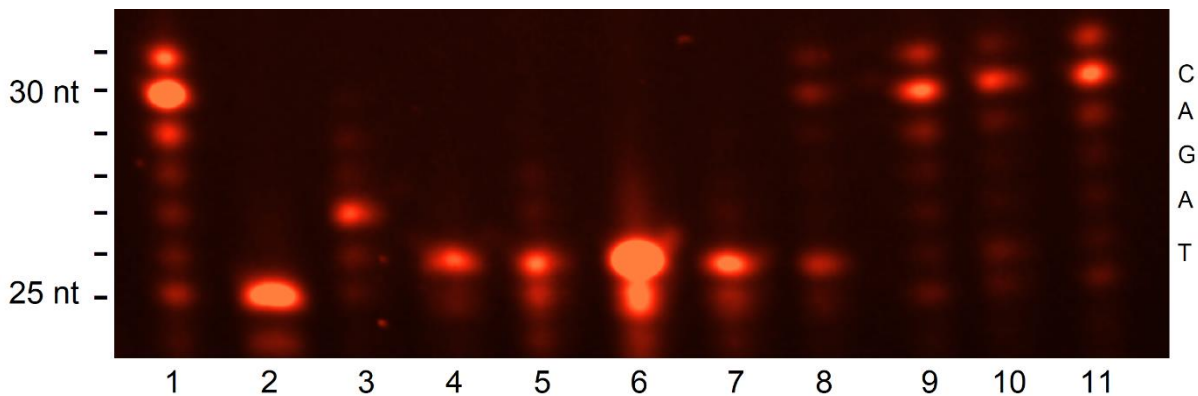


Abb. 40: *Primer Extension Assay* der (R)-PMPA-Diphosphate der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dATP), 4: (R)-PMPA-DP **35**, 5: (R)-PMPA-CH₂-DP **36**, 6: γ -C11-(R)-PMPA **7g**, 7: γ -C18-(R)-PMPA **7h**., 8: (R)-PMPA-DP **35**, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 9: (R)-PMPA-CH₂-DP **36**, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10: γ -C11-(R)-PMPA **7g**, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 11: γ -C18-(R)-PMPA **7h**, dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

Schon im ersten Assay konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen (R)-PMPA-Diphosphate, ob nun mit Modifikation oder ohne, Substrate für die HIV-RT waren. Dies ist durch eine +1-Bande auf dem Gel gut zu erkennen (Abb. 40, 4, 5, 6 und 7). Besonders hervorzuheben ist hier das γ -C18-(R)-PMPA-DP **7h** (Abb. 40, 7), welches offensichtlich

ähnliche Substrateigenschaften gegenüber der HIV-RT verfügte wie das (*R*)-PMPA-DP **35**. Dieses Ergebnis ist nicht selbstverständlich und wurde so bei noch keinem der bisherigen Nucleosidanaloga mit einer vergleichbar langen Alkylkette an dem γ -Phosphat beobachtet. In der Regel war hier ein deutlich schwächeres Signal bei der entsprechenden +1-Bande zu sehen, was auf deutlich schlechtere Substrateigenschaften hindeutete.⁸⁹ In der zweiten Hälfte des Gels (Abb. 40, 8 - 11) sind die kompetitiven Experimente zu sehen. Hier ist zu beachten, dass bei einer gleichen Konzentration an (*R*)-PMPA-DP und allen natürlichen dNTPs augenscheinlich mehr (*R*)-PMPA-DP inkorporiert wurde, als das dATP, das natürlich vorkommende Analogon (Abb. 40, 8). Es handelt sich dabei um eine rein qualitative Aussage aufgrund der Intensität der Banden. Da der entsprechende Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, ist keine wirkliche Quantifizierung der Signalintensitäten möglich, wie es z.B. bei einer radioaktiven Markierung des Primers möglich gewesen wäre.

Bei den (*R*)-PMPA-Diphosphaten mit der γ -Alkylmodifizierung ist ein leichter Trend zu erkennen. Während das γ -C11-(*R*)-PMPA-DP **7g** auch bei Anwesenheit aller natürlichen dNTPs ein Substrat war und in Konkurrenz zum dATP in den neuen Strang eingebaut wurde (Abb. 40, 10), konnte für das γ -C18-(*R*)-PMPA-DP **7h** nahezu kein Unterschied zu der Positivkontrolle beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das natürlich vorkommende dATP deutlich über dem γ -C18-(*R*)-PMPA-DP **7h** präferiert wurde (Abb. 40, 11). Das ausfälligste Ergebnis lieferte das (*R*)-PMPA-CH₂-DP **36**, welches als einzige Modifikation eine Methylengruppe zwischen dem β - und γ -Phosphat trug. Diese Modifikation schien auszureichen, um die Substrateigenschaften deutlich zu verändern. Zwar wurde das (*R*)-PMPA-CH₂-DP **36** immer noch von der HIV-RT als Substrat erkannt und in den neuen DNA-Strang eingebaut, jedoch waren die Substrateigenschaften bei den kompetitiven Proben deutlich verschlechtert. Bei der Anwesenheit aller natürlichen dNTPs wurde, im Gegensatz zu dem (*R*)-PMPA-DP **35**, kaum etwas in den neuen DNA-Strang eingebaut, was an der nahezu vollständigen Strangverlängerung zu erkennen war. Dies ließ darauf schließen, dass hier ggf. größere Mengen im Vergleich zu dem (*R*)-PMPA-DP für einen ähnlichen antiviralen Effekt benötigt werden könnten.

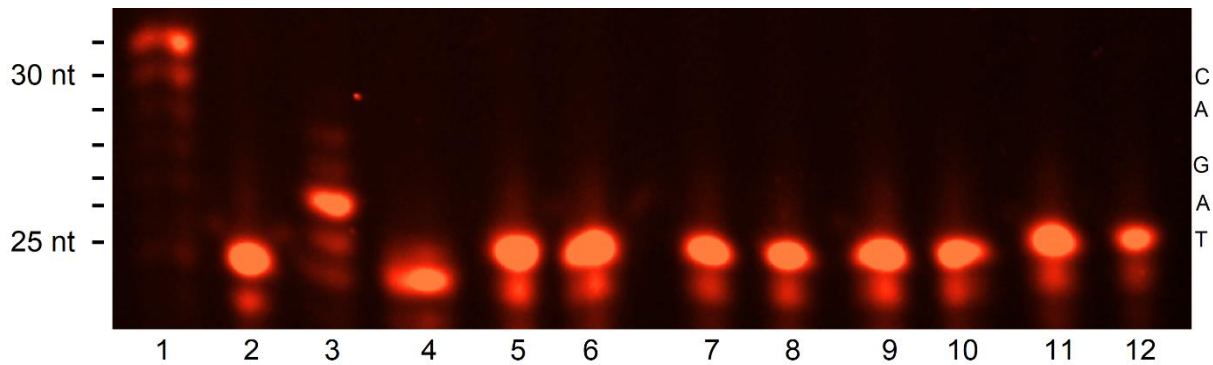


Abb. 41: *Primer Extension Assay* der (*R*)-PMPA-Diphosphate der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dATP), 4: 25000 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 5: 12500 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 6: 6250 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 7: 3125 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 8: 1562 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**; 9: 781.3 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 10: 390.6 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 10: 195 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 11: 97.6 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**.

Im nächsten Schritt sollten verschiedene Konzentrationen von (*R*)-PMPA-DP **35** auf ihre Substrateigenschaften untersucht werden. Hintergrund für diese Untersuchung war die Berechnung von CHEN. Dieser ermittelte, dass das (*R*)-PMPA-DP auch als kompetitiver Inhibitor der HIV-RT fungieren könnte.¹⁰⁰ Hierfür wurde eine 100-fach höhere Konzentration als die des vorherigen Assays als Startbedingung gewählt und in einer Verdünnungsreihe die Konzentration jeweils halbiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bei einer hundertfachen Konzentration (25000 μ M) keine Elongation des Primers zu sehen ist (Abb. 41, 4). Hier scheint das Enzym inhibiert zu sein. Bei allen Verdünnungen war jeweils eine +1-Bande zu sehen und damit ein Einbau des (*R*)-PMPA-Diphosphates **35** in den neuen DNA-Strang (Abb. 41, 5 bis 12). Weiterhin schien auch eine geringe Konzentration von 97.6 μ M (*R*)-PMPA-DP **35** zu einer Strangverlängerung zu führen, was noch einmal die guten Substrateigenschaften bestätigte (Abb. 41, 12).

Als Nächstes sollten die kompetitiven Eigenschaften von (*R*)-PMPA-DP **35** untersucht werden. Dafür wurde die gleiche Verdünnungsreihe an (*R*)-PMPA-DP **35** genutzt, nur wurden dieses Mal zu jeder Probe zusätzlich 250 μ M der natürlichen dNTPs hinzugegeben. Dadurch wurde ein Gradient des Verhältnisses von (*R*)-PMPA-DP **35** zu natürlichen dNTPs eingesetzt, der von einem 100-fachen Unterschuss bis zu einem 2.6-fachen Überschuss der natürlichen dNTPs führte.

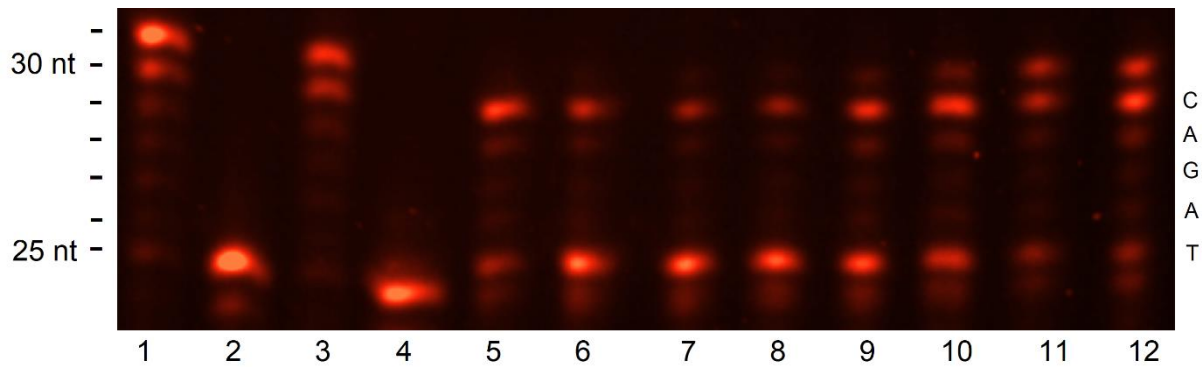


Abb. 42: *Primer Extension Assay* der (*R*)-PMPA-Diphosphate der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dATP), 4: 25000 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 5: 12500 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 6: 6250 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 7: 3125 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 8: 1562 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**; 9: 781.3 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 10: 390.6 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 10: 195 μ M (*R*)-PMPA-DP **35**, 11: 97.6 μ M (*R*)-PMPA-DP **35** mit jeweils 250 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

In Abb. 42 ist deutlich zu sehen, dass (*R*)-PMPA-DP bei jedem getesteten Verhältnis zu den natürlichen dNTPs immer ein vergleichbar gutes Substrat darstellte und somit zu einem Kettenabbruch nach einem Einbau führte. Dies ist besonders beachtlich, da auch bei einem 2.6-fachem Überschuss der natürlichen dNTPs immer noch eine klare +1-Bande und damit die Inkorporation von (*R*)-PMPA-DP zu sehen war, die eindeutig für den Einbau von (*R*)-PMPA-DP und damit einem sofortigen Kettenabbruch spricht (Abb. 42 Vergleich von 1 und 12). Weiterhin war zu beobachten, dass es bei der höchsten Konzentration an (*R*)-PMPA-DP auch bei der Anwesenheit von allen natürlichen dNTPs zu keiner Elongation des Primers gekommen ist. Dies spricht für eine komplette Inhibition des Enzyms. Des Weiteren schien das (*R*)-PMPA-DP auch einen Einfluss auf die HIV-RT zu haben, auch wenn es nicht direkt eingebaut wurde, was ebenfalls die Aussage von CHEN *et al.* unterstützte. Je höher die Konzentration an (*R*)-PMPA-DP war, desto weniger kam es vor, dass die HIV-RT einen Überhang des Primers synthetisierte. Dieses Phänomen trat regulär bei der Positivkontrolle auf und war reproduzierbar (Vergleich der Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42, jeweils 1). Die Intensität dieser Bande nahm mit zunehmender Konzentration des (*R*)-PMPA-DP ab und verschwand schließlich gänzlich. Dies deutete auf einen Effekt hin, der über die Inkorporation des (*R*)-PMPA-DP in den neuen DNA-Strang hinaus ging und war eher ein Hinweis auf eine Hemmung des Enzyms.

Anschließend sollten die sonstigen Phosphorylierungsstufen des PMPAs sowie, als nucleosidischer Vergleich, das Adenosin-Acyclovir-Triphosphat (Acyclovir mit der Nucleobase Adenin statt Guanin, A-ACV-TP) untersucht werden. Hier war es von besonderem Interesse, ob auch schon das (*R*)-PMPA-Monophosphat, das ein Diphosphat imitiert, ein Substrat für die HIV-RT darstellt. Dies war sehr aufschlussreich, da bereits dNDPs Substrate für die HIV-RT waren.¹⁰¹

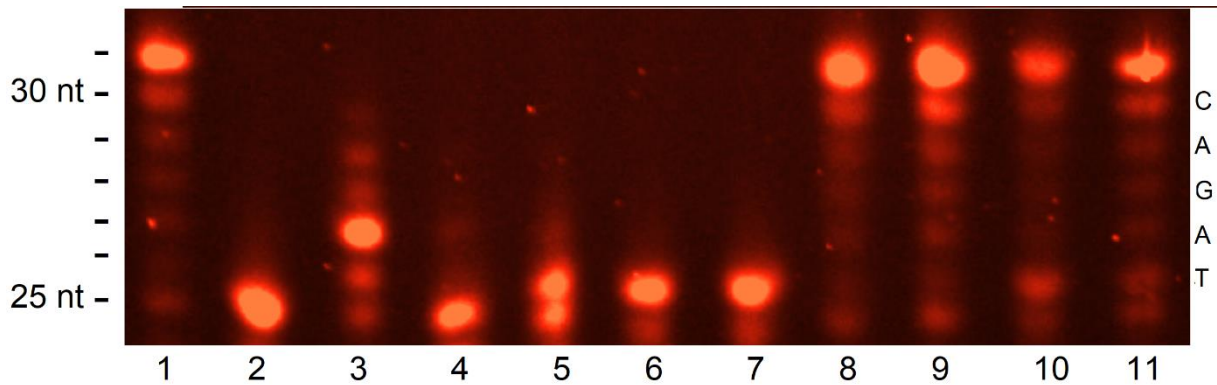


Abb. 43: *Primer Extension Assay* der verschiedenen Phosphorylierungsstufen des PMPAs sowie des AACV-TP **74** mit der HIV-RT. 1: Positivkontrolle; 2: Negativkontrolle; 3: +1 Kontrolle (nur dATP); 4: (R)-PMPA **7**; 5: (R)-PMPA-MP **34**; 6: (R)-PMPA-DP **35**; 7: A-ACV-TP **74**; 8: (R)-PMPA **7** und alle natürlichen dNTPs; 9: (R)-PMPA-MP **34** und alle natürlichen dNTPs; 10: (R)-PMPA-DP **34** und alle natürlichen dNTPs; 11: A-ACV-TP **74** und alle natürlichen dNTPs.

Die Ergebnisse bei diesem Assay deckten sich mit den Erwartungen, da (R)-PMPA kein Substrat für die HIV-RT war und daher keinen weiteren Einfluss auf ihre Tätigkeit hatte (Abb. 43, 4 und 8). Das (R)-PMPA-Monophosphat **34** hingegen war bereits ein Substrat für die HIV-RT (Abb. 43, 5), wenngleich es nicht so effektiv in den neuen Strang eingebaut wurde wie z.B. das (R)-PMPA-DP **35**. Dies war besonders daran zu erkennen, dass neben der +1-Bande auch noch ein nicht unerheblicher Teil nicht verlängerten Primers vorlag. Wie bereits bekannt, war (R)-PMPA-DP **35** sowie A-ACV-TP **74** ein Substrat für die HIV-RT. Auch bei der Anwesenheit aller natürlichen dNTPs wurde (zumindest zu einem gewissen Teil) auch noch das A-ACV-TP **74** in den neuen Strang eingebaut (Abb. 43, 11), obwohl dies augenscheinlich nicht so effizient passierte, wie bei dem (R)-PMPA-DP **35**. Hier schien der kleine strukturelle Unterschied zwischen den beiden Substanzen doch zu einem größeren Unterschied bei der Selektivität gegenüber der HIV-RT zu führen.

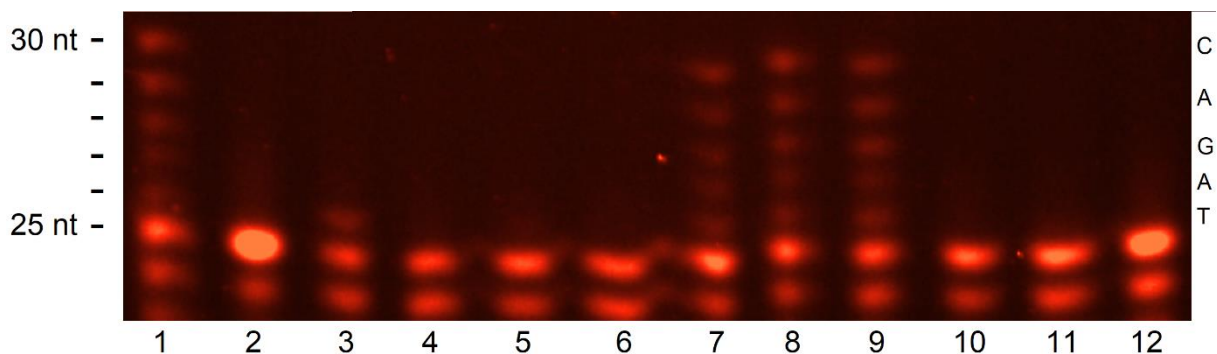


Abb. 44: *Primer Extension Assay* der verschiedenen Phosphorylierungsstufen des PMPAs, den γ -Alkyl-(R)-PMPA-DP sowie dem Adenosin-Acylovir und der humanen DNA-Polymerase γ . 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dATP), 4: (R)-PMPA-DP **35**, 5: γ -C11-(R)-PMPA-DP **7g**, 6: γ -C18-(R)-PMPA-DP **7h**, 7: (R)-PMPA-DP **35** + alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(R)-PMPA-DP **7g** + alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18 (R)-PMPA-DP **7h** + alle natürlichen dNTPs, 10: (R)-PMPA-MP **34**, 11: Adenosin-Acylovir-TP **74**, 12: (R)-PMPA **7**.

In einem weiteren Assay sollten die Substrateigenschaften der verschiedenen hoch phosphorylierten (*R*)-PMPA-Derivate, der γ -Alkyl-(*R*)-PMPA-Diphosphate sowie des Adenosin-Acyclovir-TP gegenüber der humanen DNA-Polymerase γ getestet werden.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass (*R*)-PMPA ungeachtet der Phosphorylierungsstufe kein Substrat für die humane DNA-Polymerase γ war (Abb. 44, 4-6, 10 sowie 12). Es kam bei dem Vorliegen aller natürlichen dNTP sogar zu einer Strangverlängerung, die vergleichbar mit der Positivkontrolle war (Vergleich von Abb. 44, 1 mit 7-9). Dies sprach dafür, dass (*R*)-PMPA-DP keinen Einfluss auf die Aktivität der humanen DNA-Polymerase γ hatte. Das Ergebnis ist im guten Einklang mit den kaum vorhandenen toxischen Nebenwirkungen der genutzten Präparate und den in den antiviralen Assays erhaltenen hohen Zytotoxizitätswerten.⁴⁴

Auch für das Adenosin-Acyclovir-Triphosphat **74** wurde keine Strangverlängerung über die humane DNA-Polymerase γ beobachtet, was darauf schließen ließ, dass auch diese Verbindung kein Substrat war. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass entweder das Fehlen der 3'-Hydroxyfunktion, die acyclische Struktur oder die Summe beider Faktoren die Substrateigenschaften gegenüber der humanen Polymerase deutlich verminderten.

6.2.4 Fazit der Untersuchungen an (*R*)-PMPA

Es konnten erfolgreich die ersten Diphosphat-Prodrugs von (*R*)-PMPA dargestellt werden. Hierzu wurden sowohl symmetrische, klassische TriPPP_{ro} Verbindungen, die Prodrugs der γ -alkylmodifizierten (*R*)-PMPA-Diphosphate sowie deren Metabolite, die γ -alkylmodifizierten (*R*)-PMPA-Diphosphate bzw. das (*R*)-PMPA-Di- und Monophosphat synthetisiert. Alle dargestellten Verbindungen zeigten antivirale Aktivität, ausreichende chemische Stabilität und wurden enzymatisch in Zellextrakt aktiviert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle dargestellten (*R*)-PMPA-Diphosphate ein Substrat für die HIV-RT sind und somit zu einem Kettenabbruch des neu synthetisierten DNA-Stranges führten. Es ist jedoch zu beachten, dass die Modifikationen dennoch einen Einfluss auf das kompetitive Substratverhalten hatten. Dies widerspricht etwas den antiviralen Aktivitäten, bei denen die Verbindungen mit einer γ -C18-Modifikation am aktivsten waren, wohingegen die Verbindungen, die das eigentliche (*R*)-PMPA-DP freisetzen, hinter den Erwartungen blieben. Dies würde wiederum für einen Hydrolyseprozess dieser doppelt maskierten Verbindungen im Medium oder ähnlichem sprechen, wodurch z.B. (*R*)-PMPA-MP freigesetzt wird, welches deutlich schlechter bzw. gar nicht durch die Zellmembran diffundieren kann. Hier könnte eine Methylengruppe zwischen dem γ - und β -Phosphat dieser Hydrolyse entgegenwirken und somit eine neue Generation von TriPPP_{ro}-Verbindungen darstellen.

6.3 Synthese der (S)-HPMP-Derivate

Eine weitere vielversprechende Klasse der Virustatika in der Gruppe der ANPs sind die (S)-3-Hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl-Derivate ((S)-HPMP-Derivate). Diese Verbindungen haben im Gegensatz zu den (R)-PMP-Derivaten, eine Hydroxyfunktion und führen damit nicht zu einem sofortigen Kettenabbruch.⁹¹ Das bekannteste und in der Klinik angewendete Beispiel ist das (S)-HPMPC (Cidofovir), ein Analogon vom dCMP.

(S)-HPMPC zeigte in der Literatur ein breites Wirkspektrum gegen viele DNA-Viren,⁹¹ jedoch zeigten die Derivate mit anderen Nucleobasen (A, G, T) eine geringere antivirale Aktivität.¹⁰² Um auszuschließen, dass die Aktivitätsunterschiede durch unterschiedlich schnelle Phosphorylierung zustande kommen, sollten nun die (S)-HPMP-Derivate aller vier Nucleobasen (A, C, G, T) dargestellt werden. Zusätzlich wurde 5-FU als Nucleobase benutzt, um eine potentielle antitumorale Wirkung der (S)-HPMP-Derivate zu forcieren.

6.3.1 Synthese von (S)-HPMPC (Cidofovir) 9

Anders als (R)-PMPA ist (S)-HPMPC nicht in einem großen Maßstab kommerziell erhältlich, was eine Synthese notwendig machte. Die ursprüngliche Synthese der HPMP-Derivate ist von HOLÝ für alle Nucleobasen beschrieben worden, dabei wurde jedoch das Racemat erhalten und ein Tausch der Schutzgruppen war häufig erforderlich.¹⁰³ Eine Alternative ist die Synthese nach BRODFUEHRER. Diese Syntheseroute verfolgt eine orthogonale Schutzgruppenstrategie und hat den Vorteil, dass das Stereozentrum über ein chirales Glycidol eingeführt wird. Dadurch wurde das (S)-HPMPC in der Theorie über eine 6-Stufige Synthese zugänglich.¹⁰⁴

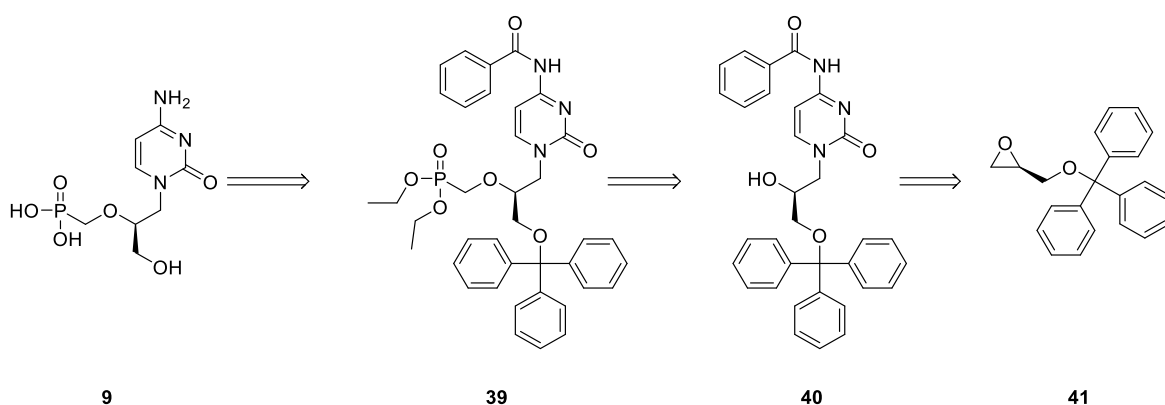


Abb. 45: Retrosyntheseschema zur Darstellung von (S)-HPMPC **9** ausgehend vom (R)-Glycidyltritylether **41**.

Aufgrund dieser Vorteile wurde die Synthese nach BRODFUEHRER angetrebt. Der geschützte (R)-Glycidolbaustein **41** konnte nach Kristallisation aus Methanol in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden. Im nächsten Schritt sollte mittels eines Nucleophiles das

(*R*)-Glycidyltritylether **41** regioselektiv geöffnet werden. Laut der Literatur wurden hierfür nur katalytische Mengen an Natriumhydrid verwendet.¹⁰⁴

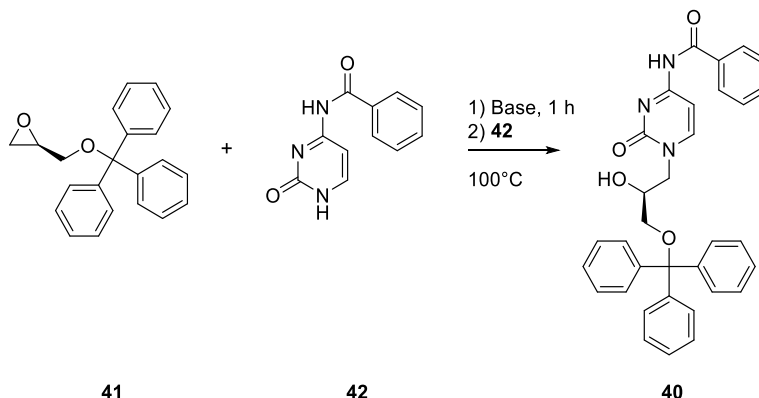


Abb. 46: Synthese des *N*-Benzoylcytosin-Bausteins **40**.

Dies führte in den ersten Syntheseversuchen allerdings nur zu geringen Ausbeuten von um die 30 %. Als Grund hierfür konnte eine nicht vollständige Umsetzung des (*R*)-Glycidyltritylethers **41** ausgemacht werden, wobei auch nach einer Verlängerung der Reaktionszeit auf 72 Stunden kein vollständiger Umsatz erreicht werden konnte. Dünnschichtchromatographisch war hierbei lediglich ein erhöhtes Auftreten von Nebenprodukten zu beobachten, jedoch konnte auch bei kürzeren Reaktionszeiten eine Vielzahl von Nebenprodukten festgestellt werden. Dies machte eine vielfache säulenchromatographische Reinigung notwendig. Auch durch eine Kristallisation aus Methanol, wie für die Butyl-Derivate beschrieben, konnte kein Produkt isoliert werden.¹⁰⁵ Diese Ergebnisse decken sich mit der Arbeit von GÖRBIG, weshalb im weiteren Verlauf auf die von GÖRBIG entwickelte Vorschrift zurückgegriffen wurde, die einen äquimolaren Einsatz von Natriumhydrid beschrieb.¹⁰⁶ Zwar konnte hierdurch ein vollständiger Umsatz des (*R*)-Glycidyltritylethers **41** beobachtet, jedoch keine Steigerung der Ausbeute erreicht werden. Daher wurde angenommen, dass die Nebenreaktionen, besonders eine doppelte Alkylierung, im Vordergrund standen.

Auch eine Steigerung der Äquivalente an Natriumhydrid führte nicht zu einer nennenswerten Steigerung der Ausbeute, weswegen im weiteren Verlauf weitere Basen ausprobiert wurden. Zusätzlich sollte das *N*-Benzoylcytosin als Anion verwendet werden. Dieser Ansatz wurde von WEISING in der Synthese carbocyclischer Nucleosidanaloga verwendet.¹⁰⁷ Zwar konnte die Ausbeute durch den Einsatz von Cäsiumcarbonat auf 70 % gesteigert werden, jedoch stellte die Isolierung des Produktes weiterhin ein Problem dar. Es zog sich ein unlöslicher Feststoff durch den Reinigungsprozess, der beispielsweise die Phasentrennung in den Waschschrritten verhinderte. Der Feststoff konnte ausschließlich mittels Zentrifugation entfernt werden, allerdings führte dies zu deutlich geringeren Ausbeuten. Auch ein direktes Auftragen auf die

Säule bei der Säulenchromatographie erwies sich problematisch, da sich der Feststoff absetzte und so eine Isolierung unmöglich machte.

Mit diesen Erkenntnissen schien Natriumhydrid die geeignetste Base zu sein und es sollten weitere Versuche unternommen werden, um die Reaktion zu optimieren. Hierfür wurden, bezogen auf (*R*)-Glycidyltritylether **41**, die Zahl der Äquivalente an Natriumhydrid auf 4.0 Äquivalente erhöht, sowie in einem anderen Ansatz auf 0.50 Äquivalente verringert. Bei der Verwendung von 0.50 Äquivalenten Natriumhydrid zeigte sich eine nahezu quantitative Ausbeute und übertraf damit die Ausbeute bei der Reaktion mit Cäsiumcarbonat. Die Reaktion mit Natriumhydrid hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Isolierung des Produktes deutlich einfacher war. Es konnte demnach durch das Anpassen der Äquivalente an Natriumhydrid eine geeignete Methode gefunden werden, mit der zuverlässig weitergearbeitet werden konnte. Die für die Optimierung der Reaktion verwendeten Basen, Mengen und Reaktionszeiten sind in Tab. 3 aufgelistet.

Im nächsten Schritt folgte die Übertragung des Phosphonates über die Knüpfung der Etherbindung. Hier zeigte sich die Verwendung der Benzoylschutzgruppe als Vorteil, da das exocyclische Amin nicht in einem separaten Schritt geschützt werden musste. Hierfür wurde der *N*-Benzoylcytosinbaustein **40** mit Natriumhydrid deprotoniert und mit dem zuvor dargestellten Tosylat **43a** versetzt. Auch bei dieser Reaktion wurden dünnschichtchromatographisch viele Nebenprodukte beobachtet, jedoch konnte das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 28 % isoliert werden. Aufgrund der geringen Ausbeute wurden auch hier alternative Möglichkeiten für die Kupplung erprobt.

Tab. 3: Verwendung der verschiedenen Basen und Äquivalente für die Synthese von **40**.

	Base	Äquivalente	Reaktionszeit	Ausbeute
1	NaH	0.10	18 Stunden	32 %
2	NaH	0.10	72 Stunden	36 %
3	NaH	1.2	18 Stunden	40 %
4	K ₂ CO ₃	1.2	18 Stunden	62 %
5	CsCO ₃	1.2	18 Stunden	70 %
6	N(Bu) ₄ Cytosin	1.2	18-72 Stunden	13 %
7	NaH	4.0	18 Stunden	15 %
8	NaH	0.50	18 Stunden	96 %

Als erstes wurde hierbei die Abgangsgruppe am Phosphonatbaustein variiert. Neben der Tosyl- sollte auch eine Triflat-Gruppe, sowie ein Bromid verwendet werden (Abb. 47). Da keine dieser Varianten einen relevanten Erfolg erbrachte, wurde eine Mesylabgangsgruppe in den

N-Benzoylcytosinbaustein eingeführt. Nun wurde das Diethylphosphonat **43** mit Natriumhydrid deprotoniert und mit dem Mesylat versetzt. Jedoch konnte kein Produkt isoliert werden, wodurch diese Route verworfen wurde.

Letztendlich wurden wieder unterschiedliche Äquivalente an Natriumhydrid erprobt, um eine mögliche Abhängigkeit aufzudecken. Hierbei stellte sich heraus, dass ein deutlicher Überschuss an Natriumhydrid (3.00 Äquivalente) die besten Ausbeuten von um die 70 % lieferte. Besonders zu beachten war neben der Anzahl an Äquivalenten an Natriumhydrid auch die Reaktionszeit. Hier zeigte eine Reaktionszeit von 18 Stunden die besten Ergebnisse, da eine längere Reaktionszeit eine vermehrte Bildung von Nebenprodukten zur Folge hatte.

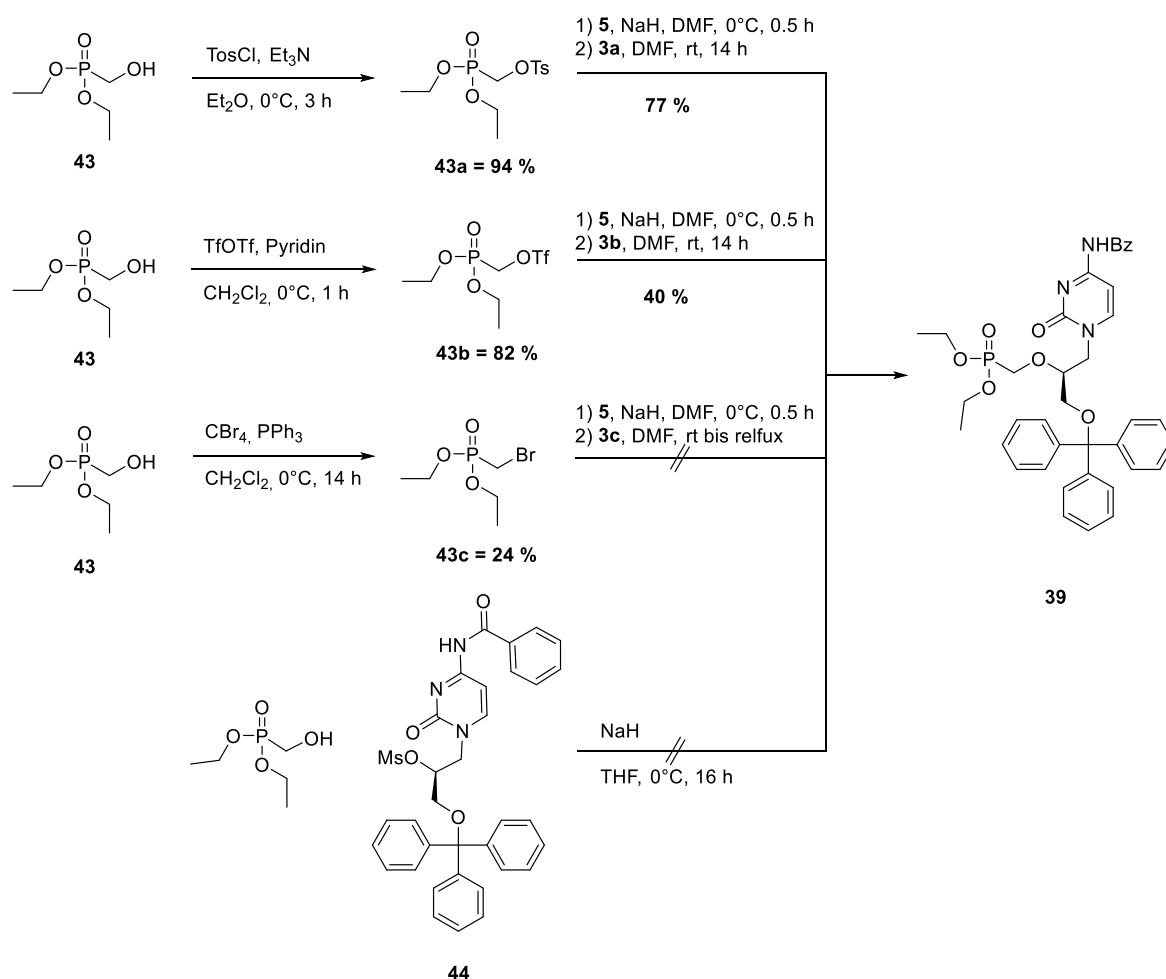


Abb. 47: Synthese und Syntheseversuche zur Darstellung des geschützten (*S*)-HPMPCs **39** über verschiedene Routen.

Im letzten Schritt sollten die Schutzgruppen wieder entfernt werden. Dabei sollte erst die Tritylgruppe sauer und anschließend die verbliebenen Ester unter basischen Bedingungen mit Ammoniak oder Natriummethanolat verseift werden. Dies hätte den Vorteil, dass man bei

Bedarf die 3'-Hydroxyfunktion durch einen anderen Ester (z.B. Pivaloyl) schützen könnte und so eine Bildung des cyclischen (S)-HPMPC, welches bei Hydrolysen von GÖRBIG beobachtet wurde, verhindern könnte.¹⁰⁶ Anders als von GÖRBIG beschrieben, führte die Verseifung von **39** nur in geringen Ausbeuten zum freien (S)-HPMPC. In welcher Reihenfolge die Schutzgruppen entfernt wurden, spielte hierbei keine Rolle. Ein häufiges Problem, stellte der sehr große Polaritätsunterschied dar. So konnte beispielsweise bei der Verseifung mit Natriummethanolat in Methanol nur ein Gemisch aus dem (S)-HPMPC, einfach ethylgeschützten (S)-HPMPC, dem doppelt ethylgeschützten (S)-HPMPC sowie dem *N*-Benzoyl-(S)-HPMPC erhalten werden. Dieses Gemisch wurde unabhängig von der Reaktionszeit und den eingesetzten Äquivalenten beobachtet. Daher konnte, je nach gewählter Chromatographiemethode, mindestens ein Produkt nicht isoliert werden. Weiterhin war das Elutionsverhalten der einfach und doppelt veresterten Verbindungen oft sehr ähnlich, wodurch kein klares Verhältnis bestimmt und zu einem großen Teil nur das Gemisch isoliert werden konnte. Daher wurde versucht, dieses Gemisch noch einmal mit Ammoniak oder Natriummethanolat zu verseifen, um (S)-HPMPC zu isolieren. Auch hiernach konnte nur ein Gemisch der verschiedenen Stufen isoliert werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der Ansatz, die Schutzgruppen stufenweise zu entfernen, verworfen und es wurde nach Bedingungen gesucht, in denen die Schutzgruppen synchron gespalten werden konnten.

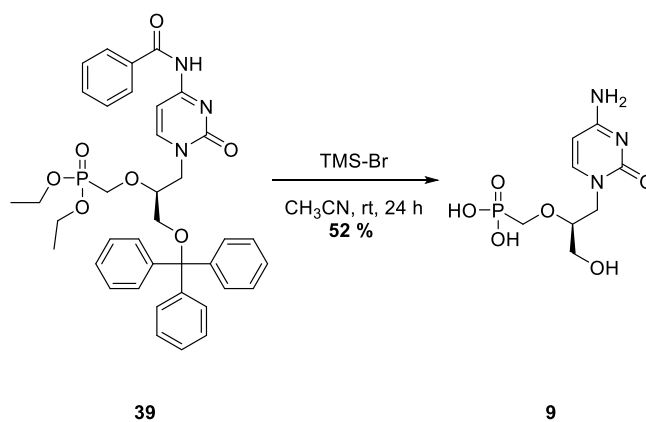


Abb. 48: Das entschützen von (S)-HPMPC **9** mittels Trimethylsilylbromid.

Neben der Verseifung der Ethylschutzgruppen mit Ammoniak oder Natriummethanolat gab es die Möglichkeit, diese mithilfe von Trimethylsilylbromid zu spalten. Bei dieser Reaktion entsteht der entsprechende Trimethylsilylester oder -ether, der in der anschließenden wässrigen Aufarbeitung direkt hydrolysiert und somit das freie Phosphonat liefert. Hierzu wurde das geschützte (S)-HPMPC über Nacht mit TMS-Bromid versetzt, wässrig aufgearbeitet und anschließend über eine automatisierte RP-Chromatographie gereinigt (Abb. 48). Mit dieser Methode konnten alle Schutzgruppen gespalten und (S)-HPMPC **9** isoliert werden. Es kann vermutet werden, dass die Benzoylgruppe analog zu den Ethylestern am Phosphonat

gespalten werden, wohingegen die freier werdende Bromwasserstoffsäure bei der wässrigen Aufarbeitung sauer genug war um die Tritylgruppe zu spalten. Dies deckt sich mit von GÖRBIG beschriebenen Beobachtungen.¹⁰⁶

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach der Optimierung der Synthesestrategie das (S)-HPMPC über vier Stufen in einer Gesamtausbeute von 35 % erhalten werden konnte. Gleichzeitig setzt diese Syntheseroute den Grundstein für die Synthese der weiteren (S)-HPMP-Derivate, da sie durch den Einsatz einer anderen (geschützten) Nucleobase leicht zu modifizieren war. Hierbei sollte besonders darauf geachtet werden, dass die entsprechenden Schutzgruppen entweder sauer oder mittels TMS-Bromid gespalten werden können, um mögliche Komplikationen im letzten Syntheseschritt zu vermeiden.

6.3.2 Alternative Synthese von (S)-HPMPC

Die Synthese des (S)-HPMPCs stellte anfangs eine Herausforderung dar, was zur Suche nach einer alternativen Synthese führte. Es sollte ein besonderes Augenmerk auf ein Synthon mit vorhandenem Stereozentrum gelegt werden. Hierbei ist die Wahl auf die Synthese nach BRONSON gefallen.¹⁰⁸ Die Synthese wurde lediglich durch den Einsatz des N-Benzoylcytosins als Edukt anstelle von Cytosin modifiziert.

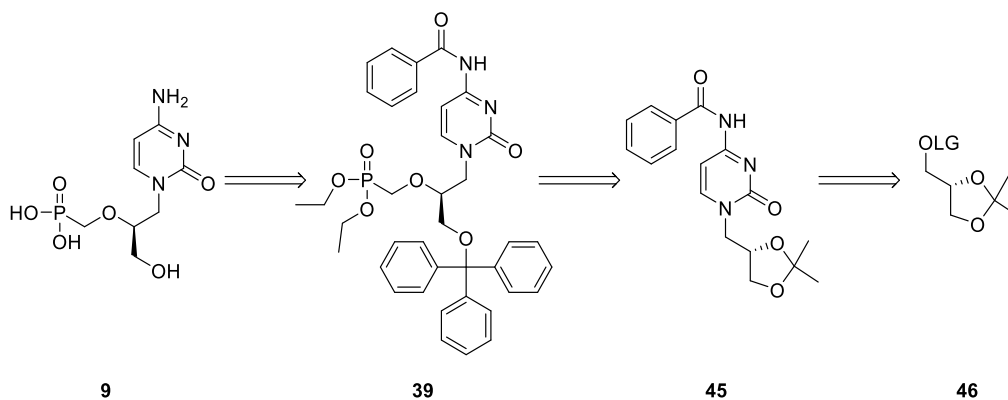


Abb. 49: Retrosyntheschema der alternativen Route für die (S)-HPMPC Synthese nach BRONSON.

Diese Route verfolgte einen linearen Ansatz, der einen Tausch der Schutzgruppen notwendig machte. Diese Synthesestrategie hat den Vorteil, dass die Bildung unerwünschter Nebenprodukte verhindert wird. Trotz der Möglichkeit der N- und O-Alkylierung sollten diese Produkte aufgrund ihrer Löslichkeit getrennt werden können, was einen signifikanten Vorteil gegenüber der Synthese mit dem Tritylgeschützten Baustein darstellt.

Für den ersten Syntheseschritt wurden zwei verschiedene Abgangsgruppen gewählt, zum einen ein Chlorid zum anderen ein Methansulfonsäureester. Bei der Verwendung des Chlorpropanacetons ergab sich nach chromatographischer Reinigung eine Ausbeute von 7 %, was deutlich unter den Erwartungen lag. Die erhoffte einfachere Isolierung des Produktes über die Löslichkeit konnte nicht erreicht werden.

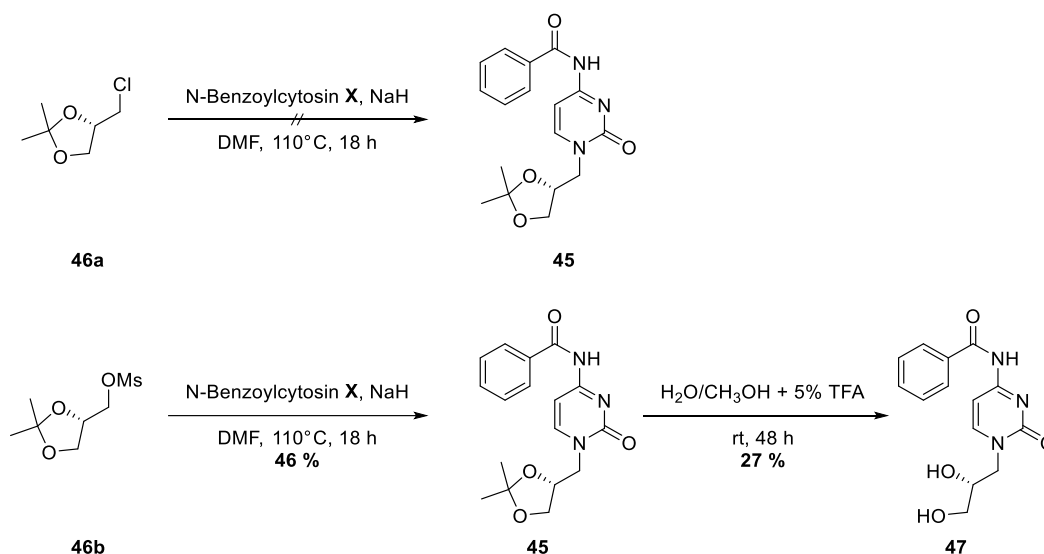


Abb. 50: Synthese der Propanacetone-Bausteine sowie die Entschützung des Acetals mit Trifluoressigsäure für die Synthese des (S)-HPMPCs **9** über die Syntheseroute von BRODFUEHRER.

Bei einem zweiten Versuch wurde ein mesyliertes Propanacetone als Edukt verwendet und das gewünschte Produkt konnte in einer Ausbeute von 31 % erhalten werden. Die Spaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe erfolgt mittels eines Wasser/Methanol-Gemisches (1:1 v/v) mit 5 % TFA in einer Ausbeute von 27 % nach säulenchromatographischer Reinigung. Nach 48 Stunden konnte hier ein vollständiger Umsatz beobachtet werden, wobei die Reaktionszeit durch Zugabe von einer größeren Anzahl an Äquivalenten TFA verkürzt werden könnte. Die geringe Ausbeute bei der Entschützung der Isopropyliden-Schutzgruppe war möglicherweise auf ein gleichzeitiges Entschützen der Benzoyl-Schutzgruppe am exocyclischen Amin zurückzuführen. Im Normalfall sind Amide unter basischen Bedingungen stabiler als Ester, jedoch sind Amide unter sauren Bedingungen vergleichsweise labil. Deshalb wurde bei der Spaltung möglichst wenig TFA verwendet, was jedoch nicht zu dem gewünschten Effekt führte. Es ist anzunehmen, dass das Produkt ohne jegliche Schutzgruppen deutlich polarer war und daher bei der säulenchromatographischen Reinigung unter den gewählten Bedingungen nicht isoliert werden konnte.

Aufgrund des geringen Erfolges und der Notwendigkeit der Säulenchromatographie wurde von einer weiteren Verfolgung dieser Methode abgesehen. Als bessere Alternative stellte sich die optimierte Syntheseroute aus Kapitel 6.3.1 heraus, da sie das (S)-HPMPC in einer Ausbeute von 35 % über vier Stufen lieferte und keinen Schutzgruppentausch erforderte.

6.3.3 Synthese von (S)-HPMPT 19

Für die Synthese des (S)-HPMPTs wurde die Syntheseroute aus Kapitel 6.3.1 verwendet. Hierbei erbrachte die *N*-Alkylierung des Thymins eine Ausbeute von 65 %. Da hier eine ungeschützte Nucleobase verwendet wurde, bestand eine erhöhtes Risiko einer *O*- oder einer unerwünschten 3-*N*-Alkylierung, was über ein HMBC-Spektrum ausgeschlossen werden sollte (Abb. 51).

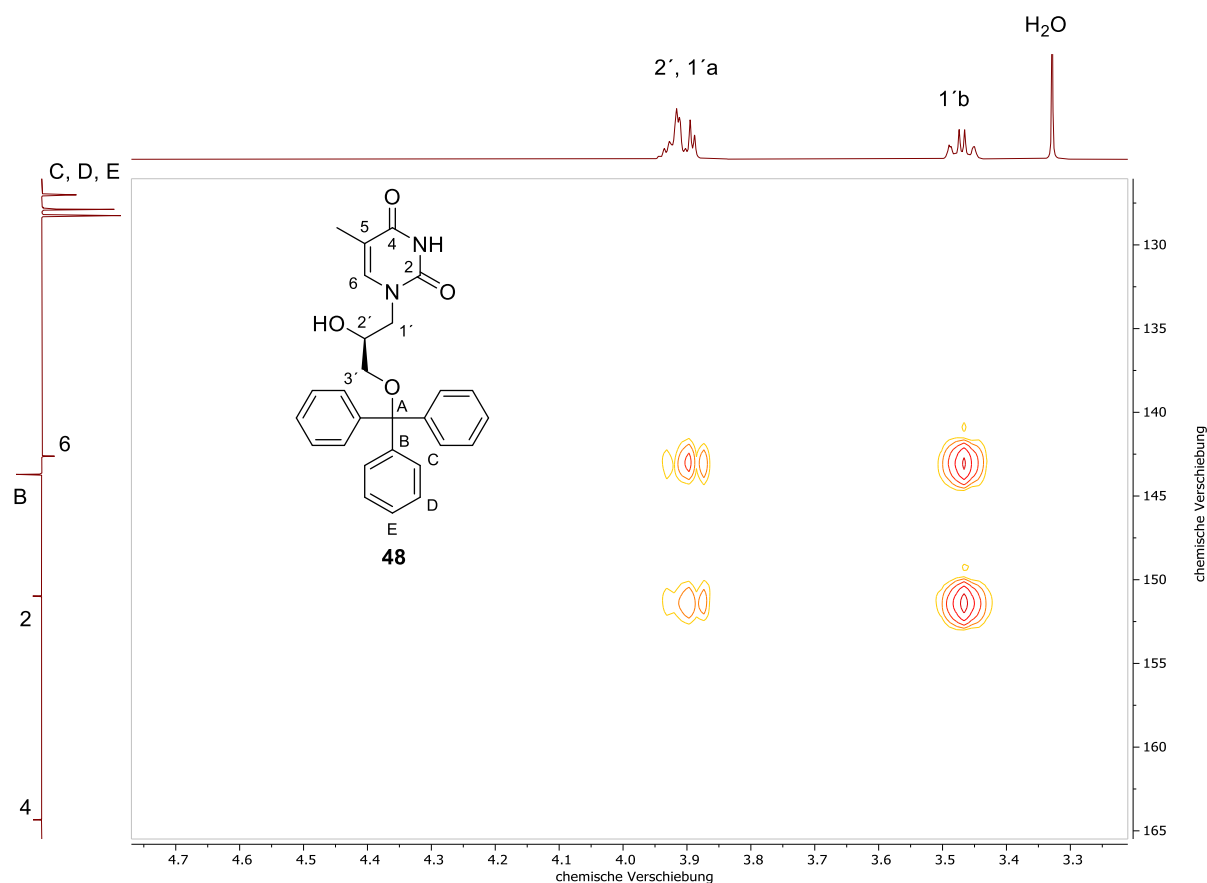
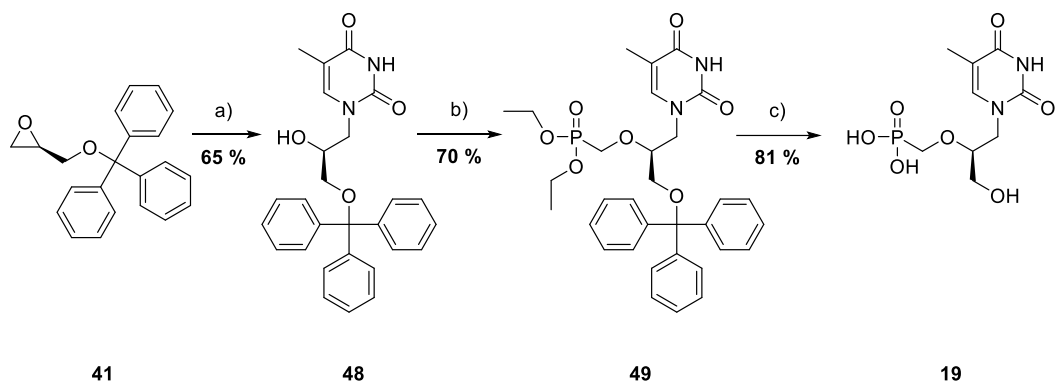


Abb. 51: HMBC-Spektrum der Verbindung **48**. Zu sehen ist die Kopplung zwischen dem 1'-H sowie dem C-2 und C-6.

In dem aufgenommenen Spektrum des erhaltenen Produktes war eine Kopplung zwischen den 1'-Protonensignalen (3.90 ppm und 3.49 ppm) sowie dem C-2-Kohlenstoffatom (151 ppm) und dem C-6-Kohlenstoffatom (141 ppm) zu sehen. Damit konnte angenommen werden, dass es sich bei der analysierten Verbindung um das gewünschte Produkt **48** handelte.

Im weiteren Verlauf wurde die Verbindung, analog zum (S)-HPMPC, in einer Ausbeute von 70 % phosphoryliert und bei der anschließenden Entschützung mit TMS-Bromid eine Ausbeute von 81 % erreicht.



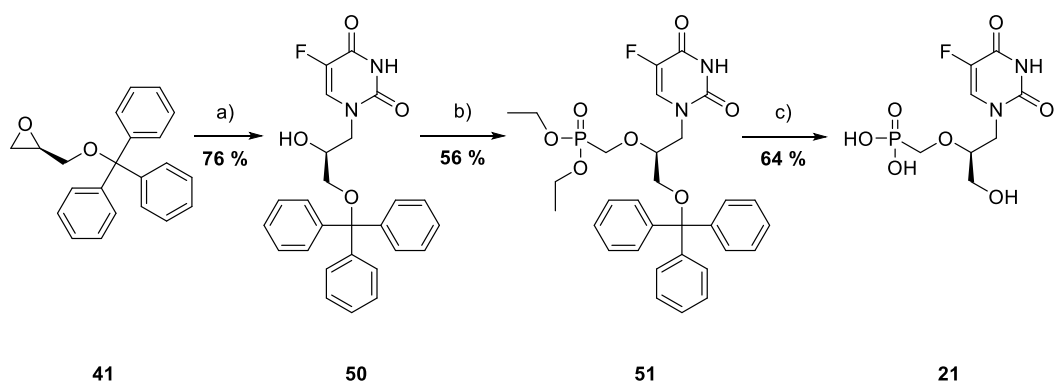
a) NaH, Thymin, DMF, 110°C, 18 h; b) NaH, (EtO)₂POCH₂OTos **43a**, DMF, rt, 18 h; c) TMS-Br, CH₃CN, rt, 18 h

Abb. 52: Synthese von (S)-HPMPT **19** ausgehend vom (R)-Glycidyltritylether **41**.

Damit konnte das (S)-HPMPT erfolgreich über drei Stufen ausgehend vom (R)-Glycidyltritylether **41** mit einer Gesamtausbeute von 37 % dargestellt werden. Die erfolgreiche Synthese zeigte, dass die Syntheseroute aus Kapitel 6.3.1 auch für andere (S)-HPMP-Derivate in vergleichbaren Ausbeuten genutzt werden konnte.

6.3.4 Synthese von (S)-HPMPFU **21**

Im weiteren Verlauf sollte (S)-HPMPFU **21**, ausgehend von 5-Fluoruracil, dargestellt werden. Die beschriebene antitumorale Wirkung von (S)-HPMPC gegen z.B. Glioblastome oder Papillome, sollte durch die Verwendung von 5-FU als Nucleobase verstärkt werden.^{70, 71}



a) NaH, 5-FU, DMF, 110°C, 18 h; b) NaH, (EtO)₂POCH₂OTos **43a**, DMF, rt, 18 h; c) TMS-Br, CH₃CN, rt, 18 h

Abb. 53: Synthese von (S)-HPMPFU **21** über drei Stufen ausgehend vom (R)-Glycidyltritylether **41**.

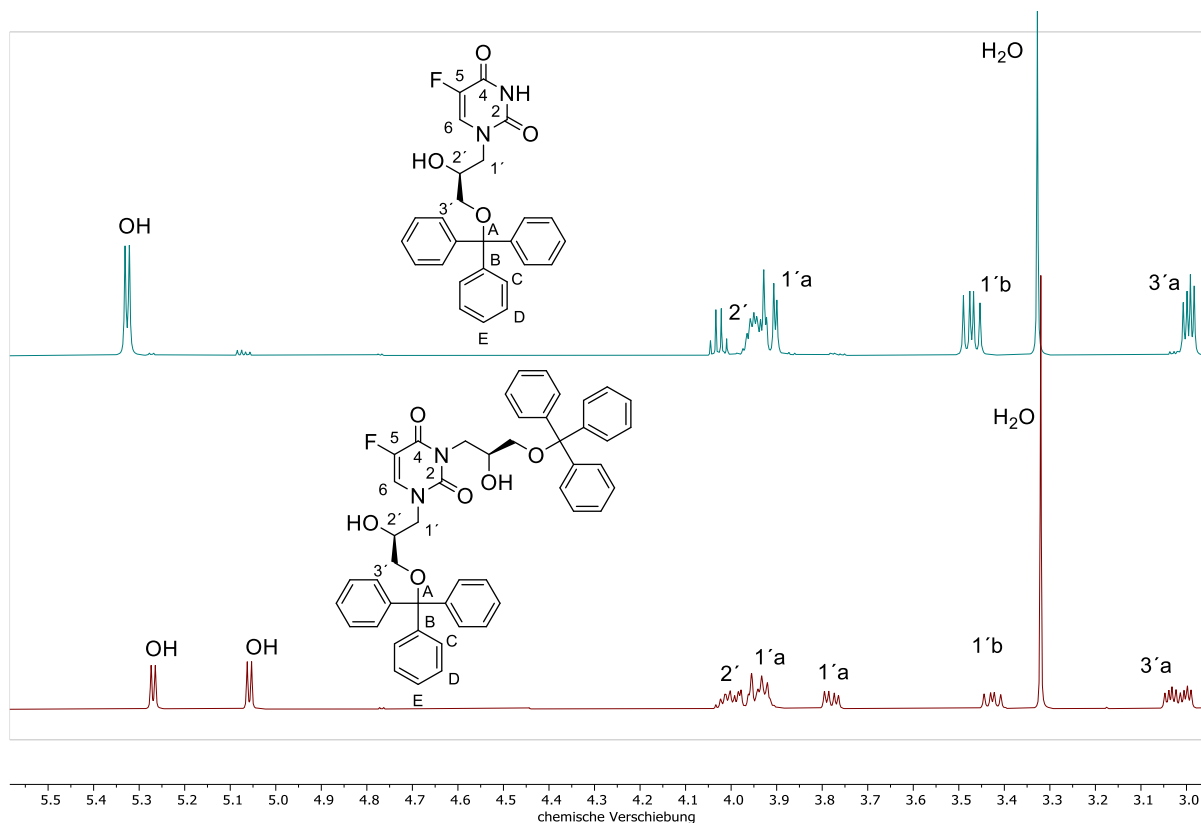


Abb. 54: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der erhaltenen Fraktionen nach der nucleophilen Ringöffnung des (*R*)-Glycidyltritylethers **41** durch 5-FU.

Die Synthese des (*S*)-HPMPFUs gelang in vergleichbaren Ausbeuten zu der Synthese des (*S*)-HPMPT. Es wurde analog die ungeschützte Nucleobase 5-FU für die nucleophile Ringöffnung am (*R*)-Glycidyltritylether genutzt und nach der säulenchromatographischen Reinigung die Fraktionen analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass unter den gleichen Reaktionsbedingungen zu 9 % das doppelt *N*-alkylierte Produkt entstanden war (Abb. 54, unten). Es wurde versucht, durch eine Reduktion der Anzahl an Äquivalenten an 5-FU die Bildung des doppelt alkylierten Produktes zu verhindern, was jedoch nicht den gewünschten Erfolg brachte. Weiterhin wurde die Reaktionsdauer sowie die -temperatur variiert, um der Bildung des doppelt alkylierten Produktes entgegen zu wirken. Es wurde beobachtet, dass das Reduzieren der Reaktionstemperatur lediglich mit einer deutlich längeren Reaktionszeit einher ging und eine verlängerte Reaktionszeit wiederum zu einer vermehrten Bildung des doppelt *N*-*N*-alkylierten Produktes führte. Die gebildeten Produkte konnten säulenchromatographisch gut getrennt werden, weshalb keine weiteren Bemühungen angestellt wurden, die Reaktion zu optimieren. Das gewünschte Produkt **50** konnte in einer Ausbeute von 75 % dargestellt werden und lag damit auch ohne weitere Optimierung in einem vergleichbaren Bereich zu den vorangegangenen Synthesen.

Anschließend wurde das erhaltene Produkt **50** mittels eines HMBC-Spektrums auf die Alkylierung an der *N*-1-Position überprüft (Abb. 55), wobei analog zum (*S*)-HPMPT die Kopplung der 1'-Protonensignale mit den entsprechenden C-2- sowie C-6-Atomen und die Kopplung der 3'-Protonensignale mit dem C_A-Atom der Tritylgruppe beobachtet werden konnte.

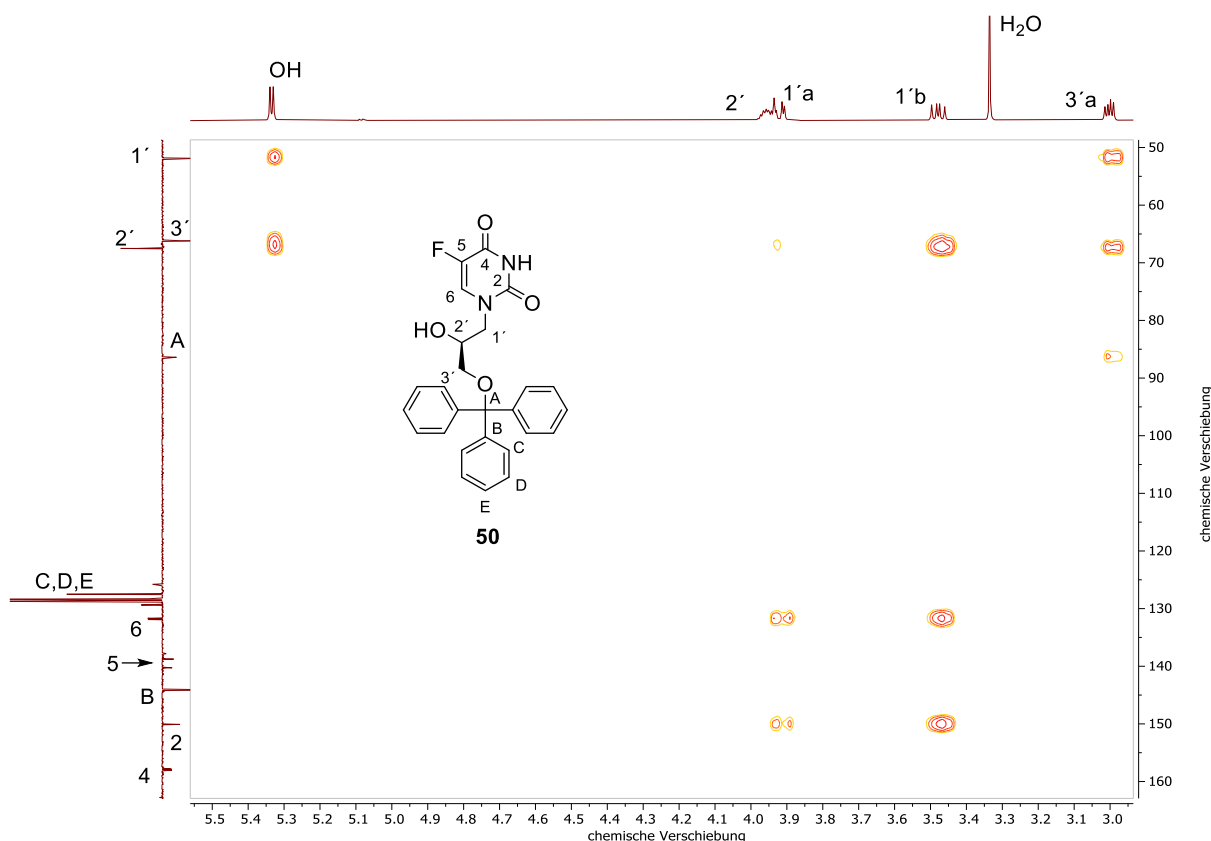


Abb. 55: HMBC-Spektrum der Verbindung **50**. Zu sehen ist die Kopplung zwischen den 1'-Protonen mit dem C-2 sowie C-6 aus dem 5-FU.

Nach der Phosphonylierung mit dem geschützten Tosylat **43a** sowie einer anschließenden Spaltung der Ethyl-Schutzgruppen mit TMS-Bromid konnte (*S*)-HPMPFU in einer Ausbeute von 27 % über 4 Stufen ausgehend vom Glycidol erfolgreich dargestellt werden.

6.3.5 Synthese von (*S*)-HPMPG **20**

Nach der erfolgreichen Synthese der (*S*)-HPMP-Pyrimidine, folgte die Synthese der (*S*)-HPMP-Purine, wobei mit der Synthese von (*S*)-HPMPG begonnen werden sollte. Die Erfahrungen aus der Synthese des (*S*)-HPMPT bzw. (*S*)-HPMPFU zeigten, dass es nicht zwingend notwendig war, eine geschützte Nucleobase zu verwenden, weshalb für die Synthese der (*S*)-HPMP-Purine auf eine Schutzgruppe an der Nucleobase verzichtet wurde. Bei der nucleophilen Ringöffnung des Epoxides mit dem ungeschützten Guanin wurde nach

der säulenchromatographischen Reinigung eine Ausbeute von 26 % erreicht. Bei der anschließenden Kupplung mit dem geschützten Phosphonat **43a** stellte die säulenchromatographische Reinigung des geschützten (*S*)-HPMPG **20** eine Herausforderung dar. Selbst das polare Lösungsmittelgemisch aus Ethylacetat und Methanol im Verhältnis 9:1 reichte nicht aus, um das gewünschte Produkt zu eluieren. Aufgrund der hohen Polarität wurde eine Umkehrphasenchromatographie durchgeführt, jedoch eluierte das Produkt erst bei einem hohen Acetonitril Anteil oder bei der Verwendung von THF als Elutionsmittel. Aufgrund dieser Umstände konnte das Produkt **54** nicht vollständig isoliert werden, wodurch in der darauffolgenden Reaktion ein leicht verunreinigtes Produkt eingesetzt wurde. Für die anschließende Spaltung der Ethylester konnte, im Gegensatz zu den vorangegangenen Synthesen, das (*S*)-HPMPG erst nach mehrfachen automatisierten RP-Chromatographien in einer Ausbeute von 2 % isoliert werden (Abb. 56).

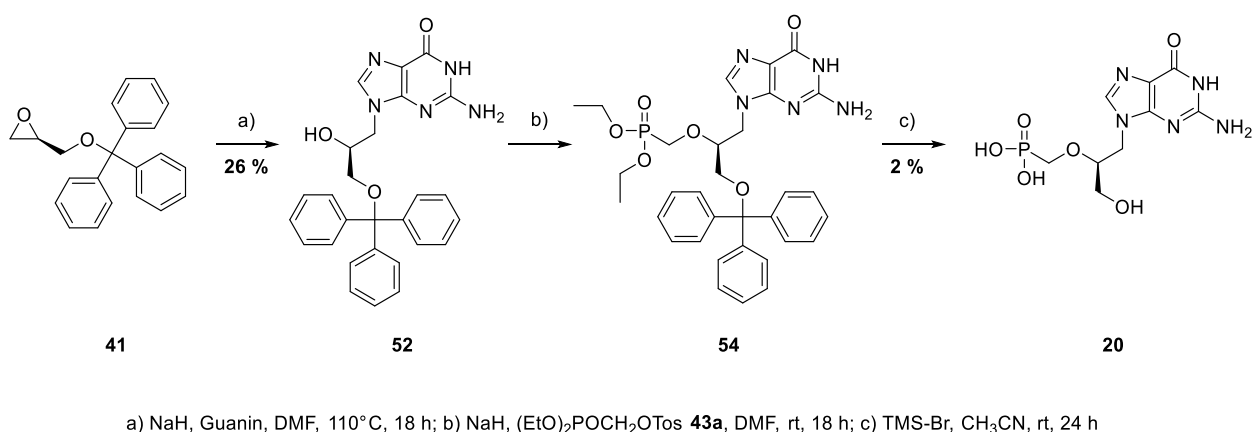
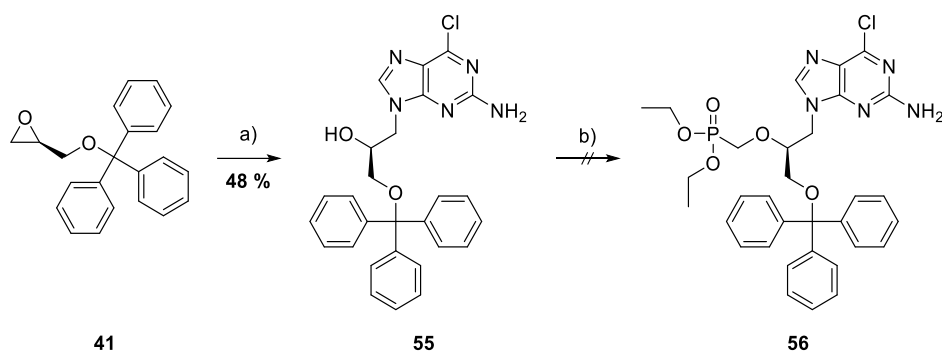


Abb. 56: Versuch der Synthese von (*S*)-HPMPG **20** ausgehend von Guanin.

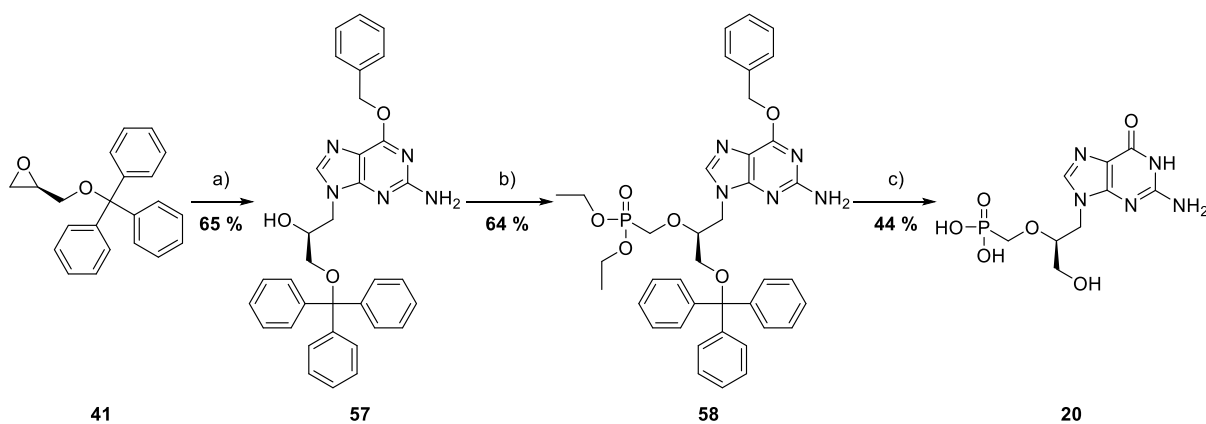
Die geringen Ausbeuten sowie die herausfordernde Isolierung der Produkte zeigten die Notwendigkeit einer Schutzgruppe an der Nucleobase auf, wodurch im weiteren Verlauf 2-Amino-6-chlorpurin verwendet werden sollte. Durch den Chlorsubstituenten im Heterocyclus sollte eine eventuelle Keto-Enol-Tautomerie der Nucleobase möglichst verhindert werden, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Dabei konnte schon bei der ersten Reaktion, der nucleophilen Ringöffnung des (*R*)-Glycidyltritylethers **41**, die Ausbeute auf 48 % gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der anschließenden Phosphonylierung zwar ein vollständiger Umsatz beobachtet, jedoch kein Produkt isoliert werden (Abb. 57).



a) NaH, 2-Amino-6-chlorpurin, DMF, 110°C, 18 h; b) NaH, (EtO)₂POCH₂OTos **43a**, DMF, rt, 18 h

Abb. 57: Versuch der Synthese von (S)-HPMPG **20** ausgehend von 2-Amino-6-chlorpurin.

Da die Synthese mit dem ungeschützten Guanin zwar (S)-HPMPG **20** lieferte, stellten die Reaktionen jedoch aufgrund der geringen Ausbeute ein großes Problem dar. Weiterhin erbrachten die Syntheseveruche mit 2-Amino-6-chlorpurin keinen Erfolg, weshalb die Synthesen unter der Verwendung eines geschützten Guanins wiederholt werden sollten. Hierbei fiel die Wahl auf das 6-O-Benzylguanin, das kommerziell erhältlich und die Schutzgruppe unter den bekannten Bedingungen spaltbar ist. Bereits im ersten Syntheseschritt konnte das gewünschte Produkt **57** in einer Ausbeute von 65 % isoliert werden.



a) NaH, 6-O-Benzylguanin, DMF, 110°C, 18 h; b) NaH, (EtO)₂POCH₂OTos **43a**, DMF, rt, 18 h; c) TMS-Br, CH₃CN, rt, 18 h

Abb. 58: Synthese von (S)-HPMPG **20** über drei Stufen ausgehend vom (R)-Glycidyltrityl ether **41**.

Durch die niedrigere Polarität der Verbindung **57** gegenüber der Verbindung **52** war eine unkomplizierte Isolierung des Produktes möglich, insbesondere bei der säulenchromatographischen Reinigung. Obwohl bei dieser Reaktion eine Schutzgruppe Verwendung fand, sollte die N-Alkylierung mittels eines HMBC-Spektrums überprüft werden (Abb. 59). Dabei konnte die gewünschte 7-N-Alkylierung durch die Kopplung der 1'-Protonensignale mit dem C-4 sowie dem C-8-Kohlenstoffatom nachgewiesen werden.

Die folgende Phosphonylierung mit der Verbindung **43a** sowie der Spaltung aller Schutzgruppen mit TMS-Bromid, gelang in Ausbeuten von 64 % sowie 44 %. So wurde eine Gesamtausbeute von 18 % über 4 Stufen ausgehend vom Glycidol erreicht.

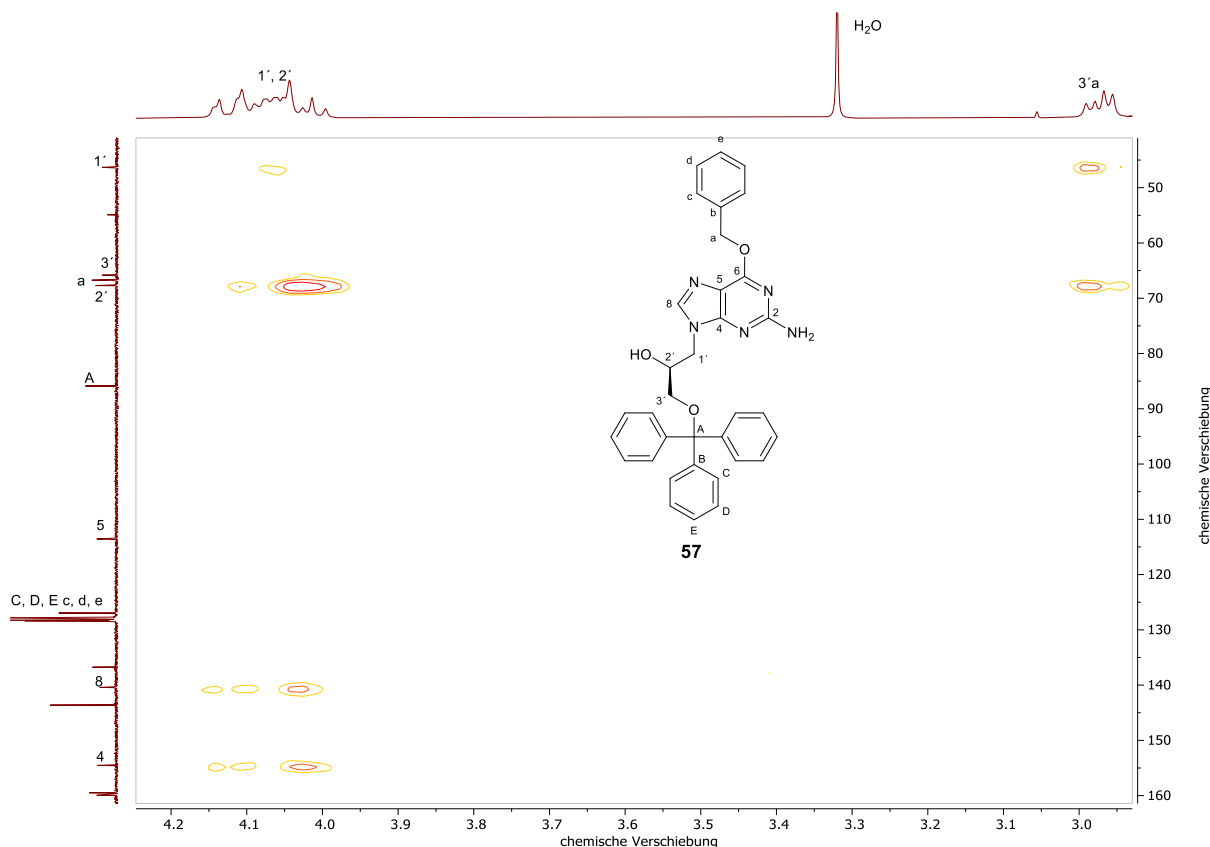


Abb. 59: HMBC-Spektrum der Verbindung **57**. Zu sehen ist die Kopplung der 1'-Protonen mit dem C-4- sowie dem C-8-Kohlenstoffatom.

6.3.6 Synthese von (S)-HPMPA **13**

Aufgrund der Erfahrungen bei der Synthese des (S)-HPMPGs **20**, wurde für die Synthese des (S)-HPMPAs **13** direkt auf das geschützte 6-*N*-Benzoyladenin zurückgegriffen. Bei der nucleophilen Ringöffnung des (*R*)-Glycidyltritylethers mit dem 6-*N*-Benzoyladenin konnte zwar das gewünschte Produkt **59** in einer Ausbeute von 64 % erhalten werden, jedoch wurde ebenfalls ein Nebenprodukt **60** in einer Ausbeute von 30 % isoliert (Abb. 60).

Es war unklar, wie es zu der Bildung dieses Nebenproduktes gekommen war. Zwar könnte die deprotonierte Hydroxyfunktion, welches sich durch die Ringöffnung bildet, nucleophil am Carbonylkohlenstoffatom des Benzoylamids angreifen. Jedoch müsste dies zu einer Bildung des ungeschützten Produktes führen, welches nicht isoliert werden konnte. Durch ein Anpassen der Anzahl an Äquivalenten an 6-*N*-Benzoyladenin bzw. durch ein Reduzieren der

Reaktionstemperatur wurde versucht, das Entstehen des Nebenproduktes bestmöglich zu vermeiden, jedoch waren diese Versuche erfolglos.

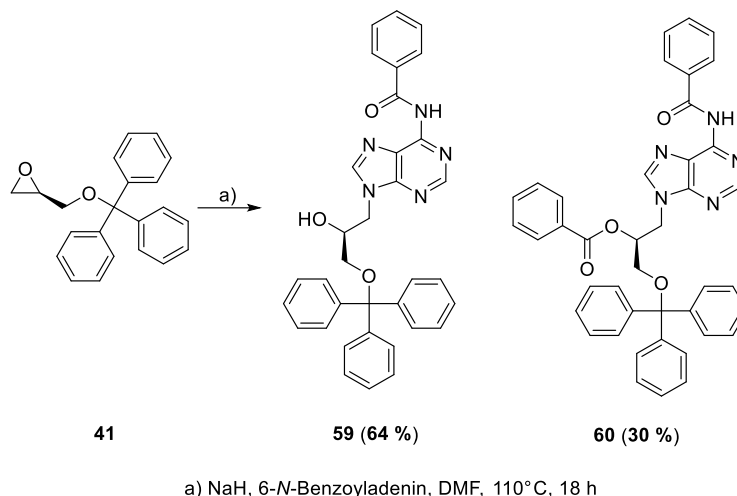


Abb. 60: Synthese des *N*-Benzoyl-Adenin-Bausteins **59** mit dem auftretenden Nebenprodukt **60**.

Um diese ungewünschte Reaktion zu umgehen, sollte die Synthese ausgehend von 6-Chlorpurin versucht werden, was in einer Ausbeute von 41 % gelang. Im nächsten Schritt sollte der ungeschützte 3-Hydroxypropyl-Adenin-Baustein **61**, durch den Austausch des Chlorids mit einer Aminogruppe dargestellt werden, da bei der Synthese des (*S*)-HPMPGs ausgehend von dem 2-Amino-6-chlorpurin nach der Phosphonylierung kein Produkt isoliert werden konnte. Für die entsprechende Synthese wurde die Verbindung **61** mit einer 7M Ammoniak-Lösung in Methanol bei 80°C versetzt. Es konnte nach 48 Stunden ein vollständiger Umsatz, sowie die Bildung eines Produktes beobachtet werden. Das gewünschte Produkt **62** konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 87 %, jedoch auch das Edukt mit 13 % isoliert werden. Obwohl ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde, könnte durch eine längere Reaktionszeit eine nahezu quantitative Ausbeute erreicht werden, da die Entstehung von Nebenprodukten weder beobachtet noch Nebenprodukte isoliert werden konnten. Somit konnte der gewünschte 3-Hydroxypropyl-Adenin-Baustein **62** in einer Gesamtausbeute von 36 % über zwei Stufen erhalten werden. Da diese Ausbeute jedoch geringer war, als die entsprechende Gesamtausbeute der Reaktion über das 6-*N*-Benzoyladenin, wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.

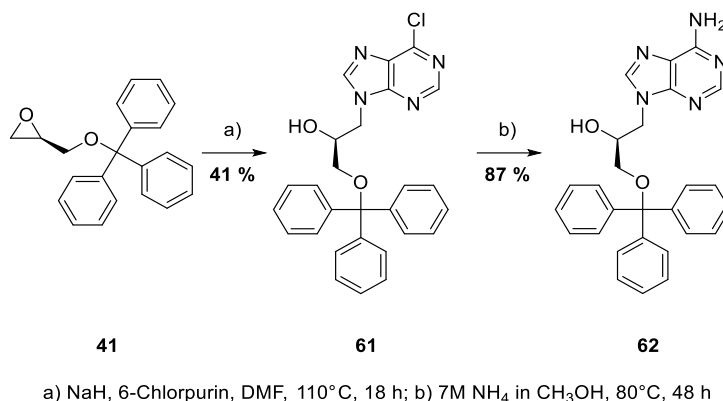


Abb. 61: Synthese des 3-Hydroxypropyl-Adenin-Bausteins **62** mit dem 6-Chlorpurin.

Analog zum (*S*)-HPMPG wurde über ein HMBC-Spektrum die Position der *N*-Alkylierung validiert und anschließend die Verbindung **59** phosphoryliert, was in einer Ausbeute von 78 % gelang. Die anschließende Entschützung mit TMS-Bromid erfolgte in einer Ausbeute von 44 %, wobei nach der ersten automatisierten RP-Chromatographie teilweise noch benzoylgeschütztes (*S*)-HPMPA isoliert werden konnte. Die erhaltenen (*S*)-HPMPA-haltigen Fraktionen wurden über Nacht in einer 10 %igen Tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid Lösung gerührt und anschließend (*S*)-HPMPA **13** als Tetra-*n*-Butylammoniumsalz mittels automatisierter RP-Chromatographie isoliert. Somit konnte das gewünschte (*S*)-HPMPA erfolgreich mit einer Ausbeute von 22 % über vier Stufen ausgehend vom Glycidol dargestellt werden.

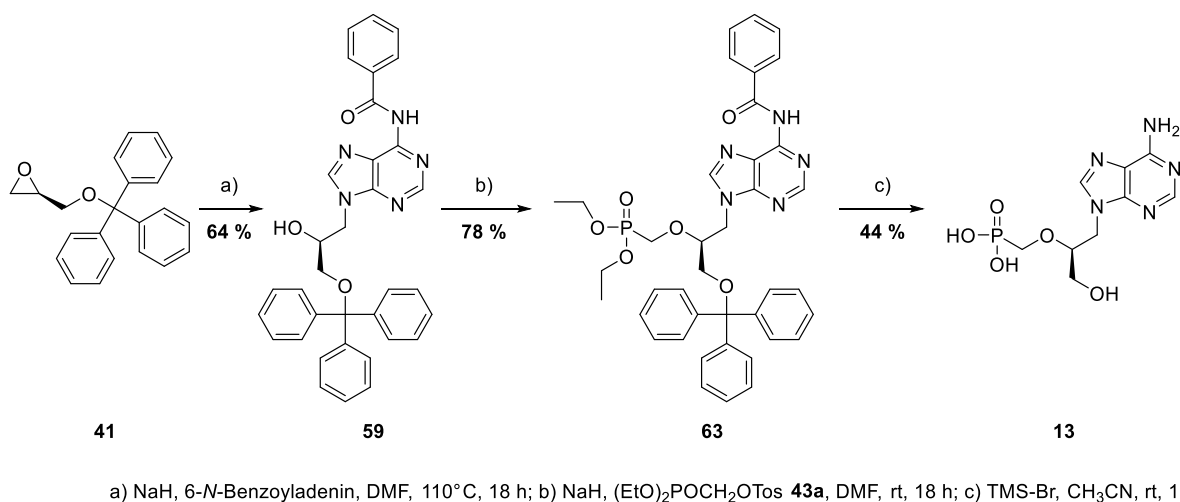


Abb. 62: Synthese von (*S*)-HPMPA **13** über vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 22% ausgehend vom (*R*)-Glycidyltritylether **41** mit dem 6-*N*-Benzoyladenin.

6.4 Synthese der (S)-HPMP-Diphosphate

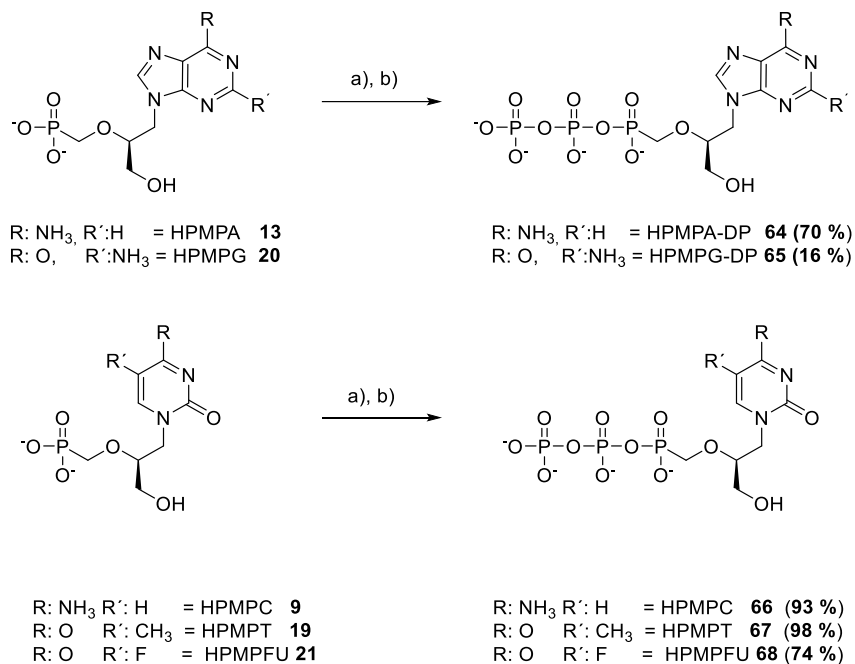
Um die Substrateigenschaften der (S)-HPMP-Diphosphate mit Hilfe eines *Primer Extension Assays* zu untersuchen, mussten die (S)-HPMP-Diphosphate aus den entsprechenden (S)-HPMP-Derivaten synthetisiert werden. Hierfür wie für das (R)-PMPA-Diphosphat **35** die Methode von MOHAMADY genutzt, wobei aufgrund der etwa doppelten bis dreifachen Ausbeute ein fünf-, zehn- bzw. dreifache Überschuss an TFAA, Triethylamin bzw. Methylimidazol genutzt wurde. Bei der Synthese der (S)-HPMP-Diphosphate wurden die Phosphonate jeweils als ihr Tetra-*n*-Butylammoniumsalz eingesetzt. Da diese Verbindungen aufgrund der Gegenionen hygroskopisch waren, erwies sich die Aktivierung mit einem hohen Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid als Vorteil. So konnte angenommen werden, dass auch letzte Reste vorhandener Feuchtigkeit abgefangen werden.

Begonnen wurde mit der Synthese der (S)-HPMP-Pyrimidin-Diphosphate. Die entsprechenden Phosphonate wurden in Acetonitril gelöst und mit TFAA sowie mit 1-Methylimidazol aktiviert. Das erhaltene Imidazolidatsalz wurde mithilfe einer Spritzenpumpe über den Zeitraum von einer Stunde zu dem bereits gelösten Tetra-*n*-Butylammonium-Pyrophosphat getropft und der Reaktionsfortschritt mittels HPLC verfolgt. Nach einer Stunde konnte bereits ein vollständiger Umsatz der (S)-HPMP-Derivate **9**, **19** und **20** beobachtet werden, was für einen schnellen nucleophilen Angriff des Pyrophosphates spricht. Die Isolierung der (S)-HPMP-Diphosphate wurde wie in Kapitel 6.1.3 beschrieben durchgeführt und die (S)-HPMPC-, (S)-HPMPT- sowie (S)-HPMPFU-Diphosphate konnten in einer Ausbeute von 74 % bis 98 % isoliert werden.

Die Synthese der (S)-HPMP-Purin-Derivate wurde unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt, wobei die entsprechenden Nucleobasen einen deutlichen Einfluss auf die Reaktion hatten. Die Synthese des (S)-HPMPA-Diphosphates gelang in einer Ausbeute von 70 %, während die des (S)-HPMPG-Diphosphates lediglich in einer Ausbeute von 16 % gelang.

Während der Synthese des (S)-HPMPG-Diphosphates fiel bei der Reaktionskontrolle mittels HPLC auf, dass deutlich mehr Signale und damit auch deutlich mehr Nebenprodukte detektiert wurden. MOHAMADY beschreibt, dass bei der Aktivierung von GMP mit einem deutlichen Überschuss an TFAA eine Zersetzung des Monophosphates stattfindet, was auf die Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung zurückzuführen war. Allerdings konnte diese Nebenreaktion bei der Synthese ausgeschlossen werden, da (S)-HPMPG **20** im Gegensatz zu GMP keine *N*-glycosidische Bindung besitzt. Weiterhin waren die Retentionszeiten der detektierten Signale bei der Reaktionskontrolle nicht mit den Retentionszeiten von Guanin oder *O*-Benzylguanin vergleichbar. Aufgrund der Retentionszeiten sowie der Absorptionsspektren der Signale wurde

vermutet, dass es zu diversen unterschiedlich hoch phosphorylierten Produkten gekommen war. Weiterhin wäre es möglich, dass sich unterschiedlichste Ester bzw. Amide der Trifluoressigsäure gebildet haben. Generell stellte sich die Frage, warum die Synthese des (S)-HPMPG-Diphosphates verglichen mit den anderen Derivaten so frustan verlief, wobei keine klare Ursache ermittelt werden konnte und eine weitere Optimierung der Synthese nicht als sinnvoll erachtet wurde.



a) TFAA, Et₃N, CH₃CN, 10 min, rt. b) 1-NMI, Et₃N, CH₃CN, 10 min, rt; PPI, CH₃CN, rt, 1 h

Abb. 63: Synthese der (S)-HPMP-Diphosphate über die Methode von MOHAMADY.

Bei der Synthese des (S)-HPMPA-Diphosphates **64** konnte, ähnlich zum (S)-HPMPG-Diphosphat **65**, die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden, jedoch entstanden diese in einer deutlich geringeren Menge. Die gebildeten Nebenprodukte konnten nahezu vollständig nach dem Tausch der Gegenionen bei der zweiten RP-Chromatographie getrennt werden. Da das Produkt (S)-HPMPA-DP **64** in einer Ausbeute von 70 % erhalten wurde, erschien die Optimierung der Synthese nicht sinnvoll.

6.5 Synthese von acyclischen Nucleosidmono- und triphosphat-Analoga

Neben den ANPs werden in der antiviralen Therapie auch acyclische Nucleosid-Analoga verwendet, die eine 3'-analoge-Hydroxyfunktion besitzen. Diese Verbindungen müssen dreimal phosphoryliert werden, um ihre eigentlich aktive Form, das Triphosphat, zu erreichen (siehe Kapitel 4.3.1). Als nucleosidische Vergleichssubstanz bzw. als Referenz für die *Primer Extension Assays*, sollten zwei acyclische Nucleosid-Analoga dargestellt werden. Zum einen die Adenin-Variante des Acyclovir Triphosphates als Vergleich zum (*R*)-PMPA-Diphosphat und zum anderen das Ganciclovir Triphosphat als direkten Vergleich zum (*S*)-HPMPG-Diphosphat.

6.5.1 Synthese von Adenin-Acyclovir **69** und dessen Triphosphat

Für die Synthese des Adenin-Acyclovirs **69** wurde nach der Vorschrift von MARASCO gearbeitet, der die Synthese von Acyclovir mit allen natürlichen Nucleobasen in vier Stufen und guten Ausbeuten beschreibt.¹⁰⁹

Dazu wurde 1,3-Dioxolan **70** mit Acetylbromid **71** versetzt und das entsprechende 2-(Bromomethoxy)-ethylacetat **72** in einer quantitativen Ausbeute dargestellt. Anschließend wurde das geschützte Adenosin-Acyclovir über einen nucleophilen Angriff des deprotonierten 6-*N*-Benzoyladenin dargestellt, säulenchromatographisch gereinigt und im Anschluss mit 1M Natriummethanolat in Methanol verseift. Das gewünschte Produkt fiel während der Reaktion aus der Reaktionslösung aus, wurde filtriert und das erhaltene Rohprodukt noch einmal aus Methanol kristallisiert. So konnte das Adenin-Acyclovir **69** mit einer Ausbeute von 87 % über drei Stufen isoliert werden.

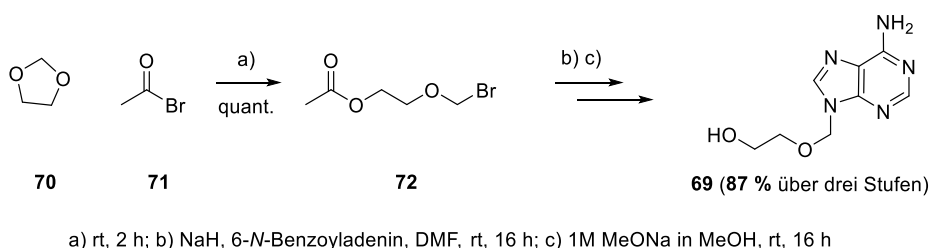


Abb. 64: Synthese von Adenin-Acyclovir **69** ausgehend von 1,3-Dioxolan **70** und Acetylbromid **71**.

Anschließend sollte das für die Synthese des Triphosphates notwendige Adenin-Acyclovir-Monophosphat **73** dargestellt werden, um analog zu den Phosphonaten das Triphosphat über die Methode MOHAMADY darzustellen.

Hierbei wurde auf die Methode von YOSHIKAWA zurückgegriffen.¹¹⁰ Das Adenin-Acyclovir **69** wurde in Trimethylphosphan suspendiert, mit Tributylamin versetzt und auf 0°C gekühlt.

Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Phosphorylchlorid versetzt und die Reaktion in Zeitabständen von 30 Minuten mittels HPLC verfolgt. Bereits nach einer Stunde konnten keine Veränderungen mehr in den Signalintensitäten beobachtet werden und die Reaktion wurde durch das Eintragen in gesättigter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in tetra-*n*-Butylammoniumacetat-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt. Hierbei konnten nur grob einige Verunreinigungen getrennt werden, da sich die Retentionszeiten des Produktes und der Nebenprodukte bei der Verwendung von tetra-*n*-Butylammonium als Gegenion zu sehr ähnelten. Die Fraktionen wurden mithilfe der HPLC analysiert, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, die Gegenionen auf Ammonium getauscht und mittels automatisierter RP-Chromatographie das gewünschte Produkt isoliert. Somit konnte das Adenin-Acyclovir-Monophosphat **73** in einer Ausbeute von 40 % dargestellt werden.

Für die Synthese des Adenin-Acyclovir-Triphosphates **74** wurde analog zu den Synthesen der ANP-Diphosphaten verfahren und das Adenin-Acyclovir-Triphosphat **74** in einer nahezu quantitative Ausbeute erhalten.

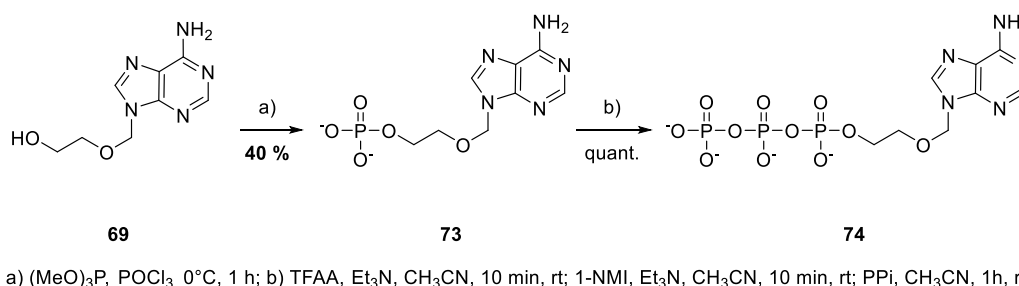


Abb. 65: Synthese von Adenin-Acyclovir-Triphosphat **74** ausgehend von Adenin-Acyclovir **69**.

6.5.2 Synthese von Ganciclovir-Ester als Diastereomere für die enantiomerenreine Synthese von Ganciclovir-Monophosphat

Anders als Acyclovir besitzt Ganciclovir zwei primäre chemisch äquivalente Hydroxygruppen, wodurch sich ein Stereozentrum bildet, sobald eine von beiden Hydroxyfunktionen phosphoryliert wird. Weiterhin konnte in Primer Extension Assays bereits gezeigt werden, dass das S-Ganciclovir-Triphosphat ein deutlich besseres Substrat für Polymerasen darstellt, als das R-Ganciclovir-Triphosphat.¹¹¹ Aufgrund dieser Überlegungen sollte versucht werden, möglichst nur das R- bzw. S-Ganciclovir-Triphosphat darzustellen.

Für die Synthese der enantiomerenreinen Monophosphate sollte auf chirale Hilfsmittel zurückgegriffen werden, zum Beispiel über eine Veresterung mit einer chiralen Carbonsäure. Das dabei erhaltene Diastereomergemisch sollte anschließend säulenchromatographisch

getrennt werden und nach der entsprechenden Entschützung die Monophosphate liefern. Da der entstandene Ester basisch verseift werden konnte, ließ sich dies sehr gut mit einer Phosphorylierung über ein Bis-Fm-Phosphoramidit verbinden, da die Fm-Schutzgruppe ebenfalls unter basischen Bedingungen gespalten wird. Hierbei könnte über die Wahl der Reaktionsbedingungen gesteuert werden, ob nur die Fm- oder alle Schutzgruppen gespalten werden.

Als chirale Carbonsäure wurde Camphansäure gewählt, da sie ein chirales Zentrum trägt, als Säurechlorid in großen Mengen erhältlich und sterisch anspruchsvoll ist. Dadurch könnte eine doppelte Veresterung der Camphansäure oder ein eventueller nucleophiler Angriff der zweiten Hydroxylgruppe verhindert werden.

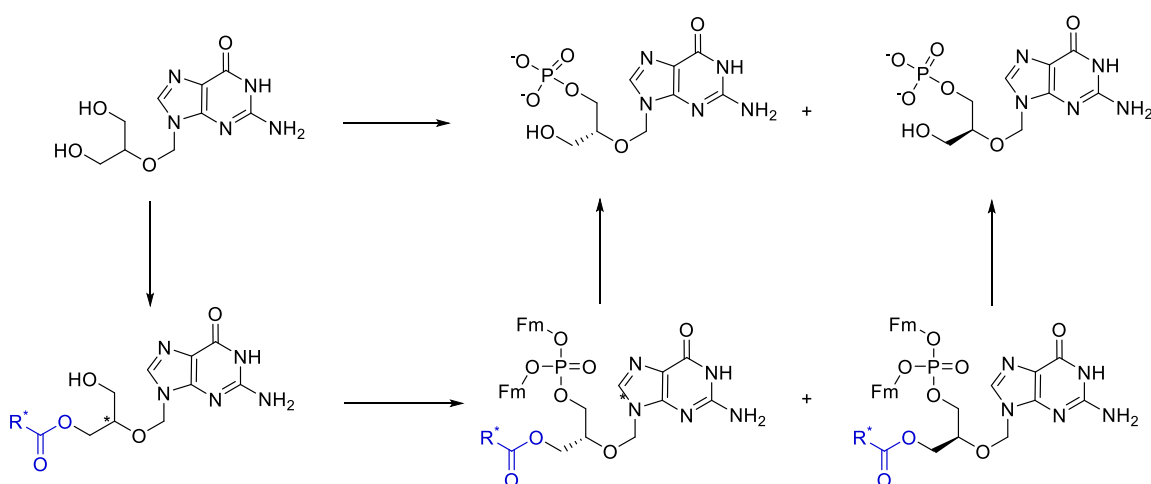
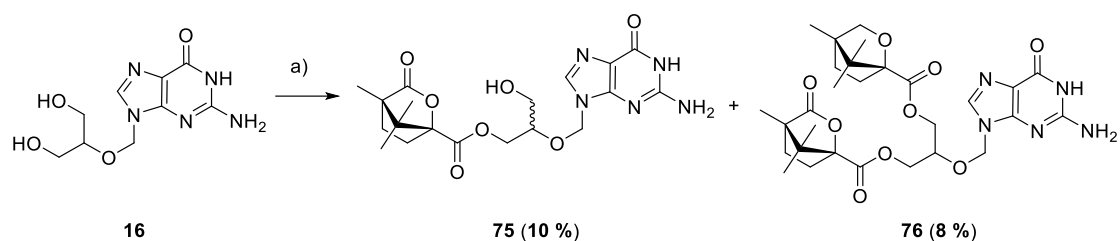


Abb. 66: Phosphorylierung von Ganciclovir direkt und über die Einführung eines chiralen Esters.

In einem ersten Versuch wurde für die Synthese des Camphanoylganciclovirs das Ganciclovir in DMF suspendiert, mit Triethylamin und anschließend tropfenweise mit in DMF gelösten Camphanoylchlorid versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, jedoch konnte bei Raumtemperatur auch nach 18 Stunden kein Umsatz beobachtet werden. Daher wurde die Reaktionstemperatur stufenweise auf bis zu 80°C erhöht und nach 18 Stunden ohne vollständigen Umsatz abgebrochen. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert, wobei ausschließlich Signale gefunden wurden die Ganciclovir zugeordnet werden mussten.

Es wurde vermutet, dass der unvollständige Umsatz des Ganciclovirs auf die die mangelnde Löslichkeit zurückzuführen war. Daher wurde in einem weiteren Versuch das Ganciclovir in siedendem DMF gelöst, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit Triethylamin sowie tropfenweise mit Camphanoylchlorid versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Aufgrund der hohen Polarität der Edukte sowie Produkte wurde das Rohprodukt mittels

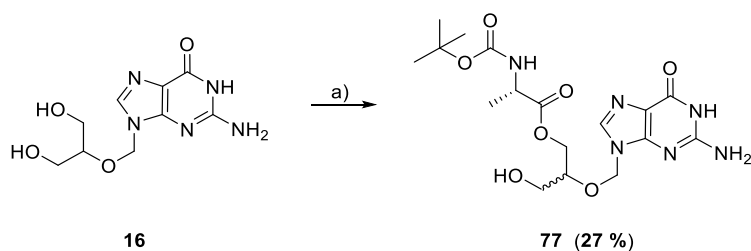
automatisierter RP-Chromatographie gereinigt, wobei sowohl das einfach- sowie zweifach veresterte Ganciclovir und eine große Menge an Ganciclovir (~70 %) isoliert wurden. Es schien trotz großer Verdünnung sowie einem Überschuss an Ganciclovir zu einer doppelten Veresterung gekommen zu sein, die möglicherweise in der schlechten Löslichkeit des Ganciclovirs bzw. die bessere Löslichkeit des Produktes ihre Ursache hatte. Zwar wurde durch das Lösen in der Siedehitze versucht, das Edukt vollständig in Lösung zu bringen, jedoch konnte dies nur optisch verfolgt werden. So ist es möglich, dass dennoch geringe Mengen an Edukt ungelöst und somit als Unterschusskomponente in der Reaktion vorlagen.



a) (-)-Camphanoylchlorid, Et₃N, DMF, rt, 16 h

Abb. 67: Synthese von (-)-Camphanoyl-Ganciclovir **75** ausgehend vom Ganciclovir **16**.

Als Alternative zur Camphansäure sollte die Veresterung mit einer BOC-geschützten Aminosäure untersucht werden. Dies hätte den Vorteil, dass die Edukte auch in sehr großen Mengen günstig verfügbar wären. Weiterhin könnte durch die BOC-Gruppe eine bessere sterische Abschirmung sowie eine bessere Löslichkeit des Produktes erreicht werden. Ausgehend von L-Alanin wurde diese Aminosäure mit einer nahezu quantitativen Ausbeute geschützt und das so erhaltene Boc-L-Alanin über eine Steglich-Veresterung mittels EDC mit Ganciclovir **16** verestert. Dies gelang in einer Ausbeute von 27 % und damit deutlich über den Ausbeuten der Veresterung mit der (-)-Camphansäure. Bei der automatisierten säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel konnten die bei der Reaktion entstandenen Diastereomere nicht effizient getrennt werden. Zusätzlich ist es möglich, dass sich die Diastereomere während der Chromatographie ineinander umwandeln, wie es z.B. bei Acetyl-Schutzgruppen an Zuckern bekannt ist.



a) Boc-L-Alanin, EDC, DMAP, DMF, rt, 16 h

Abb. 68: Synthese von Boc-L-Alanin-Ganciclovir **77** ausgehend von Ganciclovir **16**.

6.5.3 Versuch der Synthese eines chiralen DMAP-Katalysators

Der bisherige Ansatz der Synthese der Ganciclovir-Monophosphat-Enantiomere wurde über die Synthese der entsprechenden Diastereomere verfolgt, um diese chromatographisch zu trennen. Da diese Versuche bisher nicht erfolgreich waren, sollte in einem weiteren Ansatz die direkte Synthese von Ganciclovir-Monophosphats erfolgen. Jedoch sollte durch die Zugabe einer chiralen Base oder eines anderen Additivs ein Enantiomer bevorzugt dargestellt werden.

Hierbei fiel die Wahl auf ein chirales DMAP-Derivat, welches ein 1,1'-Binaphthol trägt und dadurch die gewünschte Chiralität bei der Synthese des Ganciclovir-Monophosphat nach YOSHIKAWA induzieren sollte. Weiterhin wäre es möglich durch die Zugabe des chiralen DMAP-Katalysators die vorhergegangenen Synthesen noch einmal zu wiederholen, um somit die Bildung nur eines Diastereomers zu forcieren bzw. eines der Diastereomere in einem deutlichen Überschuss zu erhalten. Diese sollten anschließend durch chromatographische Methoden einfacher zu trennen sein. Die Synthese des chiralen DMAP-Katalysators sollte nach MANDAI durchgeführt werden, bei der eine Ausbeute von 38 % über 10-Stufen mit einer durchschnittlichen Ausbeute von knapp 80 % pro Stufe erzielt wurde.¹¹²

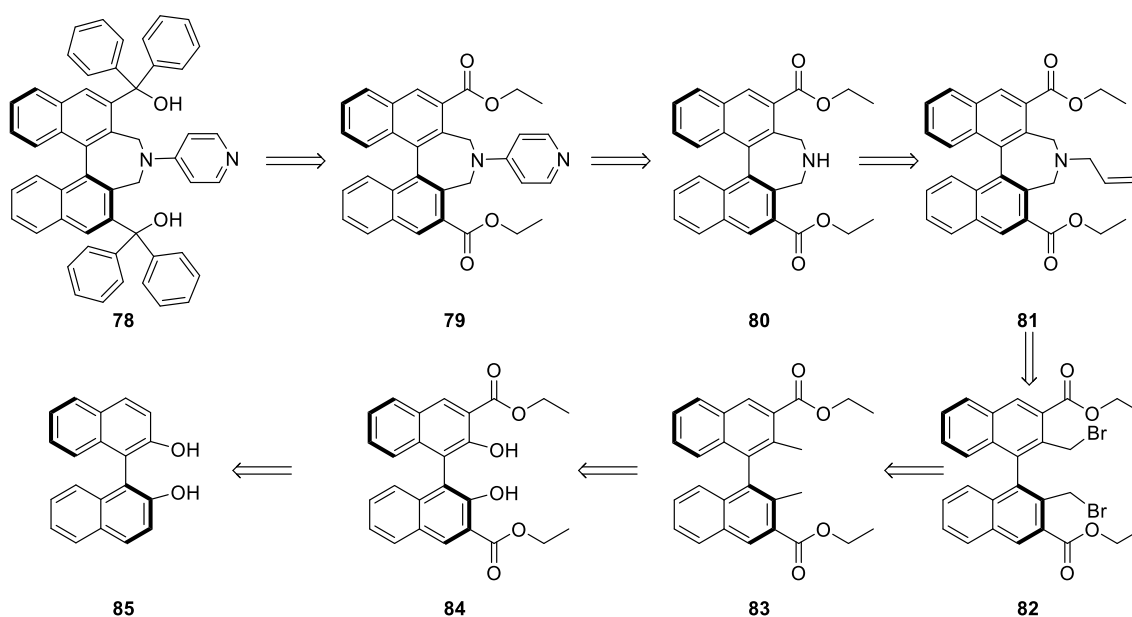


Abb. 69: Retrosynthese des chiralen-DMAP-Katalysators **78** nach MANDAI.

Im ersten Schritt sollte ausgehend von (*S*)-BINOL **85** das 3,3'-Diethylcarboxy-(*S*)-BINOL **84** dargestellt werden, wobei die 1- sowie die 1'-Hydroxyfunktionen geschützt wurden, da diese sonst mit dem genutzten Chloroformiat zu dem entsprechenden Ester reagieren würden. In der Synthese von MANDAI wurde hierfür eine Methoxymethyl-Schutzgruppe (MOM) genutzt. Der für die Darstellung notwendige (Chlormethyl)methylether wird als überaus Kanzerogen eingestuft, weshalb der 2-(Methoxyethoxy)methylether (MEM) als Alternative genutzt wurde.

Die Synthese des MEM-(S)-BINOLs gelang nach einer säulenchromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 73% (Abb. 70). Anschließend sollte das MEM-(S)-BINOL mit *n*-Butyllithium an der 3- bzw. 3'-Position lithiiert werden, um durch die Zugabe des Ethylchloroformats die gewünschte Verbindung **84** zu erhalten. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei auffiel, dass es zu der Bildung von mehreren Nebenprodukten kam, was den Erwartungen und Erfahrungen von MANDAI widersprach.¹¹² Nach Beenden der Reaktion konnte kein Produkt isoliert werden, worauf schon das ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes hingedeutet hatte.

Da davon auszugehen war, dass die MOM-Schutzgruppe bewusst gewählt wurde, sprachen die Ergebnisse des Versuches mit der MEM-Schutzgruppe für einen deutlich dirigierenden Einfluss der MOM-Gruppe. Denkbar war hier, dass die MEM-Gruppe das entsprechende Lithiumion durch Komplexierung zu sehr abschirmte und es so nicht mit dem Ethylchloroformiat zur Reaktion gekommen ist.

Daher wurde die Reaktion des (S)-BINOLs unter der Zuhilfenahme einer MOM-Schutzgruppe wiederholt und das MOM-(S)-BINOL in einer quantitativen Ausbeute isoliert. Anschließend wurde das MOM-(S)-BINOL in abs. THF gelöst und bei -78°C mit *n*-Butyllithium versetzt, um die 3- sowie 3'-Positionen zu lithiieren. Anschließend wurde Ethylchloroformiat bei -78°C über einen Zeitraum von 10 Minuten portionsweise zugegeben, die Reaktionslösung 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit 6 molarer wässriger Salzsäure versetzt und eine weitere Stunde bei 60°C gerührt. Dadurch wurde in einer so genannten *one-pot*-Reaktion die MOM-Schutzgruppe nach der Reaktion entfernt und das gewünschte 3,3'-Diethylcarboxy-(S)-BINOL **84** nach einer säulenchromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 81 % isoliert.

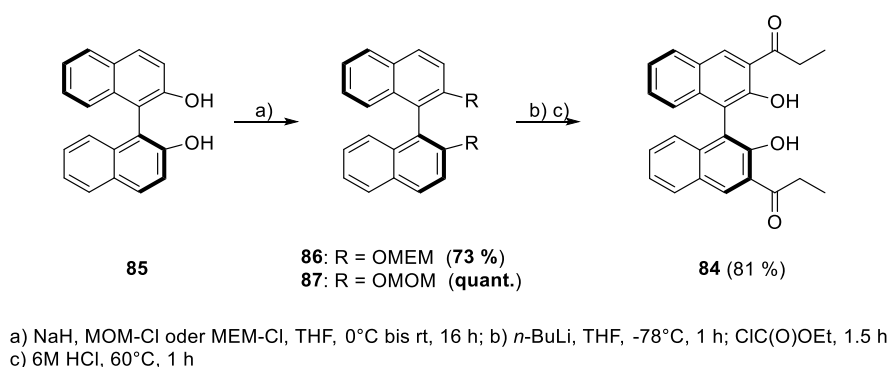
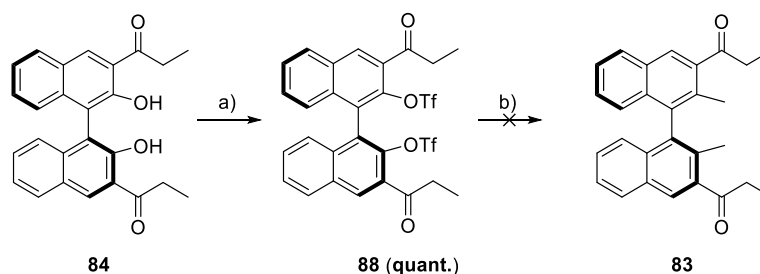


Abb. 70: Synthese von 3,3'-Diethylcarboxy-(S)-BINOL **84** ausgehend von (S)-BINOL **85**.

Für die Synthese des (S)-Diethyl-2,2'-dimethyl-BINOLs **83** war es notwendig, die Hydroxygruppen in eine gute Abgangsgruppe zu überführen, um anschließend über eine MIGITA-KOSUGI-STILLE-Kreuzkupplung das gewünschte Produkt **83** zu erhalten.

Die Verbindung **84** wurde in abs. Pyridin gelöst, auf 0°C gekühlt, mit Triflatanhydrid versetzt und die Reaktion nach 16 Stunden durch die Zugabe von Wasser beendet. So konnte das gewünschte 3,3'-Diethylcarboxyl-1,1'-triflat-(S)-BINOL **88** in einer Ausbeute von 94 % erhalten werden.

Für die anschließende Kreuzkupplung wurde die Verbindung **88** eine Stunde im Vakuum getrocknet, in abs. DMF suspendiert, mit Lithiumchlorid, tetra-*n*-Butylammoniumchlorid, Tetramethylzinn sowie Palladium-(II)-chlorid versetzt und 24 Stunden bei 120°C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch überprüft und ein vollständiger Umsatz festgestellt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung stellte eine Herausforderung dar, da es anders als beschrieben, zu vielen Nebenprodukten in der Reaktion gekommen war. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels ¹H- sowie ¹³C-NMR-Spektroskopie analysiert, jedoch konnte in keiner der Fraktionen das gewünschte Produkt identifiziert werden.



a) TfOTf, Pyridin, DMAP, 0°C bis rt, 16 h; b) LiCl, N(Bu)₄Cl, Me₄Sn, PdCl₂, DMF, 120°C, 23 h

Abb. 71: Versuch der Synthese von (S)-Diethyl-2,2'-Dimethyl-1,1'-binaphthyl-3,3'-dicarboxylat **83**.

Da nicht nachvollzogen werden konnte, warum ein vollständiger Umsatz beobachtet, jedoch das gewünschte Produkte nicht isoliert werden konnte, wurde die Synthese nicht wiederholt und auch dieser Syntheseweg verworfen.

6.5.4 Synthese von Ganciclovir-Monophosphat

Im Folgenden sollte überprüft werden, unter welchen Bedingungen eine Phosphorylierung von Ganciclovir möglich ist, welches laut der Literatur eine große Herausforderung darstellen soll.

Wie bereits erwähnt, gibt es mehrere Methoden für die Synthese von Nucleosid-Monophosphaten, die auch auf Nucleosidanaloga angewendet werden können. Dies kann über die Kupplung mit einem (z.B. Fm-)geschützten Phosphoramidit oder direkt über die Phosphorylierung mit Phosphorylchlorid nach YOSHIKAWA erreicht werden.

Im Fall des Ganciclovirs stellen die zwei chemisch äquivalenten primären Hydroxyfunktionen eine Herausforderung dar. Um eine hohe Selektivität mit der Phosphoramidit-Methode zu

erhalten, ist die Verwendung von Schutzgruppen am Ganciclovir **16** notwendig. Hierbei muss eine der beiden Hydroxyfunktionen geschützt werden, was ebenfalls einen positiven Effekt auf die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln hat. In diesem Fall musste eine Schutzgruppe gewählt werden, die sterisch anspruchsvoll genug war, damit sie nur einmal vorliegt und gleichzeitig nicht zwischen den Hydroxyfunktionen wandert. Wie im Kapitel 6.5.2 festgestellt wurde, waren Ester hierfür nicht geeignet, auch wenn diese sterisch anspruchsvoll waren.

Als Alternative bot sich hier die zuvor genutzte Trityl-Schutzgruppe an. Diese ist sterisch anspruchsvoll und erhöht die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Ein weiterer Vorteil dieser Schutzgruppe ist, dass sie nicht nur zur Schützung von Hydroxy-, sondern auch von Aminogruppen verwendet werden kann. Dadurch könnte im Fall von Ganciclovir **16** die Löslichkeit gesteigert und das mögliche Auftreten von Nebenreaktionen verhindert werden.

Die Synthese des Trityl-geschützten Ganciclovirs **89** erfolgte über das Suspensieren von Ganciclovir **16** in DMF, welches anschließend mit Triethylamin, DMAP sowie Tritylchlorid versetzt wurde. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei 40°C gerührt, um Ganciclovir bestmöglich in Lösung zu bringen und dennoch eine weitere Reaktion mit der zweiten Hydroxylgruppe zu vermeiden (Abb. 72). Das Rohprodukt wurde aus Ethanol kristallisiert, jedoch führte dies nur zu einem mäßigen Erfolg, da immer noch Verunreinigungen vorhanden waren. Der erhaltenen kristallinen Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt, was jedoch auch keinen Erfolg brachte. Also wurden die erhaltenen produkthaltigen Fraktionen vereinigt und erneut aus Ethanol kristallisiert, was letztendlich das gewünschte Produkt **89** in einer Ausbeute von 65 % lieferte.

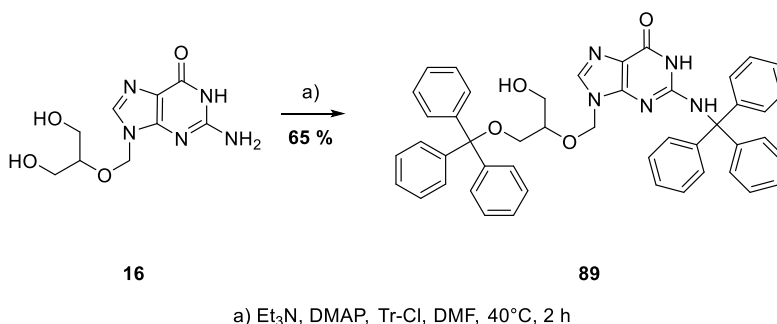


Abb. 72: Syntheschema der Tritylschützung der Amino- sowie einer Hydroxygruppe von Ganciclovir **16**.

Im nächsten Schritt sollte die Verbindung **89** mit einem Fm-Amidit phosphoryliert und anschließend entschützt werden, um Ganciclovir-Monophosphat zu erhalten. Dafür wurde die Verbindung **89** in abs. Acetonitril gelöst und mit dem Fm-Amidit versetzt. Anschließend wurden tropfenweise alle 5 Minuten 0.20 Äquivalente DCI-Aktivator zugetropft bis 1.2 Äquivalente erreicht wurden. Die Reaktionslösung wurde noch eine weitere Stunde bei Raumtemperatur

gerührt und anschließend mit *tert*-Butylhydroperoxid zur entsprechenden Phosphor-(V)-Verbindung oxidiert. Nach einer ersten groben säulenchromatographischen Reinigung, um das überschüssige Amidat zu entfernen, wurde der Rückstand in einem Gemisch aus Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1) aufgenommen und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Bei der anschließenden automatisierten RP-Chromatographie konnte fast nur die Verbindung **89** reisoliert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Reaktion gekommen war (Abb. 73).

Ein möglicher Grund hierfür könnte die Tritylgruppe sein. Durch ihren sterischen Anspruch wäre es möglich, dass sie die zweite Hydroxyfunktion so sehr abschirmte, dass unter diesen Bedingungen kein nucleophiler Angriff der Hydroxygruppe auf das Phosphoramidit möglich war. Hier könnte das Erhöhen der Reaktionstemperatur bzw. das Verlängern der Reaktionszeit möglicherweise zu einer erfolgreichen Reaktion führen.

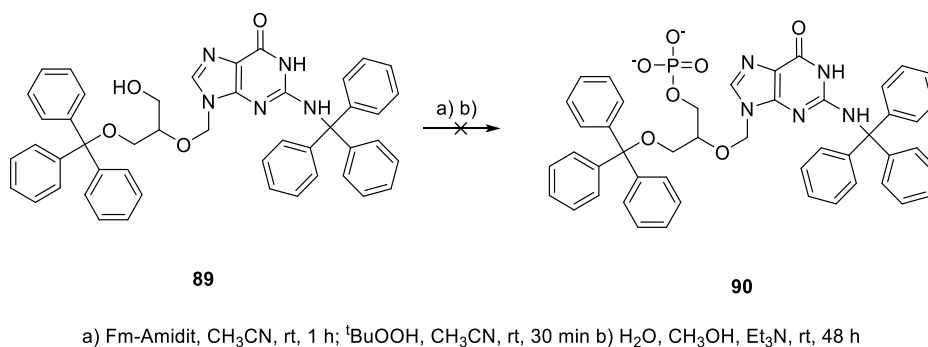
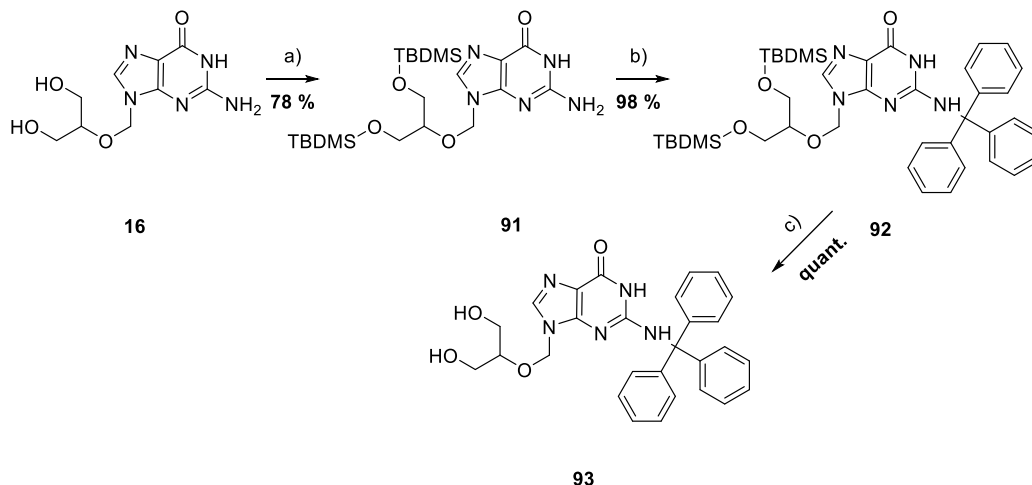


Abb. 73: Versuch der Synthese des Bis-Trityl-Ganciclovir-Monophosphates **90**.

In einem zweiten Versuch sollte die Phosphorylierung über das Fm-Amidit am ungeschützten Ganciclovir **16** versucht werden, um zu überprüfen, ob es überhaupt zu einer doppelten Phosphorylierung kommen würde. Die Reaktion wurde analog zu dem Trityl-Ganciclovir **41** durchgeführt, jedoch konnte kein Produkt isoliert, jedoch Ganciclovir nahezu vollständig reisoliert werden. Das Problem an dieser Methode war die geringe Löslichkeit von Ganciclovir **16** in Acetonitril, THF oder Dichlormethan. Auch der Versuch, Ganciclovir in der Siedehitze zu lösen, brachte keinen Erfolg, besonders, da ein Großteil des Ganciclovirs beim Abkühlen der Lösung wieder aus den verschiedenen Lösungsmitteln kristallisierte. Das Einführen einer Schutzgruppe schien dementsprechend als essentiell, um die Löslichkeit von Ganciclovir **16** in den verwendeten organischen Lösungsmitteln zu erhöhen. Da allerdings eine sterisch anspruchsvolle Schutzgruppe an einer der beiden Hydroxyfunktionen eine Phosphorylierung über das Fm-Amidit nicht möglich machte, sollte im nächsten Schritt das Einbringen einer Schutzgruppe am exocyclischen Amin der Nucleobase erfolgen.

Hierfür wurden die beiden Hydroxygruppen mit einer TBDMS-Schutzgruppe versehen, sodass diese im Anschluss nicht mit dem Tritylchlorid reagieren konnten. Dies gelang nach dem

Kristallisieren aus Methanol in einer Ausbeute von 78 %. Anschließend wurde Bis-TBDMS-Ganciclovir **91** in Dichlormethan gelöst und mit Tritylchlorid sowie Triethylamin versetzt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnte TBDMS-Trityl-Ganciclovir **92** in einer Ausbeute von 98 % erhalten werden. Um die TBDMS-Ether zu spalten, wurde die Verbindung **92** in Dichlormethan gelöst und mit Triethyltrihydrofluorid versetzt, für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt. So konnte *N*-Trityl-Ganciclovir **93** in einer nahezu quantitativen Ausbeute erhalten werden (Abb. 74).



a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, rt, 18 h b) Tr-Cl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, rt, 16 h c) Et₃N⁺·3HF, CH₂Cl₂, rt, 16 h

Abb. 74: Synthese des *N*-Trityl-Ganciclovirs **93** mit einer Ausbeute von 76 % über 3 Stufen.

Das so erhaltenen *N*-Trityl-Ganciclovir **93** sollte nun mit dem Fm-Amidit über die klassischen Bedingungen gekuppelt werden. Hierfür wurde die Verbindung **93** in Dichlormethan gelöst und mit dem Fm-Amidit sowie portionsweise mit dem DCI-Aktivator versetzt. Nach der Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid und der Entschützung in einem Wasser/Methanol/Triethylamin-Gemisch konnte jedoch auch bei dieser Reaktion nach der automatisierten RP-Chromatographie kein Produkt erhalten werden.

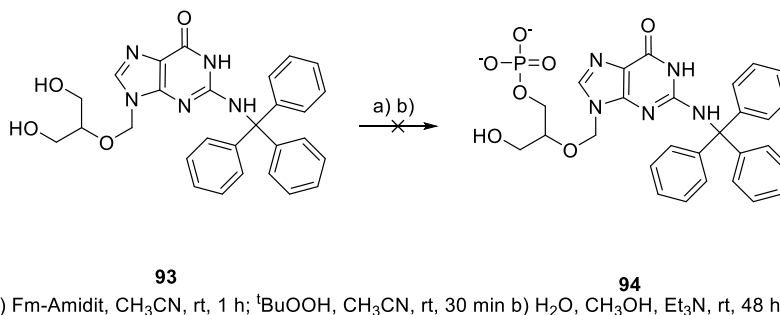


Abb. 75. Versuch der Synthese von *N*-Trityl-Ganciclovir-Monophosphat **94**.

Da alle Syntheseveruche über die Amidit-Route nicht erfolgreich waren, sollte die Phosphorylierung nach YOSHIKAWA probiert werden. Bei dieser Methode wird

Phosphorylchlorid als Edukt eingesetzt. Außerdem nutzt sie bei der Phosphorylierung von Nucleosiden die unterschiedlichen pKs-Werte der verschiedenen Hydroxygruppen aus. So wird für eine möglichst selektive Phosphorylierung an der 5'-Position keine Base verwendet. Dadurch ist die Reaktionslösung sehr sauer und es reagiert fast ausschließlich die 5'-Hydroxygruppe mit dem Phosphorylchlorid, da alle weiteren Hydroxygruppen protoniert vorliegen.¹¹⁰ Dieser Vorteil konnte bei der Reaktion mit Ganciclovir nicht genutzt werden, da beide Hydroxyfunktionen chemisch äquivalent waren. Daher sollte über die Zahl der Äquivalente und eine strenge Reaktionskontrolle die mögliche doppelte Phosphorylierung vermieden werden.

Für die Reaktion wurde Ganciclovir in Trimethylphosphan suspendiert und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Phosphorylchlorid versetzt und der Reaktionsfortschritt in Abständen von 30 Minuten via HPLC verfolgt. Nach zwei Stunden waren im Chromatogramm deutlich mehr Signale zu sehen als bei der vorangegangenen Reaktionskontrolle. Da die Gefahr einer doppelten Phosphorylierung bestand, wurde die Reaktion durch die Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat beendet. Nach einer automatisierten RP-Chromatographie, dem Ionenaustausch auf Ammonium sowie einer erneuten RP-Chromatographie, wurden zwei Fraktionen erhalten. Diese wurden mittels ¹H-, ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei der einen Fraktion um das reisolierte Ganciclovir handelte, welches mit 57 % isoliert werden konnte. Bei der zweiten Fraktion war ein Signal im ³¹P-NMR-Spektrum zu sehen, jedoch entsprach die chemische Verschiebung nicht der eines Monophosphates. Die Signale im ¹H-NMR-Spektrum deuteten auf ein symmetrisches Molekül hin und nicht wie erwartet auf Enantiomere. Daher wurde vermutet, dass es sich hierbei um das doppelt phosphorylierte Ganciclovir handelte, welches allerdings nicht in dem Massenspektrum gefunden werden konnte. Vielmehr wurde die Masse des cyclischen Ganciclovir-Monophosphats **95** gefunden. Dies würde auch die chemische Verschiebung im ³¹P-NMR-Spektrum erklären, da es sich hierbei um einen doppelten Phosphorester handelte. Gleichzeitig war das Molekül symmetrisch, was wiederum die Signalaufspaltung im ¹H-NMR-Spektrum erklärte.

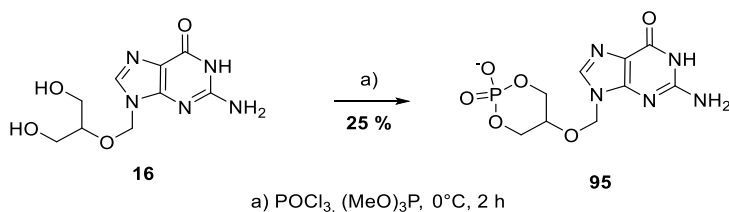


Abb. 76: Synthese von cGCV-MP **95** mit der Methode von YOSHIKAWA.

Es wurde demnach über die Methode von YOSHIKAWA das cGCV-MP **95** in einer Ausbeute von 25 % dargestellt, wobei sich unter Berücksichtigung des reisolierten Ganciclovirs eine Ausbeute von 56 % ergab.

Eine Möglichkeit die Ausbeute zu steigern und die Formation des cyclischen Ganciclovir-Monophosphates **95** zu verhindern, wäre das *N*-*O*-Ditryl-Ganciclovir **89** zu nutzen. Durch die Tritylgruppen könnte die Löslichkeit erhöht werden und gleichzeitig wäre ein Ringschluss nicht mehr möglich. Zusätzlich wäre die Verwendung einer Base wie bspw. Tributylamin wichtig, da ansonsten die sauren Reaktionsbedingungen ein Spalten der Tritylgruppen zur Folge haben könnten. Allerdings hat der hohe sterische Anspruch der Tritylgruppen den Nachteil, dass dies zu einer Verlängerung der Reaktionszeit führen oder die Reaktion sogar verhindern könnte.

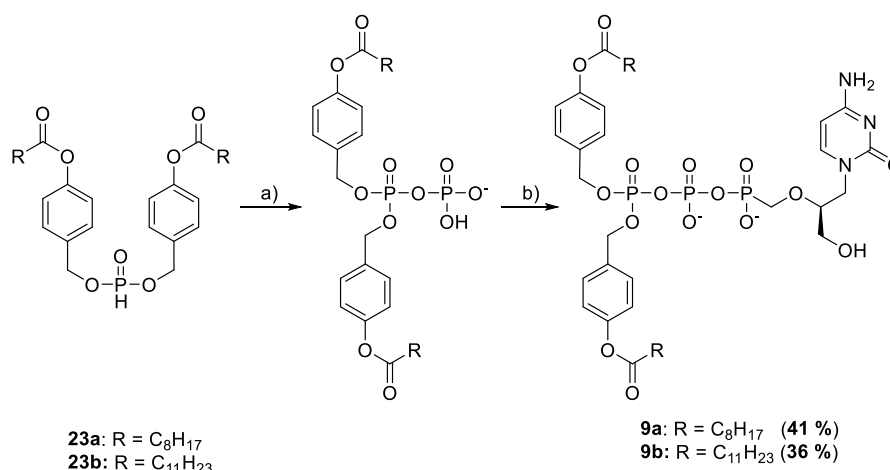
6.6 Synthese der (S)-HPMP-TriPPPro-Verbindungen und deren modifizierten Diphosphate

Nachdem die (S)-HPMP-Derivate erfolgreich synthetisiert wurden, sollten nun die entsprechenden TriPPPro-Verbindungen und modifizierte Triphosphate dargestellt werden, um sie auf ihre antivirale Aktivität, chemischen Stabilität, der Aktivierung im Zellextrakt bzw. deren Substrateigenschaften gegenüber der HIV-RT zu untersuchen. Hier wurden die γ -C11- bzw. γ -C18-modifizierten Diphosphate und deren Prodrugs mit einer C4AB- sowie einer C8AB-Maske ausgewählt. Zum anderen sollten zwei TriPPPro-Verbindungen mit jeweils zwei C8AB- und C11AB-Masken untersucht werden. Dargestellt werden sollten diese Verbindungen über die etablierte TriPPPro-Synthese die bereits ausführlich in Kapitel 6.1.2 beschrieben wurde.

6.6.1 Synthese der (S)-HPMPC-Prodrugs

Bei der Synthese der Prodrugs wurde mit den TriPPPro Verbindungen begonnen, die zwei biologisch spaltbare AB-Masken trugen. Dafür wurden die *H*-Phosphonate in die entsprechenden Pyrophosphate überführt, aktiviert und anschließend mit (S)-HPMPC als tetra-*n*-Butylammoniumsalz versetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels HPLC kontrolliert und es konnte nach zwei Stunden ein vollständiger Umsatz beobachtet werden (Abb. 77). Bei der Isolierung der Produkte war ein häufiger Ionenaustausch auf Ammonium notwendig, da auch nach mehrmaligem Tausch der Gegenionen noch zwei Fraktionen erhalten wurden, die jedoch eine gleiche Retentionszeit bei der HPLC-Kontrolle zeigten. Es war davon auszugehen, dass es sich um das gewünschte Produkt mit unterschiedlichen Gegenionen handelte. Dies führte bei der automatisierten RP-Chromatographie zu unterschiedlichen Retentionszeiten, da die Lipophilie bei diesen Verbindungen zu einem nicht unerheblichen Teil durch die Gegenionen bestimmt wurde. Dies ist bei dem verwendeten HPLC-System nicht der Fall. Durch die Verwendung eines tetra-*n*-Butylammoniumacetat-Puffers als wässrige Phase wurde eine Ionenpaar-Chromatographie angestrebt. Hierdurch wiesen die analysierten Verbindungen, sollten sie eine negative Ladung haben, immer die maximale Anzahl an tetra-*n*-Butylammonium-Gegenionen auf, da die anderen Gegenionen verdrängt wurden.

Der unvollständige und dadurch mehrfach nötige Austausch der Gegenionen könnte im Zusammenhang mit dem aus der Reaktionslösung verschleppten 1-Methylimidazol stehen. Es fiel auf, dass häufig ein unvollständiger Ionenaustausch durchgeführt wurde, wenn noch eine größere Menge an 1-Methylimidazol in den entsprechenden Fraktionen vorlag. Die Verschleppung konnte nicht immer verhindert werden, da gerade bei der ersten Chromatographie das gewünschte Produkt mit oder kurz vor dem 1-Methylimidazol eluierte, wodurch die Mischfraktionen erklärt werden konnten.



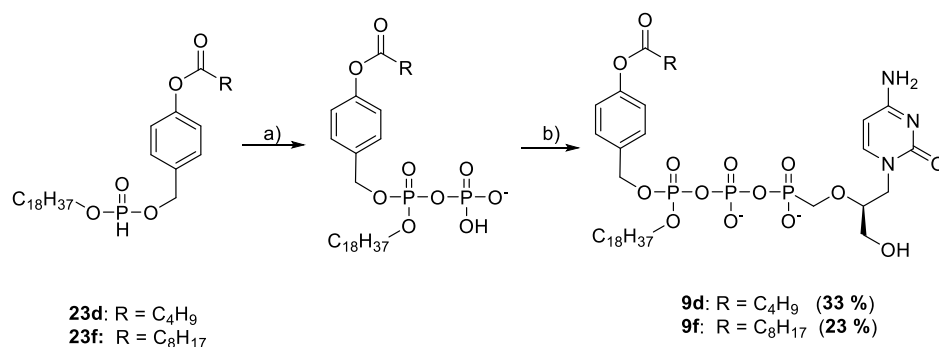
a) NCS, CH₃CN, 40°C, 1 h; N(Bu)₄H₂PO₄, CH₃CN, 40°C, 1 h;
 b) TFAA, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; NMI, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; HPMPC, CH₃CN, rt, 2 h

Abb. 77: Synthese der (S)-HPMPC-TriPPPPro Verbindungen **9a** und **9b** über die *H*-Phosphonatroute.

Trotz der mehrfachen Reinigungsschritten konnten die gewünschten Bis-C8AB- sowie Bis-C11AB-(S)-HPMPC-TriPPPPro-Verbindungen in Ausbeuten von 36 % bzw. 41 % dargestellt werden.

Als nächstes sollten die asymmetrischen TriPPPPro-Verbindungen dargestellt werden. Diese trugen eine spaltbare AB-Maske sowie eine nicht spaltbare Alkylkette und sollten die γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPC-Diphosphate intrazellulär freisetzen. Hierbei konnte nach zwei Stunden ein vollständiger Umsatz des (S)-HPMPCs **9** beobachtet werden. Bei dem ersten Reaktionsschritt, ausgehend von dem C8AB-C18-*H*-Phosphonat **23f**, wurde neben CH₃CN auch THF als Lösungsmittel genutzt, da sich das gebildete Produkt nicht vollständig gelöst hatte (Abb. 78).

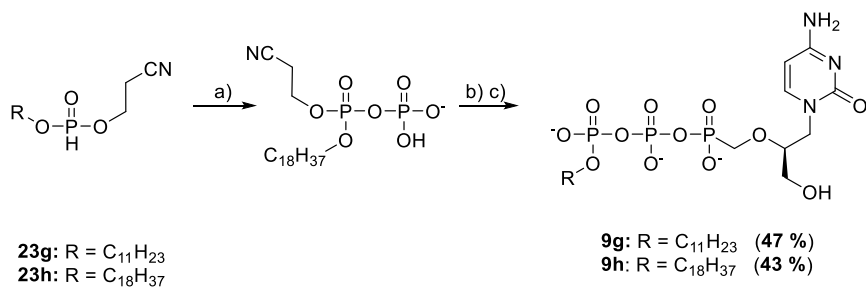
Die gewünschten Verbindungen **9d** und **9f** konnten nach mehrfacher Chromatographie in einer Ausbeute von 33 % sowie 23 % dargestellt werden.



a) NCS, CH₃CN, 40°C, 1 h; N(Bu)₄H₂PO₄, CH₃CN, 40°C, 1 h;
 b) TFAA, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; NMI, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; HPMPC, CH₃CN, rt, 2 h

Abb. 78: Synthese der asymmetrischen AB-Alkyl-(S)-HPMPC-TriPPPPro-Verbindungen **9d** und **9f** über die *H*-Phosphonatroute.

Als Vergleich für die *Primer Extension Assays*, sowie ebenfalls als mögliche antivirale Verbindungen, sollten die γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPC-Diphosphate dargestellt werden. Ausgehend von den Cyanoethyl-Alkyl-*H*-Phosphonaten **23h** sowie **23g** wurden die entsprechenden Cyanoethyl-geschützten γ -Alkyl-(S)-HPMPC-Diphosphate über die bekannte Syntheseroute dargestellt (Abb. 79). Nach einer ersten, groben chromatographischen Reinigung wurden die produkthaltigen Fraktionen in einer tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung aufgenommen und mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels HPLC kontrolliert. Es folgte ein direkter Ionenaustausch sowie eine mehrfache chromatographische Reinigung. Dabei wurden jeweils 6 % bis 9 % des eingesetzten (S)-HPMPCs **9** wieder reisoliert.



a) NCS, CH₃CN, 40°C, 1 h; N(Bu)₄H₂PO₄, CH₃CN, 40°C, 1 h;
 b) TFAA, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; NMI, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; HPMPC, CH₃CN, rt, 2 h
 c) N(Bu)₄OH, CH₃CN, rt, 24 h

Abb. 79: Synthese der γ -Alkyl-(S)-HPMPC-Diphosphate **9g** und **9h** mit anschließender Spaltung der Schutzgruppe.

Dies ist womöglich auf die Entschützung der Cyanoethyl-Schutzgruppe zurückzuführen. Die Spaltung wird basisch in einem wässrigen Medium durchgeführt, wodurch es zu einem nucleophilen Angriff des Hydroxids kommen kann, was dann zur Bildung des (S)-HPMPCs führt. Dies wurde jedoch bei der Reaktionskontrolle nur in geringen Mengen beobachtet, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass auch bei den folgenden Reinigungsschritten

die Rückbildung des (S)-HPMPCs erfolgt. Die γ -Alkyl-(S)-HPMPC-Diphosphate **9g** und **9h** konnten in einer Ausbeute von 47 % bzw. 43 % dargestellt werden. Damit konnten alle gewünschten (S)-HPMPC-Diphosphate bzw. deren Prodrugs erfolgreich in Ausbeuten von 23 % bis 47 % dargestellt werden.

6.6.2 Synthese der (S)-HPMP-Pyrimidin-Prodrugs ((S)-HPMPT und (S)-HPMPFU)

Als nächstes sollten die verschiedenen (S)-HPMPT-Prodrugs **19a**, **19b**, **19d**, **19f** und die γ -Alkyl-(S)-HPMPT-Diphosphate **19g** sowie **19h** dargestellt werden.

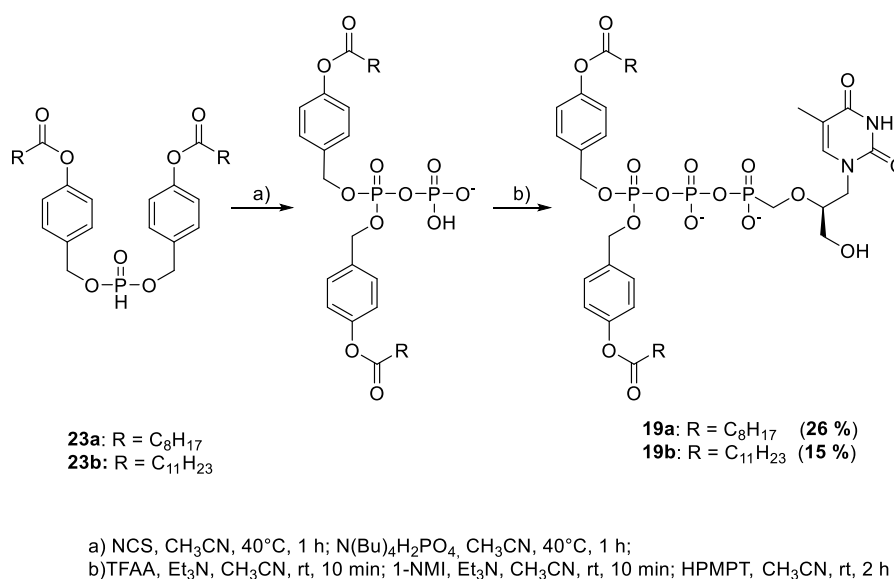


Abb. 80: Synthese der (S)-HPMPT-Prodrugs **19a** und **19b** über die *H*-Phosphonatroute.

Beginnen wurde wieder mit der Synthese der symmetrischen (S)-HPMPT-TriPPPro-Verbindungen **19a** sowie **19b** (Abb. 80). Die Synthesen verliefen vergleichbar mit den aus Kapitel 6.6.1. Für die langkettige Verbindung **19b** musste ebenfalls auf ein Lösungsmittelgemisch aus CH₃CN und THF zurückgegriffen werden, um eine annehmbare Löslichkeit des *H*-Phosphonats **23b** zu gewährleisten. Ansonsten konnte auch hier bei der Reaktionskontrolle mittels HPLC nach zwei Stunden ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Die gewünschten TriPPPro-Verbindungen konnten in einer Ausbeute von 26 % für **19a** sowie 15 % für die Verbindung **19b** dargestellt werden.

Anschließend wurden analog die γ -Alkyl-(S)-HPMPT-TriPPPro-Verbindungen **19d** und **19f** sowie die (S)-HPMPT-Diphosphate **19g** und **19h** dargestellt. Auch hier wurde ein Lösungsmittelgemisch aus CH₃CN und THF für die Reaktionen ausgehend von dem C8AB-C18-*H*-Phosphonat **23f** genutzt, um die Löslichkeit zu steigern.

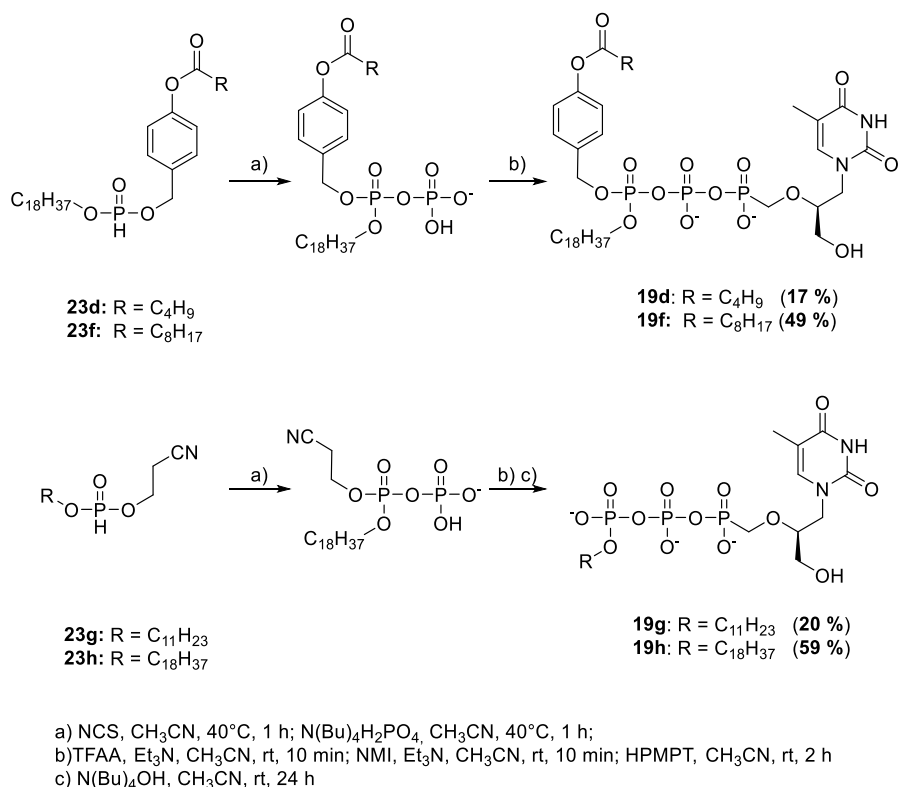


Abb. 81: Synthese der γ -Alkyl-(*S*)-HPMPT-Prodrugs **19d** und **19f** sowie der -Diphosphate **19g** und **19h** ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten.

Hier ergaben sich sehr unterschiedliche Ausbeuten von 17 % bis zu 59 %. Dies ist möglicherweise auf die Anzahl der Chromatographien mit dem einhergehenden Tausch der Gegenionen zurückzuführen. Für die Verbindungen mit den höchsten Ausbeuten (**19f** und **19h**) waren nur zwei Chromatographien notwendig, um das gewünschte Produkt zu isolieren. Im Gegensatz dazu stehen die Verbindungen **19b** sowie **19d**. Hier waren mehrere Reinigungsschritte notwendig, um die Produkte zu isolieren. Zusammenfassend konnte trotz dessen alle gewünschten Verbindungen erfolgreich dargestellt werden.

Als letztes Derivat der (*S*)-HPMP-Pyrimidine sollten die (*S*)-HPMPFU-Derivate **21a**, **21b**, **21d**, **21f**, **21g** und **21h** dargestellt werden. Diese wurden analog zu den vorherigen TriPPPro-Synthesen durchgeführt.

Für die symmetrischen (*S*)-HPMPFU-TriPPPro-Verbindungen konnten Ausbeuten von 10 % für das Bis-C8AB-(*S*)-HPMPFU **21a** sowie 42 % für das Bis-C11AB-(*S*)-HPMPFU **21b** erhalten werden (Abb. 82). Die geringe Ausbeute für die Verbindung **21b** lag an der komplizierten Reinigung. So wurden diverse Reinigungsschritte unternommen, jedoch konnte auch nach der sechsten Chromatographie kein reines Produkt isoliert werden. Daher wurde von weiteren Reinigungsschritten abgesehen und nur die sauberen Produktfraktionen isoliert und gefriergetrocknet.

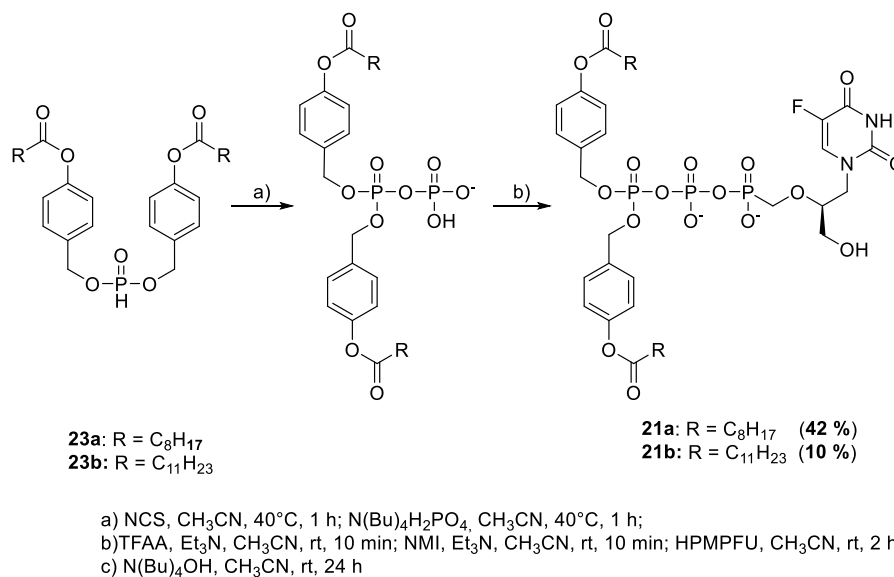


Abb. 82: Synthese der symmetrischen (S)-HPMPFU-Prodrugs **21a** und **21b** über die *H*-Phosphonatroute.

Ein ähnliches Problem mit der Isolation des Produktes ergab sich bei der Synthese des C8AB-C18-(S)-HPMPFUs **21f**. Hier wurde ebenfalls nach diversen Chromatographien aufgehört und nur die per HPLC als sauber identifizierten Fraktionen gefriergetrocknet, was zu der geringeren Ausbeute von 6 % führte (Abb. 83).

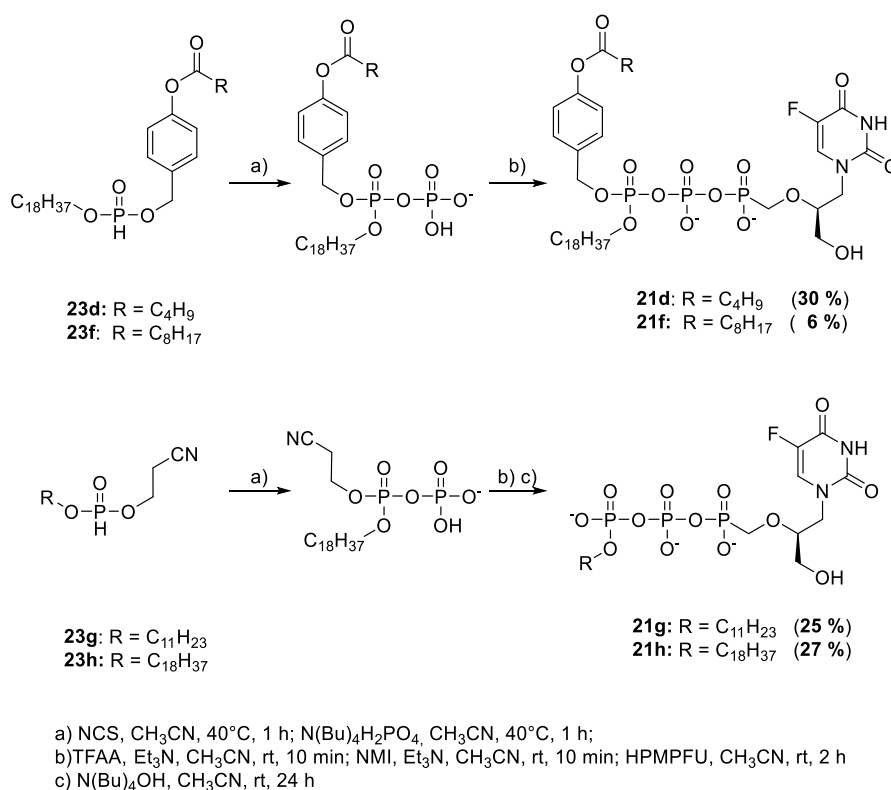
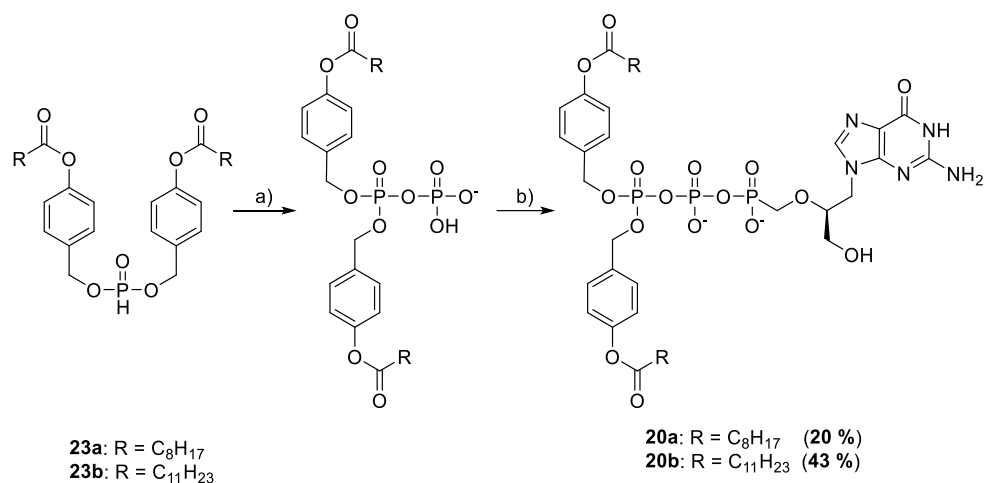


Abb. 83: Synthese der γ -Alkyl-(S)-HPMPFU-Prodrugs **21d** und **21f** sowie der -Diphosphate **21g** und **21h** ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten

Die drei verbliebenen Verbindungen **21d**, **21g** sowie **21h** konnten in Ausbeuten von 25 % bis 30 % erhalten werden. Auch hier korrelierten die Ausbeuten der Zielverbindungen mit der Anzahl der Reinigungsschritte. Je mehr Reinigungsschritte notwendig waren, desto geringer die Ausbeute des Endproduktes. So konnte beispielsweise bei Verbindung **21f** bei jeder Chromatographie wieder (S)-HPMPFU erhalten werden, was auf einen Zersetzungsprozess hindeutete. Zusammenfassend konnten jedoch alle gewünschten Verbindungen erfolgreich dargestellt werden.

6.6.3 Synthese der (S)-HPMP-Purin-Prodrugs ((S)-HPMPA und (S)-HPMPG)

Zuletzt sollten die (S)-HPMP-Purin-Prodrugs bzw. deren γ -Alkyl-Diphosphate dargestellt werden, wobei mit der Synthese der (S)-HPMPG-Derivate begonnen wurde.



a) NCS, CH₃CN, 40°C, 1 h; N(Bu)₄H₂PO₄, CH₃CN, 40°C, 1 h;
 b) TFAA, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; NMI, Et₃N, CH₃CN, rt, 10 min; HPMPG, CH₃CN, rt, 2 h

Abb. 84: Synthese der symmetrischen (S)-HPMPG-TriPPP-Verbindungen **20a** und **20b** über die H-Phosphonatroute.

Wie bereits in Kapitel 6.4 und 6.6.2 wurde auch hier der Rückstand der ersten Aktivierung des Pyrophosphates mit TFAA in einem Gemisch aus CH₃CN und THF im Verhältnis 2:1 aufgenommen, um die Löslichkeit des (S)-HPMPGs **20** zu erhöhen. So konnten die gewünschten Verbindungen in Ausbeuten von 20 % für das Bis-C8AB- **20a** und 43 % für das Bis-C11AB-(S)-HPMPG **20b** dargestellt werden (Abb. 84).

Für die Synthese der γ -Alkyl-(S)-HPMPG-Diphosphate **20g** und **20h** bzw. deren Prodrugs **20d** und **20f** wurde analog verfahren (Abb. 85). Für die Synthese der γ -Alkyl-(S)-HPMPG-Diphosphate, **20g** und **20h**, wurde die Cyanoethyl-Schutzgruppe mit DBU als Base gespalten. Dies hatte den Vorteil, dass die Reaktion deutlich schneller war als mit tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid. Hier konnte bei der Reaktionskontrolle mittels HPLC bereits nach einer Stunde ein vollständiger Umsatz beobachtet werden.

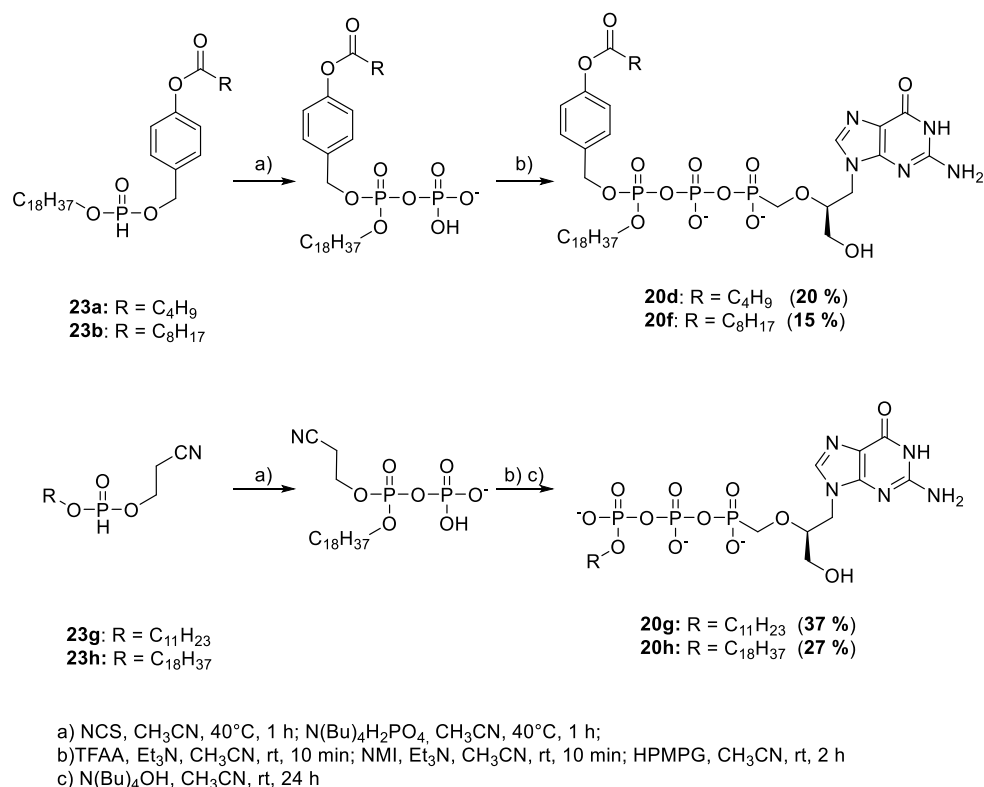


Abb. 85: Synthese der γ -Alkyl-(S)-HPMPG-Prodrugs **20d** und **20f** sowie der -Diphosphate **20g** und **20h** ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten.

Auch für die Synthese der (S)-HPMPA-Derivate wurde analog verfahren, insbesondere bezogen auf das Lösungsmittelgemisch für die weitere Reaktion, da sich auch das (S)-HPMPA **13** trotz tetra-*n*-Butylammonium-Gegenionen nicht oder nur sehr schlecht in Acetonitril gelöst hatte. Damit konnten die symmetrischen (S)-HPMPA-TriPPPro-Verbindungen in Ausbeuten von 9 % für das Bis-C11AB-(S)-HPMPA **13b** und 25 % für das Bis-C8AB-(S)-HPMPA **13a** erhalten werden (Abb. 86). Ein Grund für die geringe Ausbeute von **13b** könnte sein, dass bei der Synthese lediglich 75.0 μ mol (S)-HPMPA **13** eingesetzt wurden, was etwa die Hälfte der Stoffmenge vergleichbarer Synthesen war. Bei diesem kleinen Reaktionsansatz konnte dementsprechend auch nur eine geringere Ausbeute von 9 % für das Produkt **13b** erhalten werden, da der Verlust nach den mehrfachen Reinigungsschritten relativ hoch war.

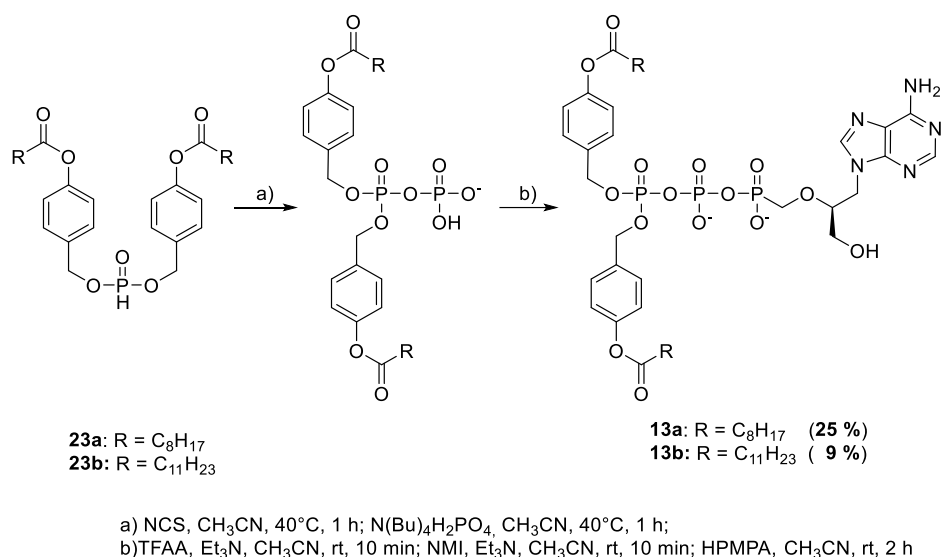


Abb. 86: Synthese der symmetrischen (*S*)-HPMPA-Prodrugs **13a** und **13b** über die *H*-Phosphonatroute.

Es folgten die Synthesen für die γ -Alkyl-(*S*)-HPMPA-Diphosphate **13g** und **13h** sowie deren Prodrugs **13d** bzw. **13f**. Hier konnten Ausbeuten von 38 % bis 71 % erreicht werden (Abb. 87).

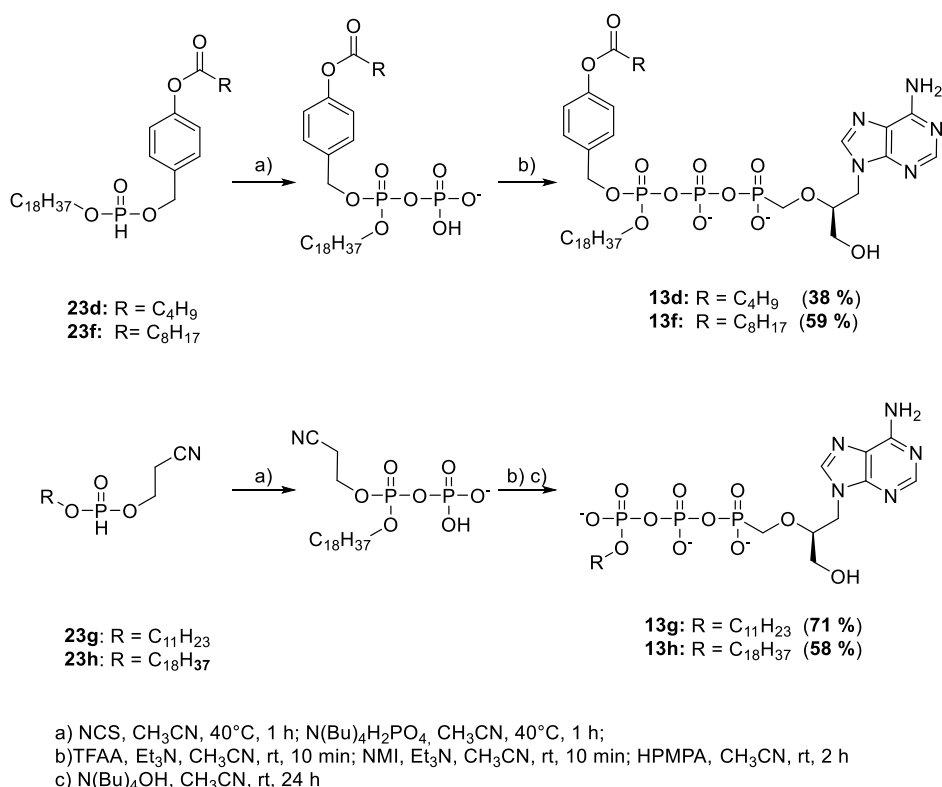


Abb. 87: Synthese der γ -Alkyl-(*S*)-HPMPG-Prodrugs **13d** und **13f** sowie der -Diphosphate **13g** und **13h** ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten.

Bei der Entschützung der Cyanoethyl-Gruppe mit tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid, um die entsprechenden modifizierten (*S*)-HPMPA-Diphosphate **13g** und **13h** zu erhalten, konnte nach einem Tausch der Gegenionen lediglich (*S*)-HPMPA **13** isoliert werden und nicht die

gewünschten Produkte **13g** und **13h**. Wurde statt des tetra-*n*-Butylammoniumhydroxids die Base DBU verwendet, konnten die Zielverbindungen nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden in guten Ausbeuten von 58 % und 71 % nach nur einem Tausch der Gegenionen und unkomplizierter RP-Chromatographie erhalten werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gewünschten (S)-HPMP-Purin-Verbindungen in Ausbeuten bis zu 71 % dargestellt werden konnten.

6.7 Biochemische Analyse der (S)-HPMP-Prodrugs

Die erfolgreich dargestellten Verbindungen sollten auf ihre antivirale Aktivität und ihre chemische Stabilität untersucht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die TriPPP_{Pro}-Verbindungen durch Zellextrakte aktiviert werden, also die eigentlich aktive Form, das (γ -alkylmodifizierte) (S)-HPMP-Diphosphat gebildet wird. Im Anschluss sollten die verschiedenen modifizierten und nicht -modifizierten (S)-HPMP-Diphosphate mithilfe eines *Primer Extension Assays* auf ihre Substrateigenschaften gegenüber der HIV-RT bzw. der humanen DNA-Polymerase γ überprüft werden.

6.7.1 Antivirale Aktivitäten der (S)-HPMP-Prodrugs

Die antiviralen Assays wurden in der Arbeitsgruppe um Dominique Schols in der KU Leuven, Belgien, durchgeführt.

Hierbei zeigte keine der dargestellten HPMP-TriPPP_{Pro}-Verbindungen eine antivirale Aktivität gegenüber mit wildtyp HIV-1 und HIV-2 sowie HIV-2 TK⁻ infizierten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass die schlechten antiviralen Daten in der Literatur von HPMP-Derivaten gegenüber HIV nicht aufgrund mangelnder Phosphorylierung dieser Verbindungen im Zytosol entstehen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die entsprechenden HPMP-Diphosphate keine oder in der Konkurrenz zu den natürlichen dNTPs deutlich schlechtere Substrate gegenüber der HIV-RT sind. Diese Vermutung wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von *Primer Extension Assays* untersucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 6.7.3 (ab Seite 120) beschrieben.

Auch wenn die dargestellten HPMP-TriPPP_{Pro}-Verbindungen keine antivirale Aktivität gegenüber HIV besitzen, so sind sie auch nicht zytotoxisch. Die CC₅₀-Werte, die angeben ab welcher Konzentration 50% der getesteten Zelllinien dem Zelltod unterliegen, liegen in der Regel im hohen zweistelligen micromolaren Bereich.

Nichtsdestotrotz werden diese Verbindungen weiter in der KU Leuven gegen DNA-Viren, das SARS-CoV 2 Virus sowie Influenza Viren getestet. Hier wird eine deutlich bessere antivirale Aktivität erwartet.

6.7.2 Hydrolysen der (S)-HPMP-Prodrugs

Als Erstes sollte die chemische Stabilität der dargestellten Verbindungen in PBS-Puffer überprüft werden. Die entsprechenden Prodrugs wurden dafür bis zu einer Woche in PBS-Puffer bei 37°C inkubiert.

Hierbei konnten alle getesteten Verbindungen eine ausreichende bis gute chemische Stabilität aufweisen (siehe Tab. 4). Es gab jedoch einige Besonderheiten. Zum einen gab es Verbindungen, die innerhalb einer Serie des gleichen HPMP-Derivates eine deutlich geringere Stabilität in PBS-Puffer aufwiesen als die anderen Maskenkombinationen.

Tab. 4: Chemische Stabilität der getesteten Verbindungen in PBS-Puffer. Angegeben ist immer nur die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) für die erste spaltbare Maske.

	Bis-C8AB	Bis-C11AB	C4AB-C18	C8AB-C18
	$t_{1/2}$ [h]	$t_{1/2}$ [h]	$t_{1/2}$ [h]	$t_{1/2}$ [h]
(S)-HPMPC	22.2	8.7	20.5	34.0
(S)-HPMPT	28.9	37.2	6.8	25.5
(S)-HPMPFU	21.3	8.8	41.5	27.6
(S)-HPMPA	11.95	5.6	8.2	18.3
(S)-HPMPG	7.5	16.2	19.7	18.8

Hier war auffällig, dass dieser Effekt nicht immer auf die gleiche Masken-Kombination zurückzuführen war. In der Regel konnte bisher ein Trend der Halbwertszeiten in Abhängigkeit der Kettenlängen bei der chemischen Hydrolyse beobachtet werden, auch wenn die Halbwertszeiten einiger Verbindungen deutlich unter denen der anderen Derivate lagen (z.B. 5.6 Stunden des Bis-C11AB-HPMPA gegenüber 37.2 Stunde für das Bis-C11AB-HPMPT). Trotz der geringen Halbwertszeiten waren die Verbindungen als ausreichend stabil anzusehen.

Zum anderen entstanden Hydrolyseprodukte bei der chemischen Hydrolyse der Verbindungen, die so nicht erwartet wurden. So wurde bei einer symmetrischen Maskierung die Bildung des monomaskierten und schließlich des freien Diphosphates angenommen. Bei den asymmetrisch maskierten Verbindungen wurde nach der Hydrolyse der ersten Maske das γ -alkylmodifizierte Diphosphat erwartet. Dies war auch eindeutig in den Chromatogrammen zu

beobachten, allerdings gab es noch ein weiteres Signal, das bei beiden Substanztypen mit der Zeit zunahm. Dieses Produkt eluierte deutlich früher als die Polyphosphate, sogar vor dem eigentlichen Monophosphat. Hier liegt die Vermutung nahe, dass es sich um das entsprechende cyclische (S)-HPMP-Derivat ((S)-cHPMP) handelte.

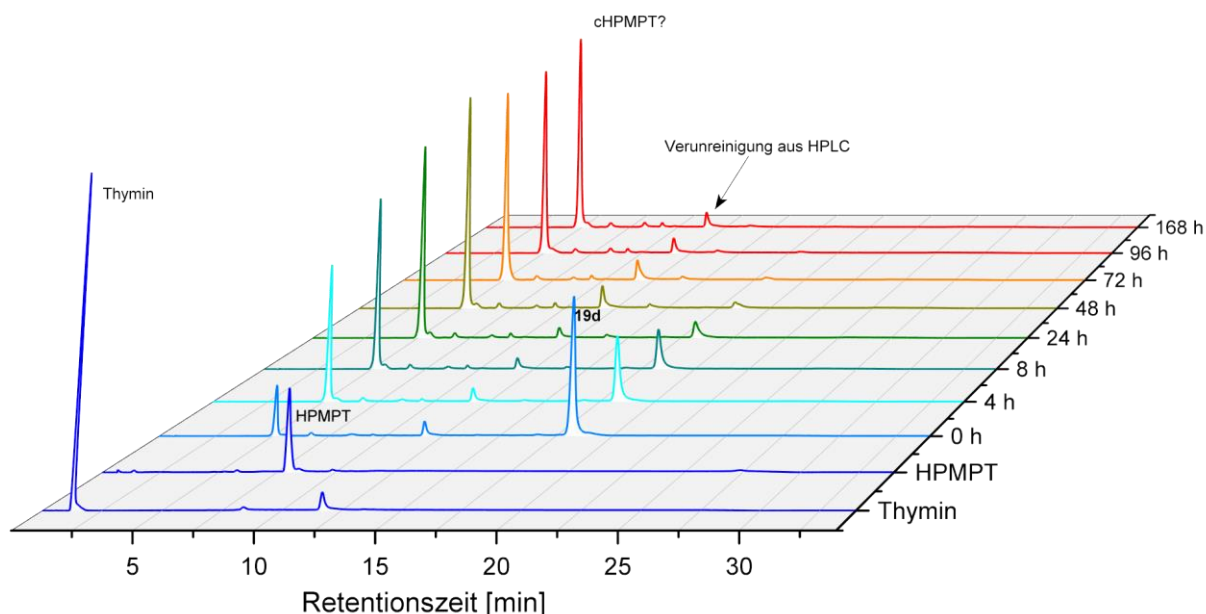


Abb. 88: PBS-Hydrolyse des C4AB-C18-(S)-HPMPT **19d**.

In Abb. 88 ist dies beispielhaft an der Hydrolyse des C4AB-C18-(S)-HPMPT zu sehen. Hier stellte das Hauptprodukt der Hydrolyse das entstehende Signal mit einer Retentionszeit von 5 Minuten dar. Dies stimmte nicht mit der Retentionszeit des (S)-HPMPTs ($t_r = 6.63$ min), sowie der reinen Thymin-Base überein. Da die Retentionszeit hier ungefähr zwei Minuten unter der vom (S)-HPMPT lag, wurde vermutet, dass es sich hierbei um das (S)-cHPMPT handelte. Dieses könnte sich durch einen nucleophilen Angriff des Hydroxids auf das Phosphoratom des α -Phosphonats gebildet haben.

Dieses Phänomen war unabhängig von der Nucleobase bei allen Verbindungen in der Hydrolyse in PBS-Puffer zu beobachten. Daher ist nicht davon auszugehen, dass hier die Nucleobase einen Einfluss, etwa durch einen Angriff der exocyclischen Aminfunktion auf das α -Phosphoratom, hatte. Deshalb wurde vermutet, dass dies aufgrund der acyclischen Struktur bevorzugt stattfand, da dem System deutlich mehr Freiheitsgrade zu Verfügung stehen als in anderen Nucleosidanaloga, die entweder eine Zuckereinheit oder eine ähnliche cyclische Struktur aufweisen.

Für die Hydrolysen in Zellextrakten wurden die Proben für 24 Stunden bei 37°C in den entsprechenden Zellextrakten inkubiert, zu bestimmten Zeitpunkten ein Aliquot entnommen, mit dem doppelten Volumen an Methanol auf Eis inkubiert, zentrifugiert und mittels HPL-Chromatographie analysiert. Aufgrund der Ergebnisse aus der Hydrolyse in PBS-Puffer wurden bei der Hydrolyse in Zellextrakt deutlich geringere Halbwertszeiten erwartet als z.B. bei den (*R*)-PMPA-Derivaten (Kapitel 6.2.2). Es wurde vermutet, dass es zu einer deutlich höheren Bildung der (*S*)-cHPMP-Derivate kommen könnte. Durch die Bildung der cHPMP-Derivate als auch der schnelleren Hydrolyse durch den komplexierenden Einfluss der zweiwertigen Ionen aus den Zellextrakten, wird insgesamt eine kürzere Halbwertszeit erwartet.

Tab. 5: Halbwertszeiten der Hydrolysen in Zellextrakten. Für die (*S*)-HPMPC, (*S*)-HPMPT, (*S*)-HPMPG sowie (*S*)-HPMPA Verbindungen in CEM/0-Zellextrakten.

	Bis-C8AB	Bis-C11AB	C4AB-C18	C8AB-C18
	t_{1/2}[min]	t_{1/2}[min]	t_{1/2}[min]	t_{1/2}[min]
(S)-HPMPC	91.8	/	79.6	/
(S)-HPMPT	60.9	/	185.	/
(S)-HPMPFU*	342.3	/	631.4	/
(S)-HPMPA	27.3	/	111.4	/
(S)-HPMPG	84.2	/	186.2	/

*für die (*S*)-HPMPFU Verbindungen in SW620-Zellextrakten

Anders als erwartet waren die Halbwertszeiten der (*S*)-HPMP-Derivate relativ konstant und vergleichbar mit denen der (*R*)-PMPA-Diphosphat Prodrugs. Hier ergaben sich durchweg Halbwertszeiten von rund einer bis 1.5 Stunden in den Zellextrakten (siehe Tab. 5). Auffällig war auch, dass sich hauptsächlich das gewünschte monomaskierte Intermediat im Falle der Bis-AB-maskierten Verbindungen, sowie die γ -Alkyl-Diphosphate bei den asymmetrisch maskierten (*S*)-HPMP-Derivaten bildete. Zwar war auch immer die Bildung der entsprechenden (*S*)-cHPMP-Derivate zu beobachten, allerdings zu einem deutlich geringeren Anteil als es bei den PBS-Hydrolysen der Fall war. Auch das entsprechende (*S*)-HPMP-Monophosphat war kaum oder nur in geringen Mengen zu beobachten. Dies war ein gutes Ergebnis, da die Verbindungen dem (*R*)-PMPA, bis auf die Hydroxyfunktion, sehr ähneln oder im Falle des (*S*)-HPMPA sogar nahezu identisch waren.

Auffällig waren die deutlich höheren Halbwertszeiten der (*S*)-HPMPFU-Derivate. Diese lassen sich durch die deutlich geringere Proteinkonzentration der SW620-Zellextrakte erklären. Während für die CEM/0-Zellextrakte etwa 1×10^6 Zellen/mL aufgeschlossen wurden, waren es bei dem SW620 Zellextrakt 0.33×10^6 Zellen/mL.

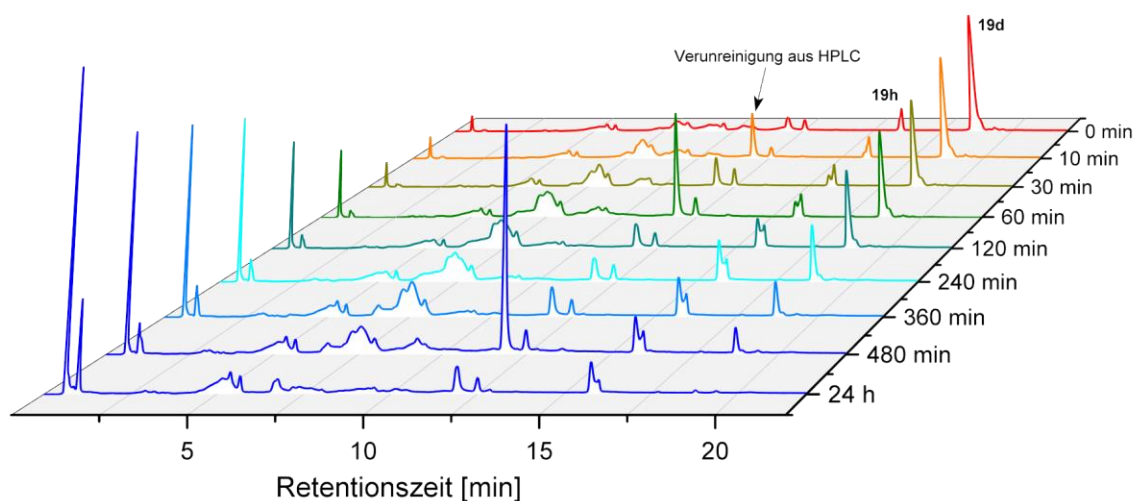


Abb. 89: Wasserfalldiagramm der CEM/0-Zellextrakt-Hydrolyse des C4AB-C18-(S)-HPMPT **19d**.

Exemplarisch konnte dies an der Hydrolyse des C4AB-C18-(S)-HPMPTs **19d** gezeigt werden (Abb. 89). Es war gut zu sehen, wie das Signal des C4AB-C18-(S)-HPMPT **19d** mit der Zeit abnahm und sich hauptsächlich das γ -C18-(S)-HPMPT-DP **19h** bildete. Es konnte kaum die Bildung von (S)-HPMPT-DP, -MP oder gar nur (S)-HPMPT beobachtet werden. Dies war vergleichbar mit den restlichen Hydrolysestudien der (S)-HPMP-Derivate.

Im Gegensatz zu den Hydrolyse-Studien der (R)-PMPA-Prodrugs in Zellextrakten, konnte bei den (S)-HPMP-Derivaten hauptsächlich die gewünschten monomaskierten bzw. γ -alkylmodifizierten (S)-HPMP-Diphosphate in den Chromatogrammen nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass die getesteten Verbindungen tatsächlich enzymatisch im Zellextrakt aktiviert wurden. Um dennoch den Einfluss von zweiwertigen Ionen wie Magnesium²⁺ bzw. Calcium²⁺ zu untersuchen, wurden für die Verbindungen **9a** sowie **9d** Hydrolysen in PBS-Puffer mit zweiwertigen Ionen durchgeführt. Es zeigte sich, dass durch die Verwendung eines Puffers mit zweiwertigen Ionen zwar die Halbwertszeit verkürzt wurde, dennoch war das Muster der Hydrolyseprodukte im Chromatogramm vergleichbar mit denen der Hydrolysen in PBS-Puffer (Tab. 6). Weiterhin waren die Halbwertszeiten deutlich länger als für die Hydrolyse in Zellextrakten. Dies deutet darauf hin, dass die (S)-HPMP-Derivate nicht oder nicht so stark dem Effekt unterliegen, der bei den (R)-PMPA Prodrugs nachgewiesen werden konnte. Ein Grund hierfür könnte die Hydroxyfunktion sein. Diese könnte zusammen mit dem α -Phosphonat das zweiwertige Ion komplexieren. Dadurch wäre auch nach dem Komplexieren noch eine negative Ladung am β -Phosphat vorhanden, die einen nucleophilen Angriff unwahrscheinlicher macht.

Tab. 6: Vergleich der Halbwertszeiten der Hydrolyse-Studien des C4AB-C18-(S)-HPMPCs **9d** in PBS-Puffer, PBS-Puffer mit zweiwertigen Ionen sowie in CEM/0 Zellextrakt.

	PBS-Puffer	PBS-Puffer mit zweiwertigen Ionen	CEM/0
	$t_{1/2}$	$t_{1/2}$	$t_{1/2}$
Bis-C8AB-(S)-HPMPC 9a	20.5 h	2.7 h oder 162.7 min	91.8 min
C4AB-C18-(S)-HPMPC 9d	22.2 h	9.1 h oder 544.8 min	79.6 min

Allerdings wurde bei den Hydrolysen in den unterschiedlichen Zellextrakten (CEM/0 sowie SW620 für die (S)-HPMPFU-Derivate) ein anderer Effekt beobachtet. In Tab. 5 sind keine Halbwertszeiten für die Bis-C11AB- sowie die C8AB-C18-Verbindungen aufgeführt. Dies hatte den Grund, dass die Integrale der Signale dieser Verbindungen bei den Hydrolysen über die Zeit nicht kleiner wurden, sondern immer auf dem gleichen, vergleichsweise niedrigen Niveau lagen. Es konnte dennoch von einer Aktivierung ausgegangen werden, da das Integral der Signale der Intermediate bzw. der γ -alkyl-Diphosphate mit der Zeit zugenommen hatte.

Auffällig war, dass die Verbindungen bei denen dieser Effekt auftrat, alle eine Retentionszeit von ca. 20 Minuten oder höher aufwiesen, also vergleichsweise lipophil waren. Da der Effekt in CEM/0- sowie SW620-Zellextrakt aufgetreten war, wurde vermutet, dass es sich hierbei um einen generellen Effekt handelte, der nicht spezifisch auf einen Zelltyp zurückzuführen war. Parallel wurde dies auch bei WITT in den Hydrolysen in Blutplasma festgestellt.⁹⁶ Gerade in Blutplasma befinden sich Proteine, deren spezifische Aufgabe es ist, größere lipophile Moleküle zu binden und so im Blut zu lösen. Diese Proteine sind sogenannten Albumine, die so bis zu 40% der Gesamtmenge im Blutplasma ausmachen. Demnach wäre es bei einer unspezifischen Bindung der TriPPP-Verbindungen an Plasmaproteine möglich, dass die TriPPP-Verbindungen auch an intrazelluläre Proteine binden.

Um diese Theorie zu belegen, wurden Versuche mit humanen Serum Albumin (HSA) durchgeführt. Hier sollte die unspezifische Bindung exemplarisch an dem C8AB-C18-(S)-HPMPC **9f** untersucht werden. Dafür wurde die Verbindung **9f** in PBS-Puffer mit HSA (0.4 mg/mL) inkubiert, zu zwei Zeitpunkten Proben entnommen und mithilfe einer HPLC analysiert. Parallel dazu wurde eine Blind-Probe durchgeführt, in der nur die Verbindung **9f** in PBS-Puffer inkubiert wurde, um eventuelle Effekte bei der Probenbehandlung auszuschließen.

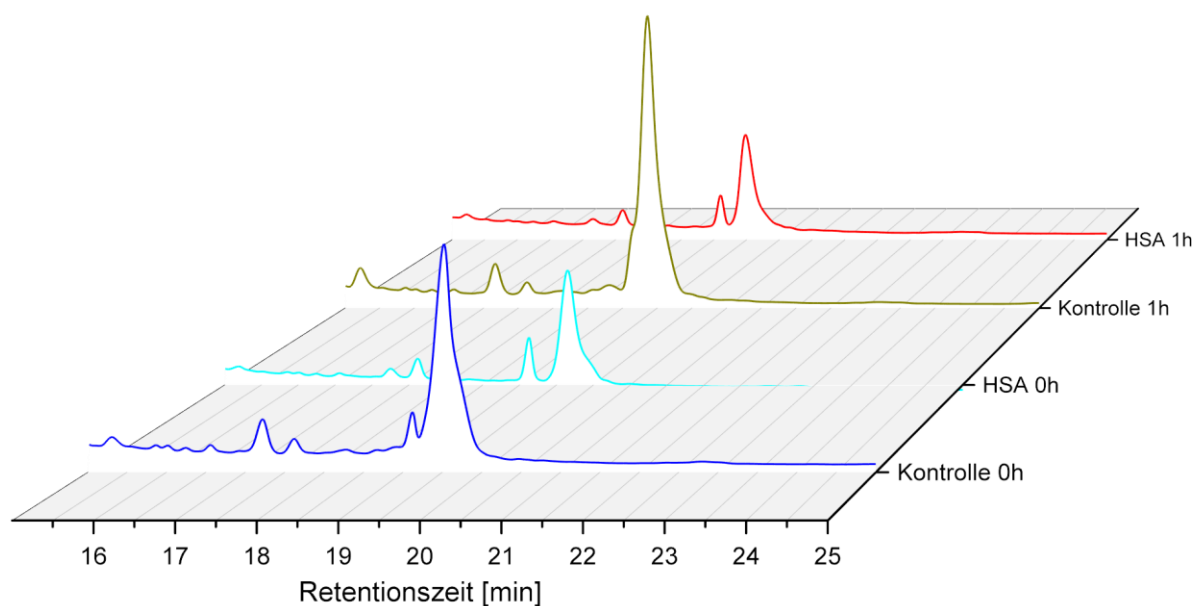


Abb. 90: Inkubation von **9f** mit humanen Serum Albumin.

Es wurde festgestellt, dass die Signale der Proben mit dem humanen Serum Albumin zwar eine geringere Intensität und damit auch ein geringeres Integral aufwiesen als die vergleichbaren Kontrollen. Jedoch war das Signal der Kontrolle deutlich schwächer als bei vergleichbaren Hydrolysen in PBS-Puffer, bei der das Injektionsvolumen geringer war und sich damit auch potenziell weniger Substanz auf der Säule befand (siehe Abb. 90).

Es lässt sich also vermuten, dass es zwar zu einer unspezifischen Bindung des Analyten an die Albumine bzw. generell an Proteine gekommen war. Dies konnte jedoch nicht die geringe Intensität der Signale bei der Hydrolyse erklären, da bereits die Signale in den Kontrollproben geringer waren.

Da eine unspezifische Bindung der lipophilen Verbindungen als alleinige Ursache für die geringe Intensität der Signale unwahrscheinlich war, wurden im nächsten Schritt die verschiedenen Stadien der Probenaufbereitung bei den Hydrolysen mit Zellextrakten untersucht. Hierbei gab es verschiedene Stadien, die jeweils mit einer Probe aus der gleichen Stammlösung von **9f** in DMSO durchgeführt wurden. Die erste Probe wurde mit dem doppelten Volumen an Methanol versetzt, die zweite zusätzlich 10 Minuten auf Eis inkubiert, die dritte anschließend 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und die vierte zusätzlich durch einen Spritzenfilter filtriert. In Abb. 91 ist zu sehen, dass die Intensitäten der Signale nach dem Zentrifugieren deutlich niedriger waren als die Vergleichsproben ohne Zentrifugieren. Dies ließ den Schluss zu, dass durch die Zugabe des Methanols die lipophilen Verbindungen gefällt und durch das Zentrifugieren aus der Suspension getrennt wurden.

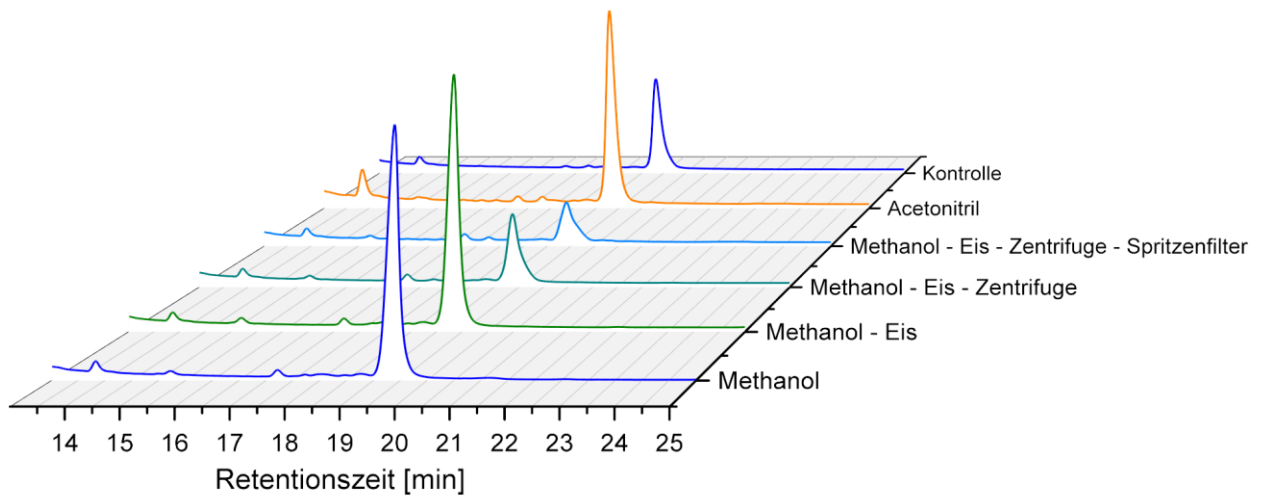


Abb. 91: Ausschnitte aus den Chromatogrammen bei der Analyse der verschiedenen Schritte der Probenaufbereitung bei der Zellextrakt-Hydrolyse. Weiterhin eine Kontrolle mit PBS-Puffer statt Methanol und alternativ Acetonitril statt Methanol zum Fällern. Durchgeführt an der Verbindung **9f**.

Generell schien es bei den langkettigen Verbindungen ein Problem mit dem Zentrifugieren zu geben. Auch in der Kontrollprobe, in der das doppelte Volumen an PBS-Puffer statt Methanol zugegeben wurde, war die Intensität niedriger als bei den nicht zentrifugierten Proben. Dies scheint auf ein Löslichkeitsproblem dieser Verbindungen hinzudeuten.

Da das Fällern der Proteine aus den Zellextrakten nach der Hydrolyse alternativlos schien, wurde nach einem möglichen Ersatz gesucht. Hier bot sich zum Fällern von Proteinen aus einer Lösung neben Methanol auch Acetonitril an. Der Versuch wurde mit der Zugabe des doppelten Volumens an Acetonitril wiederholt, wobei die weitere Probenvorbereitung unverändert blieb. Überraschender Weise waren hier die Signalintensitäten vergleichbar mit den Proben vor dem Zentrifugieren. Dies deutete darauf hin, dass durch die Zugabe des Acetonitrils offenbar die Löslichkeit der zu untersuchenden Verbindungen erhöht wurde und nicht durch das Zentrifugieren aus der Lösung getrennt wurden.

Die Experimente mit dem humanen Serum Albumin wurden nach dieser Erkenntnis wiederholt und die Proteine mit dem doppelten Volumen an Acetonitril statt Methanol gefällt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Signalintensitäten in den Proben mit HSA deutlich geringer waren als bei den Kontrollproben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass sich diese Verbindungen mit einer ähnlichen Lipophilie bzw. Retentionszeit unspezifisch an die Albumine bzw. Proteine binden. Um diese Theorie weiter zu bestätigen, wurde das C8AB-C18-(S)-HPMPC **9f** mit humanem Blutplasma inkubiert. Das Ziel dieser Untersuchung

war es zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse aus dem Modellversuch mit dem HSA bestätigen lassen.

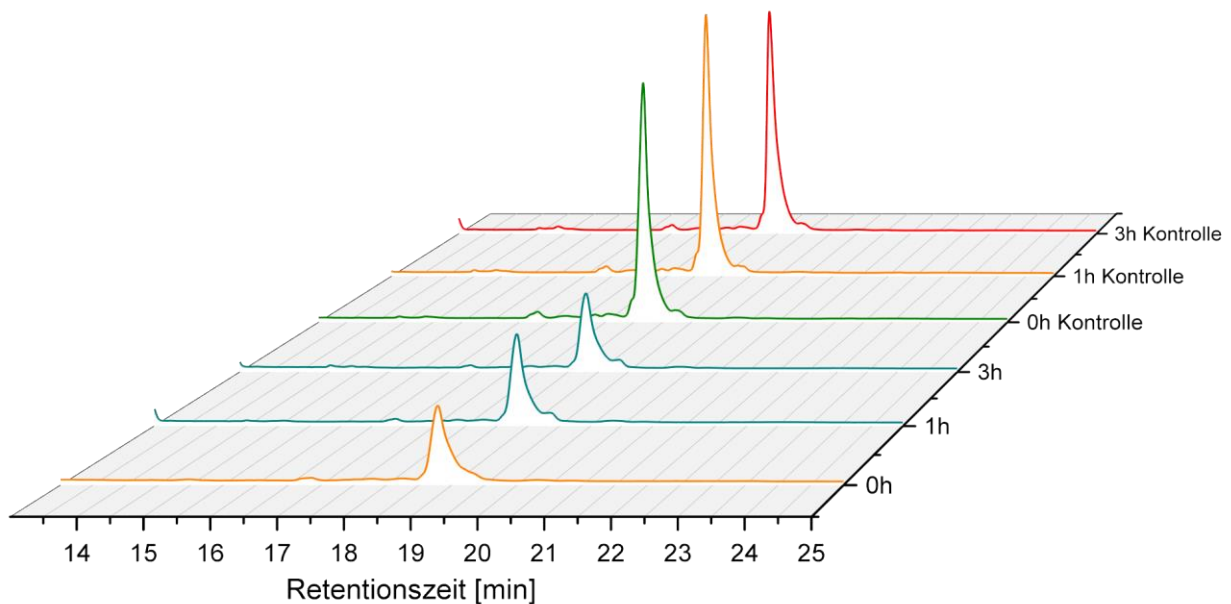


Abb. 92: Ausschnitt aus den Chromatogrammen von der Inkubation von der Verbindung **9f** mit humanen Serum Albumin und Fällungen der Proteine mit Acetonitril.

Das genutzte Blutplasma wurde von der Arbeitsgruppe um Udo Schumacher im UKE zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um menschliches Blut, welchem EDTA oder Natriumcitrat zugesetzt wurde, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Anschließend wurden die zellulären Blutbestandteile durch Zentrifugieren entfernt. Das so erhaltene Blutplasma besteht somit nur noch aus Plasmaproteinen, Elektrolyten, Nährstoffen, Metaboliten sowie Botenstoffen. Es ist nach dem Vollblut das beste Modell, um das Verhalten der TriPPPPro-Verbindungen in dieser Umgebung zu untersuchen.

Aufgrund der hohen Proteinkonzentration wurde sich bei der Durchführung des Experiments an das Protokoll für die Hydrolysestudien in Zellextrakten orientiert. Die entnommenen Aliquote wurden mit dem doppelten Volumen an Acetonitril versetzt, zehn Minuten auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand durch einen Spritzenfilter filtriert. Parallel dazu wurde eine Probe ohne die Verbindung **9f** sowie eine Probe mit PBS-Puffer statt Blutplasma als Vergleichsproben angesetzt.

Die Ergebnisse der Modellversuche mit dem HSA konnten mit dem Blutplasma reproduziert werden. Da nur in der Probe ohne Blutplasma ein Signal für die Verbindung **9f** detektiert werden konnte, lies sich im Umkehrschluss ableiten, dass die Verbindung **9f** in der Probe mit Blutplasma nahezu vollständig über 24 Stunden an die Proteine gebunden hatte (Abb. 93). Um zu bestätigen, dass es sich dabei um eine Bindung an die Plasmaproteine handelte, wurde

eine Blindprobe angefertigt. Diese enthielt statt dem humanen Blutplasma PBS-Puffer, unterlag aber ansonsten den gleichen Bedingungen und der gleichen Probenvorbereitung. Es war ein deutliches Signal sichtbar, im Gegensatz zu den Proben in Blutplasma.

Mithilfe der Experimente konnte gezeigt werden, dass TriPPPro-Verbindungen mit langkettigen Maskierungseinheiten und/oder Modifikationen offenbar unspezifisch an Plasmaproteine binden können. Dieser Effekt ist sehr interessant, da die TriPPPro-Verbindungen so möglicherweise einen *slow-release* Mechanismus bedienen können. Dieser beschreibt die langsame Freisetzung der an Proteinen gebundenen Wirkstoffe. Dadurch kann das Intervall der Einnahme gesenkt werden, da sich die entsprechenden Verbindungen so anreichern können. Gerade in Bezug auf das (S)-HPMPC ist dieser Effekt sehr interessant, da sich bereits durch das (S)-HPMPC-MP-Cholin ein intrazellulärer Speicher aufbaut.

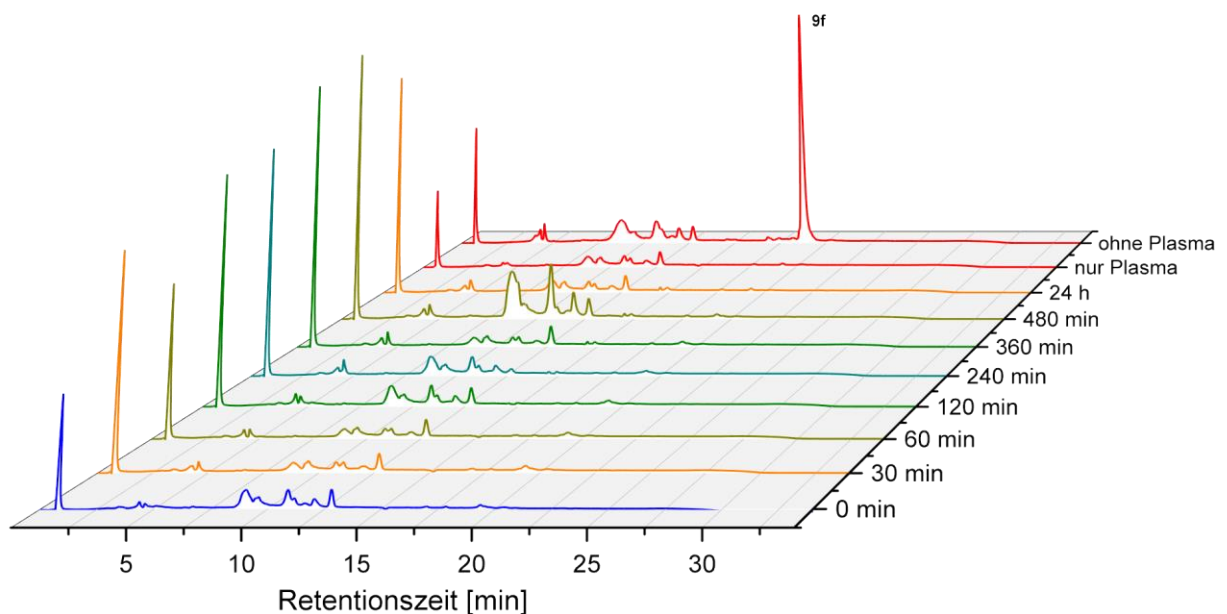


Abb. 93: Ergebnisse der Inkubation von der Verbindung **9f** mit humanem Blutplasma.

Weiterhin schien das Fällen der Proteine mit Acetonitril auch für Hydrolysestudien mit Zellextrakten eine gute Alternative zu sein und sollte bei zukünftigen Hydrolysen bedacht werden. Zwar war auch mit dem gängigen Protokoll die Aktivierung der Prodrugs zu beobachten, jedoch können hierbei keine zuverlässigen Halbwertszeiten bestimmt werden.

6.7.3 Primer Extension Assays der (S)-HPMP-Prodrugs

Um die Substrateigenschaften der verschiedenen (S)-HPMP-Derivate einzuschätzen, sowie den Einfluss der γ -Alkylmodifikation zu beurteilen, wurden auch hier *Primer Extension Assays* durchgeführt. Hierbei waren besonders die HIV-RT sowie die humane DNA-Polymerase γ von Interesse. Für die (S)-HPMPC sowie die (S)-HPMPFU Derivate wurden außerdem die Substrateigenschaften für die human DNA-Polymerase α untersucht.

Für die (S)-HPMPC Derivate konnte festgestellt werden, dass alle getesteten Substanzen ein Substrat für die HIV-RT sind (Abb. 94, 4-6). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die modifizierten Diphosphate scheinbar schlechtere Substrate als das eigentliche (S)-HPMPC-Diphosphat sind. Anders als bei den kompetitiven Experimenten mit dem (R)-PMPA (Kapitel 0) sind bei den (S)-HPMPC-Diphosphaten keine +1-Banden zu sehen. Dies ist auch nicht zwingend verwunderlich, da die (S)-HPMP-Derivate im Gegensatz zu dem (R)-PMPA zu keinem direkten Kettenabbruch führen müssen. Viel mehr würde hier ein doppelter Einbau direkt nacheinander einen Kettenabbruch erzwingen. Dies ist allerdings aufgrund des Template-Designs nicht vorgesehen. Zwar gibt es die Möglichkeit für eine zweite Inkorporation des (S)-HPMPC-DPs, jedoch wäre dies erst nach der Inkorporation von zwei weiteren, canonischen Nucleotiden möglich und führt damit aufgrund der Distanz nicht zu einem direkten Kettenabbruch.

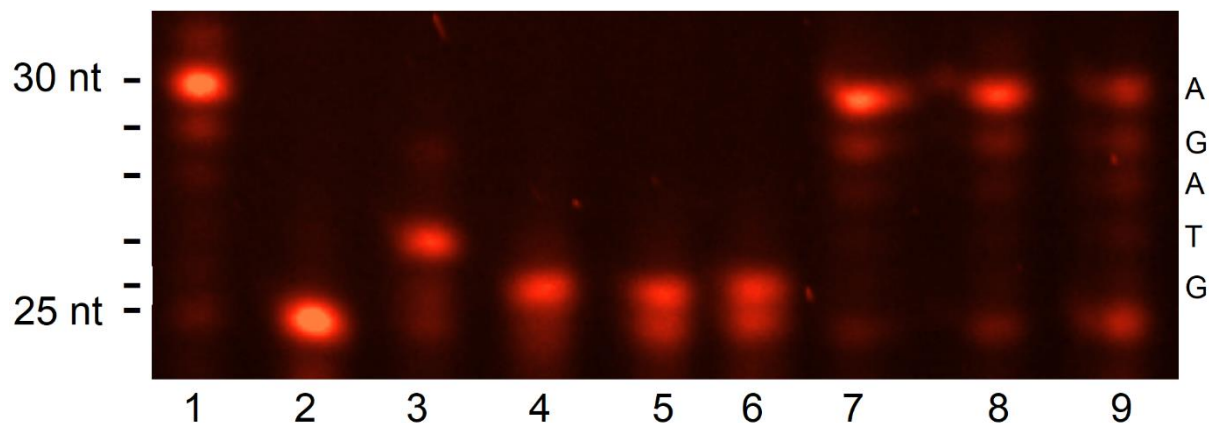


Abb. 94: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPC-DP sowie den γ -Alkylmodifizierten (S)-HPMPC-Diphosphaten mit der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dCTP), 4: (S)-HPMPC-DP **66**, 5: γ -C11-(S)-HPMPC-DP **9g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPC-DP **9h**, 7: (S)-HPMPC-DP **66** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPC-DP **9g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPC-DP **9h** und alle natürlichen dNTPs.

Es ist jedoch gut zu erkennen, wie die Modifikation am γ -Phosphat die HIV-RT beeinflusst. Wurde mit (S)-HPMPC-DP der Primer nahezu vollständig verlängert (Abb. 94, 7), gibt es bei der γ -C11-Modifikation und bei der γ -C18-Modifikation ein deutlich stärkeres Signal für den Primer, der nicht verlängert wurde (Abb. 94, 8 und 9). Da hier auch keine +1-Bande zu sehen ist und die erhaltenen Fragmente, welche der Positivkontrolle ähneln, nur eine geringere

Intensität aufweisen, ist zu vermuten, dass die entsprechenden Derivate einen anderen Einfluss auf die HIV-RT haben.

Anschließend wurde das Experiment wiederholt, nur dass hierbei überprüft werden sollte, ob diese Verbindungen Substrate für die humane DNA-Polymerase γ waren. Dabei konnte festgestellt werden, dass keines der getesteten (S)-HPMPC-Diphosphate, ob mit oder ohne Modifikation, ein Substrat für die humane DNA-Polymerase γ waren. Weiter wurde beobachtet, dass es bei der Anwesenheit aller natürlichen dNTPs nur bei dem (S)-HPMPC-DP **66** sowie dem γ -C11-(S)-HPMPC **9g** zu einer vollen Strangverlängerung gekommen war (Abb. 95, 7 und 8). Dagegen kam es bei dem γ -C18-(S)-HPMPC-Diphosphat **9h** und allen natürlichen dNTPs zu keiner sichtbaren Strangverlängerung. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Verbindung **9h** einen Einfluss auf die Polymeraseaktivität hat, auch wenn diese kein Substrat für die Polymerase ist. Die könnte z.B. durch ein Blockieren der Bindung der natürlichen dNTPs in die aktive Tasche der Polymerase passieren. Es ist anzumerken, dass es aufgrund der geringen Substrateigenschaften gegenüber der humanen DNA-Polymerase γ zu keinem Einbau der getesteten Substanzen in das Wirtsgenom kommen sollte. Dies lässt auch für die (S)-HPMPC-Derivate auf eine mögliche geringe Zytotoxizität schließen.

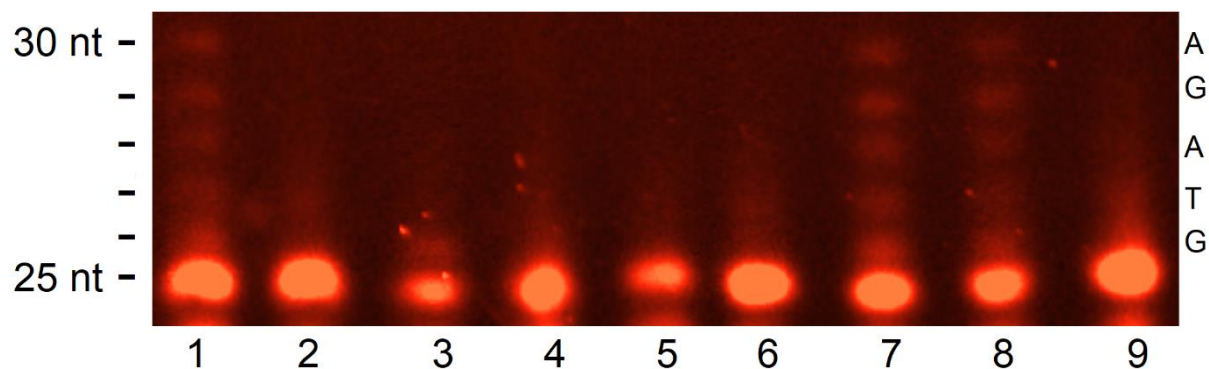


Abb. 95: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPC-DP sowie den γ -Alkylmodifizierten (S)-HPMPC-Diphosphaten mit der human DNA-Polymerase γ . 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dCTP), 4: (S)-HPMPC-DP **66**, 5: γ -C11-(S)-HPMPC-DP **9g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPC-DP **9h**, 7: (S)-HPMPC-DP **66** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPC-DP **9g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPC-DP **9h** und alle natürlichen dNTPs.

Da (S)-HPMPC bei der Behandlung von Glioblastomen außerordentlich gute Eigenschaften *in vitro* und in Tiermodellen gezeigt hat (siehe Kapitel 4.3.2.5), sollten auch die Substrateigenschaften gegenüber der humanen DNA-Polymerase α untersucht werden.

Hier stellte sich heraus, dass das (S)-HPMPC-Diphosphates auch für die humane DNA-Polymerase α ein gutes Substrat war. Dies könnte auch der Ursprung der antitumoralen Wirkung sein. Eine Modifikation an dem γ -Phosphat hingegen sorgte dafür, dass es nicht mehr als Substrat für die Polymerase erkannt und eingebaut wurde (Abb. 96, 5 und 6). Sobald alle natürlichen Nucleotide in der Reaktionslösung vorhanden waren, zeigte sich, warum

(S)-HPMPC zwar in der antiviralen Therapie kaum zytotoxische Wirkung besaß, jedoch mit großen Erfolg in der Chemotherapie gegen Tumoren eingesetzt wird.

So kommt es bei der Anwesenheit aller natürlichen dNTPs sowie dem (S)-HPMPC-Diphosphat zu einer vergleichbaren Strangverlängerung wie bei der Positivkontrolle (Abb. 96, vergleich 1 mit 7). Dies könnte bedeuten, dass es in normal proliferierenden Zellen, bei denen die natürlichen dNTPs in einem deutlichen Überschuss vorhanden sind, zu keinem Einbau des (S)-HPMPC-Diphosphates in das Wirtsgenom kommt. Bei schnell proliferierenden Zellen, wie z.B. Krebs- oder Virus infizierte Zellen, kommt es jedoch zu einem Mangel an natürlichen dNTPs, da diese Zellen einen deutlich höheren Bedarf haben. Durch diesen hohen Bedarf ist es wahrscheinlich, dass auch das (S)-HPMPC-Diphosphat als Substrat für die humane DNA-Polymerase α zur Verfügung steht.

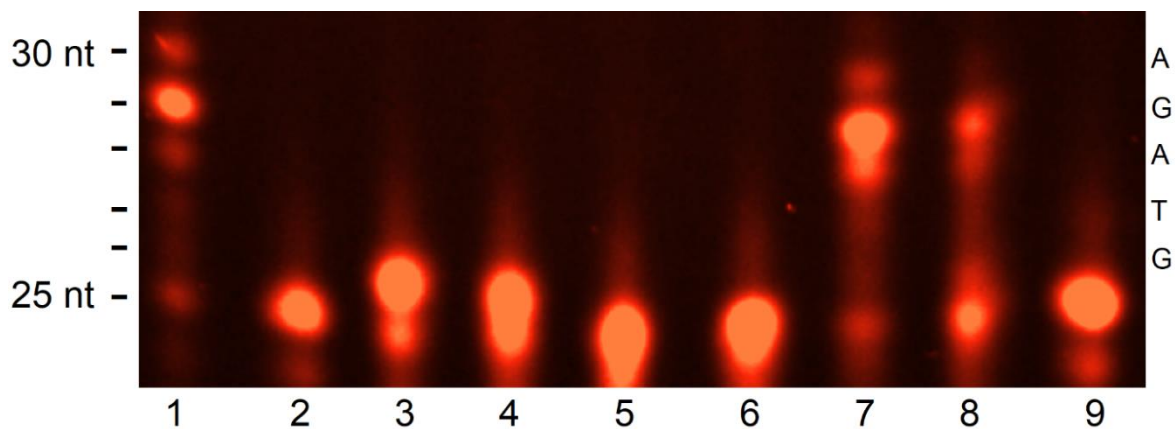


Abb. 96: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPC-DP sowie den γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPC-Diphosphaten mit der humanen DNA-Polymerase α . 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dCTP), 4: (S)-HPMPC-DP **66**, 5: γ -C11-(S)-HPMPC-DP **9g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPC-DP **9h**, 7: (S)-HPMPC-DP **66** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPC-DP **9g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPC-DP **9h** und alle natürlichen dNTPs.

Für die γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPC-Diphosphate wurde ein anderes Verhalten beobachtet. Zwar scheinen diese Verbindungen keine Substrate für die Polymerase zu sein, jedoch haben sie, ähnlich wie bei der DNA-Polymerase γ , einen Einfluss auf die Enzyme. Hier scheint schon bei der γ -C11-Alkylmodifikation die Aktivität der Polymerase gehemmt zu sein. Dies ist deutlich durch das Fehlen der kompletten Elongation (+5-Bande) sowie des immer noch vorhandenen jedoch nicht umgesetzten Primers (0 Bande) zu beobachten (Abb. 96, 8). Dieses Phänomen ist bei der γ -C18-Alkylmodifikation noch deutlicher zu erkennen. Hier konnte keine Strangverlängerung, sondern nahezu nur der eigentlich Primer detektiert werden (Abb. 96, 9). Da die Ergebnisse sowohl bei der DNA-Polymerase α als auch bei der DNA-Polymerase γ beobachtet wurden, könnte davon ausgegangen werden, dass dies auch für die anderen humanen Polymerasen gilt. Damit ist anzunehmen, dass je länger die Alkylmodifikation der Diphosphate ist, desto stärker ist die Inhibition der humanen

Polymerasen. Dies könnte ggf. auf eine erhöhte Zytotoxizität schließen lassen, welches auch in den biologischen Assays festgestellt werden konnte. Hier waren die CC_{50} -Werte des γ -C11-HPMPC-DPs **9g** mindestens doppelt so hoch, wie die des γ -C18-HPMPCs **9h**. Jedoch war der CC_{50} -Wert der Verbindung **9h** mit rund 47 μ M deutlich über der minimalen Anforderung.

Die aus den vorangegangenen *Primer Extension Assays* gewonnenen Ergebnisse über die Substrateigenschaften des (S)-HPMPC-Diphosphates sollten nun im Anschluss mit denen der anderen (S)-HPMP-Derivate verglichen werden. Dazu wurden auch von den unterschiedlichen Derivaten *Primer Extension Assays* mit der HIV-RT durchgeführt.

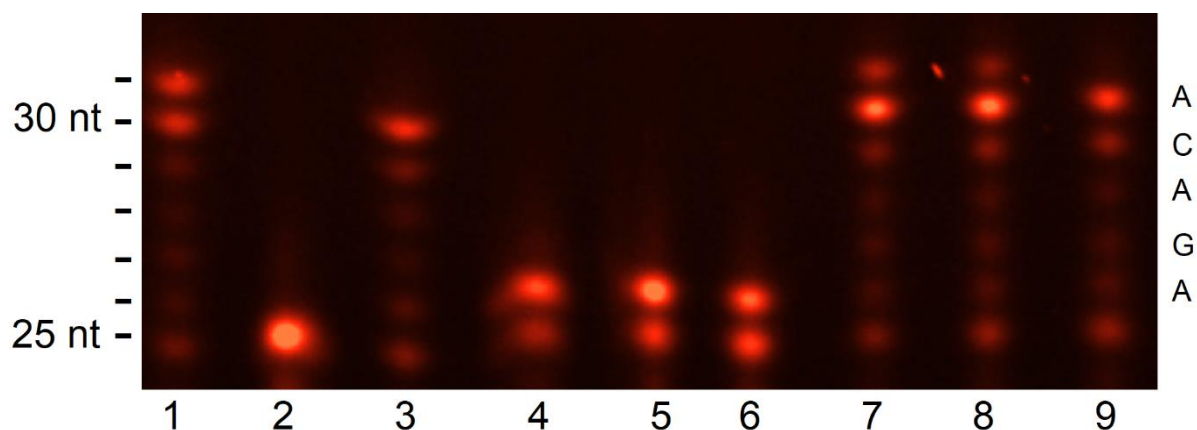


Abb. 97: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPT-DP sowie den γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPT-Diphosphaten und der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dTTP), 4: (S)-HPMPT-DP **67**, 5: γ -C11-(S)-HPMPT-DP **13g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPT-DP **13h**, 7: (S)-HPMPT-DP **67** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPT-DP **13g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPT-DP **13h** und alle natürlichen dNTPs.

Die Ergebnisse für die (S)-HPMPT-Diphosphate sind vergleichbar mit denen der (S)-HPMPC-Diphosphate. Es ist gut zu erkennen, dass alle (S)-HPMPT-Diphosphate ein Substrat für die HIV-RT sind und jeweils nur einmal eingebaut werden (Abb. 97, 4-6). Dies steht im Gegensatz zu dem natürlichen dTTP, welches ungeachtet der Basenpaarung, eine +5 Bande erzeugt (Abb. 97, 3). Sobald die natürlichen dNTPs vorhanden sind, kommt es analog zu der Positivkontrolle wieder zu einer kompletten Strangverlängerung. Hierbei ist anzumerken, dass es mit den (S)-HPMPT-Diphosphaten, eine deutlich bessere +5- und nur eine schwache oder im Fall des γ -C18-(S)-HPMPT-Diphosphates, keine +6-Bande zu sehen ist (Abb. 97, 7-9). Damit waren die (S)-HPMPT-Diphosphate und die (S)-HPMPC-Diphosphaten vergleichbare Substrate für die HIV-RT.

Anders als bei den Pyrimidinen, werden die (S)-HPMPA-Diphosphate von der HIV-RT nicht nur einmal eingebaut, sondern unabhängig von der Basenpaarung auch ein zweites Mal. Anschließend kam es offensichtlich zu einem Strangabbruch, da es keine bzw. nur minimale +3-Banden gegeben hat (Abb. 98, 4-6). Diese Ergebnisse passen gut zu dem Wirkmechanismus der (S)-HPMP-Derivate (siehe Kapitel 4.3.2.2, Seite 22). Es wurde daraus

geschlossen, dass es bei dem (S)-HPMPA-Diphosphat nach der zweiten Inkorporation zu einem Strangabbruch gekommen war, da bei der Probe mit dATP, nicht bloß eine sehr deutliche +2-Bande zu sehen war, sondern auch eine +3- bzw. +4-Bande (Abb. 98, 3).

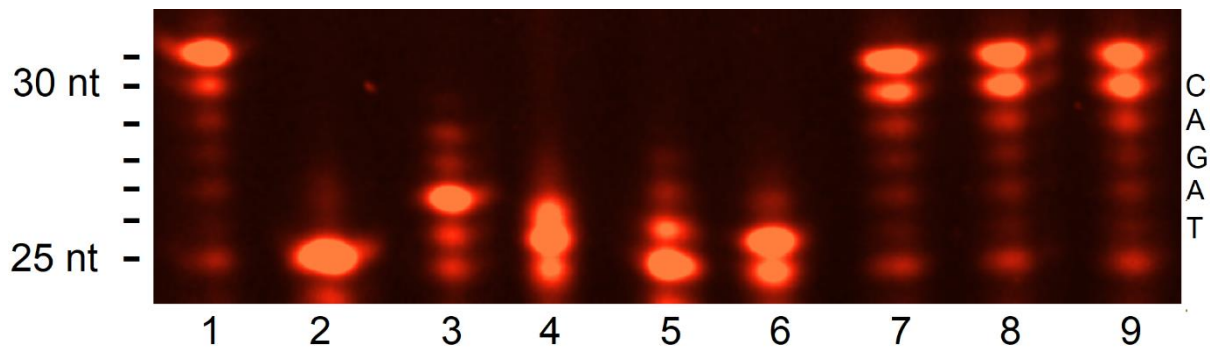


Abb. 98: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPA-DP sowie den γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPA-Diphosphaten und der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dATP), 4: (S)-HPMPA-DP **64**, 5: γ -C11-(S)-HPMPA-DP **13g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPA-DP **13h**, 7: (S)-HPMPA-DP **64** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPA-DP **13g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPA-DP **13h** und alle natürlichen dNTPs.

Unerwartete Ergebnisse gab es jedoch für die (S)-HPMPG-Diphosphate. Für das (S)-HPMPG-Diphosphat ohne sowie mit einer γ -C18-Alkylmodifikation wurden ähnliche Ergebnisse wie für die vergleichbaren (S)-HPMPA-Diphosphate beobachtet (Abb. 99, 4, 6, 7 und 9). Dieses konnte bei dem γ -C11-Alkyl-(S)-HPMPG-Diphosphat nicht beobachtet werden (Abb. 99, 5 und 8). Die Verbindung **13g** schien kein Substrat für die HIV-RT zu sein. Jedoch konnte auch bei der Anwesenheit aller natürlichen dNTPs keine Strangverlängerung beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass das γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat ein Inhibitor für die HIV-RT sein könnte.

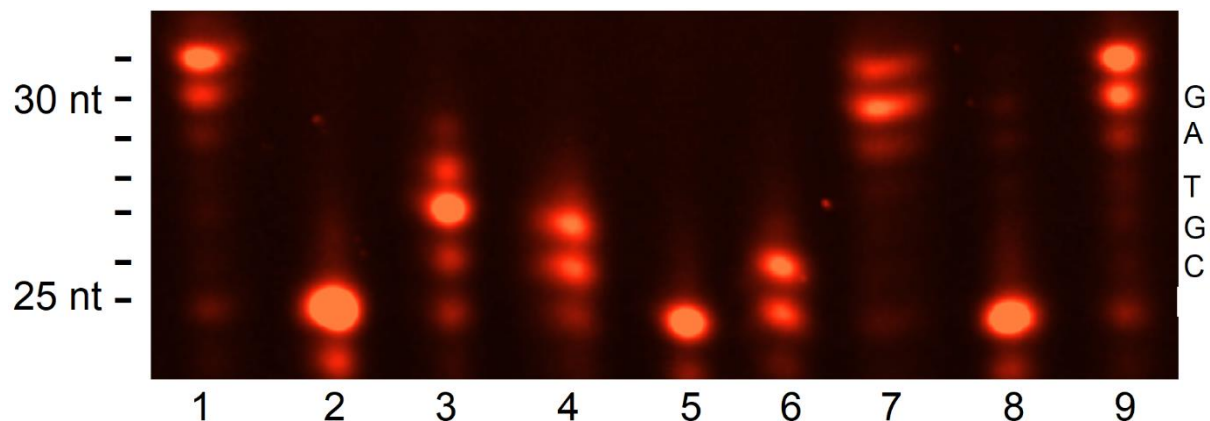


Abb. 99: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPG-DP sowie den γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPG-Diphosphaten mit der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dGTP), 4: (S)-HPMPG-DP **65**, 5: γ -C11-(S)-HPMPG-DP **20g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPG-DP **20h**, 7: (S)-HPMPG-DP **65** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPG-DP **20g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPG-DP **20h** und alle natürlichen dNTPs.

Um diese Eigenschaften noch einmal etwas genauer zu untersuchen, wurde ein zweiter Assay durchgeführt. In diesem wurde das γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat einmal analog zu dem vorherigen Assay eingesetzt und einmal hundertfach verdünnt. Die anderen Bedingungen blieben gleich, was dazu geführt hat, dass es einmal ein Verhältnis von 1:1 des γ -C18-(S)-HPMPG-Diphosphates zu den natürlichen dNTPs gab sowie ein Verhältnis von 1:100. Dies sollte zeigen, ob es ähnlich wie bei dem (R)-PMPA zu einer Übersättigung der HIV-RT kommen kann und daher kein Substrat für die HIV-RT mehr darstellt. Bei dem Assay konnte nur bei einem hundertfachen Überschuss der natürlichen dNTPs eine komplette Strangverlängerung beobachtet werden, analog zu der Positivkontrolle (Abb. 100, Spur 1 und 6). Für alle anderen Bedingungen konnte keine Aktivität der HIV-RT festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat um einen möglichen Inhibitor für die HIV-RT handelt. Warum dies bei dem γ -C18-(S)-HPMPG Diphosphat nicht mehr der Fall war, konnte dadurch nicht erklärt werden. Zu dieser Frage könnte ggf. durch eine *in silico* Modellierung der HIV-RT eine mögliche Theorie entwickelt werden.

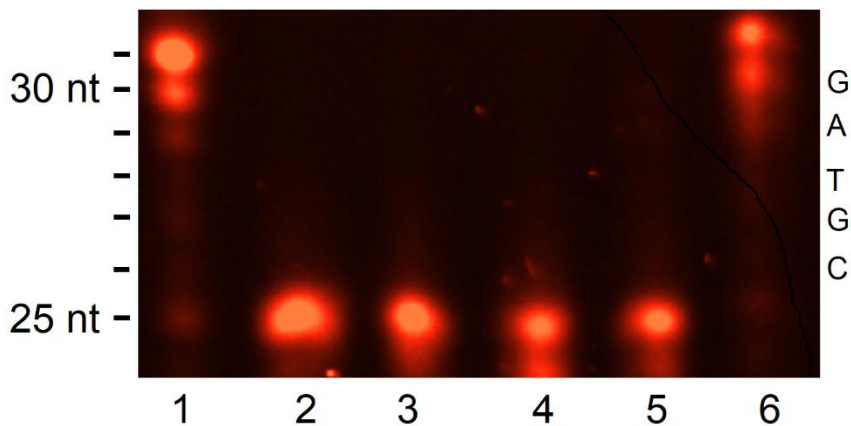


Abb. 100: *Primer Extension Assay* mit dem γ -C11-(S)-HPMPG-DP und der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: 250 μ M γ -C11-(S)-HPMPG-DP **20g**, 4: 2,5 μ M γ -C11-(S)-HPMPG-DP **20g**, 5: γ -C11-(S)-HPMPG-DP **20g** und alle natürlichen dNTPs im Verhältnis 1:1, 6: γ -C11-(S)-HPMPG-DP **20g** und alle natürlichen dNTPs im Verhältnis 1:100.

Als Letztes sollten noch die Eigenschaften der (S)-HPMPFU-Derivate gegenüber der HIV-RT sowie den humanen DNA Polymerasen α sowie γ untersucht werden. Dabei wurde keine oder nur eine geringe Akzeptanz der HIV-RT erwartet, da bereits in der Literatur kaum eine antivirale Aktivität des (S)-HPMPFU beobachtet wurde. Dennoch kann es sein, dass durch die Verwendung des Triphosphates mögliche Schwierigkeiten in der zellulären Phosphorylierung umgangen werden könnten. Allerdings wurde erwartet, dass es ein gutes Substrat für die humane DNA Polymerase α wäre, analog zu dem (S)-HPMPC (siehe Seite 122).

Wie erwartet, war keins der (S)-HPMPFU-Diphosphate ein Substrat für die HIV-RT (Abb. 101, 4-6). Dies erklärt auch die fehlende antiviralen Aktivitäten des in der Literatur zuvor synthetisierten (S)-HPMPFUs von der Arbeitsgruppe um HOSTETLER.¹¹³ Es ist anzunehmen, dass es sich bei der Inaktivität nicht um Probleme mit der Phosphorylierung handelt, sondern die HPMPFU-Diphosphate kein Substrat für die HIV-RT darstellen.

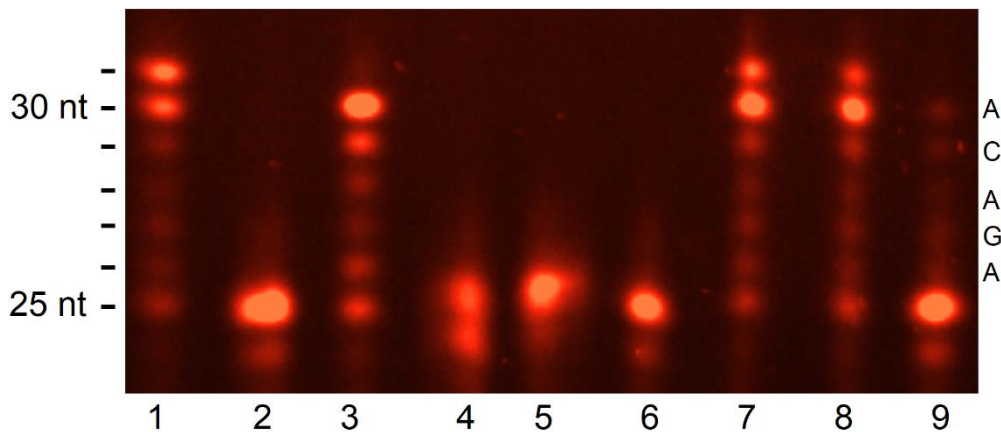


Abb. 101: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPFU-DP sowie den γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPFU-Diphosphaten mit der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dGTP), 4: (S)-HPMPFU-DP **68**, 5: γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPFU-DP **21h**, 7: (S)-HPMPFU-DP **28** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPFU-DP **21h** und alle natürlichen dNTPs.

Überraschend dagegen war das Ergebnis des γ -C18-(S)-HPMPFU-Diphosphates. Während es wie die anderen getesteten (S)-HPMPFU-Diphosphate scheinbar kein Substrat für die HIV RT war, zeigte sich jedoch auch bei dem kompetitiven Versuch mit allen natürlichen dNTPs keine Strangverlängerung, ähnlich zu dem γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat. Um erneut zu überprüfen, ob es ggf. einfach nur durch eine Übersättigung kein Substrat für die HIV-RT ist, wurde der Versuch analog zu dem γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat wiederholt. Hier zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Während auch in einer geringeren Konzentration das γ -C11-(S)-HPMPFU-Diphosphat kein Substrat für die HIV-RT darstellte, inhibierte es jedoch in einem hundertfachen Unterschuss die DNA-Synthese deutlich weniger. Bei einem 1:1 Verhältnis war nur ein leichter Schatten der Bande zu sehen, die dem verlängerten Primer zuzuordnen war, dagegen zeigte sich bei einem hundertfachen Überschuss ein deutlich sichtbarer verlängerter Primer mit dem Fokus auf der +5-Bande (Abb. 102, 5 und 6). Da hier deutlich die verschiedenen Zwischenstadien sowie der ursprüngliche Primer zu sehen ist, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem γ -C18-(S)-HPMPFU-Diphosphat um eine Art Inhibitor für die HIV-RT handelt.

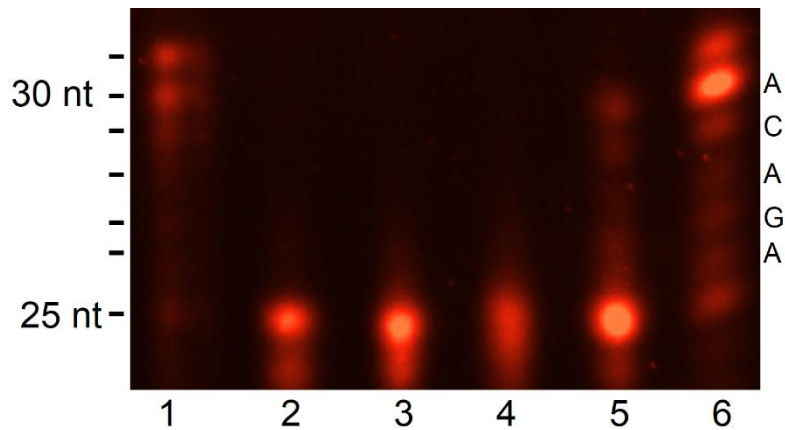


Abb. 102: *Primer Extension Assay* mit dem γ -C11-(S)-HPMPFU-DP und der HIV-RT. 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: 250 μ M γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21h**, 4: 2,5 μ M γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21h**, 5: γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21h** und alle natürlichen dNTPs im Verhältnis 1:1, 6: γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21h** und alle natürlichen dNTPs im Verhältnis 1:100.

Als Nächstes wurden die Eigenschaften der (S)-HPMPFU-Diphosphate gegenüber der humanen DNA Polymerase α untersucht. Hier wurde erwartet, dass es sich bei den (S)-HPMPFU-Diphosphaten um ein Substrat für die humane Polymerase handelt. Dies wurde vermutet, da bereits (S)-HPMPC-Diphosphat als Substrat für die humane DNA Polymerase α identifiziert werden konnte (Abb. 96) und in der Literatur auch der Einbau von FdUTP in die DNA von Tumorzellen nachgewiesen werden konnte.¹¹⁴

Diese Erwartungen konnten jedoch nicht erfüllt werden. Bei dem Assay konnte festgestellt werden, dass die getesteten (S)-HPMPFU-Diphosphate keine Substrate für die humane DNA Polymerase α sind. Im Gegenteil ähnelten die Ergebnisse eher den Untersuchungen mit der HIV-RT (Vergleich von Abb. 101 mit Abb. 103). So sind die (S)-HPMPFU-Diphosphate zwar kein Substrat für die DNA-Polymerase α , jedoch haben sie mit der Alkylmodifikation einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität der Polymerase.

Während bei dem (S)-HPMPFU kein Effekt beobachtet werden konnte, nahmen die Intensitäten der Banden bei dem γ -C11-(S)-HPMPFU-Diphosphat deutlich ab, während bei dem γ -C18-(S)-HPMPFU keine Strangverlängerung mehr beobachtet werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem γ -C18-(S)-HPMPFU-Diphosphat tatsächlich um ein Molekül handelt, welches die HIV-RT inhibiert.

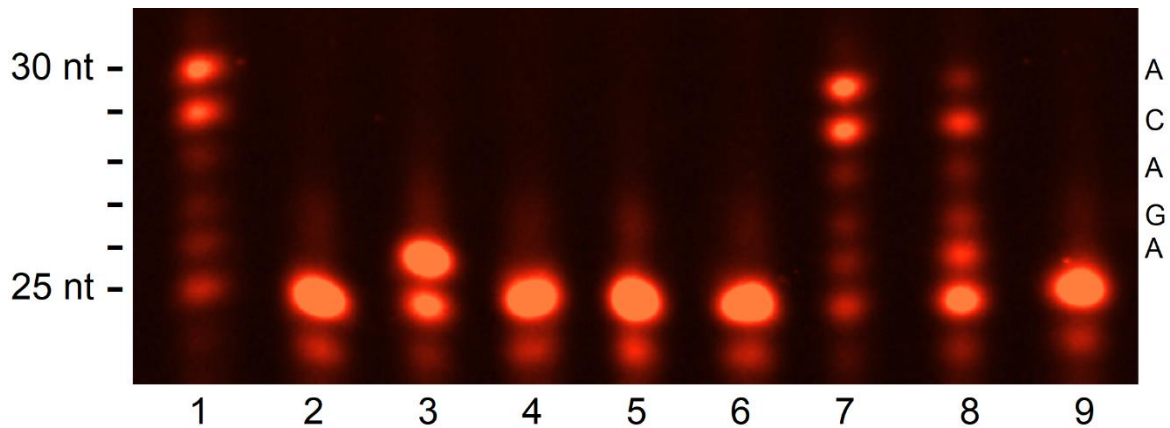


Abb. 103: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPFU-DP sowie den γ -alkylmodifizierten (S)-HPMPFU-Diphosphaten mit der DNA-Polymerase α . 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1 Kontrolle (nur dGTP), 4: (S)-HPMPFU-DP **68**, 5: γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21g**, 6: γ -C18-(S)-HPMPFU-DP **21h**, 7: (S)-HPMPFU-DP **68** und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMPFU-DP **21g** und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMPFU-DP **21h** und alle natürlichen dNTPs.

Zuletzt sollte überprüft werden, ob die verbliebenden (S)-HPMP-Diphosphate Substrate für die humane DNA-Polymerase γ sind. Die Assays wurden analog zu dem Assay mit den (S)-HPMPC-Diphosphaten durchgeführt und die Ergebnisse sind in Abb. 104 dargestellt.

Wie zu erwarten, war keines der getesteten Verbindungen ein Substrat für die humane DNA-Polymerase γ . Dies deutet auf niedrige zytotoxische Eigenschaften hin und konnte so auch in den Zellassays bestätigt werden.

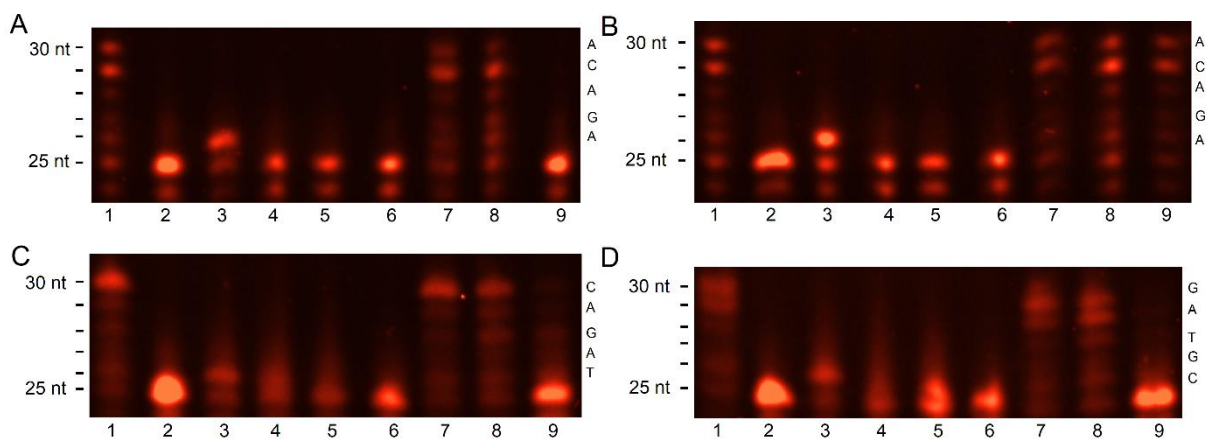


Abb. 104: *Primer Extension Assay* mit (S)-HPMPFU-Diphosphaten (A), (S)-HPMPT-Diphosphaten (B), (S)-HPMPA-Diphosphaten (C) sowie den (S)-HPMPG-Diphosphaten (D) mit der humanen DNA-Polymerase γ . 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3: +1-Kontrolle (dTTP, dATP oder dGTP), 4: (S)-HPMP-Diphosphat, 5: γ -C11-(S)-HPMP-Diphosphat, 6: γ -C18-(S)-HPMP-Diphosphat, 7: (S)-HPMP-Diphosphat und alle natürlichen dNTPs, 8: γ -C11-(S)-HPMP-Diphosphat und alle natürlichen dNTPs, 9: γ -C18-(S)-HPMP-Diphosphat und alle natürlichen dNTPs.

Es konnte jedoch bei den γ -C18-Alkylmodifizierten (S)-HPMP-Diphosphaten mit den Nucleobasen 5-FU, Adenosin sowie Guanin festgestellt werden, dass es zu keiner Strangverlängerung durch die humane DNA-Polymerase γ gekommen ist, auch wenn alle

natürlichen dNTPs vorhanden waren. Dies deutet auf einen inhibitorischen Effekt dieser Verbindungen hin. Dieser konnte so auch für das γ -C18-(S)-HPMPFU-Diphosphate bei der HIV-RT (Abb. 101) sowie der humanen DNA-Polymerase α (Abb. 103) beobachtet werden.

Ebenso konnte dieser Effekt für das γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat bei der HIV-RT (Abb. 99) festgestellt werden. Es zeigte sich, dass der Unterschied in den Alkylmodifikationen ebenso einen Unterschied in der Selektivität für die entsprechenden Polymerasen hatte. Dies konnte durch die antiviralen Daten nicht bestätigt werden, da alle HPMP-Derivate keine antivirale Aktivität gegen das HI-Virus zeigten. So wurde erwartet, dass das γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat eine gute antivirale Aktivität gegenüber dem HI-Virus bei einer geringeren Zytotoxizität zeigen würde. Dagegen müsste das entsprechende γ -C18-(S)-HPMPG-Diphosphat sowie das γ -C18-(S)-HPMPFU-Diphosphat eine höhere Zytotoxizität aufweisen, da sie die humane DNA-Polymerase γ inhibieren. Hierbei konnte über die vorhandenen antiviralen Daten nur bestätigt werden, dass das γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat potentiell weniger zytotoxisch ist, als das entsprechende γ -C18-(S)-HPMPG-Diphosphat.

6.7.4 Fazit der Untersuchungen an den (S)-HPMP-Prodrugs

Es konnten erfolgreich die fünf gewünschten (S)-HPMP-Derivate mit den Nucleobasen Cytosin, Guanin, Adenosin, Thymin sowie 5-Fluoruracil in Ausbeuten von 22 % bis 38 % über vier Stufen dargestellt werden. Weiterhin wurden von jedem Derivat zwei symmetrisch maskierte, zwei asymmetrisch maskierte sowie zwei γ -alkylmodifizierte Diphosphate bzw. deren Prodrugs synthetisiert. Für die Analyse der Substrateigenschaften in *Primer Extension Assays* konnten die entsprechenden (S)-HPMP-Diphosphate über die Methode von MOHAMADY aus den entsprechenden (S)-HPMP-Derivaten in Ausbeuten von 16 % bis 98 % dargestellt werden.

Alle Diphosphat-Prodrugs wiesen eine ausreichende bis ausgezeichnete chemische Stabilität in PBS-Puffer auf. Ebenso konnte eine enzymatische Freisetzung der eigentlich aktiven Substanzen in Zellextrakten nachgewiesen werden. Im Zuge dessen wurde festgestellt, dass es offenbar zu einer unspezifischen Bindung der Prodrugs in einem bestimmten Lipophilbereich an Proteine kommt. Dieses konnte für das humane Serum Albumin sowie in humanem Blutplasma am Beispiel von C8AB-C18-(S)-HPMPC nachgewiesen werden und deutete auf einen sogenannten *slow release* Mechanismus hin.

In den *Primer Extension Assays* konnte für alle (S)-HPMP-Derivate, die eine natürliche Nucleobase trugen, nachgewiesen werden, dass sie Substrate für die HIV-RT sind. Einzig das γ -C11-(S)-HPMPG-Diphosphat erwies sich als potenzieller Inhibitor für die HIV-RT.

Gegenüber der humanen DNA-Polymerase γ zeigte sich keine der getesteten Verbindungen als Substrat. In diesen Assays stachen die γ -C18-(S)-HPMP-Diphosphate als potenzielle Inhibitoren der humanen DNA-Polymerase γ heraus. Nur bei dem γ -C18-(S)-HPMPT-Diphosphat konnte eine vollständige Strangverlängerung beobachtet werden.

Anders als erwartet, stellten sich die (S)-HPMPFU-Diphosphate nicht als Substrat für die HIV-RT sowie den humanen Polymerasen α und γ heraus. Einzig das γ -C18-(S)-HPMPFU-Diphosphat zeigte in allen Assays einen inhibitorischen Effekt. Es wurde daher davon ausgegangen, dass alle dargestellten (S)-HPMPFU-Diphosphate keine antivirale Aktivität besitzen.

Diese Vermutung konnte durch die anti-HIV Assays, durchgeführt von der Arbeitsgruppe um Dominique Schols an der KU Leuven, für alle HPMP-Derivate bestätigt werden. Es wurde für keine der getesteten HPMP-Derivate eine antivirale Aktivität gegenüber HIV festgestellt. Jedoch konnte im gleichen Assay gezeigt werden, dass keine dieser Verbindungen als zytotoxisch angesehen werden können. Es werden weitere Assays in Leuven mit diesen Verbindungen durchgeführt. Dabei werden die antiviralen Daten gegenüber DNA-Viren sowie das SARS-CoV 2 und Influenza Viren erhoben.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Edukte und Reagenzien

Die Edukte und Reagenzien wurden von den Firmen Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Glen Research, Grüssing GmbH, Link, Technologies, Molekula, Proligo, Sigma-Aldrich, TCI, Carbosynth, Roth und VWR in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung für die Synthesen verwendet.

7.1.2 Lösungsmittel

- Acetonitril: CH_3CN [41.05 g/mol]; Sdp.: 82 °C; $\rho = 0.78 \text{ g/cm}^3$
- a) HiPerSolv CHROMANORM[®] gradient grade, for HPLC (VWR 83639.320-2.5L)
 - b) Absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt
 - c) Absolut; über Molsieb, max. 0.005% H_2O (Acros 326811000)
- Chloroform CHCl_3 [119.38 g/mol]; Sdp.: 61 °C; $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$
- AnalaR NORMAPUR ACS Reag. Ph. Eur. zur Analyse (VWR 22711. 324)
- Dichlormethan: CH_2Cl_2 [84.93 g/mol]; Sdp.: 40 °C; $\rho = 1.30 \text{ g/cm}^3$
- a) das Lösungsmittel wurde in technischer Qualität bezogen und vor der Verwendung unter Normaldruck destilliert
 - b) Absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt
- Diethylether: $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [74.12 g/mol]; Sdp.: 35 °C; $\rho = 0.71 \text{ g/cm}^3$
- Absolut, aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt.
- 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 10534341)

- DMSO: C_2H_6OS [78.13 g/mol]; Sdp.: 189 °C; $\rho = 1.10 \text{ g/cm}^3$
Absolut; über Molsieb, max. 0.005 H₂O (Acros 00002089)
- DMSO-d₆: C_2H_6OS [78.13 g/mol]; Sdp.: 189 °C; $\rho = 1.10 \text{ g/cm}^3$
Deutero (00905-10mL-s); Eurosiotop (D010FE)
- Ethylacetat: EtOAc [84.93 g/mol]; Sdp.: 77 °C; $\rho = 0.89 \text{ g/cm}^3$
Das Lösungsmittel wurde in technischer Qualität bezogen und vor der Verwendung unter Normaldruck destilliert.
- Methanol: CH_3OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C; $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$
a) Das Lösungsmittel wurde in technischer Qualität bezogen und vor der Verwendung unter Normaldruck destilliert.
b) Absolut, über Molsieb, max. 0.005 % H₂O (Acros 00004595)
- Methanol-d₃: CH_3OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C; $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$
Eurisotop (D024FE)
- Petrolether: Sdp.: 50 – 70 °C
Das Lösungsmittel wurde in technischer Qualität bezogen und vor der Verwendung unter Normaldruck destilliert.
- THF: C_4H_8O [72.11 g/mol]; Sdp.: 66 °C; $\rho = 0.89 \text{ g/cm}^3$
a) HiPerSolv CHROMANORM[®] gradient grade, for HPLC (VWR28559.320-2.5L)
b) Absolut, aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt.
- Triethylamin: $C_6H_{15}N$ [101.19 g/mol]; Sdp.: 89 °C; $\rho = 0.72 \text{ g/cm}^3$
a) Mind. 99.5%, zur Synthese (Roth X875.1-1.0L)
b) Getrocknet über Calciumhydrid
c) Mind. 99.5%, zur Synthese (Aldrich 471283)
- Pyridin: C_5H_5N [79.10 g/mol]; Sdp.: 115 °C; $\rho = 0.98 \text{ g/cm}^3$

- a) Absolut, aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt
- b) Absolut; über Molsieb, max. 0.005% H₂O (Acros 364420010)

7.1.3 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator der Firma Macherey-Nagel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄) verwendet. Die angegebenen R_f-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die UV-aktiven Verbindungen wurden mit einer UV-Lampe mit der Wellenlänge von 254 nm detektiert oder durch Benetzen einer Cer-Ammonium-Molybdat-Lösung (0.5 g Cer Ammoniumsulfat, 12 g Ammoniummolybdat, 235 mL H₂O, 15 mL konz. Schwefelsäure) und anschließender Wärmebehandlung angefärbt.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Reinigungen wurden an Kieselgel 60 M der Firma Marcherey-Nagel (0.040 – 0.063 mm, 230 – 400 mesh) als stationäre Phase durchgeführt.

Ionenaustauschchromatographie an DOWEX

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

Automatisierte reversed phase-(RP-)Chromatographie

Für die Umkehrphasenchromatographie (RP-18/RP-8) wurde der automatisierte puriFlash® der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für die RP-18 und RP-8-Chromatographie wurden Säulen von Marcherey-Nagel (Chromabond® Flash RS 40 C₁₈/C₈ 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 VI
Autosampler: 1260 Vialsampler
Detektor: 1260, Dioden Array Detector (DAD)
Analytische Säule: EC 125/3 Nukleodur 100-5 C₁₈ ec der Firma Marcherey-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 min bis 20 min: TBAA-Laufpuffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80%), von 20 min bis 30 min: isokratisch (20% Laufpuffer, 80% Acetonitril), von 30 min bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5%), von 33 min bis 38 min: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C18 ec, UV-Detektion bei den Wellenlängen von 220 nm, 260 nm oder 275 nm.

HPLC-Laufpuffer:

TBAA-Laufpuffer (2 mM): 2000 mL Reinstwasser wurden mit 10.1 mL einer 10%igen tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung in Wasser versetzt und mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.0 eingestellt.

7.1.4 Spektroskopie und Spektrometrie

Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl und Dr. Young-Joo Lee aufgenommen. Dies erfolgte an den folgenden Geräten der Firma Bruker: Avance I 400 MHz Spektrometer, Avance II 400 MHz Spektrometer, DRX 500 MHz Spektrometer und Avance III HD 600 MHz Spektrometer. Die Kalibrierung zur Ermittlung der chemischen Verschiebungen der Signale (¹H/¹³C) erfolgte mit Hilfe der Lösungsmittelsignale [CHCl₃ 7.26/77.16 (in CDCl₃); DMSO 2.50/39.52 (in DMSO-*d*₆), MeCN 1.94/118.26 (in CD₃CN), MeOH 3.31/49.00 (in CD₃OD), H₂O 4.79 (in D₂O)]. Die Verschiebungen der ³¹P-NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard von 85%iger Phosphorsäure bestimmt. Zur Zuordnung der Signale wurden

zweidimensionale Spektren (H,H-COSY, HSQC, HMBC) aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden soweit möglich als Spektren 1. Ordnung ausgewertet.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden an einem ALPHA Platinum ATIR-IR-Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. Die Messung erfolgte in einem Messbereich von 400 – 4000 cm^{-1} .

Massenspektrometrie

Die MS-Spektren wurden in der Massenspektrometrie-Abteilung des Fachbereiches Chemie der MIN-Fakultät der Universität Hamburg unter der Leitung von Dr. Maria Riedner aufgenommen. Die hochaufgelösten ESI-Massenspektren wurden an einem Agilent 6224 Accurate-Mass TOF-Spektrometer der Firma Agilent Technologies im positiven bzw. negativen Modus gemessen sowie für die 18O-Hydrolysestudien an einem Bruker maXis ESI-Q-TOF gekoppelt an eine Dionex Ultimate 3000 UPLC im Direkteinlass und negativen Modus. Die MALDI-Messungen wurden an einem MALDI TOF-TOF Bruker UltrafleXtreme Spektrometer (Smartbeam II Laser) der Firma Bruker durchgeführt. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) in Wasser/Acetonitril 1:1 (v/v) mit 10 mg/mL Ammoniumdihydrogencitrat. Nach der Kristallisation der Matrix mit der Probe wurde die Messung im linear negativen Modus vorgenommen.

7.1.5 Biochemische Methoden

7.1.5.1 Hydrolyse in *Phosphate-buffered saline* (PBS-Puffer)

Für die Hydrolysestudien in PBS-Puffer zur Beurteilung der chemischen Stabilität der Phosphonat-Diphosphat-Prodrugs bzw. der γ -alkylmodifizierten Phosphonat-Diphosphate wurde *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* der Firma gibco benutzt.

Die Hydrolysebedingungen betragen: 37°C, eine Zielkonzentration von 0.92 mM Prodrug in PBS-Puffer (50 mM, pH 7.3) mit einer finalen DMSO-Konzentration von 16%.

Das Reaktionsvolumen für die Hydrolysen betrug 610 μL (305 μL PBS-Puffer, 192.2 μL Reinstwasser, 90.6 μL DMSO sowie 22.4 μL der 25 mM Stammlösung). Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard bei 37°C im Thermomixer. Von der Reaktionslösung wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten 35 μL Aliquote entnommen und mittels HPLC analysiert (Methode A, 30 μL Injektionsvolumen).

7.1.5.2 Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakt

Das verwendete Zellextrakt wurde von D. SCHOLS, Katholieke Universiteit Leuven (Belgien), zur Verfügung gestellt.

Die Hydrolysebedingungen betragen: 37°C, eine Zielkonzentration von 0.86 mM Prodrug mit einer finalen DMSO-Konzentration von 4%.

Das Reaktionsvolumen für die Hydrolysen betrug 700 µL (176 µL Reinstwasser, 500 µL CEM/0-Zellextrakt, 24.0 µL 25 mM Stammlösung). Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard bei 37°C im Thermomixer. Von der Reaktionslösung wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten 60 µL Aliquote abgenommen, mit 120 µL eiskaltem Methanol versetzt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Aliquote wurden zentrifugiert (10 Minuten, 13.000 RPM) und anschließend über einen Spritzenfilter (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 µm) filtriert. Die so behandelten Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff gelagert bis sie mittels HPLC (Methode A, 65 µL Injektionsvolumen) analysiert wurden.

7.1.5.3 Primer Extension Assays

Die verwendeten Polymerasen wurden von der Firma Roboklon (HIV-RT, humane DNA-Polymerase β, humane DNA-Polymerase γ) sowie von der Firma ChimerX (HIV-RT, humane DNA-Polymerase α, humane DNA-Polymerase β, humane DNA-Polymerase γ) bezogen. Die Primer sowie Templates wurden von der Firma metabion bezogen.

Primer-Sequenz:

5'-Cy3-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT T-3'

A-Template-Sequenz:

5'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA ATA GAC-3'

C-Template-Sequenz:

5'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA **AG**T AGA-3'

T-Template-Sequenz:

5'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA **AAG** ACA-3'

G-Template-Sequenz:

5'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA **ACG** TAG-3'

Für das Primer/Template-*Annealing* wurden 40 µL des Primers (10 µM) mit 60 µL des entsprechenden Templates (10 µM) zusammengegeben, vermischt und kurz zentrifugiert. Die Reaktionslösung wurde anschließend im Thermocycler 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

Anschließend wurde für das *Annealing* die Temperatur über zwei Stunden auf 20°C reduziert und schließlich weitere 20 Minuten bei 20°C inkubiert.

Die finalen Konzentrationen der Reaktionsansätze sind der Tab. 7 zu entnehmen.

Die Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten (HIV-RT), 60 Minuten (humane Polymerase α sowie β) oder 120 Minuten (humane Polymerase γ) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze sieben Minuten bei 80°C denaturiert, mit 2 μ L *loading dye* versetzt und mittels denaturierender PAGE (15%ig) getrennt. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenz.

Tab. 7: Reaktionsansätze für Primer Extension Assays.

	<i>HIV-RT</i>	<i>humane</i> <i>α-Pol.</i>	<i>humane</i> <i>β-Pol.</i>	<i>humane</i> <i>γ-Pol.</i>
<i>250 μM Analyt [μL]</i>	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>Reaktionspuffer 10x [μL]</i>	1	1	1	1
<i>Hybridisierungssatz [μL]</i>	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Enzym [U]</i>	4.5	2	2	3
<i>BSA [mg/mL]</i>	/	3	3	3
<i>Glycerin [μL]</i>	/	/	1.5	/
<i>Reinstwasser [μL]</i>	6.2	5.8	4.2	5.8

7.1.6 Weitere Geräte

Gefriertrocknungsanlage

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

pH-Messgerät

Zum Einstellen des pH-Werts von Pufferlösungen wurde das pH-Messgerät ProLab 3000 der Firma Schott verwendet.

Wasseraufbereitungsanlage

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

Thermomixer

Zur Inkubation der Hydrolyselösungen wurde ein Thermomixer TS basic der Firma CellMedia verwendet.

Zentrifuge

Für Lösungen bis 50 mL wurde eine Heraeus Primo R Centrifuge der Firma Thermo Scientific bei 0 °C oder 4 °C und 8000 u/min verwendet. Zum Zentrifugieren von Volumina < 1.5 mL in Eppendorftubes wurde eine Centrifuge 5418 R der Firma Eppendorf bei 14000 u/min eingesetzt

Thermocycler

Für die *Primer Extension Assays* wurde ein Thermocycler der Firma biometra (T Professional basic Thermocycler gradient) genutzt.

7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)

7.2.1 AAV 1 Synthese von (4-Hydroxymethyl)-phenylalkanoaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.20 Äquiv. 4-Hydroxybenzylalkohol **25** in abs. THF gelöst, mit 1.00 Äquiv. abs. Triethylamin sowie 10 mol% DMAP versetzt und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde tropfenweise 1.00 Äquiv. des jeweiligen Säurechlorids gelöst in abs. THF zugegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt und filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.2 AAV 2 Synthese von Bis(4-alkanoyloxybenzyl)-phosphonaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.00 Äquiv. Des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoats in abs. Pyridin gelöst und mit 1.00 Äquiv. Diphenylphosphonat (95%ig) versetzt. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei 40°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol sowie einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.

7.2.3 AAV 3 Synthese von (4-Alkanoyloxybenzyl)-alkylphosphonaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.00 Äquiv. Diphenylphosphonat in abs. Pyridin gelöst, mit 1.00 Äquiv. des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoats versetzt und 30 Minuten bei 0°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1.40 Äquiv. des entsprechenden Alkylalkohols versetzt und zwei Stunden bei 40°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.4 AAV 4 Synthese von Cyanoethyl-alkylphosphonaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.30 Äquiv. Diphenylphosphonat in abs. Pyridin gelöst, mit 1.00 Äquiv. des entsprechenden Alkylalkohols versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.80 Äquiv. Hydroxypropionitril zugegeben und für zwei Stunden bei 40°C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.5 AAV 5 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)proyl]-Derivaten ((S)-HPMP-Vorläufer)

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.00 Äquiv. der entsprechenden Nucleobase (*N*4-Benzoylcytosin, *N*6-Benzoyladenin, 6*O*-Benzylguanin, Thymidin oder 5-Fluoruracil) in abs. DMF gelöst, mit 0.500 Äquiv. Natriumhydrid versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.00 Äquiv. (*R*)-Glycidyltritylether zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser sowie Ethylacetat aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase zweimal mit Wasser und einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.6 AAV 6 Synthese von O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonyl-methoxy-propyl]-Derivaten (Geschützte (S)-HPMP-Derivate)

Unter Stickstoff als Inertgas wurden die (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)proyl]-Derivate ((S)-HPMP-precursor) in abs. DMF gelöst, mit 2.50 Äquiv. Natriumhydrid versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2.00 Äquiv. Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxy-methanposphonat in abs. DMF zugetropft und die Reaktionslösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser sowie Ethylacetat aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase zweimal mit Wasser und einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.7 AAV 7 Spaltung von Phosphonsäurediethylestern

Unter Stickstoff als Inertgas wurde 1.00 Äquiv. des jeweilige Phosphonsäurediethylesters (geschützte (S)-HPMP-Derivate) in abs. Acetonitril gelöst und mit 3.00 Äquiv. Bromtrimethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan oder Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wurde mittels RP-Chromatographie gereinigt. Anschließend wurden die Phosphonsäure mit tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung (10%ig in Wasser) versetzt und

über RP-Chromatographie gereinigt, um das entsprechende tetra-*n*-Butylammoniumsalz zu erhalten.

7.2.8 AAV 8 Synthese von Pyrophosphaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurde 1.00 Äquiv. des jeweiligen *H*-Phosphonats unter leichtem Erwärmen (max. 40°C) in abs. Acetonitril gelöst. Es wurden 2.00 Äquiv. *N*-Chlorsuccinimid zugegeben und die Reaktionslösung für eine Stunde bei 40°C gerührt. Anschließend wurden 2.50 Äquiv. tetra-*n*-Butylammoniumphosphatsalz gelöst in Acetonitril (0.4 M) zugegeben und für eine Stunde bei 40°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit kalter wässriger Ammoniumacetatlösung (1 M) und kaltem Wasser gewaschen. Zur Phasentrennung war der Einsatz einer Zentrifuge notwendig. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Eine weitere Isolierung fand nicht statt.

7.2.9 AAV 9 Synthese von Diphosphat-Prodrugs

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.00 Äquiv. des entsprechenden Pyrophosphats in abs. Acetonitril gelöst und mit einer Lösung aus 10.0 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid und 12.0 Äquiv. Triethylamin, gelöst in abs. Acetonitril, umgesetzt. Nach zehn Minuten wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 5.00 Äquiv. Methylimidazol sowie 10.0 Äquiv. Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde zehn Minuten gerührt. Anschließend wurde tropfenweise 0.50 Äquiv. des entsprechenden Monophosphatanalogons ((*R*)-PMPA, (*S*)-HPMPA, (*S*)-HPMPC, (*S*)-HPMPT, (*S*)-HPMPG, (*S*)-HPMPFU), gelöst in abs. Acetonitril, zugegeben. Für eine bessere Löslichkeit wurden evt. 5 mL abs. THF zugegeben. Die Reaktionslösung wurde per HPLC kontrolliert und bei vollständigem Umsatz oder einem Stillstand der Reaktion die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und mittels RP-Chromatographie gereinigt.

7.2.10 AAV 10 Synthese von Diphosphaten bzw. Phosphonat-Monophosphaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurde das entsprechende Monophosphat bzw. das Phosphonat ((*R*)-PMPA, PMEA, (*S*)-HPMPA, (*S*)-HPMPC, (*S*)-HPMPT, (*S*)-HPMPG, (*S*)-HPMPFU) in abs. Acetonitril gelöst und mit 10.0 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid und 12.0 Äquiv. Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 5.0 Äquiv. Methylimidazol sowie 10.0 Äquiv. Triethylamin

versetzt. Nach zehn Minuten wurde die Reaktionslösung in einer Spritze aufgezogen und mittels einer Spritzenpumpe zu einer tetra-*n*-Butylammoniumphosphatsalzlösung (3.00 Äquiv) in Acetonitril (0.4 M) getropft (0.2 mL/min). Nach dem Zutropfen wurde der Reaktionsfortschritt mittels HPLC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz des Monophosphates bzw. Phosphonats wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in etwas Wasser (10 bis 20 mL) aufgenommen und dreimal mit Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wurde mittels RP-Chromatographie, Ionenaustausch und einer weiteren RP-Chromatographie gereinigt.

7.2.11 AAV 11 Synthese von Triphosphaten bzw. Phosphonat-Diphosphaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurde das entsprechende Monophosphat bzw. das Phosphonat ((*R*)-PMPA, PMEA, (*S*)-HPMPA, (*S*)-HPMPC, (*S*)-HPMPT, (*S*)-HPMPG, (*S*)-HPMPFU, A-ACV-MP) in abs. Acetonitril gelöst und mit 10.0 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid und 12.0 Äquiv. Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 5.00 Äquiv. Methylimidazol sowie 10.0 Äquiv. Triethylamin versetzt. Nach zehn Minuten wurde die Reaktionslösung in einer Spritze aufgezogen und mittels einer Spritzenpumpe zu einer tetra-*n*-Butylammoniumpyrophosphatsalzlösung (3.00 Äquiv) in Acetonitril getropft (0.2 mL/min). Nach dem Zutropfen wurde der Reaktionsfortschritt mittels HPLC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz des Monophosphates bzw. Phosphonats wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in etwas Wasser (10 bis 20 mL) aufgenommen und dreimal mit Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wurde mittels RP-Chromatographie, Ionenaustausch und einer weiteren RP-Chromatographie gereinigt.

7.3 Synthesen

7.3.1 Synthese der (S)-[(3-Hydroxy-2-diethylphosphonyl-methoxy)propyl]-Derivate ((S)-HPMPA, (S)-HPMPC, (S)-HPMPT, (S)-HPMPG, (S)-HPMPFU)

7.3.1.1 Synthese von (R)-Glycidyltritylether 41

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 10.0 mL (R)-Glycidol (0.151 mol, 1.00 Äquiv.) in abs. Dichlormethan gelöst und mit 42.0 mL Triethylamin (301 mmol, 2.00 Äquiv) sowie einer Spatelspitze DMAP versetzt. Anschließend wurden 50.4 g Tritylchlorid (0.181 mol, 1.20 Äquiv) gelöst in abs. Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über 16 Stunden gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und das Filtrat zweimal mit Wasser und einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 45.2 g (0.125 mol, 95%) farbloser Kristalle erhalten.

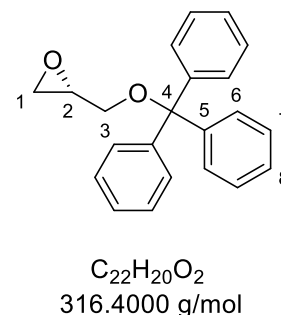
R_f-Wert: 0.21 (CH₂Cl₂/Petrhoether 2:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.52 – 7.46 (m, 6H, H-6), 7.38 – 7.29 (m, 6H, H-7'), 7.29 – 7.21 (m, 3H, H-8), 3.35 (dd, ²J_{H,H} = 2.4 Hz, ³J_{H,H} = 10.0, 1H, H-3), 3.22 – 3.06 (m, 2H, H-2, H-3'), 2.80 (dd, ³J_{H,H} = 5.1, 4.0 Hz, 1H, H-1'), 2.65 (dd, ²J_{H,H} = 2.5 Hz, ³J_{H,H} = 5.1, 1H, H-1).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 143.42 (C-5), 128.66 (C-7), 127.87 (C-6), 127.07 (C-8), 86.49 (C-4), 64.77 (C-3), 51.06 (C-2), 44.66 (C-1).

HRMS (EI⁺): m/z = ber.: 316.1463 [M]⁺ gef.: 316.0919.

IR: ν [cm⁻¹] = 3055, 3002, 2924, 2873, 1595, 1490, 1445, 1340, 1320, 1260, 1247, 1215, 1179, 1162, 1129, 1089, 1070, 1030, 989, 949, 926, 914, 901, 856, 779, 765, 742, 707, 696, 646, 631, 614, 536, 485, 428.



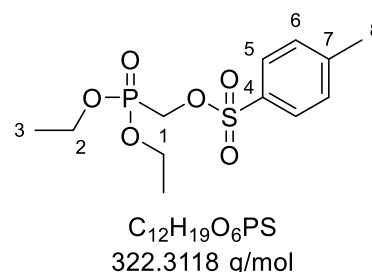
7.3.1.2 Synthese von Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxymethanphosphonat 43a

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.30 mL (8.37 mmol, 1.00 Äquiv.) Diethyl-(hydroxymethyl)-phosphonat **43** in abs. Dichlormethan gelöst und mit 1.46 mL (10.5 mmol, 1.25 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Anschließend wurden 1.75 g (9.21 mmol, 1.10 Äquiv.) Tosylchlorid gelöst in abs. Dichlormethan über 45 Minuten bei 0°C zugetropft und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und das Filtrat dreimal mit Wasser und einmal mit ges. Natriumchlorid gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 2.44 g (7.57 mmol, 90%) eines gelblichen Öls erhalten.

R_f-Wert: 0.51 (CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.87 – 7.72 (m, 2H, H-6), 7.44 – 7.30 (m, 2H, H-5), 4.17 (d, ²J_{H,P} = 10.0 Hz, 2H, H-1), 4.16 – 4.08 (m, 4H, H-2), 1.31 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 6H, H-3).



³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 15.20.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 145.54 (C-7), 131.72 (C-4), 130.02 (C-6, C-6'), 128.23 (C-5, C-5'), 63.40 (d, ²J_{C,P} = 6.4 Hz, C-2), 61.32 (d, ¹J_{C,P} = 169.0 Hz, H-1), 21.70 (C-8), 16.34 (d, ³J_{C,P} = 5.9 Hz, C-3).

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 323.0713 [M+H]⁺ gef.: 323.0619.

IR: ν [cm⁻¹] = 2985, 5934, 1597, 1477, 1444, 1367, 1325, 1258, 1189, 1175, 1095, 1055, 1017, 972, 882, 814, 802, 770, 732, 702, 380, 661, 572, 551, 509, 474, 430.

7.3.1.3 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-N4-Benzoylcytosin 40

Die Synthese wurde nach **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 5.49 g (25.3 mmol, 2.00 Äquiv.) N4-Benzoylcytosin **42** und 150 mg (6.32 mmol, 0.50 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 4.00 g (12.6 mmol, 1.00 Äquiv) (R)-Glycidyltritylether **41** zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 100:1 → 50:1).

Ausbeute: Es wurden 6.04 g (11.4 mmol, 90%) eines gelblichen Schaums erhalten.

R_f-Wert: 0.14 (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.16 (s, 1H, N-H), 8.04 – 7.97 (m, 3H, H-c, H-6), 7.66 – 7.59 (m, 1H, H-e), 7.55 – 7.50 (m, 2H, H-d), 7.46 – 7.41 (m, 6H, H-C), 7.39 – 7.32 (m, 6H, H-D), 7.30 – 7.22 (m, 4H, H-E, H-5), 5.34 (d, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 1H, OH), 4.22 (dd, ²J_{H,H} = 13.1, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-1'a), 4.04 (ddd, ³J_{H,H} = 9.5, 6.0, 3.9 Hz, 1H, H-2'), 3.59 (dd, ²J_{H,H} = 13.1, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, 1H, H-1'b), 3.03 (dd, ¹J_{H,H} = 9.3, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, H-3'b), 2.93 (dd, ³J_{H,H} = 9.3, 5.7 Hz, 1H, H-3'a).

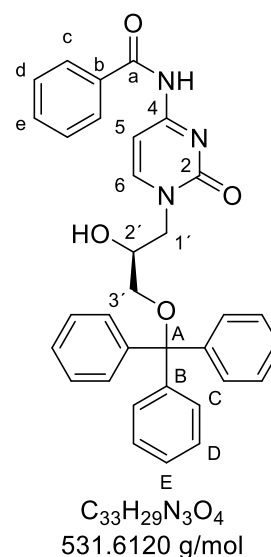
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 167.60 (C-4), 163.46 (C-a), 155.83 (C-2) 151.96 (C-6) , 144.16 (C-B), 133.12 (C-e), 128.90 (C-d), 128.87(C-c), 128.74 (C-C), 128.38 (C-D), 127.50 (C-E), 95.68 (C-A), 86.37 (C-5), 67.16 (C-2'), 66.49 (C-3'), 54.06 (C-1').

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 532.2231 [M+H]⁺ gef.: 532.2323.

IR: ν [cm⁻¹] = 3276, 3056, 3030, 2953, 2921, 2869, 2206, 2081, 2053, 2034, 1957, 1913, 1648, 1621, 1555, 1481, 1447, 1420, 1357, 1297, 1240, 1182, 1156, 1070, 1030, 1001, 897, 785, 775, 764, 746, 697, 645, 631, 610, 515, 467, 445, 434, 420.

7.3.1.4 Synthese von Mesyl-Solketal 46

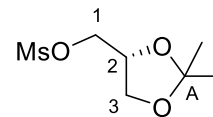
Unter Stickstoff als Innertgas wurden 2.00 mL (16.2 mmol, 1.00 Äquiv.) Solketal in abs. THF gelöst und mit 3.37 mL (24.3 mmol, 1.50 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0°C gekühlt und tropfenweise mit 2.37 mL (24.3 mmol, 1.50 Äquiv.) Mesylchlorid versetzt. Die Reaktion wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit Ethylacetat verdünnt und anschließend einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



Ausbeute: Es wurden 3.27 g (15.6 mmol, 96%) eines geblichenen Öls erhalten.

R_F-Wert: 0.75 (CH₂Cl₂/CH₃OH 19:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 4.38 – 4.21 (m, 2H, H-2, H-3a), 4.15 (dd, ¹J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 1H, H-3b), 4.04 (dd, ¹J_{H,H} = 8.6, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-1a), 3.71 (dd, ¹J_{H,H} = 8.6, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, H-1b), 3.21 (s, 3H, -CH₃ Mesyl), 1.35 (s, 3H, -CH₃), 1.29 (s, 3H, -CH₃).



¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 109.18 (C-A), 72.99 (C-1), 71.90 (C-2), 70.11 (C-3), 36.74 (-CH₃ Mesyl), 26.48 (-CH₃), 25.22 (-CH₃).

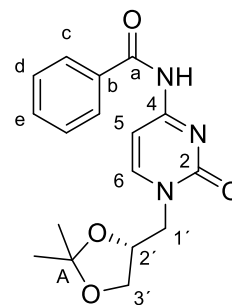
7.3.1.5 Synthese von Isopropyliden-propyl-*N*-Benzoylcytosin 45

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.04 g (9.51 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Benzoylcytosin **42** in abs. DMF gelöst und mit 228 mg (9.51 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumhydrid versetzt. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend tropfenweise mit 1.00 g (4.76 mmol, 1.00 Äquiv.) Mesyl-Solketal **46** versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei 110°C gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Etylacetat aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

Ausbeute: Es wurden 715 mg (2.17 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

R_F-Wert: 0.24 (CH₂Cl₂/CH₃OH 19:1).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.18 (s, 1H, NH), 8.09 (d, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1H, H-6), 8.01 (pseudo d, ³J = 8.2 Hz, 2H, H-c), 7.69 – 7.58 (m, 1H, H-e), 7.52 (pseudo t, ³J_{H,H} = 7.8 Hz, 2H, H-d), 7.32 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 1H, H-5), 4.41 (qd, ³J_{H,H} = 6.5, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 4.12 – 4.01 (m, 2H, H-1'a, H-3'b), 3.89 (dd, ¹J_{H,H} = 13.5, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 1H, H-1'b), 3.74 (dd, ¹J_{H,H} = 8.7, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, H-3'b), 1.36 (s, 3H, -CH₃), 1.26 (s, 3H, -CH₃).



¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 168.23 (C-a), 164.28 (C-4), 155.36 (C-2), 151.18 (C-6), 134.76 (C-b), 132.67 (C-e), 128.42 (C-d), 128.39 (C-c), 108.83 (C-A), 95.54 (C-5), 72.86 (C-2'), 65.96 (C-3'), 51.73 (C-1'), 26.54 (-CH₃), 25.15 (-CH₃).

7.3.1.6 Synthese von Propyl-*N*-Benzoylcytosin 47

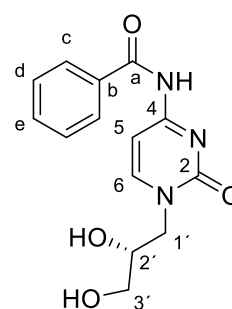
Es wurden 480 mg (146 mmol, 1.00 Äquiv.) Isopropyliden-*N*-Benzoylcytosin **45** in 20 mL eines Wasser/Methanol Gemisches (1:1) aufgenommen und mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1).

Ausbeute: Es wurden 113 mg (392 μmol, 27%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

R_F-Wert: 0.31 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.17 (s, 1H, N-H), 8.06 – 7.98 (m, 2H, H-c), 7.97 – 7.91 (m, 1H, H-6), 7.68 – 7.54 (m, 1H, H-e), 7.54 – 7.41 (m, 2H, H-d), 7.26 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-5), 5.04 (s, 1H, OH), 4.75 (s, 1H, OH), 4.15 (dd, ¹*J*_{H,H} = 13.1, ³*J*_{H,H} 3.3 Hz, 1H, H-1'a), 3.78 (q, ³*J*_{H,H} = 4.3, 3.9 Hz, 1H, H-2'), 3.52 (dd, ¹*J*_{H,H} = 13.1, ³*J*_{H,H} = 8.7 Hz, 1H, H-1'b), 3.40 (dd, ¹*J*_{H,H} = 11.1, ³*J*_{H,H} 5.2 Hz, 1H, H-3'a), 3.32 (dd, ¹*J*_{H,H} = 11.1, ³*J*_{H,H} = 10.4 Hz, 1H, H-3'b).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 162.90 (C-a), 151.52 (C-4), 148.23 (C-2), 133.30 (C-b), 132.64 (C-e), 129.21 (C-6), 128.43 (C-d), 128.39 (C-c), 95.28 (C-5), 68.61 (C-2'), 63.76 (C-3'), 53.14 (C-1').



7.3.1.7 Synthese von *O*-Trityl-(*S*)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylpropyl]-*N*4-Benzoylcytosin **39**

Die Synthese wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 3.00 g (5.62 mmol, 1.00 Äquiv.) (*S*)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-*N*4-Benzoylcytosin **40** und 0.340 g (14.1 mmol, 2.50 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 2.72 g (8.43 mmol, 1.50 Äquiv.) Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxymethanphosphonat **43a** gelöst in abs. DMF über 45 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 100:1 → 50:1).

Ausbeute: Es wurden 2.69 g (3.93 mmol, 70%) eines gelblichen Schaums erhalten.

R_F-Wert: 0.09 (CH₂Cl₂/CH₃OH 40:1).

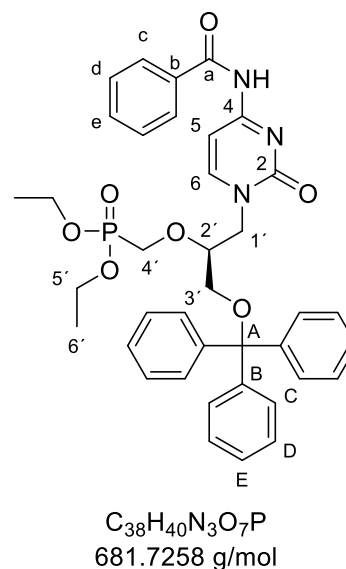
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.19 (s, 1H, NH), 8.06 – 7.94 (m, 3H, H-c, H-6), 7.66 – 7.58 (m, 1H, H-e), 7.57 – 7.47 (m, 2H, H-d), 7.46 – 7.39 (m, 6H, H-C), 7.39 – 7.32 (m, 6H, H-D), 7.31 – 7.24 (m, 4H, H-E, H-5), 4.09 – 4.03 (m, 2H, H-4'), 4.00 – 3.89 (m, 5H, H-5', H-2'), 3.86 (dd, ¹J_{H,H} = 14.0, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 1H, H-1'a), 3.74 (dd, ²J_{H,H} = 14.0, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 1H, H-1'b), 3.26 (dd, ²J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-3'a), 2.98 (dd, ²J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, H-3'b), 1.18 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 6H, H-6').

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 17.02.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 167.70 (C-a), 163.61 (C-4), 155.68 (C-2), 151.60 (C-6), 143.92 (C-B), 133.15 (C-e), 128.91 (C-c), 128.86 (C-d), 128.71 (C-D), 128.44 (C-C), 127.60 (C-E), 95.84 (C-5), 86.64 (C-A), 78.35 (d, ²J_{C,P} = 11.7 Hz, H-5'), 66.67 (C-2'), 64.09 (C-3'), 62.62 (d, ¹J_{C,P} = 118.4 Hz, C-4'), 55.39 (C-1'), 16.70 (d, ³J_{C,P} = 4.7 Hz, C-6').

HRMS (ESI): m/z = ber.: 680.2531 [M-H]⁻ gef.: 680.2309.

IR: ν [cm⁻¹] = 3144, 3057, 2955, 2922, 2869, 2270, 2216, 2034, 1965, 1661, 1622, 1557, 1484, 1447, 1419, 135, 1297, 1238, 1186, 1157, 1117, 1097, 1071, 1048, 1019, 971, 897, 764, 747, 698, 642, 631, 609, 578, 517, 471, 432, 422, 411.



7.3.1.8 Synthese von (S)-HPMPC 9

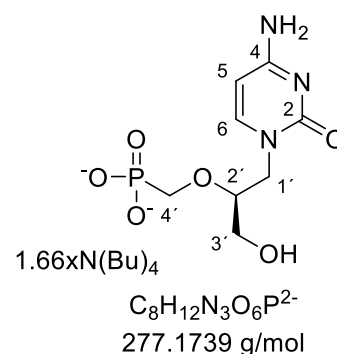
Die Synthese wurde nach **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 1.03 g (1.51 mmol, 1.00 Äquiv.) O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-N4-Benzoylcytosin **39** in abs. Acetonitril gelöst und mit 1.19 mL (9.04 mmol, 6.00 Äquiv.) Trimethylsilylbromid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie gereinigt, anschließend mit tetra-*n*-Butylammoniumhydroxyd-Lösung (10%ig in Wasser) versetzt und erneut mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 610 mg (0.80 mmol, 52%, H⁺ als Gegenionen) eines gelblichen Harzes erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 6.63 min.

¹H-NMR (600 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ [ppm]: 8.38 (d, ³*J*_{H,H} = 7.2 Hz, 1H, H-6), 8.12 (s, 1H, N-H_{2a}), 7.71 (s, 1H, N-H_{2b}), 6.49 (d, ³*J*_{H,H} = 7.2 Hz, 1H, H-5), 4.61 (q, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, 1H, H-2'), 4.30 (dt, ²*J*_{H,P} = 10.8, ³*J*_{H,H} 4.6 Hz, 2H, H-4'), 4.25 (dd, ¹*J*_{H,H} = 13.5, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 1H, H-3'a), 4.16 (dd, ¹*J*_{H,H} = 12.1, ³*J*_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, H-3'b), 4.03 – 3.96 (m, 14H, H-1'a, -CH₂-), 3.94 (dd, ¹*J*_{H,H} = 13.5, ³*J*_{H,H} = 8.1 Hz, 1H, H-1'b), 2.44 – 2.33 (m, 14H, -CH₂-), 2.11 (h, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 14H, -CH₂-), 1.73 (t, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 20H, -CH₃).



³¹P-NMR (243 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ [ppm]: 12.31.

¹³C-NMR (101 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ [ppm]: 175.50 (C-2), 165.71 (C-4), 156.62 (C-6), 102.37 (C-5), 90.38 (d, ³*J*_{C,P} = 4.1 Hz, C-2'), 78.26 (d, ¹*J*_{C,P} = 151.7 Hz, C-4'), 70.52 (C-3'), 66.99 (-CH₂-), 59.09 (C-1'), 32.56 (-CH₂-), 28.66 (-CH₂-), 22.96 (-CH₃).

HRMS (ESI): m/z = ber.: 278.0547 [M-H]⁻ gef.: 278.0558.

7.3.1.9 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-Thymin **48**

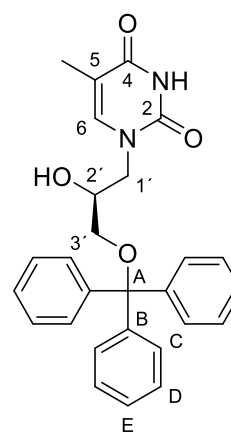
Die Synthese wurde nach **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 3.19 g (25.3 mmol, 2.00 Äquiv.) Thymin und 150 mg (6.32 mmol, 0.500 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 3.00 g (12.6 mmol, 1.00 Äquiv.) (*R*)-Glycidyltritylether **41** zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

Ausbeute: Es wurden 3.63 g (8.21 mmol, 65%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_f-Wert: 0.20 (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.20 (s, 1H, H-6), 7.45 – 7.40 (m, 6H, H-C), 7.39 – 7.31 (m, 6H, H-D), 7.31 – 7.20 (m, 3H, H-e), 5.29 (d, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 1H, O-H), 3.97 – 3.84 (m, 2H, H-1'), 3.51 – 3.43 (m, 1H, H-2'), 2.98 (dd, ¹J_{H,H} = 9.4, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, H-3'a), 2.89 (dd, ¹J_{H,H} = 9.4, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 1H, H-3'b), 1.70 (d, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 164.34 (C-4), 150.98 (C-2), 144.72 (C-B), 142.62 (C-6), 128.25 (C-D), 127.88 (C-C), 127.01 (C-E), 107.47 (C-5), 85.88 (C-A), 67.28 (C-2'), 65.83 (C-3'), 51.06 (C-1'), 11.93 (CH₃).



C₂₇H₂₆N₂O₄
442.5150 g/mol

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 443.1965 [M+H]⁺, 465.1785 [M+Na]⁺ gef.: 443.1937, 465.1768.

IR: ν [cm⁻¹] = 3387, 3174, 3056, 2926, 1661, 1488, 1469, 1447, 1383, 1350, 1220, 1182, 1154, 1062, 1032, 1001, 984, 899, 851, 763, 747, 697, 646, 631, 576, 539, 519, 464, 445, 409.

7.3.1.10 Synthese von O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-Thymin 49

Die Synthese wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 3.00 g (7.10 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-Thymin **48** und 430 mg (17.8 mmol, 2.50 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 3.43 g (10.7 mmol, 1.50 Äquiv.) Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxymethanphosphonat **43a** gelöst in abs. DMF über 45 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1 → 19:1).

Ausbeute: Es wurden 2.96 g (4.99 mmol, 70%) eines gelblichen Schaums erhalten.

R_f-Wert: 0.27 (CH₂Cl₂/CH₃OH 19:1).

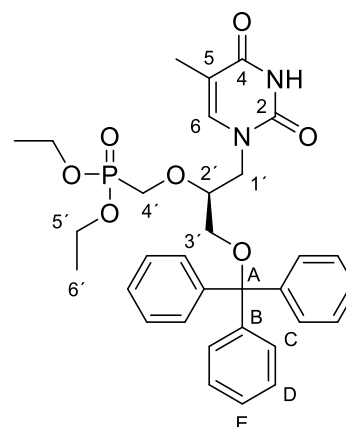
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.23 (s, 1H, N-H), 7.43 – 7.38 (m, 6H, H-C), 7.38 – 7.31 (m, 6H, H-D), 7.31 – 7.24 (m, 4H, H-E, H-6), 4.11 – 3.93 (m, 5H, H-2', H-5',), 3.92 – 3.70 (m, 4H, H-1', H-4'), 3.20 (dd, ¹J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, H-3'a), 2.94 (dd, ¹J_{H,H} = 10.7, ³J_{H,H} = 4.2 Hz, 1H, H-3'b), 1.69 (s, 3H, -CH₃), 1.19 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 6H, H-6').

³¹P-NMR (243 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 20.92.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 164.28 (C-4), 150.94 (C-2), 143.48 (C-B), 142.29 (C-6), 128.23 (C-D), 127.96 (C-C), 127.13 (C-E), 107.79 (C-5), 86.17 (C-A), 78.40 (d, ³J_{C,P} = 11.1 Hz, C-2'), 66.12 (C-3'), 63.06 (d, ¹J_{C,P} = 163.1 Hz, C-4'), 62.64 (C-1'), 61.90 – 61.52 (m, C-5'), 16.58 – 15.90 (m, C-6'), 11.94 (-CH₃).

HRMS (ESI*): m/z = ber.: 615.2231 [M+Na]⁺, gef.: 615.2234.

IR: ν [cm⁻¹] = 3155, 3057, 2983, 2929, 2816, 1676, 1597, 1533, 1489, 1465, 1448, 1386, 1367, 1224, 1160, 1019, 966, 899, 820, 764, 749, 698, 646, 631, 577, 518, 468, 408.



C₃₂H₃₇N₂O₇P
592.6288 g/mol

7.3.1.11 Synthese von (S)-HPMPT 19

Die Synthese wurde nach **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 0.860 g (1.45 mmol, 1.00 Äquiv.) O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-Thymidin **49** in abs. Acetonitril gelöst und mit 0.960 mL (7.30 mmol, 5.00 Äquiv.) Trimethylsilylbromid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 350 mg (1.18 mmol, 81%, H⁺ als Gegenionen) eines farblosen Feststoffes erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

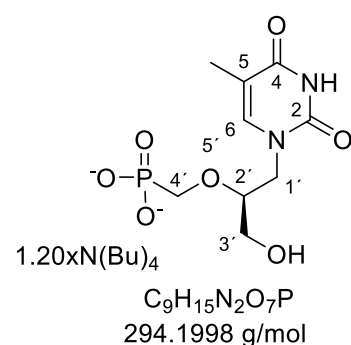
HPLC (Methode A): t_r = 6.63 min.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.21 (s, 1H, NH), 7.45 (d, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, H-6), 3.99 – 3.80 (m, 1H, H-2'), 3.57 – 3.40 (m, 3H, H-4', H-1'), 3.28 – 3.05 (m, 12H, H-3', -CH₂-), 1.75 (s, 3H, CH₃), 1.67 – 1.48 (m, 10H, -CH₂-), 1.32 (h, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 10H, -CH₂-), 0.94 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 15H, -CH₃).

³¹P-NMR (243 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.98.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 165.05 (C-4), 156.02 (C-2), 142.90 (C-5), 108.16 (C-6), 78.26 (d, ¹J_{C,P} = 151.7 Hz, C-4'), 70.52 (C-3'), 66.99 (-CH₂-), 59.09 (C-1'), 32.56 (-CH₂-), 28.66 (-CH₂-), 22.96 (-CH₃), 13.91 (-CH₃).

HRMS (ESI): m/z = ber.: 293.0544 [M-H]⁻ gef.: 293.0528.



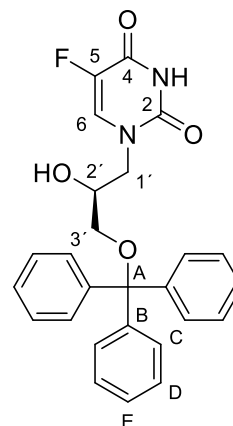
7.3.1.12 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-5-Fluoruracil 50

Die Synthese wurde nach **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 1.64 g (12.6 mmol, 2.00 Äquiv.) 5-Fluoruracil und 75.8 mg (3.16 mmol, 0.500 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 2.00 g (6.32 mmol, 1.00 Äquiv.) (*R*)-Glycidyltritylether **41** zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

Ausbeute: Es wurden 2.15 g (4.08 mmol, 76%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_F-Wert: 0.13 (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.74 (s, 1H, N-H), 7.91 (d, ³J_{H,F} = 6.8 Hz, 1H, H-6), 7.45 – 7.39 (m, 6H, H-C), 7.37 – 7.32 (m, 6H, H-D), 7.30 – 7.26 (m, 3H, H-E), 5.33 (d, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, OH), 3.99 – 3.87 (m, 2H, H-2', H-1'a), 3.48 (dd, ²J_{H,H} = 13.4, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, H-1'b), 3.00 (dd, ²J_{H,H} = 9.4, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, 1H, H-3'a), 2.89 (dd, ²J_{H,H} = 9.4, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, H-3'b)



C₂₆H₂₃FN₂O₄
446.4784 g/mol

¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: -171.10 (d, ³J_{F,H} = 7.4 Hz).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 157.93 (d, ²J_{C,F} = 25.5 Hz, C-4), 150.09 (C-2), 144.13 (C-B), 139.52 (d, ¹J_{C,F} = 227.7 Hz, C-5), 131.79 (d, ²J_{C,F} = 33.5 Hz, C-6), 128.71 (C-D), 128.37 (C-C), 127.51 (C-E), 86.39 (C-A), 67.51 (C-2'), 66.19 (C-3'), 51.88 (C-1').

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 447.1715 [M+H]⁺, ber.: 469.1537 [M+Na]⁺, gef.: 447.1708, gef.: 469.1526.

IR: ν [cm⁻¹] = 3409, 2180, 3057, 2927, 2871, 2247, 2217, 2170, 1684, 1655, 1488, 1447, 1371, 1238, 1181, 1154, 1133, 1092, 1062, 1031, 1001, 983, 897, 764, 746, 697, 666, 647, 631, 571, 538, 512, 464, 442, 408.

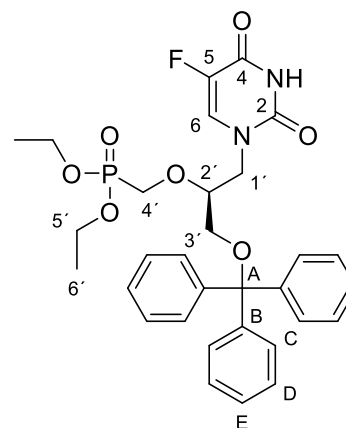
7.3.1.13 Synthese von O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-5-Fluoruracil 51

Die Synthese wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 1.00 g (2.24 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-5-Fluoruracil **50** und 134 mg (5.60 mmol, 2.50 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 1.08 g (3.36 mmol, 1.50 Äquiv.) Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxymethanphosphonat **43a** gelöst in abs. DMF über 45 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1 → 19:1).

Ausbeute: Es wurden 743 mg (1.25 mmol, 56%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_F-Wert: 0.29 (CH₂Cl₂/CH₃OH 19:1).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.77 (d, ⁴J_{H,F} = 5.2 Hz, 1H, N-H), 7.91 (d, ³J_{H,F} = 6.8 Hz, 1H, H-6), 7.42 – 7.38 (m, 6H, H-C), 7.38 – 7.33 (m, 6H, H-D), 7.32 – 7.20 (m, 3H, H-E), 4.11 – 4.03 (m, 1H, H-4'a), 4.02 – 3.93 (m, 3H, H-4'b, -CH₂-), 3.80 (dd, ¹J_{H,H} = 14.1, ³J_{H,H} 8.5 Hz, 1H, H-1'a), 3.74 (dd, ¹J_{H,H} = 14.9, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 1H, H-1'b), 3.22 (dd, ¹J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 3.6 Hz, 1H, H-3'a), 2.96 (dd, ¹J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-3'b), 1.20 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 6H, -CH₃).



C₃₁H₃₄FN₂O₇P
596.5922 g/mol

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 21.10.

¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: - 170.75 (t, ³J_{H,F} = 5.9 Hz).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 157.94 (d, ²J_{C,F} = 25.4 Hz, C-4), 150.07 (C-2), 143.92 (C-B), 139.63 (d, ¹J_{C,F} = 227.9 Hz, C-5), 131.52 (d, ²J_{C,F} = 33.4 Hz, C-6), 128.70 (C-D), 128.44 (C-C), 127.62 (C-E), 86.66 (C-A), 78.69 (d, ³J_{C,P} = 10.8 Hz, C-2'), 63.41 (d, ¹J_{C,P} = 162.5 Hz, C-4'), 62.13 (d, ²J_{C,P} = 6.1, C-5'), 49.38 (C-1'), 16.93 – 15.91 (m, C-6').

HRMS (ESI): m/z = ber.: 595.2015 [M-H]⁻, gef.: 595.1825.

IR: ν [cm⁻¹] = 3177, 3055, 2982, 2820, 1694, 1664, 1596, 1489, 1466, 1447, 1369, 1236, 1185, 1157, 1017, 968, 898, 823, 764, 747, 705, 698, 667, 647, 631, 574, 638, 515, 466, 420.

7.3.1.14 Synthese von (S)-HPMPFU 21

Die Synthese wurde nach **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 1.45 g (2.43 mmol, 1.00 Äquiv.) O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-5-Floururacil **51** in abs. Acetonitril gelöst und mit 1.60 mL (12.2 mmol, 5.00 Äquiv.) Trimethylsilylbromid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 1.03 g (1.55 mmol, 64%, 1.5xN(Bu)₄⁺ als Gegenionen) eines farblosen Harzes erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 6.91 min.

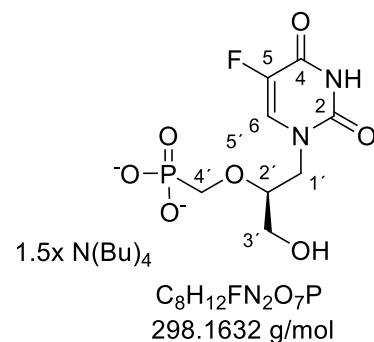
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 7.77 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.3$ Hz, 1H, H-6), 4.05 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.9$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'a), 3.90 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, 1H, H-3'b), 3.80 – 3.65 (m, 4H, H-4', H-2', H-1'a), 3.61 – 3.54 (m, 1H, H-1'b), 3.25 – 3.19 (m, 15H, $-\text{CH}_2-$), 1.71 – 1.59 (m, 15H, $-\text{CH}_2-$), 1.41 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 15H, $-\text{CH}_2-$), 1.02 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 21H, $-\text{CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 19.21.

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: -171.24 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 158.41 (C-4), 150.04 (C-2), 141.35 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 231.4$ Hz, C-5), 132.59 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.7$ Hz, C-6), 81.86 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.1$ Hz, C-2'), 66.25 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.9$ Hz C-4'), 61.87 (C-3'), 50.43 (C-1').

HRMS (ESI): m/z = ber.: 297.0293 [M-H]⁻ gef.: 297.0281.



7.3.1.15 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-6-O-Benzylguanin 57

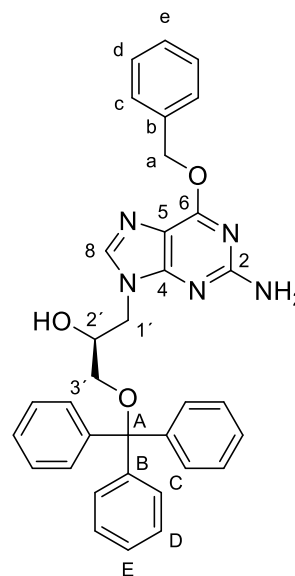
Die Synthese wurde nach **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 2.07 g (8.41 mmol, 2.00 Äquiv.) 6-O-Benzylguanin und 50.4 mg (2.10 mmol, 0.500 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 1.33 g (4.20 mmol, 1.00 Äquiv.) (*R*)-Glycidyltritylether **41** zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

Ausbeute: Es wurden 1.52 g (2.72 mmol, 65%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_F-Wert: 0.16 (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 7.74 (s, 1H, H-8), 7.55 – 7.48 (m, 2H, H-c), 7.48 – 7.37 (m, 8H, H-C. H-d), 7.48 – 7.37 (m, 7H, H-D, H-e), 7.28 – 7.18 (m, 3H, H-E), 6.38 (s, 2H, NH₂), 5.51 (s, 2H, H-a), 5.40 (d, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, OH), 4.17 – 3.98 (m, 3H, H-1', H-2'), 2.98 (dd, ¹J_{H,H} = 9.4, ¹J_{H,H} 4.7 Hz, 1H, H-3'a), 2.94 – 2.85 (m, 1H, H-3'b).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 160.42 (C-6), 159.97 (C-2), 155.01 (C-4), 144.11 (C-B), 140.90 (C-8), 137.24 (C-a, C-5), 128.92 (C-d), 128.86 (C-c), 128.75 (C-D), 128.48 (C-e), 128.32 (C-C), 127.44 (C-e), 114.05 (C-5), 86.37 (C-A), 68.20 (C-2'), 67.22 (C-a), 66.29 (C-3'), 46.81 (C-1').



C₃₄H₃₁N₅O₃
557.6540 g/mol

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 558.2500 [M+H]⁺, gef.: 558.2631.

IR: ν [cm⁻¹] = 3496, 3340, 3202, 3060, 3029, 2322, 2871, 2362, 2323, 2164, 1979, 1969, 1670, 1609, 1581, 1517, 1490, 1448, 1407, 1355, 1329, 1289, 1246, 1182, 1155, 1059, 1028, 1001, 980, 943, 919, 898, 850, 787, 760, 745, 695, 631, 573, 514, 472, 451, 427, 408.

7.3.1.16 Synthese von O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-6-O-Benzylguanin 58

Die Synthese wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 1.24 g (2.22 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-6-O-Benzylguanin **57** und 213 mg (8.89 mmol, 4.00 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 1.08 g (3.34 mmol, 1.50 Äquiv.) Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxymethanphosphonat **43a** gelöst in abs. DMF über 45 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE/CH₃OH 50:1).

Ausbeute: Es wurden 1.01 g (1.42 mmol, 64%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_f-Wert: 0.24 (EE/CH₃OH 50:1).

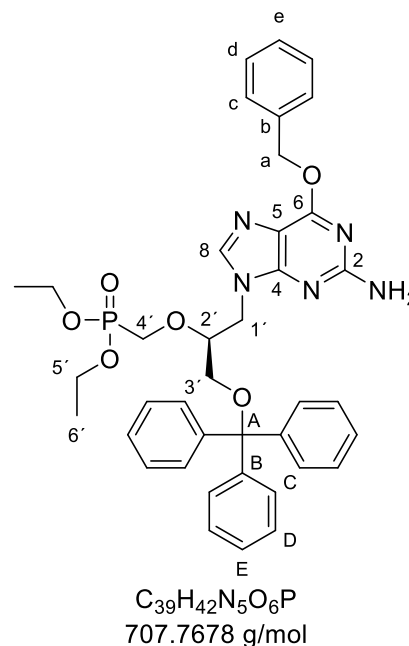
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 7.74 (s, 1H, H-8), 7.53 – 7.49 (m, 2H, H-c), 7.43 – 7.39 (m, 2H, H-d), 7.39 – 7.35 (m, 6H, H-C), 7.35 – 7.31 (m, 6H, H-D), 7.31 – 7.27 (m, 1H, H-e), 7.27 – 7.24 (m, 3H, H-E), 6.38 (s, 2H, NH₂), 5.49 (s, 2H, H-a), 4.24 (dd, ¹J_{H,H} = 14.5, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1H, H-1'a), 4.21 – 4.08 (m, 1H, H-1'b), 4.04 – 3.97 (m, 1H, H-2'), 3.97 – 3.84 (m, 4H, H-5'), 3.17 (dd, ¹J_{H,H} = 10.5, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-3'a), 2.94 (dd, ¹J_{H,H} = 10.5, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, H-3'b), 1.13 (dt, ⁴J_{H,P} = 14.0, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 6H, H-6').

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 21.77.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 160.41 (C-6), 160.06 (C-2), 154.99 (C-4), 143.84 (C-B), 140.54 (C-8), 137.20 (C-a, C-5), 128.95 (C-d), 128.86 (C-c), 128.70 (C-D), 128.39 (C-C), 128.34 (C-e), 127.56 (C-E), 86.63 (C-A), 79.25 (d, ³J_{C,P} = 12.6 Hz, C-2'), 67.23 (C-a), 63.59 (d, ¹J_{C,P} = 163.5 Hz), 62.20 (d, ²J_{C,P} = 6.2 Hz, C-5'), 43.83 (C-1'), 16.61 (d, ³J_{C,P} = 5.1 Hz, C-6').

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 708.2945 [M+H]⁺, gef.: 708.2915.

IR: ν [cm⁻¹] = 3326, 3203, 3059, 3030, 2980, 2927, 2165, 1969, 1672, 1608, 1577, 1517, 1490, 1448, 1409, 1355, 1326, 1287, 1238, 1183, 1158, 1049, 1019, 961, 900, 824, 789, 762, 746, 696, 631, 522, 474, 426.



7.3.1.17 Synthese von (S)-HPMPG 20

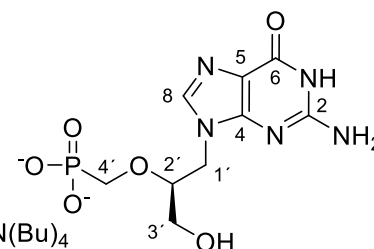
Die Synthese wurde nach **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 650 mg (918 μmol , 1.00 Äquiv.) O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-6-O-Benzylguanin **58** in abs. Acetonitril gelöst und mit 430 μL (0.367 mmol, 4.00 Äquiv.) Trimethylsilylbromid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 129 mg (405 μmol , 44%, mit H^+ als Gegenionen) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 6.49 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 7.83 (s, 1H, H-8), 2.00xN(Bu)₄, 4.25 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.18 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.77 – 3.59 (m, 5H, H-4', H-2', H-3'a), 3.44 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 3.27 – 3.16 (m, 17H, $-\text{CH}_2-$), 1.75 – 1.50 (m, 18H, $-\text{CH}_2-$), 1.42 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 18H, $-\text{CH}_2-$), 1.02 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 25H, $-\text{CH}_3$).



$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}$
319.2138 g/mol

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 15.69.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm] = 155.42 (C-6), 153.34 (C-4), 153.28 (C-2), 152.38 (C-5), 140.79 (C-8), 81.94 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 10.6 \text{ Hz}$, C-2'), 68.80 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 155.8 \text{ Hz}$, C-4'), 62.02 (C-1'), 44.67 ($-\text{CH}_2-$), 24.79 ($-\text{CH}_2-$), 20.71 ($-\text{CH}_2-$), 13.92 ($-\text{CH}_3$).

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 318.0609$ [M-H]⁻ gef.: 318.0566.

7.3.1.18 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-6-N-Benzyladenin **59**

Die Synthese wurde nach **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 7.26 g (30.3 mmol, 1.20 Äquiv.) 6-N-Benzyladenin und 303 mg (12.6 mmol, 0.50 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 8.00 g (25.3 mmol, 1.00 Äquiv.) (R)-Glycidyltritylether **41** zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50:1).

Ausbeute: Es wurden 8.92 g (16.1 mmol, 64%) eines farblosen Schaums erhalten.

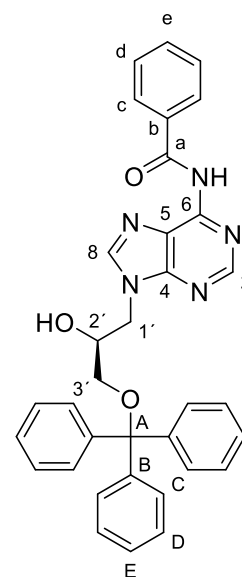
R_F-Wert: 0.09 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 11.10 (s, 1H, N-H), 8.71 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, H-2), 8.09 – 8.02 (m, 2H, H-c), 7.69 – 7.60 (m, 1H, H-e), 7.59 – 7.51 (m, 2H, H-d), 7.46 – 7.38 (m, 6H, H-C), 7.38 – 7.30 (m, 7H, H-D), 7.30 – 7.21 (m, 3H, H-E), 5.43 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 1H, OH), 4.45 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.9$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7$ Hz, 1H, H-1'a), 4.27 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 1H, H-1'b), 4.21 – 4.08 (m, 1H, H-2'), 3.06 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 9.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, 1H, H-3'a), 2.93 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 9.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, H-3'b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 165.49 (C-a), 152.62 (C-6), 151.26 (C-2), 149.88 (C-4), 145.23 (C-8), 143.63 (C-B), 133.49 (C-e), 128.42 (C-c, C-d), 128.24 (C-D), 127.87 (C-C), 127.02 (C-E), 125.25 (C-5), 86.00 (C-A), 67.75 (C-2'), 65.75 (C-3'), 46.87 (C-1').

HRMS (ESI⁺): $m/z = \text{ber.}: 555.2343$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 556.2375$.

IR: ν [cm^{-1}] = 3280, 3058, 2927, 2871, 2361, 1980, 1968, 1698, 1609, 1580, 1512, 1487, 1447, 1402, 1312, 1281, 1243, 1218, 1181, 1156, 1068, 1029, 1000, 945, 898, 797, 763, 746, 696, 643, 631, 561, 473, 427.



$\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3$
555.6380 g/mol

7.3.1.19 Synthese von (S)-[2-Hydroxy-3-(triphenylmethoxy)propyl]-6-Chlorpurin 61

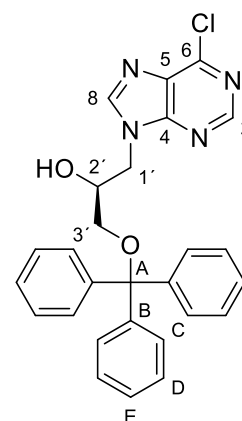
Die Synthese wurde nach **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 2.99 g (19.0 mmol, 2.00 Äquiv.) 6-Chlorpurin und 114 mg (4.74 mmol, 0.500 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 3.00 g (9.48 mmol, 1.00 Äquiv) (*R*)-Glycidyltritylether **41** zugegeben und die Reaktionslösung 16 Stunden bei 110°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50:1).

Ausbeute: Es wurden 1.85 g (3.93 mmol, 41%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_f-Wert: 0.17 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50:1).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 8.75 (s, 1H, H-2), 8.57 (s, 1H, H-8), 7.39 – 7.34 (m, 6H, H-C), 7.34 – 7.29 (m, 6H, H-D), 7.28 – 7.22 (m, 3H, H-E), 5.42 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 1H, O-H), 4.46 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.9$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, 1H, H-1'a), 4.30 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.0$, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, H-1'b), 4.20 – 4.09 (m, 1H, H-2'), 3.04 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 9.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, H-3'a), 2.88 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 9.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 1H, H-3'b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 152.15 (C-6), 151.37 (C-2), 148.79 (C-4), 148.01 (C-8), 143.54 (C-B), 130.67 (C-5), 128.20 (C-D),



$\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_2$
470.9570 g/mol

127.85 (C-C), 127.02 (C-E), 86.01 (C-A), 67.53 (C-2'), 65.64 (C-1'), 47.41 (C-3').

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 471.1582 [M+H]⁺, gef.: 471.1588.

IR: ν [cm⁻¹] = 3280, 3058, 3024, 2925, 2872, 1969, 1663, 1592, 1560, 1490, 1447, 1401, 1333, 1253, 1213, 1187, 1146, 1070, 1032, 1001, 982, 942, 899, 860, 791, 763, 747, 698, 644, 632, 585, 559, 541, 521, 473, 426.

7.3.1.20 Synthese von (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-Adenin **62**

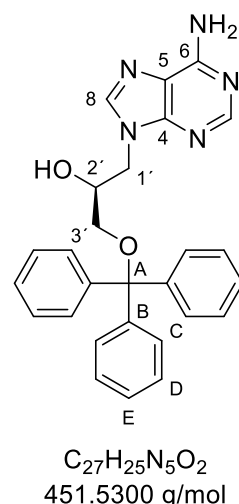
Es wurden 500 mg (1.06 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-6-Chlorpurin **61** in 6.00 mL (42.5 mmol, 40.0 Äquiv.) 7 M Ammoniak in Methanol gelöst und 48 Stunden bei 80°C unter Druck gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1 → 19:1).

Ausbeute: Es wurden 418 mg (925 μ mol, 87%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_F-Wert: 0.17 (CH₂Cl₂/CH₃OH 19:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 8.12 (s, 1H, H-2), 7.97 (s, 1H, H-8), 7.46 – 7.36 (m, 6H, H-C), 7.36 – 7.29 (m, 6H, H-D), 7.29 – 7.21 (m, 3H, H-E), 7.15 (s, 2H, N-H₂), 5.39 (d, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, 1H, O-H), 4.39 – 4.24 (m, 1H, H-3'a), 4.19 – 4.03 (m, 2H, H-3'b, 2'), 3.00 (dd, ¹J_{H,H} = 9.4, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, H-1'a), 2.90 (dd, ¹J_{H,H} = 9.4, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 1H, H-1'b).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 152.15 (C-6), 151.37 (C-2), 148.79 (C-4), 148.01 (C-8), 143.54 (C-B), 130.67 (C-5), 128.20 (C-D), 127.85 (C-C), 127.02 (C-E), 86.01 (C-A), 67.53 (C-2'), 65.64 (C-1'), 47.41 (C-3').



HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 452.2081 [M+H]⁺, gef.: 452.2088.

IR: ν [cm⁻¹] = 3310, 3156, 3058, 2922, 2140, 2029, 2018, 1955, 1643, 1594, 1511, 1475, 1447, 1415, 1358, 1324, 1299, 1242, 1203, 1155, 1066, 1031, 1001, 982, 899, 851, 797, 763, 746, 696, 645, 631, 570, 533, 473.

7.3.1.21 Synthese von O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-6-N-Benzoyladenin **63**

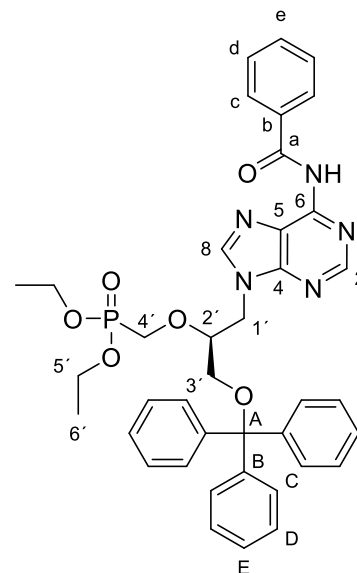
Die Synthese wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 1.50 g (2.70 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-[(2-Hydroxy-3-triphenylmethoxy)propyl]-6-N-Benzoyladenin **59** und 259 mg (10.8 mmol, 4.00 Äquiv.) Natriumhydrid in abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 1.31 g (4.05 mmol,

1.50 Äquiv.) Diethyl-*p*-toluolsulfonyloxymethanphosphonat **43a** gelöst in abs. DMF über 45 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1 → 19:1).

Ausbeute: Es wurden 1.70 g (2.10 mmol, 78%) eines farblosen Schaums erhalten.

R_F-Wert: 0.12 (CH₂Cl₂/CH₃OH 50:1).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.12 (s, 1H, N-H), 8.67 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8), 8.07 – 8.02 (m, 2H, H-c), 7.68 – 7.61 (m, 1H, H-e), 7.58 – 7.52 (m, 2H, H-d), 7.40 – 7.36 (m, 6H, H-C), 7.36 – 7.31 (m, 6H, H-D), 7.31 – 7.24 (m, 3H, H-e), 4.54 – 4.44 (m, 2H, H-4'), 4.14 – 4.08 (m, 1H, H-2'), 3.97 – 3.84 (m, 5H, H-5', H-1'a), 3.82 (dd, ¹J_{H,H} = 13.8, ³J_{H,H} = 9.2 Hz, 1H, H-1'b), 3.20 (dd, ¹J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, 1H, H-3'a), 3.01 (dd, ¹J_{H,H} = 10.6, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, H-3'b), 1.12 (dt, ⁴J_{H,P} = 15.3, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 6H, H-6').



C₃₉H₄₀N₅O₆P
705.7518 g/mol

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 20.59.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 166.31 (C-a), 153.44 (C-6), 150.74 (C-2), 149.98 (C-4), 144.87 (C-8), 143.39 (C-B), 132.33 (C-e), 128.42 (C-c, C-d), 128.18 (C-D), 127.90 (C-C), 127.09 (C-5), 86.24 (C-A), 78.63 (d, ³J_{C,P} = 12.2 Hz, C-2'), 62.98 (d, ¹J_{C,P} = 163.2 Hz, C-4'), 62.85 (C-3'), 61.70 (d, ²J_{C,P} = 10.7 Hz, C-5'), 43.83 C-1', 16.16 (t, ³J_{C,P} = 5.89 Hz, C-6').

HRMS (ESI): m/z = ber.: 704.2643 [M+H]⁺, gef.: 704.2644.

IR: ν [cm⁻¹] = 3745, 3245, 3060, 2981, 2906, 2361, 2325, 2283, 2239, 2227, 2203, 2009, 1980, 1969, 1692, 1607, 1579, 1515, 1487, 1448, 1407, 1334, 1313, 1243, 1221, 1182, 1158, 1096, 1048, 1020, 967, 898, 883, 825, 797, 764, 748, 700, 643, 631, 553, 522, 473, 426, 409.

7.3.1.22 Synthese von (S)-HPMPA 13

Die Synthese wurde nach **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 650 mg (918 μmol, 1.00 Äquiv.) O-Trityl-(S)-9-[3-hydroxy-2-diethylphosphonylmethoxypropyl]-6-O-Benzylguanin **63** in abs. Acetonitril gelöst und mit 430 μL (0.367 mmol, 4.00 Äquiv.) Trimethylsilylbromid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 129 mg (405 μmol , 44%, H^+ als Gegenionen) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

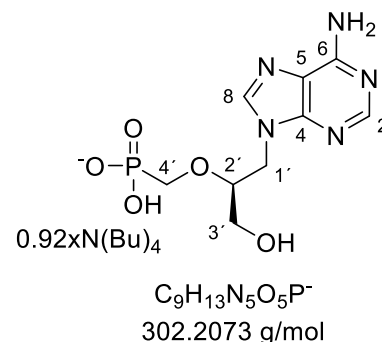
HPLC (Methode A): $t_r = 6.97 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 8.33 (s, 1H, H-2), 8.20 (s, 1H, H-8), 4.45 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.37 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.80 – 3.69 (m, 2H, H-2', H-3'a), 3.63 – 3.56 (m, 2H, H-4'), 3.49 – 3.40 (m, 1H, H-3'b), 3.27 – 3.20 (m, 8H, $-\text{CH}_2-$), 1.73 – 1.61 (m, 8H, $-\text{CH}_2-$), 1.42 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 8H, $-\text{CH}_2-$), 1.03 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 11H, $-\text{CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 14.00.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm] = 157.22 (C-4), 153.58 (C-8), 150.91 (C-6), 144.18 (C-2), 118.16 (C-5), 82.09 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.0 \text{ Hz}$, C-2'), 69.17 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 154.1 \text{ Hz}$, C-4'), 61.91 (C-3'), 59.22 ($-\text{CH}_2-$), 45.27 (C-1'), 24.79 ($-\text{CH}_2-$), 20.72 ($-\text{CH}_2-$), 13.92 ($-\text{CH}_3$).

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 318.0609 [\text{M-H}]^-$ gef.: 318.0566.



7.3.2 Synthese der maskierten *H*-Phosphonate

7.3.2.1 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylpropionat **26a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 2.51 g (20.2 mmol, 1.10 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **25**, 2.54 mL und (18.4 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin in abs. THF gelöst und mit 1.60 mL (18.4 mmol, 1.00 Äquiv.) Propionylchlorid **24a** gelöst in abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 1.74 g (9.68 mmol, 53%) eines farblosen Öls erhalten.

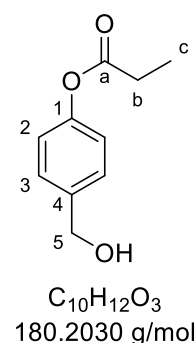
R_F-Wert: 0.13 (PE/EE 4:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.46 – 7.34 (m, 2H, H-3), 7.15 – 7.02 (m, 2H, H-2), 2.61 (q, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 2H, H-b), 1.29 (t, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 3H, H-c).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.11 (C-a), 150.15 (C-1), 138.39 (C-4), 128.07 (C-3), 121.66 (C-2), 64.74 (C-5), 27.74 (C-b), 9.07 (C-c).

IR: ν [cm⁻¹] = 3371, 2982, 2942, 2880, 1756, 1606, 1506, 1461, 1419, 1354, 1268, 1197, 1163, 1139, 1076, 1043, 1013, 982, 941, 890, 845, 805, 759, 627, 555, 499, 439, 414.

HRMS (EI⁺): m/z = ber.: 180.0786 [M]⁺, gef.: 180.0724.



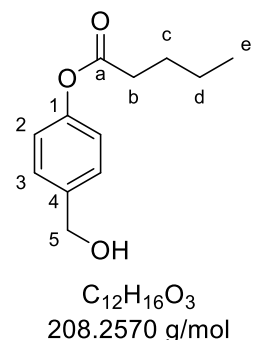
7.3.2.2 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat **26b**

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 9.02 g (34.1 mmol, 1.20 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **25**, 3.94 mL (28.4 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin und 350 mg (2.85 mmol, 10 mol%) 4-(Dimethylamino)pyridin in abs. THF gelöst und mit 3.50 mL (28.4 mmol, 1.00 Äquiv.) Pentanoylchlorid **24b** gelöst in abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 5.27 g (25.3 mmol, 89%) eines farblosen Öls erhalten.

R_F-Wert: 0.27 (PE/EE 4:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 7.38 - 7.32 (m, 2H, H-3), 7.09 - 7.01 (m, 2H, H-2), 5.20 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, O-H), 4.50 (d, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, H-5), 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-b), 1.74 (p, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-c), 1.39 (p, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-d), 0.92 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-e).



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 171.9 (C-a), 149.2 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.4 (C-5), 33.2 (C-b), 26.5 (C-c), 21.6 (C-d), 13.2 (C-e).

IR: ν [cm^{-1}] = 3328, 2955, 2914, 2847, 1747, 1605, 1509, 1463, 1410, 1386, 1330, 1312, 1291, 1272, 1252, 1217, 1165, 1150, 1101, 1034, 1014, 949, 924, 845, 817, 759, 718, 581, 511, 391.

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 231.2463, gef.: 231.0721 [M+Na]⁺.

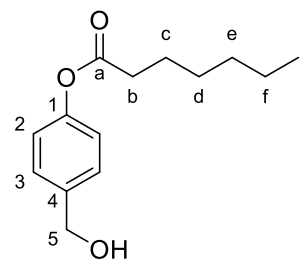
7.3.2.3 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylheptanoat 26c

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 5.00 g (40.3 mmol, 1.20 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **25**, 4.65 mL (33.6 mmol, 1.00 Äquiv.) Triethylamin und 350 mg (2.85 mmol, 10 mol%) 4-(Dimethylamino)pyridin in abs. THF gelöst und mit 5.18 mL (33.6 mmol, 1.000 Äquiv.) Heptanoylchlorid **24c** gelöst in abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 6.87 g (29.1 mmol, 72%) eines farblosen Öls erhalten.

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

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 7.43 – 7.35 (m, 2H, H-3), 7.11 – 7.05 (m, 2H, H-2), 4.70 (s, 2H, H-5), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, H-b), 1.78 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, H-c), 1.49 – 1.32 (m, 6H, H-d, H-e, H-f), 0.93 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3H, H-g).



$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$
236.3110 g/mol

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.41 (C-a), 150.20 (C-1), 138.36 (C-4), 128.06 (C-3), 121.70 (C-2), 64.80 (C-5), 34.41 (C-b), 31.44 (C-e), 28.78 (C-d), 24.91 (C-c), 22.49 (C-f), 14.02 (C-g).

IR: ν [cm^{-1}] = 3372, 2955, 2929, 2858, 1754, 1606, 1506, 1458, 1416, 1364, 1296, 1195, 1163, 1141, 1101, 1038, 1013, 916, 847, 811, 759, 726, 559, 502, 437, 413.

HRMS (EI⁺): m/z = ber.: 236.1412 [M]⁺ gef.: 236.1183.

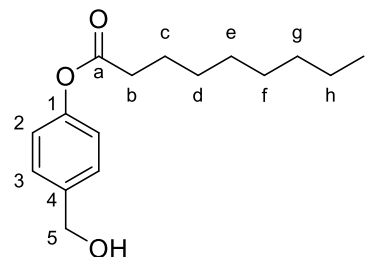
7.3.2.4 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat 26d

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 8.80 g (33.3 mmol, 1.20 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **25**, 3.84 mL (27.7 mmol, 1.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 168 mg (1.38 mmol, 10 mol%) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in abs. THF gelöst und mit 5.00 mL (27.7 mmol, 1.00 Äquiv.) Nonanoylchlorid **24d** gelöst in 10 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 6.42 g (24.3 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

R_F-Wert: 0.29 (PE/EE 4:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 7.36 - 7.31 (m, 2H, H-3), 7.07 - 7.02 (m, 2H, H-2), 5.20 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, O-H), 4.48 (d, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 2H, H-5), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-b), 1.63 (p, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, H-c), 1.41 - 1.20 (m, 10H, H-d, H-e, H-f, G-h, H-h), 0.86 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, H-i).



C₁₆H₂₄O₃
264.3650 g/mol

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.9 (C-a), 149.1 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (C-5), 33.4 (C-b), 31.2, 28.6, 28.5, 28.4, 22.0 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 24.3 (C-c), 13.9 (C-i).

IR: ν [cm⁻¹] = 3325, 2954, 2915, 2848, 1748, 1605, 1507, 1467, 1411, 1381, 1342, 1302, 1259, 1215, 1165, 1149, 1119, 1032, 1012, 950, 925, 889, 845, 817, 751, 179, 691, 580, 509.

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 265.1725 [M+H]⁺, gef.: 265.1728.

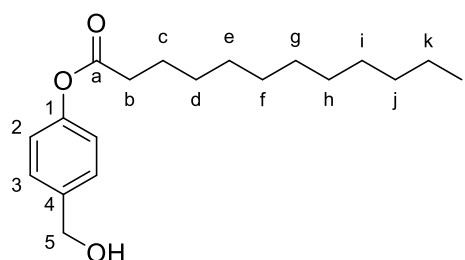
7.3.2.5 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat **26e**

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.07 g (32.8 mmol, 1.20 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **25**, 3.79 mL (27.3 mmol, 1.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 334 mg (2.73 mmol, 10 mol%) 4-(Dimethylamino)pyridin in abs. THF gelöst und mit 6.50 mL (27.3 mmol, 1.00 Äquiv.) Dodecanoylchlorid **24e** gelöst in 20 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 6.93 g (22.6 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

R_F-Wert: 0.33 (PE/EE 4:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.37 (dt, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, 2H, H-3), 7.07 (dt, ⁴J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 2H, H-2), 4.68 (s, 2H, H-5), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-b), 1.75 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-c), 1.47 - 1.35 (m, 2H, H-d) 1.35 - 1.19 (m, 14H, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 0.88 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-l).



C₁₉H₃₀O₃
306.4460

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-a), 150.3 (C-1), 138.5 (C-4), 128.2 (C-3), 121.8 (C-2), 65.0 (C-5), 34.6 (C-b), 32.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 23.8 (C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.4 (C-d), 25.1 (C-c), 14.3 (C-l).

IR: ν [cm^{-1}] = 3338, 2954, 2915, 2848, 1748, 1605, 1508, 1463, 1411, 1383, 1364, 1342, 1310, 1376, 1242, 1215, 1166, 1149, 1123, 1078, 1035, 1013, 949, 935, 846, 817, 795, 760, 719, 690, 580, 512, 417.

HRMS (EI⁺): m/z = ber.: 292.2038 [M]⁺, gef.: 292.2703.

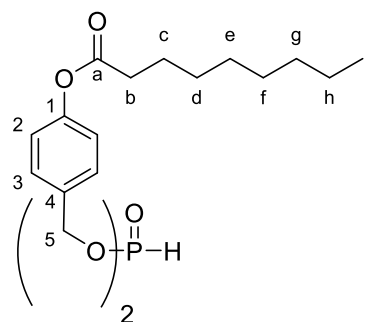
7.3.2.6 Synthese von Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat 23a

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 2.14 g (8.11 mmol, 2.20 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **26d** in abs. Pyridin gelöst und mit 0.700 mL (3.69 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.

Ausbeute: Es wurden 1.25 g (2.17 mmol, 58%) eines farblosen, kristallinen Feststoffs erhalten.

R_f-Wert: 0.67 (PE/EE 3:2).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.39 - 7.33 (m, 4H, H-2), 7.11 - 7.05 (m, 4H, H-3), 6.94 (d, ³J_{H,P} = 708 Hz, 1H, P-H), 5.10 - 4.97 (m, 4H, H-5), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, H-b), 1.75 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, H-c), 1.46 - 1.36 (m, 4H, H-d), 1.36 - 1.22 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.89 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 6H, H-i).



C₃₂H₄₇O₇P
574.6948 g/mol

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.71.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.2 (C-a), 151.0 (C-1), 132.9 (d, ³J_{C,P} = 6.0 Hz, C-4), 129.3 (C-2), 122.0 (C-3), 66.7 (d, ²J_{H,P} = 5.9 Hz, C-5), 34.4 (C-b), 31.9, 29.2, 29.1, 29.1, 22.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 24.9 (C-c), 14.1 (C-i).

IR: ν [cm^{-1}] = 2955, 2927, 2905, 2855, 1749, 1721, 1686, 1609, 1510, 1468, 1438, 1411, 1381, 1342, 1323, 1301, 1277, 1251, 1218, 1166, 1146, 1119, 1059, 1019, 996, 924, 878, 833, 769, 752, 740, 722, 693, 673, 649, 607, 581, 558, 540, 514, 482, 446, 420.

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 597.2957 [M+Na]⁺, gef.: 597.2929.

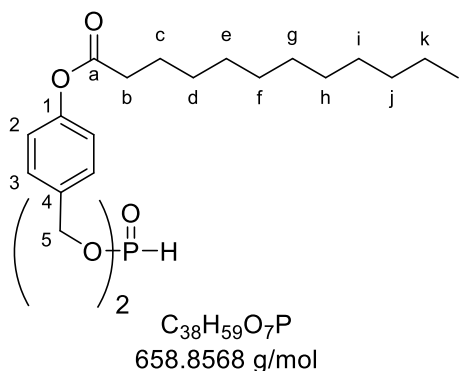
7.3.2.7 Synthese von Bis (4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat 23b

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 1.69 g (5.50 mmol, 2.20 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecanoat **26e** wurde in abs. Pyridin gelöst und mit 0.550 mL (2.75 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.

Ausbeute: Es wurden 1.04 g (1.57 mmol, 57%) eines farblosen, kristallinen Feststoffs erhalten.

R_f-Wert: 0.50 (PE/EE 2:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.40 – 7.32 (m, 4H, H-2), 7.12 – 7.04 (m, 4H, H-3), 6.94 (d, ³J_{H,P} = 709 Hz, 1H, P-H), 5.12 – 4.96 (m, 4H, H-5), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, H-b), 1.75 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, H-c), 1.47 – 1.35 (m, 4H, H-d), 1.35 – 1.19 (m, 28H, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 0.88 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 6H, H-l).



³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.70.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.3 (C-a), 151.1 (C-1), 133.1 (d, ³J_{C,P} = 6.0 Hz, C-4), 129.4 (C-2), 122.1 (C-3), 66.9 (d, ²J_{H,P} = 5.9 Hz, C-5), 34.5 (C-b), 32.1, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 25.1 (C-c), 14.3 (C-l).

IR: ν [cm⁻¹] = 2955, 2914, 2848, 1754, 1748, 1607, 1510, 1464, 1411, 1383, 1352, 1327, 1297, 1265, 1250, 1236, 1218, 1166, 1148, 1125, 1060, 997, 924, 879, 833, 769, 739, 693, 636, 581, 540, 515, 497, 451, 425, 415.

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 659.4071 [M+H]⁺, gef.: 659.3472.

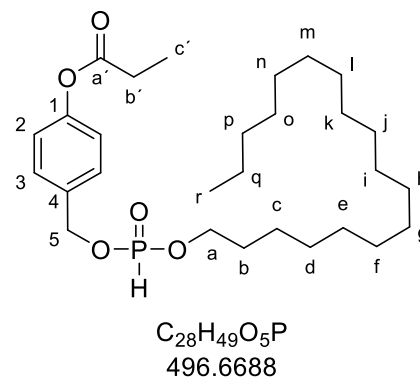
7.3.2.8 Synthese von (4-Propionyloxybenzyl)-octadecanoylphosphonat 23c

Die Synthese wurde nach **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 500 mg (2.78 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylpropionat **26a** in abs. Pyridin gelöst und mit 0.69 mL (3.61 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** versetzt. Anschließend wurden 1.35 g (5.00 mmol, 1.80 Äquiv.) 1-Octadecanol **28** zugegeben und zwei Stunden bei 40°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:2).

Ausbeute: Es wurden 0.73 g (1.48 mmol, 53%) eines farblosen Wachses erhalten.

R_f-Wert: 0.43 (PE/EE 3:2).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.42 – 7.40 (m, 2H, H-3), 7.11 – 7.08 (m, 2H, H-4), 6.87 (d, ¹J_{HP} = 700.0 Hz, 1H, H-P), 5.09 (d, ³J_{HP} = 9.5 Hz, 2H, H-1), 4.08 – 3.94 (m, 2H, H-a), 2.59 (q, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-b'), 1.72 – 1.58 (m, 2H, H-b), 1.41 – 1.18 (m, 33H, H-c', C-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-l, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 0.88 (t, ³J = 6.8 Hz, 3H, H-r).



³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.70.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.76 (C-a'), 150.97 (C-1), 129.18 (C-4), 121.65 (C-2), 66.55 (d, ²J_{C,P} = 5.4 Hz, C-a), 66.03 (d, ²J_{C,P} = 6.3 Hz, C-5), 30.39 (C-b'), 29.70, 29.81 – 29.18 (m, 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), 27.74 (C-c'), 22.70 (C-d'), 14.17 (C-r), 13.76 (C-e').

IR: ν [cm⁻¹] = 2955, 2919, 2847, 1753, 1598, 1509, 1460, 1422, 1384, 1358, 1254, 1241, 1222, 1202, 1173, 1158, 1109, 1087, 992, 903, 870, 830, 803, 770, 753, 725, 567, 551, 531, 515, 478, 446, 426, 419.

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 497:3390 [M+H]⁺, 519.3210 [M+Na]⁺, gef.: 497:3391, 519.3211.

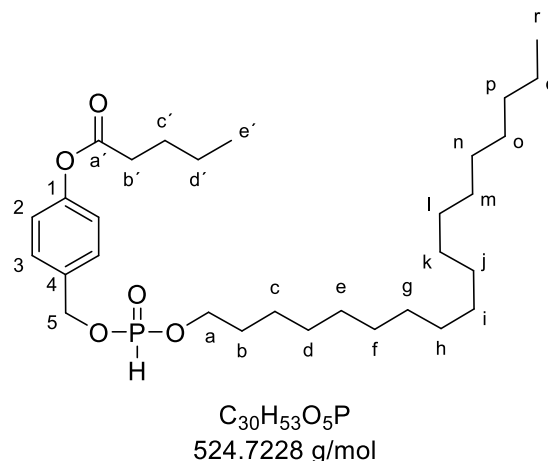
7.3.2.9 Synthese von (4-Pentynoyloxybenzyl)-octadecanoylphosphonat **23d**

Die Synthese wurde nach **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 2.00 g (9.60 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylpentanoat **26b** in abs. Pyridin gelöst und mit 1.93 mL (9.60 mmol, 1.00 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** versetzt. Anschließend wurden 3.64 g (13.4 mmol, 1.40 Äquiv.) 1-Octadecanol **28** zugegeben und zwei Stunden bei 40°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 9:1 + 2% AcOH).

Ausbeute: Es wurden 3.42 g (6.52 mmol, 68%) eines farblosen Wachses erhalten.

R_F-Wert: 0.34 (PE/EE 9:1 + 2% AcOH).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.42 – 7.40 (m, 2H, H-3), 7.11 – 7.08 (m, 2H, H-2), 6.87 (d, ¹J_{HP} = 700.0 Hz, 1H, H-P), 5.09 (d, ³J_{HP} = 9.5 Hz, 2H, H-5), 4.09 – 3.97 (m, 2H, H-a), 2.56 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-b'), 1.74 (tt, ³J = 9.2, 6.7 Hz, 2H, H-c'), 1.65 (dt, J = 14.7, 6.7 Hz, 2H, H-b), 1.45 (hd, J = 7.3, 1.1 Hz, 2H, H-d'), 1.37 – 1.21 (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), 0.97 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, H-e'), 0.88 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-r).



³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.71.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.29 (C-a'), 151.09 (C-1), 129.32 (C-3), 128.21 (C-2), 121.86 (C-4), 66.71 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-a), 66.18 (d, ²J_{CP} = 6.2 Hz, (C-5), 34.25 (C-b'), 32.08, 30.51, 29.86, 29.82, 29.80, 29.72, 29.65, 29.52, 29.26, 27.16, 22.85, 25.62 (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), 27.12 (C-c'), 22.40 (C-d'), 14.28 (C-r), 13.87 (C-e').

IR: ν [cm⁻¹] = 2955, 2918, 2871, 2847, 1753, 1607, 1508, 1460, 1414, 1381, 1352, 1317, 1248, 1234, 1219, 1203, 1170, 1145, 1105, 1085, 1022, 1003, 991, 972, 952, 896, 876, 852, 822, 752, 723, 552, 512, 477, 454, 427, 415.

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 525.7302 [M+H]⁺, 542.3969 [M+NH₄]⁺, 547.3523 [M+Na]⁺ gef.: 525.3731, 542.3961, 547.3518.

7.3.2.10 Synthese von (4-heptanoyloxybenzyl)-octadecanoylphosphon **23e**

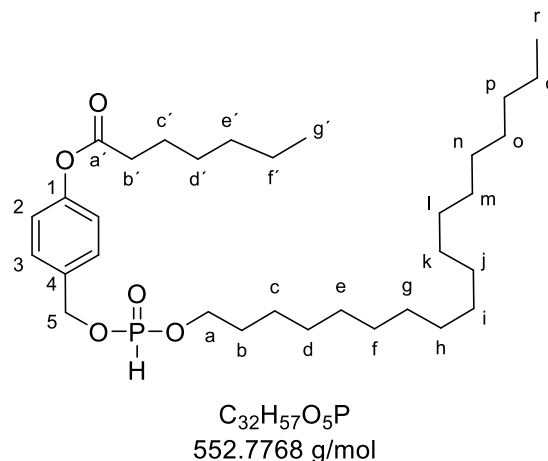
Die Synthese wurde nach **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.650 g (2.75 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylheptanoat **26c** abs. Pyridin gelöst und mit 0.680 mL (3.58 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** versetzt. Anschließend wurden 1.34 g (4.95 mmol,

1.80 Äquiv.) 1-Octadecanol **28** zugegeben und zwei Stunden bei 40°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:2).

Ausbeute: Es wurden 0.82 g (1.48 mmol, 54%) eines farblosen Wachses erhalten.

R_f-Wert: 0.51 (PE/EE 3:2).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.45 – 7.39 (m, 2H, H-3), 7.12 – 7.07 (m, 2H, H-2), 6.87 (d, ¹J_{H,P} = 700.1 Hz, 1H, P-H), 5.09 (d, ³J_{H,P} = 9.5 Hz, 2H, H-5), 4.08 – 3.94 (m, 2H, H-a), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-b'), 1.81 – 1.70 (m, 2H, H-c'), 1.70 – 1.60 (m, 2H, H-b), 1.47 – 1.36 (m, 2H, H-d'), 1.36 – 1.13 (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'), 0.95 – 0.81 (m, 6H, H-r, H-g').



³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.71.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.17 (C-a'), 150.95 (C-1), 133.19 (d, ³J_{C,P} = 5.9 Hz, C-4), 129.19 (C-3), 121.93 (C-2), 66.56 (d, ²J_{C,P} = 5.4 Hz, C-5), 66.03 (d, ²J_{C,P} = 6.1 Hz, C-a), 34.38 (C-b'), 31.93, 31.43, 30.35 (d, ³J_{C,P} = 6.3 Hz, C-b), 29.80 – 29.63 (m), 29.57, 29.49, 29.37, 29.10, 28.77, 25.46, 24.87, 22.70, 22.48, 21.06 (C-c', 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), 14.20 (C-r), 14.02 (C-g').

IR: ν [cm⁻¹] = 2956, 2919, 2870, 2847, 1754, 1509, 1460, 1384, 1249, 1235, 1219, 1204, 1171, 1146, 1110, 1086, 1023, 1003, 991, 971, 952, 927, 877, 853, 823, 724, 552, 514, 452, 428, 413.

HRMS (ESI⁺): m/z =ber.: 570.4282 [M+NH₄]⁺, 575.3836 [M+Na]⁺, gef.: 570.4268, 575.3818.

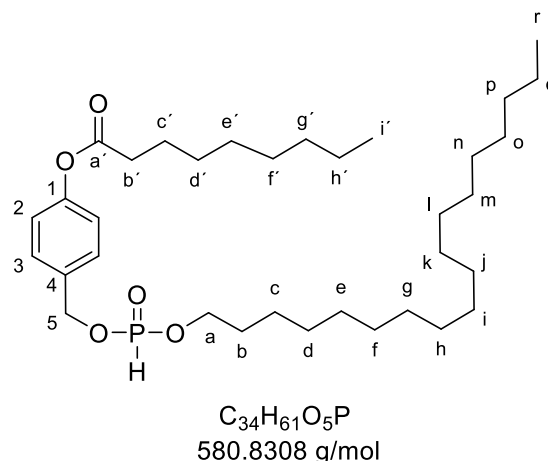
7.3.2.11 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzoyl)-octadecanoylphosphan **23f**

Die Synthese wurde nach **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.500 g (1.89 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **26d** in abs. Pyridin gelöst und mit 0.470 mL (2.46 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** versetzt. Anschließend wurden 0.920 g (3.40 mmol, 1.80 Äquiv.) 1-Octadecanol **28** zugegeben und zwei Stunden bei 40°C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 0.62 g (1.06 mmol, 56%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

R_f-Wert: 0.45 (PE/EE 2:1 v/v).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.36 – 7.32 (m, 2H, H-3), 7.04 – 7.01 (m, 2H, H-2), 6.80 (d, ¹J_{HP} = 699.8 Hz, 1H, P-H), 5.02 (d, ³J_{HP} = 9.5 Hz, 2H, H-5), 4.02 – 3.90 (m, 2H, H-a), 2.48 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-b'), 1.72 – 1.65 (m, 2H, H-c'), 1.62 – 1.54 (m, 2H, H-b), 1.34 (p, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-c'), 1.31 – 1.09 (m, 42H, 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'), 0.84 – 0.79 (m, 6H, H-r, H-i').



³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.71.

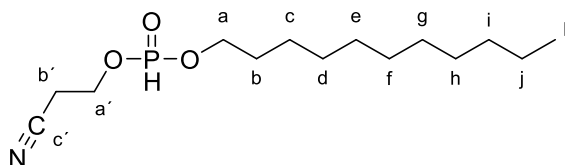
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.30 (C-a'), 151.10 (C-1), 129.32 (C-3), 122.07 (C-2), 66.70 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-5), 66.18 (d, ²J_{CP} = 6.1 Hz, C-a), 34.54 (C-b'), 32.08, 31.96, 30.53, 30.49, 29.86, 29.83, 29.82, 29.80, 29.72, 29.65, 29.52, 29.37, 29.27, 29.26, 22.85, 22.80 (C-c, C-d, C-e, 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-d', C-e', C-f, C-g', C-h'), 25.62 (C-c'), 25.07 (C-b), 14.28 (C-i'), 14.25 (C-r).

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 581.3429 [M+H]⁺, 598.4595 [M+NH₄]⁺, 603.4149 [M+Na]⁺ gef.: 581.4273, 589.4538, 603.4086.

IR: ν [cm⁻¹] = 2953, 2916, 2848, 1748, 1608, 1508, 1468, 1415, 1380, 1342, 1302, 1239, 1220, 1165, 1150, 1110, 1073, 1038, 1022, 1014, 1004, 984, 924, 880, 839, 769, 719, 552, 526, 512, 502, 482, 448, 422, 387.

7.3.2.12 Synthese von 2-Cyanoethylundecylphosphonat 23g

Die Synthese wurde nach **AAV 4** durchgeführt. Es wurde 3.00 mL (15.8 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** in abs. Pyridin gelöst und mit 2.52 mL (12.1 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Undecanol **29** versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.49 mL (21.8 mmol, 1.30 Äquiv.) 3-Hydroxypropionitril **30** zugegeben und die Reaktionslösung zwei Stunden bei 40°C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 50:1 v/v + 1% AcOH).



Ausbeute: Es wurden 2.26 g (7.81 mmol, 50%) eines farblosen Öls erhalten.

R_f-Wert: 0.5 (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v + 1% AcOH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.91 (d, ¹J_{HP} = 712.4 Hz, 1H, H-P), 4.29 (dt, ³J_{HP} = 8.8 Hz, ³J = 6.2 Hz, 2H, H-a'), 4.20 – 4.06 (m, 2H, H-b), 2.76 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, H-b'), 1.70 (dt, ³J_{HP} = 8.2 Hz, ³J = 6.5 Hz, 2H, H-a), 1.43 – 1.20 (m, 16H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.92 – 0.84 (m, 3H, H-k).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.66.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 66.78 (d, ³J_{C,P} = 6.2 Hz, C-b), 59.98 (d, ²J_{C,P} = 5.4 Hz, c-a'), 30.32 (d, ²J_{C,P} = 6.3 Hz, C-a), 31.91, 29.59, 29.55, 29.47, 29.33, 29.08, 25.43, 22.69 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 19.99 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, C-b'), 14.13 (C-k).

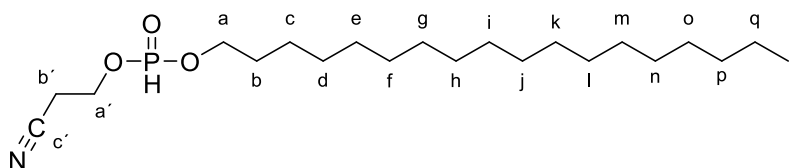
HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 290.1880 [M+H]⁺, 307.2145 [M+NH₄]⁺, 312.1699 [M+Na]⁺, gef.: 290.1924, 307.2193, 312.1745.

IR: ν [cm⁻¹] = 3296, 3044, 2924, 2853, 2447, 2258, 1710, 1605, 1594, 1552, 1528, 150, 1471, 1367, 1220, 1166, 1151, 10069, 971, 886, 829, 512, 752, 691, 517, 577, 543, 529, 508, 441, 424, 410, 386.

7.3.2.13 Synthese von 2-Cyanoethyl-octadecylphosphonat 23h

Die Synthese wurde nach **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 3.00 mL (15.8 mmol, 1.30 Äquiv.) Diphenylphosphonat **27** in abs. Pyridin gelöst und mit 3.28 g (12.1 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-Octadecanol **28** versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.49 mL (21.8 mmol, 1.80 Äquiv.) 3-Hydroxypropionitril **30** zugegeben und die Reaktionslösung zwei Stunden bei 40°C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 + 2% AcOH).

Ausbeute: Es wurden 3.72 g (9.73 mmol, 62%) eines farblosen Waxes erhalten.



R_f-Wert: 0.62 (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v + 1% AcOH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.90 (d, ¹J_{HP} = 710.2 Hz, 1H, H-P), 4.29 (dt, ³J_{HP} = 8.9 Hz, ³J = 6.2 Hz, 2H, H-a'), 4.19 – 4.06 (m, 2H, H-b), 2.77 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, H-b'), 1.70 (dt, ³J_{HP} = 8.2 Hz, ³J = 6.5 Hz, 2H, H-a), 1.42 – 1.19 (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), 0.91 – 0.86 (m, 3H, H-r).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.66.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.90 (d, ¹J_{H,P} = 710.2 Hz, 1H, H-P), 4.29 (dt, ³J_{H,P} = 8.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, H-a'), 4.19 – 4.06 (m, 2H, H-b), 2.77 (t, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, H-b'), 1.70 (dt, ³J_{H,P} = 8.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, H-a), 1.42 – 1.19 (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), 0.91 – 0.86 (m, 3H, H-r).

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 388.2975 [M+H]⁺, 405.3240 [M+NH₄]⁺, 410.2794 [M+Na]⁺ gef.: 388.3038, 405.3305, 410.2855.

IR: ν [cm⁻¹] = 3286, 3044, 2922, 2852, 2257, 1713, 1605, 1594, 1500, 1470, 1367, 1221, 1166, 1151 1069, 1050, 972, 885, 829, 813, 752, 720, 691, 917, 577, 529, 509, 449, 408.

7.3.3 Synthese der Synthese der Phosphonatmono- und diphosphate

7.3.3.1 Synthese von (*R*)-PMPA-Monophosphat 34

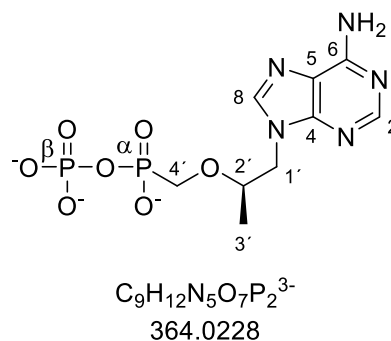
Die Synthese wurde nach **AAV 10** durchgeführt. Es wurden 50.0 mg (174 μ mol, 1.0 Äquiv.) (*R*)-PMPA **7** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 390 μ L (2.79 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 250 μ L (1.74 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 390 μ L (2.79 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 80.0 μ L (1.05 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu 1.31 mL (522 μ mol, 3.00 Äquiv.) Phosphatlösung getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 38.0 mg (90.8 μ mol, 52%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 260 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 9.15 min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 8.42 (s, 1H, H-2), 8.24 (s, 1H, H-8), 4.47 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, 1H, H-1'a), 4.32 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, 1H), 4.08 – 3.96 (m, 1H, H-2'), 3.88 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.9$, $^1J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, 1H, H-4'a), 3.75 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.9$, $^1J_{\text{H,H}} = 9.9$ Hz, 1H, H-4'b), 1.12 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 3H; H-3').



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 7.80 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.3$ Hz, P- α), -10.11 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.8$ Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 157.24 (C-4), 153.70 (C-2), 152.00 (C-6), 140.81 (C-5), 137.51 (C-8), 77.49 (C-2'), 66.48 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 154.1$ Hz, C-4'), 48.35 (C-1'), 31.11 (t, $^1J_{\text{C,P}} = 113$ Hz, CH_2), 16.63 (C-3).

HRMS (ESI): m/z = ber.: 336.0374 [$\text{M}+2\text{H}$] $^-$ gef.: 366.0354.

7.3.3.2 Synthese von (R)-PMPA-Diphosphat 35

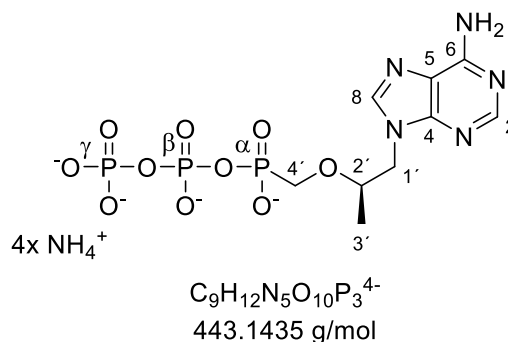
Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 50.0 mg (174 μmol , 1.00 Äquiv.) (R)-PMPA **7** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 290 μL (2.09 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 250 μL (1.74 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 240 μL (1.74 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 80.0 μL (1.05 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 471 mg (522 μmol , 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 84.0 mg (163 μmol , 94%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 10.13 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.38 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8), 4.50 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, 1H, H-1'a), 4.33 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, H-1'b), 4.13 – 4.03 (m, 1H, H-2'), 3.88 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 13.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.2$ Hz, 1H, H-4'a), 3.77 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 13.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, 1H, H-4'b), 1.19 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-3').



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.71 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.5$ Hz, P- α), -10.82 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.6$ Hz, P- γ), -23.23 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 26.5$, 19.7 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]: 157.24 (C-4), 153.70 (C-2), 152.00 (C-6), 140.81 (C-5), 137.51 (C-8), 77.49 (C-2'), 66.48 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 154.1$ Hz, C-4'), 48.35 (C-1'), 31.11 (t, $^1J_{\text{C,P}} = 113$ Hz, CH_2), 16.63 (C-3).

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 446.0037$ [$\text{M}+3\text{H}$] $^-$ gef.: 446.0001.

7.3.3.3 Synthese von Methylen-(*R*)-PMPA-Diphosphat 36

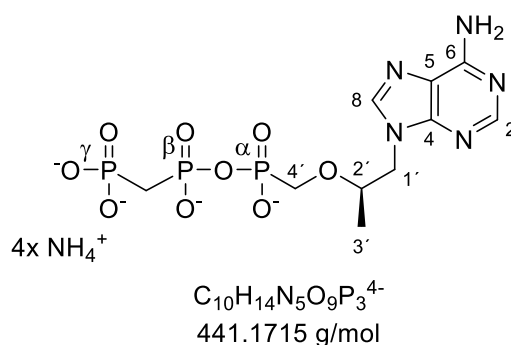
Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 100 mg (348 μmol , 1.00 Äquiv.) (*R*)-PMPA **7** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 770 μL (5.57 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 480 μL (3.48 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 770 μL (5.57 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (2.09 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu 6.27 mL einer 10%igen Methylenepyrophosphat-Lösung in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 164 mg (118 μmol , 34%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 9.97 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ [ppm]: 8.44 (s, 1H, H-2), 8.25 (s, 1H, H-8), 4.46 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.4 \text{ Hz}$, 1H), 4.32 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8 \text{ Hz}$, 1H), 4.04 – 3.94 (m, 1H; H-2'), 3.88 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.9$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6 \text{ Hz}$, 1H, H-4'a), 3.73 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.9$, $^3J_{\text{H,H}} = 10.0 \text{ Hz}$, 1H, H-4'b), 2.39 (t, $^2J_{\text{H,P}} = 20.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.14 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ [ppm]: 15.46 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 8.0 \text{ Hz}$, P- α), 8.87 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 29.1 \text{ Hz}$, P- γ), 7.74 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 28.8$, 7.9 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 157.24 (C-4), 153.70 (C-2), 152.00 (C-6), 140.81 (C-5), 137.51 (C-8), 77.49 (C-2'), 66.48 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 154.1 \text{ Hz}$, C-4'), 48.35 (C-1'), 31.11 (t, $^1J_{\text{C,P}} = 113 \text{ Hz}$, CH_2), 16.63 (C-3).

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 444.0245$ [$\text{M}+3\text{H}$] $^-$ gef.: 444.0000.

7.3.3.4 Synthese von (S)-HPMPC-Diphosphat 66

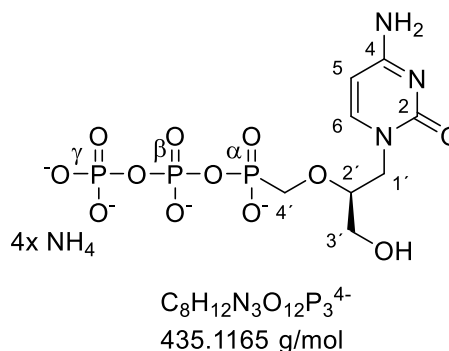
Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 120 mg (157 μmol , 1.00 Äquiv.) (S)-HPMPC **9** als Tetrabutylammoniumsalz in abs. Acetonitril gelöst und mit 260 μL (1.89 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 220 μL (1.57 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 220 μL (1.57 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 80.0 μL (1.05 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 426 mg (472 μmol , 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 73.9 mg (146 μmol , 93%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 10.95 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]: 7.77 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 6.01 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 4.10 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.2$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.99 – 3.84 (m, 2H, H-4'), 3.84 – 3.75 (m, 1H, H-1'a), 3.75 – 3.68 (m, 1H, H-2'), 3.55 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.24 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.3 \text{ Hz}$; P- α), -9.37 (d, $^2J_{\text{P,P}} J = 19.6 \text{ Hz}$; P- γ), -20.08 – -23.88 (m; P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]: 175.50 (C-2), 165.71 (C-4), 156.62 (C-6), 102.37 (C-5), 90.38 (df, $^3J_{\text{C,P}} = 4.1 \text{ Hz}$, C-2'), 78.26 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 151.7 \text{ Hz}$, C-4'), 70.52 (C-3'), 59.09 (C-1').

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 437.9874 [\text{M}+3\text{H}]^-$ gef.: 438.0001.

7.3.3.5 Synthese von (S)-HPMPT-Diphosphat 67

Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 50.0 mg (170 μmol , 1.00 Äquiv.) (S)-HPMPT **19** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 280 μL (2.04 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 240 μL (1.70 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 240 μL (1.70 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 80.0 μL (1.05 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 460 mg (472 μmol , 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 87.3 mg (167 μmol , 98%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 11.06 \text{ min}$.

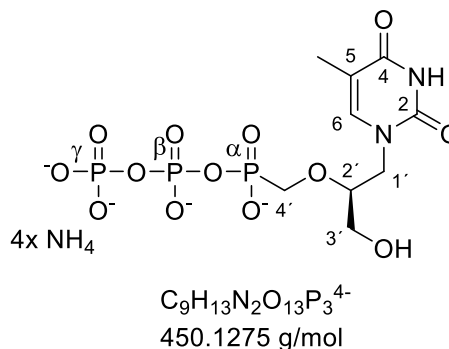
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]: 7.59 (s, 1H, H-6), 4.01 – 3.88 (m, 3H, H-4', H-3'a), 3.88 – 3.78 (m, 2H, H-3'b, H-1'a), 3.77 – 3.68 (m, 1H, H-2'), 3.55 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4 \text{ Hz}$, 1H, H1'b), 1.92 (s, 3H, -CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.30 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.4 \text{ Hz}$, P- α), -9.06 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.1 \text{ Hz}$, P- γ), -22.32 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 26.2$, 20.2 Hz , P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]: 165.05 (C-4), 156.02

(C-2), 142.90 (C-5), 108.16 (C-6), 78.26 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 151.7 \text{ Hz}$, C-4'), 70.52 (C-3'), 66.99 (-CH₂-), 59.09 (C-1'), 32.56 (-CH₂-), 28.66 (-CH₂-), 22.96 (-CH₃), 13.91 (-CH₃).

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 452.9871$ [$\text{M}+3\text{H}$]⁻ gef.: 438.0001.



7.3.3.6 Synthese von (S)-HPMPFU-Diphosphat 68

Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 87.1 mg (292 μmol , 1.00 Äquiv.) (S)-HPMPFU **21** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 490 μL (3.51 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 410 μL (2.92 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 400 μL (2.92 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 μL (1.75 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 791 mg (876 μmol , 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 114 mg (217 μmol , 74%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 10.25 \text{ min}$.

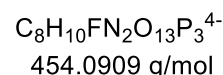
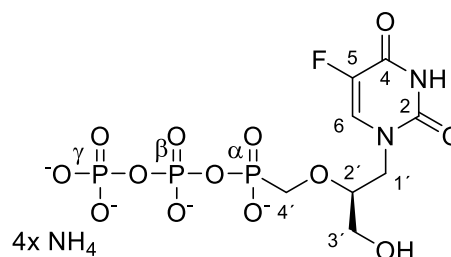
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]: 7.77 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 4.05 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.9$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.90 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 3.80 – 3.65 (m, 4H, H-4', H-2', H-1'a), 3.61 – 3.54 (m, 1H, H-1'b).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, D_2O): δ [ppm]: -170.16 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.0 \text{ Hz}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.22 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.3 \text{ Hz}$, P- α), -9.06 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.9 \text{ Hz}$, P- γ), -22.32 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 26.1$, 20.6 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ [ppm]: 158.41 (C-4), 150.04 (C-2), 141.35 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 231.4 \text{ Hz}$, C-5), 132.59 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.7 \text{ Hz}$, C-6), 81.86 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.1 \text{ Hz}$, C-2'), 66.25 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.9 \text{ Hz}$, C-4'), 61.87 (C-3'), 50.43 (C-1').

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 456.9620$ [$\text{M}+3\text{H}$] $^-$ gef.: 456.9499.



7.3.3.7 Synthese von (S)-HPMPG-Diphosphat 65

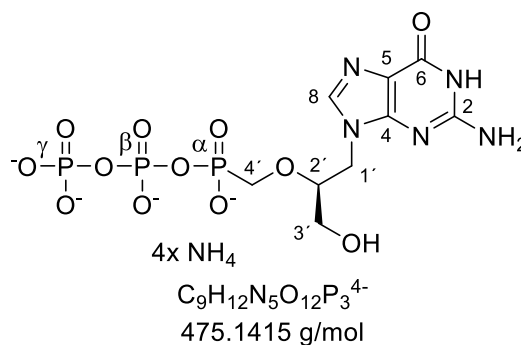
Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 130 mg (407 μmol , 1.00 Äquiv.) (S)-HPMPG **20** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 680 μL (4.88 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 560 μL (4.07 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 570 μL (4.07 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 190 μL (2.44 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 1.10 mg (1.22 mmol, 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 35.0 mg (64.0 μmol , 16%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 10.17 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 7.83 (s, 1H, H-8), 4.25 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.18 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.3$, $^3J_{\text{H,H}} = ^3J_{\text{H,H}} = 5.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.77 – 3.59 (m, 5H, H-4', H-2', H-3'a), 3.44 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 3.27 – 3.16 (m, 17H, $-\text{CH}_2-$), 1.75 – 1.50 (m, 18H, $-\text{CH}_2-$), 1.42 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 18H, $-\text{CH}_2-$), 1.02 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 25H, $-\text{CH}_3$).



$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm]: 8.31 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.9 \text{ Hz}$), -11.23 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 18.1 \text{ Hz}$), -24.2.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$): δ [ppm] = 155.42 (C-6), 153.34 (C-4), 153.28 (C-2), 152.38 (C-5), 140.79 (C-8), 81.94 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 10.6 \text{ Hz}$, C-2'), 68.80 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 155.8 \text{ Hz}$, C-4'), 62.02 (C-1'), 44.67 ($-\text{CH}_2-$), 24.79 ($-\text{CH}_2-$), 20.71 ($-\text{CH}_2-$), 13.92 ($-\text{CH}_3$).

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 477.9936 [\text{M}+3\text{H}]^-$ gef.: 477.9991.

7.3.3.8 Synthese von (S)-HPMPA-Diphosphat 64

Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 130 mg (143 μmol , 1.00 Äquiv.) (S)-HPMPA **13** als Tetrabutylammoniumsalz in abs. Acetonitril gelöst und mit 240 μL (1.72 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 200 μL (1.43 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 200 μL (1.43 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 70.0 μL (860 μmol , 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 388 mg (433 μmol , 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 531 mg (100 μmol , 70%) eines farblosen Pulvers erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 10.05 \text{ min}$.

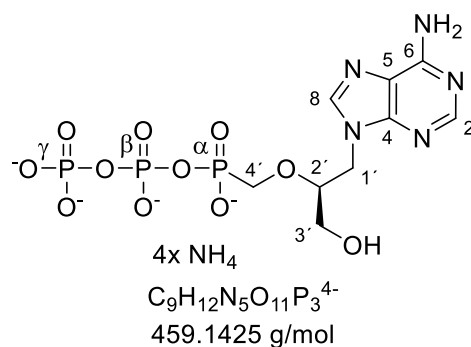
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.33 (s, 1H, H-2),

8.20 (s, 1H, H-8), 4.45 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.37 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.80 – 3.69 (m, 2H, H-2', H-3'a), 3.63 – 3.56 (m, 2H, H-4'), 3.49 – 3.40 (m, 1H, H-3'b).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]: 8.20 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.9 \text{ Hz}$), -10.63 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.6 \text{ Hz}$), -23.06.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ [ppm]: 157.22 (C-4), 153.58 (C-8), 150.91 (C-6), 144.18 (C-2), 118.16 (C-5), 82.09 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.0 \text{ Hz}$, C-2'), 69.17 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 154.1 \text{ Hz}$, C-4'), 61.91 (C-3'), 45.27 (C-1').

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 464.0132$ $[\text{M}+4\text{H}]^+$ gef.: 464.0342.



7.3.4 Synthese der (*R*)-PMPA-Diphosphatprodukts

7.3.4.1 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-(*R*)-PMPA-Diphosphat **7a**

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 200 mg (348 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** und 92.9 mg (696 μmol , 2.00 Äquiv.) N-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.18 mL (870 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 296 mg (324 μmol , 93%) eines farblosen Öls erhalten.

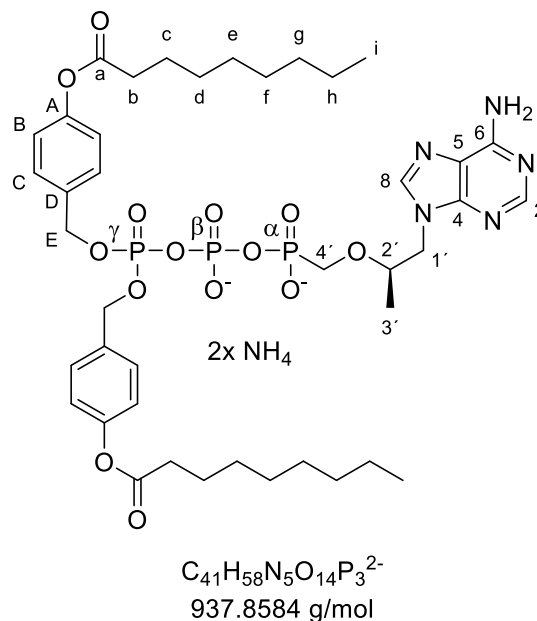
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 296 mg (324 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **22a** in abs. Acetonitril gelöst und mit 270 μL (1.95 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 230 μL (1.62 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 270 μL (1.95 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 80.0 μL (973 μmol , 3.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 97.3 mg (162 μmol , 0.500 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 51.5 mg (51.9 μmol , 32% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 260 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 17.9 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.39 (s, 1H, H-8), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.40 – 7.37 (m, 4H, H-C), 7.03 – 7.00 (m, 4H, H-B), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}}$ = 8.1 Hz, 4H, H-E), 4.41 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.5 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.2 Hz, 1H, H-1'a), 4.19 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.5 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.2 Hz, 1H, H-1'b), 3.95 – 3.80 (m, 3H, H-4', H-2'), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 4H, H-b) 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 4H, H-c), 1.46 – 1.26 (m, 10H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.97 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.3 Hz, 3H, H-3'), 0.93 – 0.89 (m, 6H, H-i).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.60 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 25.4 Hz, P- α), -13.28 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 16.9 Hz, P- γ), -23.79 (dd, $^2J_{\text{P,P}}$ = 25.7, 17.3 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.65 (C-a), 156.52 (C-A) 152.32 (C-D), 148.60 (C-6), 146.46 (C-8), 145.49 (C-2), 134.97 (C-C), 130.41 (C-B), 122.77, 76.60 (C-2'), 117.96 (C-5), 70.33 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.9 Hz, C-E), 59.71 – 59.30 (m, C-4'), 48.52 (C-1') 35.03 (C-b), 33.09, 30.76, 30.64, 30.49, 30.44, 30.19, 25.98 (C-c), 24.78, 23.75, 20.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 16.89 (C-3'), 13.93 (C-i).

HRMS (MALDI-MS): m/z = ber.: 938.3277 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 938.3350.

7.3.4.2 Synthese von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-(R)-PMPA-Diphosphat 7b

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 200 mg (348 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **23b** und 81.1 mg (607 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 1.90 mL (759 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 273 mg (274 μmol , 90%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 273 mg (274 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **22b** in abs. Acetonitril gelöst und mit 380 μL (2.74 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 190 μL (1.37 mmol, 5.00 Äquiv.)

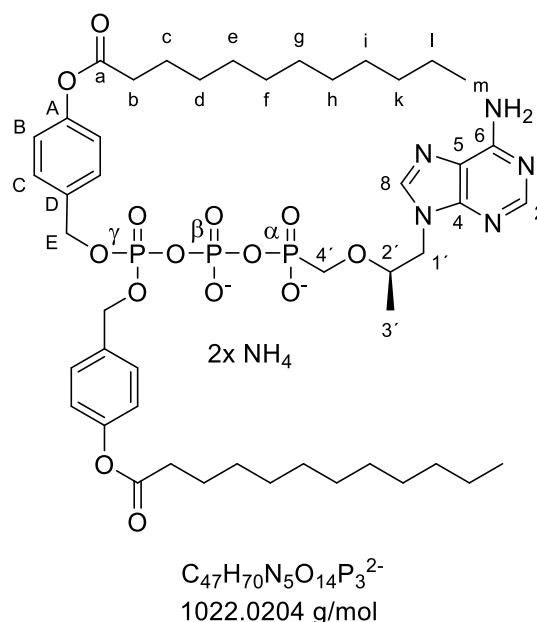
Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 380 μL (2.74 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 130 μL (1.64 μmol , 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 82.2 mg (137 μmol , 0.500 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 30.5 mg (28.3 μmol , 21% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 17.66 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.39 (s, 1H, H-8), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.40 – 7.37 (m, 4H, H-C), 7.03 – 7.00 (m, 4H, H-B), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.1 \text{ Hz}$, 4H, H-E), 4.41 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.19 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.95 – 3.80 (m, 3H, H-4', H-2'), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-b) 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-c), 1.46 – 1.26 (m, 10H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l), 0.97 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H-3'), 0.93 – 0.89 (m, 6H, H-m).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.58 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.7 \text{ Hz}$, P- α), -13.23 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.6 \text{ Hz}$, P- γ), -23.71 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.4, 17.1 \text{ Hz}$, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.65 (C-a), 156.52 (C-A) 152.32 (C-D), 148.60 (C-6), 146.46 (C-8), 145.49 (C-2), 134.97 (C-C), 130.41 (C-B), 122.77, 76.60 (C-2'), 117.96 (C-5), 70.33 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.9 \text{ Hz}$, C-E), 59.71 – 59.30 (m, C-4'), 48.52 (C-1') 35.03 (C-b), 33.09, 30.76, 30.64, 30.49, 30.44, 30.19, 25.98 (C-c), 24.78, 23.75, 20.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l), 16.89 (C-3'), 13.93 (C-m).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 1022.4216 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1022.4000$.

7.3.4.3 Synthese von (4-Propionyloxybenzyl)-octadecanoyl-(*R*)-PMPA-Diphosphat **7c**

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 500 mg (1.07 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-propionyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23c** und 284 mg (2.13 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 6.65 mL (2.66 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 871 mg (1.04 mmol, 98%) eines farblosen Öls erhalten.

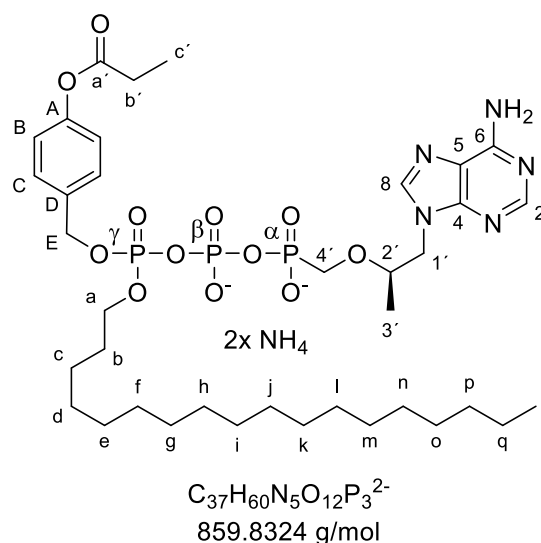
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 871 mg (1.04 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Propionyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat **22c** in abs. Acetonitril gelöst und mit 1.75 mL (12.6 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 740 µL (5.23 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 1.75 mL (12.6 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 250 µL (3.14 mmol, 3.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 284 mg (732 µmol, 0.700 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Triethylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 200 mg (223 µmol, 30% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 260 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 15.57 min.

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 8.42 (s, 1H, H-8), 8.19 (s, 1H, H-2), 7.50 – 7.45 (m, 2H, H-C), 7.10 – 7.03 (m, 2H, H-B), 5.20 (d, $^3J_{H,P}$ = 7.9 Hz, 2H, H-E), 4.41 (dd, $^1J_{H,H}$ = 14.3, $^3J_{H,H}$ = 2.9 Hz, 1H, H-1'a), 4.26 (ddd, $^1J_{H,H}$ = 14.5, $^3J_{H,H}$ = 5.3, $^4J_{H,H}$ = 1.8 Hz, 1H, H-1'b), 4.16 – 4.06 (m, 2H, H-a), 3.96 (dq, $^3J_{H,H}$ = 9.7, 6.1 Hz, 1H, H-2'), 3.90 (dd, $^2J_{H,P}$ = 12.8, $^3J_{H,H}$ = 9.5 Hz, 1H, 4'a), 3.76 (dd, $^2J_{H,P}$ = 12.8, $^3J_{H,H}$ = 9.8 Hz, 1H, H-4'b), 2.59 (q,



$^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, 2H, H-b'), 1.61 (p, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 2H, H-b), 1.34 – 1.23 (m, 30H, c), 1.21 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 3H, H-c'), 1.07 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 3H, H-3'), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, H-r).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.83 (d, $^2J_{P,P} = 25.4$ Hz, P- α), -12.81 (d, $^2J_{P,P} = 16.4$ Hz, P- γ), -23.30 (dd, $^2J_{P,P} = 25.3, 16.4$ Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 172.98 (C-a'), 152.31 (C-4) 150.80 (C-A), 149.28 (C-5), 133.63 (C-D), 130.32(C-C), 122.78 (C-B), 76.66 (C-2'), 69.73 (C-E), 69.43 (C-a), 66.18 (C-4'), 48.47 (C-1'), 33.07 (C-b'), 31.19 – 30.57 (m), 30.47, 30.30, 28.36, 26.56, 23.73 (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), 16.99 (C-r), 14.43 (C-3'), 9.31 (C-c').

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 860.3535$ [M+H]⁺, $\text{gef.}: 860.3500$.

7.3.4.4 Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(R)-PMPA-Diphosphat 7d

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (400 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23d** und 107 mg (800 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.50 mL (1.00 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 281 mg (326 μmol , 82%) eines farblosen Öls erhalten.

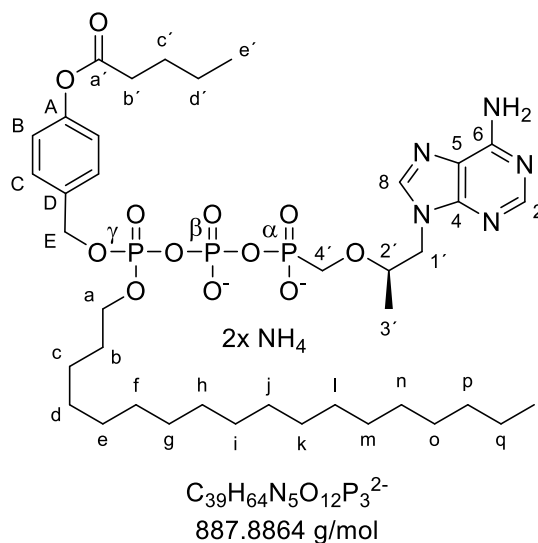
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 281 mg (326 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat **22d** in abs. Acetonitril gelöst und mit 55.0 μL (4.00 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 560 μL (4.00 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 55.0 μL (4.00 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 190 μL (2.40 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 98.0 mg (163 μmol , 0.500 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 51.2 mg (62.3 μmol , 38% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 16.24 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.43 (s, 1H, H-2), 8.23 (s, 1H, H-8), 7.52 – 7.41 (m, 2H, H-C), 7.09 – 7.00 (m, 2H, H-B), 5.20 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.43 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.22 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3 \text{ Hz}$, 1H), 4.18 – 4.06 (m, 2H, H-a), 4.01 – 3.93 (m, 1H, H-2'), 3.89 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6 \text{ Hz}$, 1H, H-4'a), 3.84 – 3.71 (m, 1H, H-4'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.71 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-c'), 1.61 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.45 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-d'), 1.37 – 1.14 (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), 1.03 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H-3'), 0.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, H-e'), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-r).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.00 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.2 \text{ Hz}$, P- α), -12.70 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.0 \text{ Hz}$, P- γ), -23.09 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.3$, 16.1 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 173.61 (C-a'), 157.43 (C-4), 152.32 (C-A), 140.32 (C-5), 135.10 (C-D), 130.29 (C-C), 122.82 (C-B), 76.76 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 13.0 \text{ Hz}$, C-E), 70.03 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 52.4$, $^4J_{\text{C,P}} = 5.9 \text{ Hz}$, C-a), 66.53 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 161.6 \text{ Hz}$, C-4'), 34.76, 33.08, 31.24 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, C-2'), 31.01 – 30.50 (m), 30.47, 30.29, 28.08, 23.25 (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), 16.99 (C-r), 14.44 (C-3'), 14.10 (C-e').

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 888.3848 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 888.3900$.

7.3.4.5 Synthese von (4-Heptanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(*R*)-PMPA-Diphosphat 7e

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 600 mg (1.09 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Heptanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23e** und 290 mg (2.17 mmol, 2.00 Äquiv.) N-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 6.78 mL (2.71 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 938 mg (1.04 mmol, 96%) eines farblosen Öls erhalten.

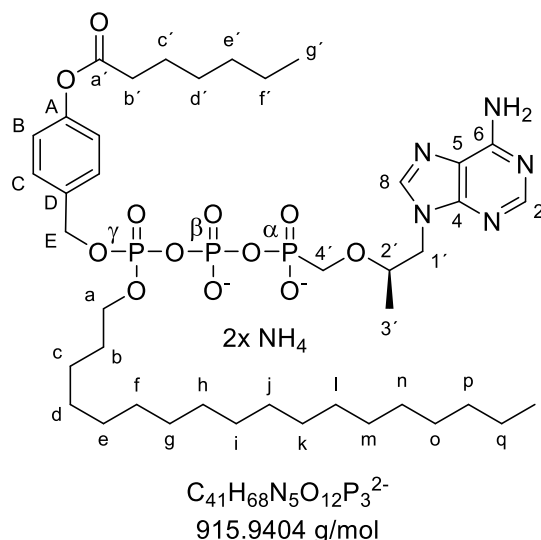
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 938 mg (1.04 mmol, 1.00 Äquiv.) (4-Heptanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat **22e** in abs. Acetonitril gelöst und mit 1.74 mL (12.5 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 730 μ L (5.21 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 1.74 mL (12.5 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 250 μ L (3.13 mmol, 3.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 284 mg (730 μ mol, 0.700 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Triethylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 56.5 mg (59.3 μ mol, 8% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 260 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 16.97 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.43 (s, 1H, H-2), 8.23 (s, 1H, H-8), 7.52 – 7.41 (m, 2H, H-C), 7.09 – 7.00 (m, 2H, H-B), 5.20 (d, $^3J_{\text{H,P}}$ = 8.1 Hz, 2H, H-E), 4.43 (dd, $^1J_{\text{H,H}}$ = 14.5, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.2 Hz, 1H, H-1'a), 4.22 (dd, $^1J_{\text{H,H}}$ = 14.5, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.3 Hz, 1H), 4.18 – 4.06 (m, 2H, H-a), 4.01 – 3.93 (m, 1H, H-2'), 3.89 (dd, $^2J_{\text{H,P}}$ = 12.8, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.6 Hz, 1H, H-4'a), 3.84 – 3.71 (m, 1H, H-4'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 2H, H-b'), 1.71 (p, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 2H, H-c'), 1.61 (p, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.5 Hz, 2H, H-b), 1.45 (h, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 2H, H-d'), 1.37 – 1.14 (m, 32H, 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 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.2 Hz, 3H, H-3'), 0.98 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 3H, H-g'), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 3H, H-r).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.51 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 24.9 Hz, P- α), -13.06 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 17.4 Hz, P- γ), -23.74 (dd, $^2J_{\text{P,P}}$ = 25.2, 16.8 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.61 (C-a'), 157.43 (C-4), 152.32 (C-A), 140.32 (C-5), 135.10 (C-D), 130.29 (C-C), 122.82 (C-B), 76.76 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 13.0 Hz, C-E), 70.03 (dd,

$^2J_{C,P} = 52.4$, $^4J_{C,P} = 5.9$ Hz, C-a), 66.53 (d, $^1J_{C,P} = 161.6$ Hz, C-4'), 34.76, 33.08, 31.24 (d, $J = 7.4$ Hz, C-2'), 31.01 – 30.50 (m), 30.47, 30.29, 28.08, 23.25 (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-e', C-f'), 16.99 (C-r), 14.44 (C-3'), 14.10 (C-g').

HRMS (ESI): m/z = ber.: 916.4161 [M+H]⁺, gef.: 916.3996.

7.3.4.6 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(R)-PMPA-Diphosphat 7f

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (362 μ mol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23f** und 96.6 mg (723 μ mol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.26 mL (904 μ mol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 309 mg (336 μ mol, 93%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 309 mg (336 μ mol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat **22f** in abs. Acetonitril gelöst und mit 280 μ L (2.02 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 240 μ L (1.68 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 280 μ L (2.02 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 80.0 μ L (1.01 mmol, 3.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 101 mg (168 μ mol, 0.500 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 56.2 mg (56.3 μmol , 33% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 21.8 \text{ min}$.

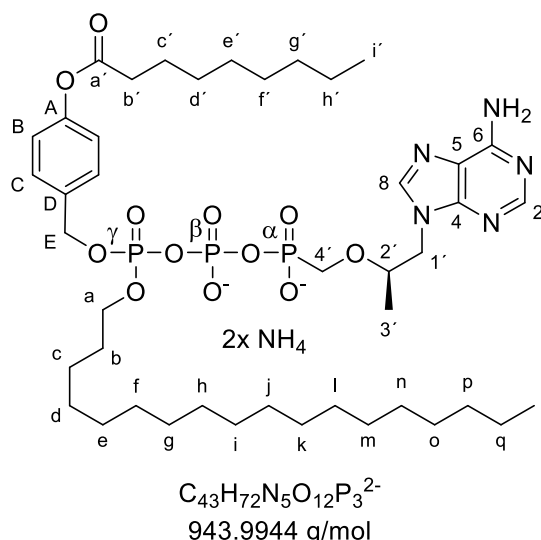
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.42 (s, 1H, H-2), 8.22 (s, 1H, H-8), 7.47 – 7.44 (m, 2H, H-C), 7.06 – 7.03 (m, 2H, H-B), 5.19 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.42 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.22 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 4.15 – 4.04 (m, 2H, H-a), 3.98 – 3.93 (m, 1H, H-2'), 3.90 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$

Hz, 1H, H-4'a), 3.82 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.8 \text{ Hz}$, 1H, H-4'b), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.77 – 1.67 (m, 2H, H-c'), 1.60 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.44 – 1.19 (m, 36H, 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-f'), 0.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H-3'), 0.94 – 0.85 (m, 6H, H-r, H-i').

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.00 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.3 \text{ Hz}$, P- α), -12.56 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.0 \text{ Hz}$, P- γ), -23.04 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.2$, 15.2 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.61 (C-a'), 157.43 (C-4), 152.32 (C-A), 140.32 (C-5), 135.10 (C-D), 130.29 (C-C), 122.82 (C-B), 76.76 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 13.0 \text{ Hz}$, C-E), 70.03 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 52.4$, $^4J_{\text{C,P}} = 5.9 \text{ Hz}$, C-a), 66.53 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 161.6 \text{ Hz}$, C-4'), 34.76, 33.08, 31.24 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, C-2'), 31.01 – 30.50 (m), 30.47, 30.29, 28.08, 23.25 (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-e', C-f', C-g', C-h'), 16.99 (C-r), 14.44 (C-3'), 14.10 (C-i').

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 944.4474 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 944.4000$.



7.3.4.7 Synthese von γ -Undecanoyl-(*R*)-PMPA-Diphosphat 7g

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 110 mg (380 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-phosphonat **23g** und 102 mg (760 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.38 mL (950 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 184 mg (294 μmol , 77%) eines farblosen Öls erhalten.

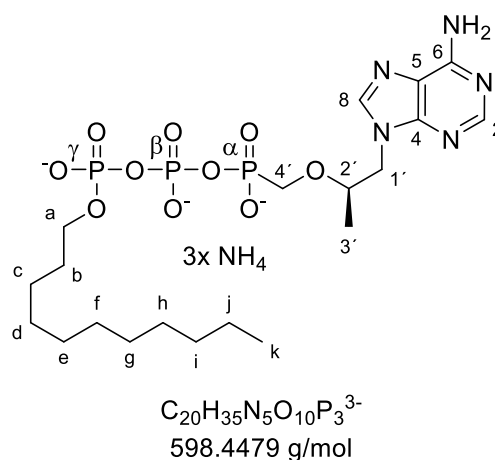
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 184 mg (294 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-pyrophosphat **22g** in abs. Acetonitril gelöst und mit 630 μL (4.56 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 540 μL (3.80 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 630 μL (4.56 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 180 μL (2.28 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 88.2 mg (147 μmol , 0.500 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt. Das so erhaltene Produkt wurde in 20 mL einer Acetonitril/tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung (10%ig in Wasser) gelöst und für 24 Stunden gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 62.0 mg (58.2 μmol , 40% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 11.58 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.41 (s, 1H, H-8), 8.16 (s, 1H, H-2), 4.38 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.18 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.94 – 3.83 (m, 3H, H-2', H-a), 3.83 – 3.78 (m, 1H, H-4'a), 3.70 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.8 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H,H}} = 10.2 \text{ Hz}$, 1H, H-4'b), 1.53 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, H-b), 1.07 – 1.20 (m, 16H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, G-i, H-j), 0.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H-4), 0.85 – 0.76 (m, 3H, H-k).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.75 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.0 \text{ Hz}$, P- α), -10.75 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.4 \text{ Hz}$, P- γ), -22.59 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.0$, 19.3 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 157.43 (C-4), 140.32 (C-5), 70.03 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 52.4$, $^4J_{\text{C,P}} = 5.9 \text{ Hz}$, C-a), 66.53 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 161.6 \text{ Hz}$, C-4'), 34.76, 33.08, 31.24 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, C-2'), 31.01 – 30.50 (m), 30.47, 30.29, 28.08, 23.25 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 16.99 (C-k), 14.44 (C-3').

HRMS (ESI): m/z = ber.: 600.1753 $[M+2H]^+$, gef.: 600.1756.

7.3.4.8 Synthese von γ -Octadecanoyl-(*R*)-PMPA-Diphosphat 7h

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 150 mg (387 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-phosphonat **23h** und 103 mg (774 μ mol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.42 mL (964 μ mol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 209 mg (288 μ mol, 74%) eines farblosen Öls erhalten.

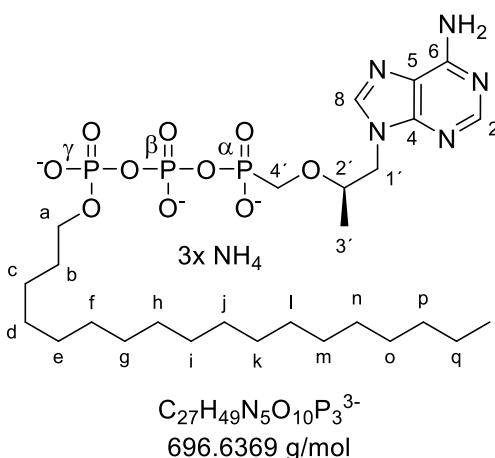
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 809 mg (288 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-pyrophosphat **22h** in abs. Acetonitril gelöst und mit 240 μ L (1.73 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 200 μ L (1.44 mmol, 5.00 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 240 μ L (1.73 mmol, 6.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 70.0 μ L (86.4 μ mol, 3.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 86.5 mg (144 μ mol, 0.500 Äquiv.) (*R*)-PMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des PMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt. Das so erhaltene Produkt wurde in 20 mL einer Acetonitril/tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung (10%ig in Wasser) gelöst und für 24 Stunden gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 32.1 mg (41.8 μ mol, 29% bezogen auf das (*R*)-PMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 260 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 13.87 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 8.51 (s, 1H, H-8), 8.25 (s, 1H, H-2), 4.47 (d, $^2J = 14.7$ Hz, 1H, H-1'a), 4.27 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 1H, H-1'b), 4.01 – 3.93 (m, 3H, H-2', H-a), 3.93 – 3.85 (m, 1H, H-4'a), 3.81 – 3.75 (m, 1H, H-4'b), 1.66 – 1.55 (m, 2H, H-b), 1.41 – 1.20 (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), 1.09 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 3H, H-4), 0.89 (t, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, 3H, H-r).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.75 (d, $^2J_{P,P} = 25.0$ Hz, P- α), -10.75 (d, $^2J_{P,P} = 19.4$ Hz, P- γ), -22.59 (dd, $^2J_{P,P} = 25.0, 19.3$ Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 157.43 (C-4), 140.32 (C-5), 70.03 (dd, $^2J_{C,P} = 52.4, ^4J_{C,P} = 5.9$ Hz, C-a), 66.53 (d, $^1J_{C,P} = 161.6$ Hz, C-4'), 34.76, 33.08, 31.24 (d, $J = 7.4$ Hz, C-2'), 31.01 – 30.50 (m), 30.47, 30.29, 28.08, 23.25 (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), 16.99 (C-r), 14.44 (C-3').

HRMS (ESI): $m/z = \text{ber.}: 698.2854$ [M+2H] $^+$, $\text{gef.}: 698.2856$.

7.3.5 Synthese der (S)-HPMPC-Diphosphatprodrugs

7.3.5.1 Synthese der Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPC-Diphosphat 9a

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 200 mg (348 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** und 92.9 mg (696 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.18 mL (870 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 209 mg (229 μmol , 65%) eines farblosen Öls erhalten.

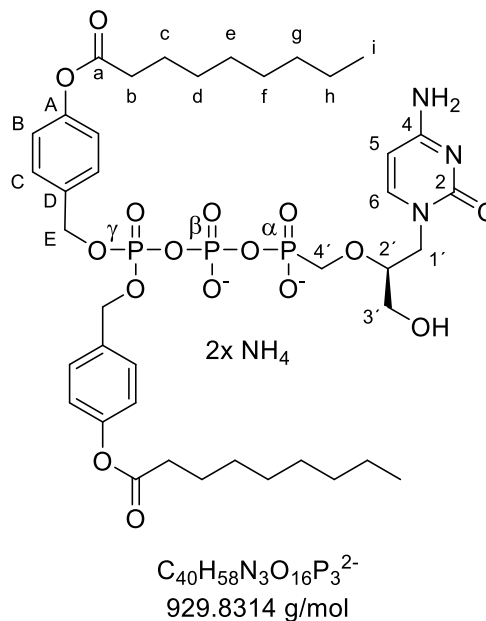
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 209 mg (229 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 580 μL (4.18 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 490 μL (3.48 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 580 μL (4.18 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 170 μL (2.09 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 73.4 mg (114 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPC als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPCs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 44.8 mg (46.4 μmol , 41% bezogen auf das (S)-HPMPC) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 15.36 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.94 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz, 1H, H-6), 7.43 – 7.37 (m, 4H, H-C), 7.07 – 7.02 (m, 4H, H-B), 6.01 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz, 1H, H-5), 5.17 (d, $^3J_{\text{H,P}}$ = 8.1 Hz, 4H, H-E), 4.02 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.3, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.0 Hz, 1H, H-1'a), 3.93 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 13.0, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.4 Hz, 1H, H-3'a), 3.77 – 3.73 (m, 2H, H-4'), 3.66 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 13.7, $^3J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-3'b), 3.52 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 11.9, $^3J_{\text{H,H}}$ = 2.6 Hz, 1H, H-1'b), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 4H, H-b), 1.66 (q, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.3 Hz, 4H, H-c), 1.39 – 1.27 (m, 20H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.93 – 0.86 (m, 6H, H-i).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.59 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 26.1 Hz, P- α), -13.14 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 16.9 Hz, P- γ), -23.75 (dd, $^2J_{\text{P,P}}$ = 25.8, 16.9 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 172.33 (C-a), 165.71 (C-4), 152.32 (C-A), 150.92 (C-6), 135.10 (C-D), 129.06 (C-C), 128.97 (C-B), 92.75 (C-5), 90.38 (m, C-2'), 79.26 (m, C-4'), 69.43 – 67.79 (m, C-E), 70.52 (C-3'), 59.09 (C-1'), 33.63 (C-b), 31.60, 28.99, 28.90, 28.79, 24.57 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 23.37 (C-c), 12.52 (C-i).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 930.8314 [M+H] $^+$, gef.: 930.3000.

7.3.5.2 Synthese von Bis-(4-dodecanolyoxybenzyl)-(S)-HPMPC-Diphosphat 9b

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 240 mg (364 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanolyoxybenzyl)-phosphonat **23b** und 97.3 mg (729 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.28 mL (911 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 325 mg (327 μmol , 90%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 325 mg (327 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanolyoxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 610 μL (4.37 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 510 μL (3.64 mmol, 10.0 Äquiv.)

Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 610 μL (4.37 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 170 μL (2.19 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 105 mg (163 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPC als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPCs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 61.6 mg (58.7 μmol , 36% bezogen auf das (S)-HPMPC) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

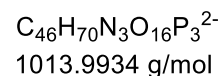
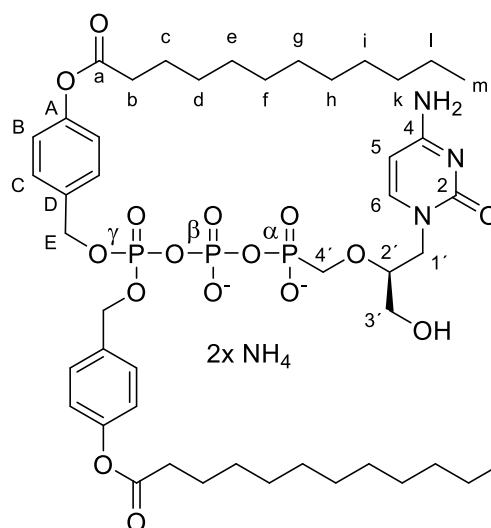
HPLC (Methode A): $t_r = 19.99 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.45 – 7.37 (m, 4H, H-C), 7.08 – 7.02 (m, 4H, H-B), 6.01 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 5.17 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, 4H, H-E), 4.23 – 4.13 (m, 1H, H-1'a), 3.95 (dd, $^1J = 12.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.86 – 3.71 (m, 4H, H-4', H-2', H-3'b), 3.52 (dd, $J = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-b), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-c), 1.43 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8 \text{ Hz}$, 4H, H-d), 1.39 – 1.22 (m, 32H, H-e, H-f, H-g, H-h, h-l, H-j, H-k, H-l), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 6H, H-m).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.23 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.7 \text{ Hz}$, P- α), -13.34 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.9 \text{ Hz}$, P- γ), -24.21 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 26.2$, 17.0 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.73 (C-a), 170.17 (C-4), 152.33 (C-2), 130.48 (C-C), 129.63 (C-A), 122.84 (C-B, C-6), 122.51 (C-D), 94.30 (C-5), 70.38 (C-2'), 61.41 (C-E), 51.28 (C-4'), 49.57 (C-1'), 35.05 (C-b), 33.09, 30.76, 30.64, 30.49, 30.44, 30.20 (C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l), 25.99 (C-d), 23.75 (C-c), 14.45 (C-m).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 1016.4198 [\text{M}+2\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1016.4492$.



7.3.5.3 Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPC-Diphosphat 9d

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (400 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23d** und 107 mg (800 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.50 mL (1.00 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 342 mg (397 μmol , 99%) eines farblosen Öls erhalten.

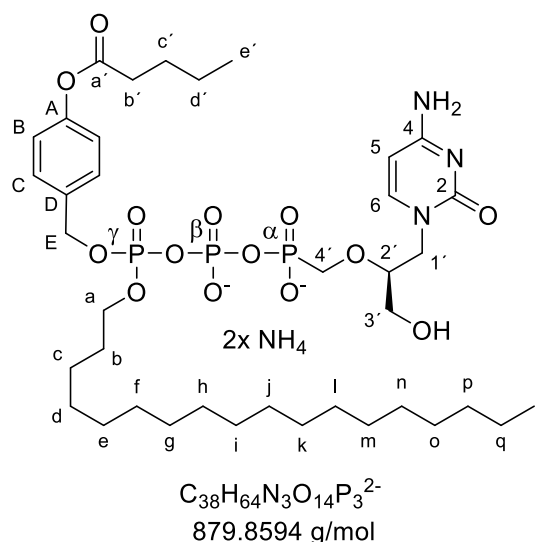
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 342 mg (397 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 660 μL (4.76 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 560 μL (3.97 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 660 μL (4.76 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 190 μL (2.38 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 122 mg (198 μmol , 0.500 Äquiv.) (*S*)-HPMPC als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (*S*)-HPMPCs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 60.1 mg (65.6 μmol , 33% bezogen auf das (*S*)-HPMPC) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 16.27 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.90 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.53 – 7.47 (m, 2H, H-C), 7.11 – 7.05 (m, 2H, H-B), 5.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 5.21 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.16 – 4.05 (m, 3H, H-4', H-a), 3.91 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.8 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 3.84 – 3.73 (m, 2H, H-3'a, H-3'b), 3.73 – 3.66 (m, 1H, H-2), 3.51 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.75 – 1.67



(m, 2H, H-c'), 1.67 – 1.55 (m, 2H, H-b), 1.49 – 1.38 (m, 4H, H-d', H-c), 1.34 – 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), 1.01 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, H-r), 0.97 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, H-e').

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.34 (d, $^2J_{P,P} = 25.8$ Hz, P- α), -13.08 (d, $^2J_{P,P} = 17.4$ Hz, P- γ), -24.03 (dd, $^2J_{P,P} = 25.4, 17.1$ Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 173.93 (C-a'), 162.48 (C-2), 152.26 (C-6), 151.33 (C-4), 135.29 (d, $^3J_{C,P} = 7.4$ Hz, C-D), 130.44 (C-C), 130.35 (C-B), 129.10 (C-A), 95.04 (C-5), 81.37 (d, $^3J_{C,P} = 12.0$ Hz, C-2'), 70.27 (d, $^2J_{C,P} = 5.6$ Hz, C-E), 69.92 (d, $^2J_{C,P} = 6.2$ Hz, C-a), 67.21 (d, $J = 164.5$ Hz, C-4'), 61.54 (C-1'), 51.09 (C-3'), 34.78 (C-b'), 33.03, 31.20, 30.80 – 30.60 (m), 30.42, 30.27, 28.06 (C-c'), 26.53, 24.76, 23.71, 23.23 (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), 20.67 (C-d'), 14.11 (C-r), 13.95 (C-e').

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 880.3685$ [M+H] $^+$, $\text{gef.}: 880.3500$.

7.3.5.4 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPC-Diphosphat 9f

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (362 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23f** und 96.6 mg (723 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.26 mL (90.4 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 256 mg (279 μmol , 77%) eines farblosen Öls erhalten.

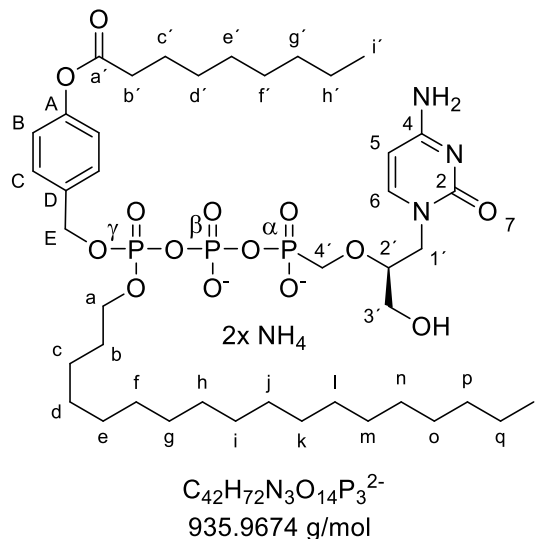
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 256 mg (279 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 460 μL (3.53 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 390 μL (2.79 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 460 μL (3.53 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 130 μL (1.68 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 89.5 mg (140 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPC als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPCs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 31.7 mg (32.6 μmol , 23% bezogen auf das (S)-HPMPC) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 17.78 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.95 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6, 3.1 \text{ Hz}$, 1H, H-6, zwei DS), 7.52 – 7.47 (m, 2H, H-C), 7.09 – 7.04 (m, 2H, H-B), 6.01 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6, 2.1 \text{ Hz}$, 1H, H-5, zwei DS), 5.21 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.5 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.25 – 4.15 (m, 1H, H-1'a), 4.14 – 4.06 (m, 2H, H-a), 3.97 – 3.89 (m, 1H, H-3'a), 3.86 – 3.72 (m, 4H, H-4', H-2', H-3'b), 3.55 – 3.48 (m, 1H, H-1'b), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.76 – 1.68 (m, 2H, H-c'), 1.60 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.45 – 1.23 (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'), 0.90 (pseudo q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, 6H, H-r, H-i').



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.36 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 21.2, 5.0 \text{ Hz}$, P- α , zwei DS), -13.06 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 17.4, 7.4 \text{ Hz}$, P- γ , zwei DS), -23.97 (ddd, $^2J_{\text{P,P}} = 23.9, 17.0, 5.6 \text{ Hz}$, P- β , zwei DS).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 173.66 (C-a), 152.32 (C-6), 130.38 (C-C), 122.85 (C-B), 122.83, 122.81, 94.53 (C-5), 80.84 (C-2'), 70.24 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.1 \text{ Hz}$, C-a), 69.85 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4 \text{ Hz}$, H-E), 66.81 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 219.4 \text{ Hz}$, C-4'), 61.45 (C-1'), 51.31 (C-3'), 49.57, 35.06 (C-b'), 33.05, 31.25, 31.04 – 30.62 (m), 30.49, 30.41, 30.32, 30.21, 26.57, 25.99, 24.78, 23.75, 23.73 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q, c-c', C-d', C-e', C-g', C-h'), 14.46 (C-r, C-i').

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 936.4311 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 936.3990$.

7.3.5.5 Synthese von γ -Undecanoyl-(S)-HPMPC-Diphosphat 9g

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 108 mg (373 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-phosphonat **23g** und 99.7 mg (746 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.33 mL (93.3 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der

Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 184 mg (294 μmol , 79%) eines farblosen Öls erhalten.

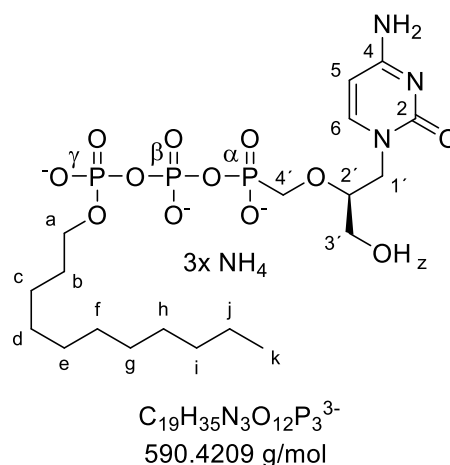
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 184 mg (294 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 620 μL (4.48 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 530 μL (3.73 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 620 μL (4.48 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 180 μL (2.34 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 87.1 mg (147 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPC als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPCs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 20 mL 10%iger tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung aufgenommen und 24 Stunden gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 40.5 mg (62.8 μmol , 48% bezogen auf das (S)-HPMPC) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 11.06 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.94 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 6.11 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 4.19 – 4.14 (m, 1H, H-1'a), 4.04 – 3.95 (m, 4H, H-a, H-4'), 3.92 – 3.73 (m, 3H, H-3'a, H-2', H-3'b), 3.57 – 3.50 (m, 1H, H-1'b), 1.65 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.43 – 1.36 (m, 2H, H-c), 1.36 – 1.24 (m, 14H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-k).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.65 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 23.9 \text{ Hz}$, P- α), -10.69 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 18.0 \text{ Hz}$, P- γ), -21.77 – 23.32 (m, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 161.28 (C-2), 151.45 (C-6), 150.87 (C-4), 95.06 (C-5), 81.04 (C-2'), 67.41 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4 \text{ Hz}$, C-a), 66.65 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 160.7 \text{ Hz}$, C-4'), 59.34 (C-1'), 50.90 (C-3'), 32.80, 31.56, 30.58 – 30.28 (m), 30.16, 26.67, 24.59, 23.52, 20.50 (C-b, C-c, C-d, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 14.41 (C-k).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 592.1596 [M+2H]⁺, gef.: 592.1500.

7.3.5.6 Synthese von γ -Octadecanoyl-(S)-HPMPC-Diphosphat 9h

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 117 mg (303 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoeethyl)-octadecanoyl-phosphonat **23h** und 82.6 mg (606 μ mol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 1.89 mL (757 μ mol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 146 mg (201 μ mol, 66%) eines farblosen Öls erhalten.

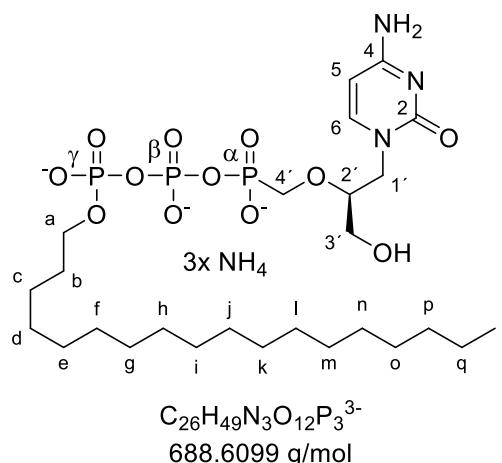
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 146 mg (201 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoeethyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 500 μ L (3.64 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 430 μ L (3.03 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 500 μ L (3.64 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 μ L (1.82 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 90.2 mg (141 μ mol, 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPC als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPCs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 20 mL 10%iger tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung aufgenommen und 24 Stunden gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 49.3 mg (66.4 μ mol, 47% bezogen auf das (S)-HPMPC) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 13.38 min.

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 8.02 (d, ³*J*_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, H-6), 6.18 (d, ³*J*_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, H-5), 4.18 (dd, ¹*J*_{H,H} = 14.3, ³*J*_{H,H} = 2.9 Hz, 1H, H-1'a), 3.98 (q, ³*J*_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, H-a), 3.95 – 3.86 (m, 2H, H-4'), 3.82 (dd, ¹*J*_{H,H} = 12.6, ³*J*_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, H-3'a), 3.76 (dd, ¹*J*_{H,H} = 12.8, ³*J*_{H,H} = 9.9 Hz, 1H, H-3'b), 3.71



(dq, $^3J_{H,H} = 7.4, 3.7$ Hz, 1H, H-2'), 3.55 (dd, $^1J_{H,H} = 12.6, ^3J_{H,H} = 4.1$ Hz, 1H, H-1' b), 1.42 (p, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, H-b), 1.26 (s, 30H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-l, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 0.88 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, H-r).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.66 (d, $^2J_{P,P} = 24.8$ Hz, P- α), -10.98 (d, $^2J_{P,P} = 19.1$ Hz, P- γ), -23.14 (dd, $^2J_{P,P} = 24.6, 19.2$ Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 161.35 (C-2), 151.90 (C-6), 150.55 (C-4), 95.19 (C-5), 80.96 (C-2'), 67.59 (C-a), 66.91 (d, $^1J_{C,P} = 160.7$ Hz, C-4'), 59.34 (C-1'), 50.90 (C-3'), 32.80, 31.56, 30.58 – 30.28 (m), 30.16, 26.67, 24.59, 23.52, 20.50 (C-b, C-c, C-d, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-k, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q), 14.41 (C-r).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 690.2691$ [M+2H] $^+$, $\text{gef.}: 690.2500$.

7.3.6 Synthese der (S)-HPMPT-Diphosphatprodrugs

7.3.6.1 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPT-Diphosphat 19a

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (366 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** und 85.1 mg (637 μmol , 1.80 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.00 mL (797 μmol , 2.20 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 230 mg (252 μmol , 70%) eines farblosen Öls erhalten.

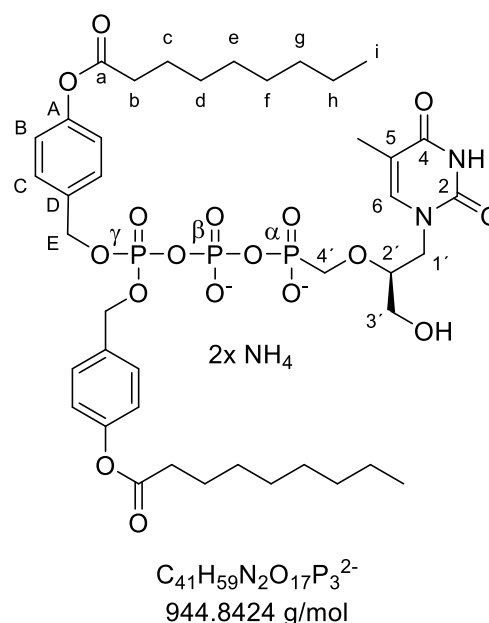
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 230 mg (231 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 530 μL (3.83 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 450 μL (3.19 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 530 μL (3.83 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 150 μL (1.91 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 84.2 mg (116 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPT als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPTs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 32.0 mg (32.6 μmol , 28% bezogen auf das (S)-HPMPT) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 15.68 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.54 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.43 – 7.40 (m, 4H, H-C), 7.08 – 7.03 (m, 4H, H-B), 5.17 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, 4H, H-E), 3.95 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 3.92 – 3.86 (m, 2H, H-1'b, H-4'a), 3.82 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 1H, H-4'b), 3.75 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.67 – 3.62 (m, 1H, H-2'), 3.46 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 4H, H-b), 1.87 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2 \text{ Hz}$, 3H, -



CH₃), 1.73 (q, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 4H, H-c), 1.48 – 1.40 (m, 4H, H-d), 1.40 – 1.24 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.94 – 0.87 (m, 6H, H-i).

³¹P-NMR (162 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 7.89 (d, ²J_{P,P} = 24.8 Hz, P-α), -13.31 (d, ²J_{P,P} = 17.5 Hz, P-γ), -24.10 (dd, ²J_{P,P} = 24.9, 17.6 Hz, P-β).

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 172.36 (C-a), 165.51 (C-5), 152.36, 144.60 (C-6), 130.49 (C-C), 122.81 (C-B), 81.89 (C-2'), 70.41 (C-E), 67.28 (C-4'), 61.82 (C-3'), 49.57 (C-1'), 35.03 (C-b), 33.01, 30.40, 30.31, 30.19, 25.98 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 14.44 (C-i), 11.97 (-CH₃).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 945.3100 [M+H]⁺, gef.: 945.3000.

7.3.6.2 Synthese von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPT-Diphosphat 19b

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (319 μmol, 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23b** und 85.1 mg (637 μmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.00 mL (797 μmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 230 mg (231 μmol, 73%) eines farblosen Öls erhalten.

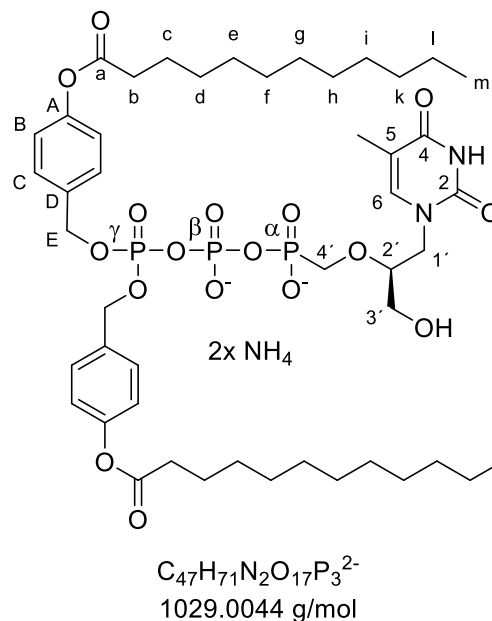
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 230 mg (231 μmol, 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 530 μL (3.83 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 450 μL (3.19 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 530 μL (3.83 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 150 μL (1.91 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 84.2 mg (116 μmol, 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPT als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPTs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 18.5 mg (17.4 μmol, 15% bezogen auf das (S)-HPMPT) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 18.14 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.54 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.43 – 7.40 (m, 4H, H-C), 7.08 – 7.03 (m, 4H, H-B), 5.17 (d, $^3J_{\text{H,P}}$ = 8.2 Hz, 4H, H-E), 3.95 (dd, $^1J_{\text{H,H}}$ = 12.7, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.9 Hz, 1H, H-1'a), 3.92 – 3.86 (m, 2H, H-1'b, H-4'a), 3.82 (dd, $^1J_{\text{H,H}}$ = 14.3, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.5 Hz, 1H, H-4'b), 3.75 (dd, $^1J_{\text{H,H}}$ = 12.5, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.5 Hz, 1H, H-3'a), 3.67 – 3.62 (m, 1H, H-2'), 3.46 (dd, $^1J_{\text{H,H}}$ = 12.5, $^3J_{\text{H,H}}$ = 4.5 Hz, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.5 Hz, 4H, H-b), 1.87 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.2 Hz, 3H, -CH₃), 1.73 (q, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.4 Hz, 4H, H-c), 1.48 – 1.40 (m, 4H, H-d), 1.40 – 1.24 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-k, H-l), 0.94 – 0.87 (m, 6H, H-m).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.93 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 24.6 Hz, P- α), -13.68 (d, $^2J_{\text{P,P}}$ = 17.3 Hz, P- γ), -24.15 (dd, $^2J_{\text{P,P}}$ = 24.2, 16.9 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 172.36 (C-a), 165.51 (C-5), 152.36, 144.60 (C-6) 130.49 (C-C), 122.81 (C-B), 81.89 (C-2'), 70.41 (C-E), 67.28 (C-4'), 61.82 (C-3'), 49.57 (C-1'), 35.03 (C-b), 33.01, 30.40, 30.31, 30.19, 25.98 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-k, C-l), 14.44 (C-m), 11.97 (-CH₃).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 1029.4049 [M+H]⁺, gef.: 1029.4000.

7.3.6.3 Synthese von (4-Pentadecanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPT-Diphosphat 19d

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (400 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23d** und 107 mg (800 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.50 mL (1.00 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 291 mg (338 μmol , 85%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 291 mg (338 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 560 μL (4.06 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 480 μL (3.38 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 560 μL (4.06 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (2.03 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 123 mg (169 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPT als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPTs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 26.5 mg (28.5 μmol , 17% bezogen auf das (S)-HPMPT) einer farblosen Watte erhalten.

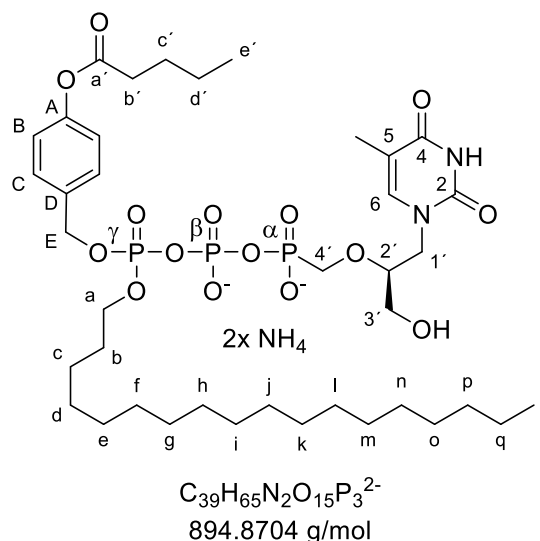
UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 16.75 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.57 (dt, $^4J_{\text{H,H}} = 2.7, 1.2 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.52 – 7.48 (m, 2H, H-C), 7.13 – 7.07 (m, 2H, H-B), 5.22 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.12 (qd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7, ^3J_{\text{H,P}} = 2.9 \text{ Hz}$, 2H, H-a), 3.97 – 3.82 (m, 4H, H-4', H-1'), 3.77 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5, ^3J_{\text{H,H}} = 3.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.71 – 3.63 (m, 1H, H-2'), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5, ^3J_{\text{H,H}} = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.88 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2 \text{ Hz}$, 3H, CH_3), 1.72 (p, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H-c'), 1.68 – 1.58 (m, 2H, H-b), 1.50 – 1.37 (m, 2H, H-d'), 1.36 – 1.22 (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), 0.99 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, H-e'), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-r).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.67 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.4 \text{ Hz}$, P- α), -13.04 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.5 \text{ Hz}$, P- γ), -23.79 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.9, 17.4 \text{ Hz}$, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 173.67 (C-a'), 167.01 (C-2), 153.26 (C-4), 152.36 (C-A), 144.55 (C-6), 135.24 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.6 \text{ Hz}$, C-D), 130.40 (C-C), 122.85 (C-B), 110.78 (C-5), 82.04 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0 \text{ Hz}$, C-2'), 70.05 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 58.5, ^4J_{\text{C,P}} = 5.9 \text{ Hz}$, C-E, C-a), 67.58 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 164.2 \text{ Hz}$, H-4'), 61.84 (C-3'), 49.49 (C-1'), 34.77 (C-b'), 33.08, 31.24 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3 \text{ Hz}$, C-



b), 30.97 – 30.60 (m), 30.48, 30.31, 28.08 (C-c'), 26.56, 24.78 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q), 23.50 (C-d'), 14.44 (C-e'), 14.09 (C-r), 12.25 (CH₃).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 895.3682 [M+H]⁺, gef.: 895.3500.

7.3.6.4 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPT-Diphosphat 19f

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (362 µmol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23f** und 96.6 mg (723 µmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.26 mL (90.4 µmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 266 mg (290 µmol, 80%) eines farblosen Öls erhalten.

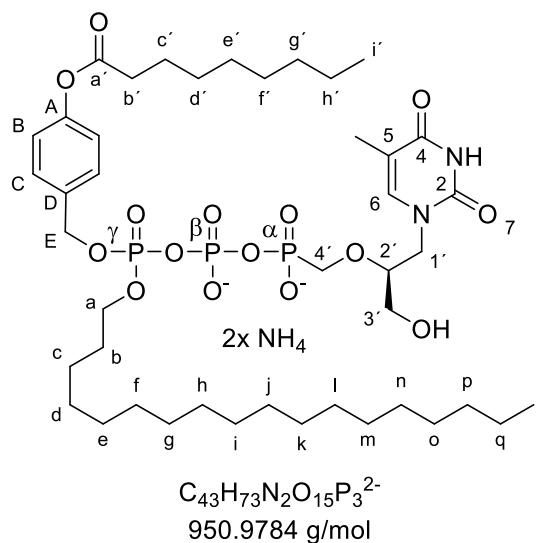
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 266 mg (290 µmol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 480 µL (3.48 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 410 µL (2.90 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 480 µL (3.48 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 µL (1.74 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 106 mg (145 µmol, 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPT als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPTs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 70.6 mg (71.5 µmol, 49% bezogen auf das (S)-HPMPT) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): λ_{max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 18.25 min.

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 7.57 (s, 1H, -CH₃), 7.51 – 7.48 (m, 2H, H-C), 7.11 – 7.07 (m, 2H, H-B), 5.22 (d, ³J_{H,P} = 8.4 Hz, 2H, H-E), 4.17 – 4.08 (m, 2H, H-a), 3.98 – 3.83 (m, 4H, H-4', H-1'), 3.77 (dd, ¹J_{H,H} = 12.5, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-3'a), 3.70 – 3.64 (m, 1H, H-2'), 3.49 (dd, ¹J_{H,H} = 12.5, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-3'b), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-b'), 1.88 (t, ³J_{H,H} = 1.1 Hz, 3H, -CH₃), 1.73 (p, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 2H, H-c'), 1.62 (p, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, H-b), 1.50 – 1.40 (m, 2H, H-d'), 1.40 – 1.21 (m, 38H, 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'), 0.91 (pseudo q, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 6H, H-i', H-r).



³¹P-NMR (162 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 7.96 (d, ²J_{P,P} = 24.2 Hz, P-α), -12.96 (d, ²J_{P,P} = 16.5 Hz, P-γ), -23.66 – 23.97 (m, P-β).

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 173.65 (C-a'), 167.00 (C-2), 153.27 (C-4), 152.39 (C-A), 144.55 (C-6), 130.45 (C-C), 122.86 (C-B), 110.80 (C-5), 82.05 (d, ³J_{C,P} = 12.3 Hz, C-2'), 70.14 (d, ²J_{C,P} = 61.5 Hz, C-E, C-a), 67.32 (d, ¹J_{C,P} = 128.4 Hz, C-4') 61.83 (C-3'), 49.51 (C-1'), 35.05 (C-b'), 33.09, 33.01, 31.25, 31.20 (C-b), 30.96 – 30.63 (m), 30.49, 30.41, 30.31, 30.20, 26.56, 25.98 (C-c'), 23.74 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q, C-d', C-e', C-f, C-g', C-h'), 14.45 (C-i', C-r), 12.26 (-CH₃).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 951.4308 [M+H]⁺, gef.: 951.4000.

7.3.6.5 Synthese von γ-Undecanoyl-(S)-HPMPT-Diphosphat 19g

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 160 mg (553 μmol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-phosphonat **23g** und 148 mg (1.11 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 3.46 mL (1.38 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 284 mg (484 μmol, 82%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 284 mg (484 μmol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 920 μL (6.64 mmol,

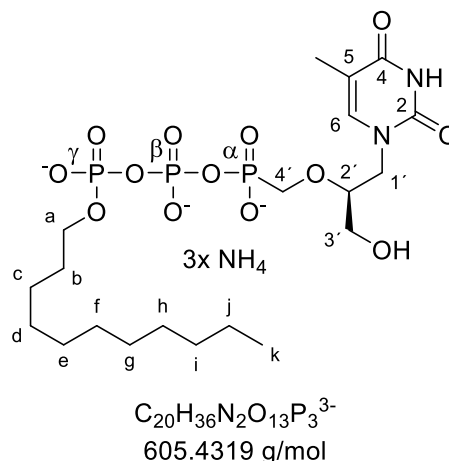
12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 780 μL (5.53 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 920 μL (6.64 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 260 μL (3.32 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 165 mg (227 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPT als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPTs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 20 mL 10%iger tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung aufgenommen und 24 Stunden gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 29.7 mg (45.0 μmol , 20% bezogen auf das (S)-HPMPT) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 11.14 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.59 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 4.05 – 3.86 (m, 6H, H-a, H-4', H-3'), 3.81 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.6 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 3.70 – 3.64 (m, 1H, H-2'), 3.49 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 1.89 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.2 \text{ Hz}$, 3H, -CH₃), 1.64 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.39 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$, 6.4 Hz, 2H, H-c), 1.36 – 1.25 (m, 14H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-k).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.58 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.2 \text{ Hz}$, P- α), -10.76 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.8 \text{ Hz}$, P- γ), -22.33 - ,22.72 (m, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 167.02 (C-6), 153.31 (C-2), 144.52 (C-4), 110.81 (C-5), 81.95 (d, $J = 12.1 \text{ Hz}$, C-2'), 67.6 (d, $J = 154.32 \text{ Hz}$, C-4'), 67.23 (dd, $J = 43.1$, C-a), 61.75 (C-3'), 49.57 (C-1'), 33.08, 31.82 (d, $J = 9.4$, C-b), 31.17 – 30.54 (m), 30.49, 26.92, 23.74 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 14.43 (C-k), 12.23 (-CH₃).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 607.1592 [\text{M}+2\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 607.1500$.

7.3.6.6 Synthese von γ -Octadecanoyl-(S)-HPMPT-Diphosphat 19h

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 130 mg (336 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-phosphonat **23h** und 89.6 mg (671 μmol , 2.00 Äquiv.)

N-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.10 mL (839 µmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 160 mg (221 µmol, 66%) eines farblosen Öls erhalten.

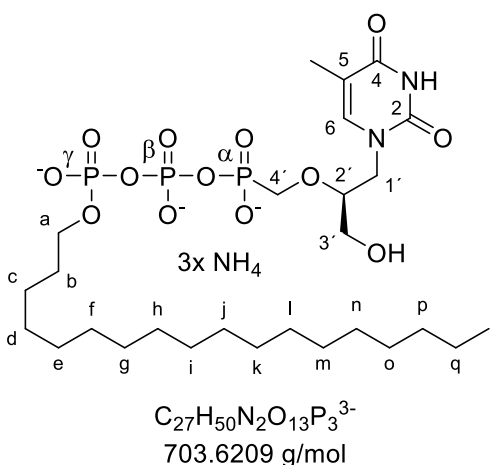
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 160 mg (221 µmol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 560 µL (4.03 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 470 µL (3.36 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 560 µL (4.03 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 µL (2.01 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 40.2 mg (66.0 µmol, 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPT als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPTs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 20 mL 10%iger tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung aufgenommen und 24 Stunden gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 29.4 mg (38.8 µmol, 59% bezogen auf das (S)-HPMPT) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 275 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 13.46 min.

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 7.59 (d, ³*J*_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, H-6), 4.05 – 3.86 (m, 6H, H-a, H-4', H-3'), 3.81 (dd, ¹*J*_{H,H} = 12.7, ³*J*_{H,H} = 3.6 Hz, 1H, H-1'a), 3.70 – 3.64 (m, 1H, H-2'), 3.49 (dd, ¹*J*_{H,H} = 12.6, ³*J*_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-1'b), 1.89 (d, ³*J*_{H,H} = 1.2 Hz, 3H, -CH₃), 1.64 (p, ³*J*_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-b), 1.39 (p, ³*J*_{H,H} = 6.9, 6.4 Hz, 2H, H-c), 1.36 – 1.25 (m, 14H, 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), 0.90 (t, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, H-r).



³¹P-NMR (243 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 7.81 (d, ²*J*_{P,P} = 24.8 Hz, P- α), -10.83 (d, ²*J*_{P,P} = 19.8 Hz, P- γ), -22.69 (dd, ²*J*_{P,P} = 24.4, 20.0 Hz, P- β).

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 167.02 (C-6), 153.31 (C-2), 144.52 (C-4), 110.81 (C-5), 81.95 (d, J = 12.1 Hz, C-2'), 67.6 (d, J = 154.32 Hz, C-4'), 67.23 (dd, J = 43.1, C-a), 61.75 (C-3'), 49.57 (C-1'), 33.08, 31.82 (d, J = 9.4, C-b), 31.17 – 30.54 (m), 30.49, 26.92, 23.74 (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), 14.43 (C-r), 12.23 (-CH₃).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 705.2688 [M+H]⁺, gef.: 705.2499.

7.3.7 Synthese der (S)-HPMPFU-Diphosphatprodrugs

7.3.7.1 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPFU-Diphosphat 21a

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 260 mg (395 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** und 105 mg (789 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.47 mL (987 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 342 mg (376 μmol , 95%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 342 mg (376 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 660 μL (4.74 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 560 μL (3.95 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 660 μL (4.74 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 190 μL (2.37 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 137 mg (188 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPFU als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPFUs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 78.0 mg (79.2 μmol , 42% bezogen auf das (S)-HPMPFU) einer farblosen Wasse erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 17.63$ min.

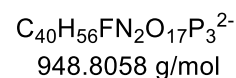
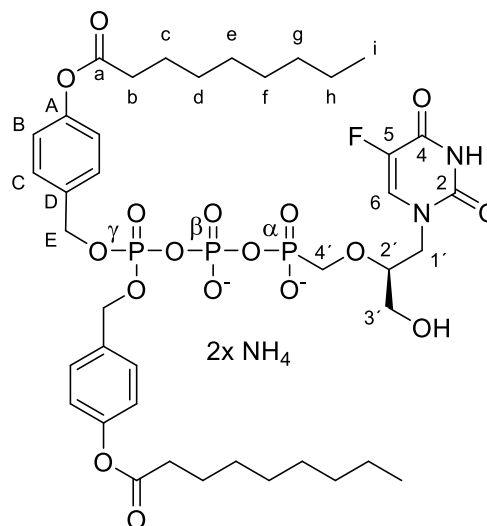
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.95 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4$ Hz, 1H, H-6), 7.45 – 7.39 (m, 4H, H-C), 7.08 – 7.02 (m, 4H, H-B), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2$ Hz, 4H, H-E), 3.98 – 3.89 (m, 2H, H-4'a, H-1'a), 3.89 – 3.79 (m, 2H, H-4'b, H-1'b), 3.77 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, 1H, H-3'a), 3.68 – 3.63 (m, 1H, H-2'), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, H-b), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, H-c), 1.48 – 1.40 (m, 4H, H-d), 1.40 – 1.26 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.94 – 0.88 (m, 6H, H-i).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.56 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.1$ Hz, P- α), -13.26 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.5$ Hz, P- γ), -23.78 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.1$, 17.3 Hz, P- β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: -170.68 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 5.5$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 173.75 (C-a), 159.93 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 25.9$ Hz, C-4), 152.35 (C-A), 151.76 (C-2), 141.23 (d $^1J_{\text{C,F}} = 231.0$ Hz, C-5), 135.02 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, C-D), 132.74 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.6$ Hz, C-6), 130.50 (C-C), 122.85 (C-B), 81.71 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0$ Hz, C-2'), 70.38 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, C-E), 67.50 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.8$ Hz, C-4'), 61.64 (C-3'), 50.08 (C-1'), 35.03 (C-b), 33.01, 31.95 – 28.23 (m), 25.97 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 14.44 (C-i).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 949.2860$ [M+H] $^+$, $\text{gef.}: 949.2975$.



7.3.7.2 Synthese von Bis-(dodecanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPFU-Diphosphat 21b

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 220 mg (334 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23b** und 89.2 mg (668 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.09 mL (835 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 251 mg (253 μmol , 76%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 251 mg (253 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 560 μL (4.01 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 470 μL (3.34 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid

versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 560 μL (4.01 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (2.00 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 98.6 mg (126 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPFU als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des HPMFUs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 13.2 mg (12.3 μmol , 10% bezogen auf das (S)-HPMPFU) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 18.14 \text{ min}$.

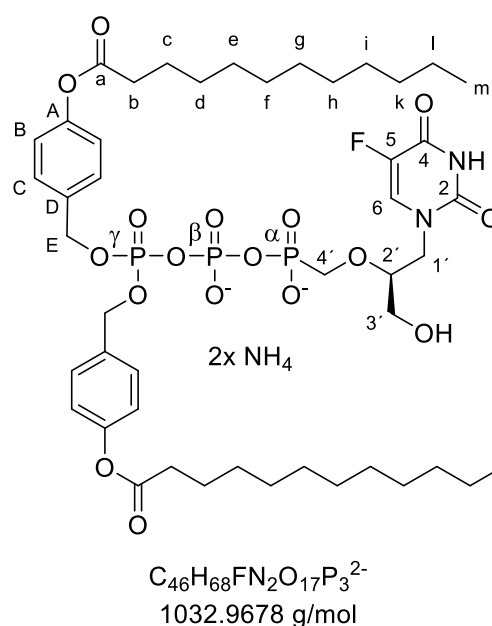
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.95 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.45 – 7.39 (m, 4H, H-C), 7.08 – 7.02 (m, 4H, H-B), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, 4H, H-E), 3.98 – 3.89 (m, 2H, H-4'a, H-1'a), 3.89 – 3.79 (m, 2H, H-4'b, H-1'b), 3.77 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.68 – 3.63 (m, 1H, H-2'), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-b), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 4H, H-c), 1.48 – 1.40 (m, 4H, H-d), 1.40 – 1.26 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k; H-l), 0.94 – 0.88 (m, 6H, H-m).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.56 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.1 \text{ Hz}$, P- α), -13.26 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.5 \text{ Hz}$, P- γ), -23.78 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.1$, 17.3 Hz, P- β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: -170.68 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 5.5 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 173.75 (C-a), 159.93 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 25.9 \text{ Hz}$, C-4), 152.35 (C-A), 151.76 (C-2), 141.23 (d $^1J_{\text{C,F}} = 231.0 \text{ Hz}$, C-5), 135.02 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3 \text{ Hz}$, C-D), 132.74 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.6 \text{ Hz}$, C-6), 130.50 (C-C), 122.85 (C-B), 81.71 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0 \text{ Hz}$, C-2'), 70.38 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.8 \text{ Hz}$, C-E), 67.50 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.8 \text{ Hz}$, C-4'), 61.64 (C-3'), 50.08 (C-1'), 35.03 (C-b), 33.01, 31.95 – 28.23 (m), 25.97 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-k, C-l), 14.44 (C-i).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 1033.3799 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1033.4000$.



7.3.7.3 Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPFU-Diphosphat 21d

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 170 mg (324 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23d** und 86.5 mg (648 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.02 mL (810 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 241 mg (280 μmol , 87%) eines farblosen Öls erhalten.

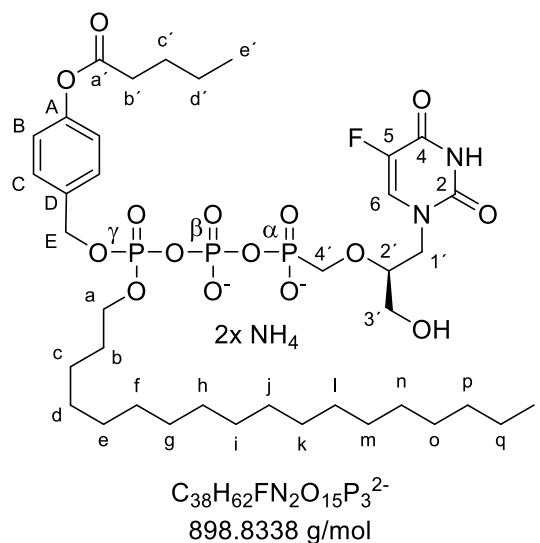
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 241 mg (280 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 470 μL (3.36 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 400 μL (2.80 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 470 μL (3.36 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 130 μL (1.68 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 92.5 mg (140 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPFU als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPFUs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 39.4 mg (42.1 μmol , 30% bezogen auf das (S)-HPMPFU) einer farblosen Wasse erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 16.36 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.00 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.3$ Hz, 1H, H-6), 7.52 – 7.48 (m, 2H, H-C), 7.11 – 7.06 (m, 2H, H-B), 5.22 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.0$ Hz, 2H, H-E), 4.18 – 4.09 (m, 2H, H-a), 3.98 – 3.91 (m, 2H, H-4'), 3.90 – 3.82 (m, 2H, H-1'), 3.82 – 3.77 (m, 1H, H-3'a), 3.71 – 3.65 (m, 1H, H-2'), 3.53 – 3.46 (m, 1H, H-3'b), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, H-b'), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, H-b'), 1.72 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-c'), 1.68 – 1.58 (m, 2H, H-b), 1.50 – 1.37 (m, 2H, H-d'), 1.36 – 1.22 (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), 0.99 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, H-e'), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3H, H-r).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.43 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.9$ Hz, P- α), -13.04 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1$ Hz, P- γ), -23.74 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.5$, 17.0 Hz, P- β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: -170.73 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.7$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.75 (C-a'), 159.93 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 25.9$ Hz, C-4), 152.35 (C-A), 151.76 (C-2), 141.23 (d $^1J_{\text{C,F}} = 231.0$ Hz, C-5), 135.02 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, C-D), 132.74 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.6$ Hz, C-6), 130.50 (C-C), 122.85 (C-B), 81.71 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0$ Hz, C-2'), 70.38 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, C-E), 67.50 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.8$ Hz, C-4'), 61.64 (C-3'), 50.08 (C-1'), 34.77 (C-b'), 33.08, 31.24 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, C-b), 30.97 – 30.60 (m), 30.48, 30.31, 28.08 (C-c'), 26.56, 24.78 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q), 23.50 (C-d'), 14.44 (C-e'), 14.09 (C-r).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 899.3431$ [$\text{M}+\text{H}$] $^-$, $\text{gef.}: 899.3410$.

7.3.7.4 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPFU-Diphosphat 21f

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (362 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23f** und 96.6 mg (723 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.26 mL (90.4 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 315 mg (344 μmol , 95%) eines farblosen Öls erhalten.

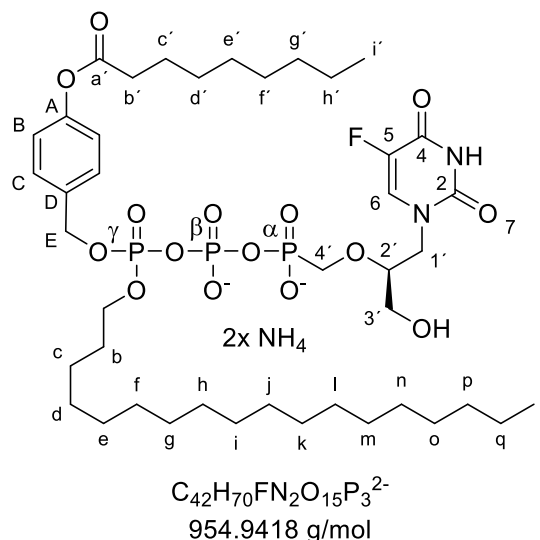
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 315 mg (344 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 570 μL (4.13 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 480 μL (3.44 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 570 μL (4.13 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (2.06 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 134 mg (172 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPFU als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPFUs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 9.90 mg (10.0 μmol , 6% bezogen auf das (S)-HPMPFU) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 18.71 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 8.00 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 7.52 – 7.48 (m, 2H, H-C), 7.11 – 7.06 (m, 2H, H-B), 5.22 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.0 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.18 – 4.09 (m, 2H, H-a), 3.98 – 3.91 (m, 2H, H-4'), 3.90 – 3.82 (m, 2H, H-1'), 3.82 – 3.77 (m, 1H, H-3'a), 3.71 – 3.65 (m, 1H, H-2'), 3.53 – 3.46 (m, 1H, H-3'b), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.67 – 1.51 (m, 2H, H-c'), 1.39 – 1.22 (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'), 0.90 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, 6H, H-r, H-i').



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.51 (d,

$^2J_{\text{P,P}} = 25.1 \text{ Hz}$, P- α), -13.04 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1 \text{ Hz}$, P- γ), -23.85 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.7, 17.3 \text{ Hz}$, P- β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: -170.73 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.2 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 173.75 (C-a'), 159.93 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 25.9 \text{ Hz}$, C-4), 152.35 (C-A), 151.76 (C-2), 141.23 (d $^1J_{\text{C,F}} = 231.0 \text{ Hz}$, C-5), 135.02 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3 \text{ Hz}$, C-D), 132.74 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.6 \text{ Hz}$, C-6), 130.50 (C-C), 122.85 (C-B), 81.71 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0 \text{ Hz}$, C-2'), 70.38 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.8 \text{ Hz}$, C-E), 67.50 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.8 \text{ Hz}$, C-4'), 61.64 (C-3'), 50.08 (C-1'), 34.77 (C-b'),

33.08, 31.24 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, C-b), 30.97 – 30.60 (m), 30.48, 30.31, 28.08, 26.56, 24.78 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, 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'), 23.50 (C-d'), 14.44 (C-e'), 14.09 (C-r).

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 955.4057 [M+H]⁺, gef.: 955.4000.

7.3.7.5 Synthese von γ -Undecanoyl-(S)-HPMPFU-Diphosphat 21g

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 100 mg (346 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-phosphonat **23g** und 92.3 mg (691 μ mol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.16 mL (864 μ mol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 178 mg (284 μ mol, 82%) eines farblosen Öls erhalten.

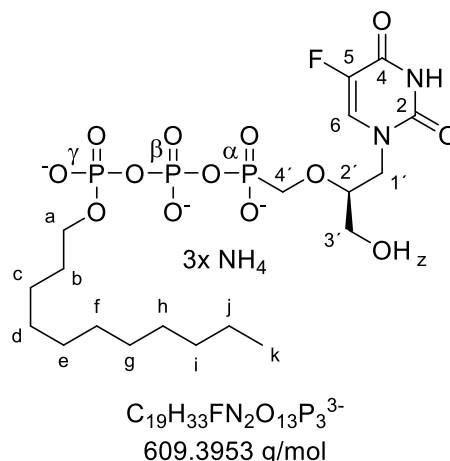
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 178 mg (284 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 570 μ L (4.15 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 490 μ L (3.46 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 570 μ L (4.15 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 170 μ L (2.07 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 89.8 mg (136 μ mol, 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPFU als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPFUs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen, mit 200 μ L (1.36 mmol, 20 Äquiv.) DBU versetzt und eine Stunde gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 27.6 mg (41.6 μmol , 31% bezogen auf das (S)-HPMPFU) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 11.24 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 8.01 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 4.01 – 3.93 (m, 4H, H-a, H-4'), 3.89 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 3.85 – 3.78 (m, 2H, H-1'b, H-3'a), 3.69 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$, 3.9 Hz, 1H, H-2'), 3.51 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 1.72 – 1.59 (m, 2H, H-b), 1.38 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, H-c), 1.36 – 1.25 (m, 14H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-k).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.52 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 23.9 \text{ Hz}$, P- α), -10.77 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.1 \text{ Hz}$, P- γ), -22.48 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.6$, 19.4 Hz, P- β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: -170.80 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.3 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 160.02 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 25.5 \text{ Hz}$, C-4), 151.84 (C-2), 141.41 (d, $J = 231.1 \text{ Hz}$, C-5), 132.72 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 33.6 \text{ Hz}$, H-6), 81.66 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.1 \text{ Hz}$, H-2'), 67.47 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 164.0 \text{ Hz}$, C-4'), 67.38 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4 \text{ Hz}$, C-a), 61.55 (C-3'), 50.09 (C-1'), 33.08, 31.82 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.2 \text{ Hz}$, C-b), 30.89 – 30.38 (m), 26.91, 23.74 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 14.43 (C-k).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 611.1342 [\text{M}+2\text{H}]^-$, $\text{gef.}: 611.1500$.

7.3.7.6 Synthese von γ -Octadecanoyl-(S)-HPMPFU-Diphosphat 21h

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 150 mg (387 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-phosphonat **23h** und 106 mg (774 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.42 mL (968 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 207 mg (286 μmol , 66%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 207 mg (286 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 640 μL (4.65 mmol,

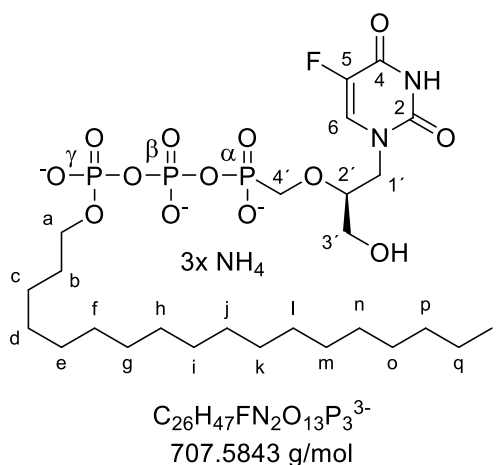
12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 550 μL (3.87 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 640 μL (4.65 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 190 μL (2.32 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 90.6 mg (137 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPFU als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPFUs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und Lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen, mit 200 μL (1.36 mmol, 20.0 Äquiv.) DBU versetzt und eine Stunde gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 13.5 mg (17.7 μmol , 13% bezogen auf das (S)-HPMPFU) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 13.53 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.01 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 4.01 – 3.93 (m, 6H, H-a, H-4'), 3.92 – 3.84 (m, 1H, H-3'a), 3.84 – 3.79 (m, 2H, H-3'b, H-1'a), 3.72 – 3.67 (m, 1H, H-2'), 3.50 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 1.64 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, H-c), 1.34 – 1.18 (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), 0.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-r).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.58 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.7 \text{ Hz}$, P- α), -10.93 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.3 \text{ Hz}$, P- γ), -22.86 (pseudo t, $^2J_{\text{P,P}} = 22.0 \text{ Hz}$, P- β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (565 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: -170.88 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.8 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 159.93 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 25.9 \text{ Hz}$, C-4), 151.76 (C-2), 141.23 (d $^1J_{\text{C,F}} = 231.0 \text{ Hz}$, C-5), 132.74 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 33.6 \text{ Hz}$, C-6), 81.71 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0 \text{ Hz}$, C-2'), 67.50 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.8 \text{ Hz}$, C-4'), 61.64 (C-3'), 67.38 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4 \text{ Hz}$, C-a), 50.08 (C-1'), 33.08, 31.24 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3 \text{ Hz}$, C-b), 30.97 – 30.60 (m), 30.48, 30.31, 28.08, 26.56, 24.78 (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), 14.09 (C-r).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 709.2437 [\text{M}+2\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 709.2505$.

7.3.8 Synthese der (S)-HPMPG-Diphosphatprodrugs

7.3.8.1 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPG-Diphosphat 20a

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 250 mg (437 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** und 117 mg (873 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.73 mL (1.09 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 355 mg (391 μmol , 89%) eines farblosen Öls erhalten.

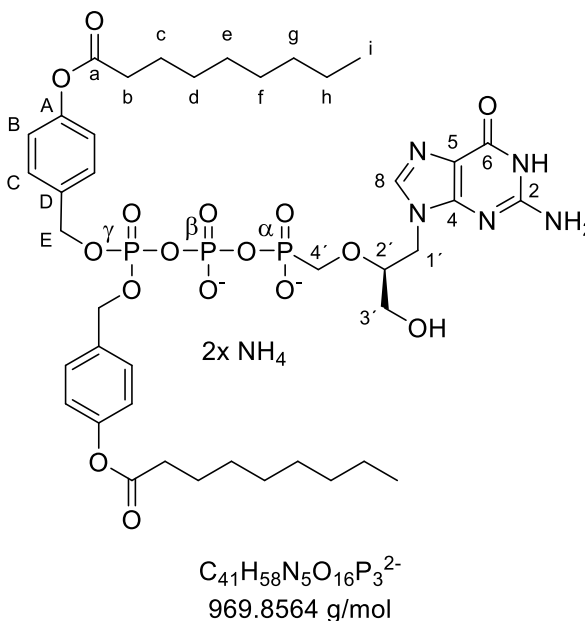
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 355 mg (391 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 730 μL (5.24 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 620 μL (4.37 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 730 μL (5.24 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 210 μL (2.62 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 157 mg (195 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPG als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPGs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 40.0 mg (39.8 μmol , 20% bezogen auf das (S)-HPMPG) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 15.06$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.50 (s, 1H, H-8), 7.41 – 7.34 (m, 4H, H-C), 7.05 – 7.00 (m, 4H, H-B), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 4H, H-E), 4.36 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, 1H, H-1'a), 4.23 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1H, H-1'b), 3.96 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$ Hz, 1H, H-4'a), 3.87 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$ Hz, 1H, H-4'b), 3.81 – 3.74 (m, 1H, H-2'), 3.69 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, H-3'a), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, H-b), 1.78 – 1.67 (m, 4H, H-c), 1.47 – 1.39 (m, 4H, H-d), 1.39 – 1.23 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.94 – 0.87 (m, 6H, H-i).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.37 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 27.2$ Hz, P- α), -13.15 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.5$ Hz, P- γ), -23.74 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.9$, 17.4 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.73 (C-a), 157.83 (C-6), 157.25 (C-4), 152.34 (C-A), 150.32 (C-2), 138.95 (C-5), 137.51 (C-8), 134.99 (C-D), 130.48 (C-C), 122.83 (C-B), 81.23 (C-2'), 70.40 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, C-E), 67.53 (C-4'), 61.42 (C-3'), 45.53 (C-1'), 35.03 (C-b), 33.01, 30.40, 30.31, 30.19, 25.97 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 14.44 (C-i).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 970.3175$ [M+H] $^+$, $\text{gef.}: 970.3000$.

7.3.8.2 Synthese von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPG-Diphosphat 20b

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 220 mg (334 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **23b** und 89.2 mg (668 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.09 mL (835 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 262 mg (263 μmol , 79%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 262 mg (263 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 560 μL

(4.01 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 470 μL (3.34 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 560 μL (4.01 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (2.00 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 106 mg (132 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPG als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPGs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 61.2 mg (56.1 μmol , 43% bezogen auf das (S)-HPMPG) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

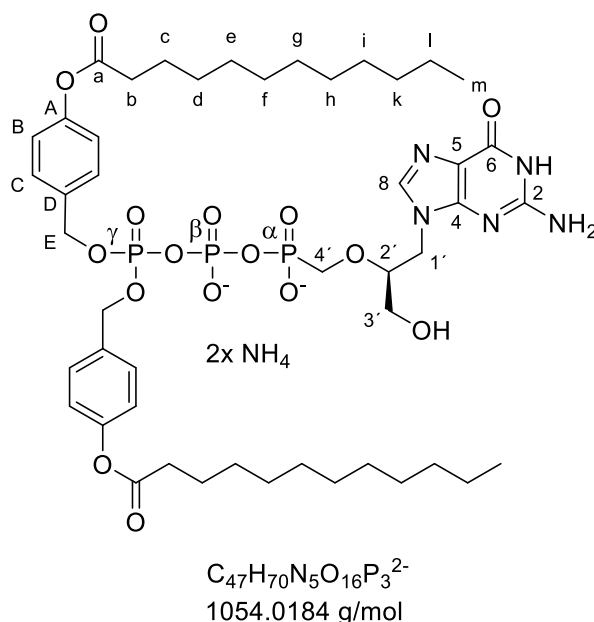
HPLC (Methode A): $t_r = 17.35 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.50 (s, 1H, H-8), 7.41 – 7.34 (m, 4H, H-C), 7.05 – 7.00 (m, 4H, H-B), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2 \text{ Hz}$, 4H, H-E), 4.36 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.23 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.96 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6 \text{ Hz}$, 1H, H-4'a), 3.87 (dd, $^2J_{\text{H,P}} = 12.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6 \text{ Hz}$, 1H, H-4'b), 3.81 – 3.74 (m, 1H, H-2'), 3.69 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-b), 1.78 – 1.67 (m, 4H, H-c), 1.47 – 1.39 (m, 4H, H-d), 1.39 – 1.23 (m, 28H, H-3, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l), 0.94 – 0.87 (m, 6H, H-m).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.60 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.4 \text{ Hz}$, P- α), -13.28 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.9 \text{ Hz}$, P- γ), -23.79 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.7$, 17.3 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 173.73 (C-a), 157.83 (C-6), 157.25 (C-4), 152.34 (C-A), 150.32 (C-2), 138.95 (C-5), 137.51 (C-8), 134.99 (C-D), 130.48 (C-C), 122.83 (C-B), 81.23 (C-2'), 70.40 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8 \text{ Hz}$, C-E), 67.53 (C-4'), 61.42 (C-3'), 45.53 (C-1'), 35.03 (C-b), 33.01, 30.40, 30.31, 30.19, 25.97 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-k, C-l), 14.44 (C-m).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 1054.4114 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1054.4000$.



7.3.8.3 Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPG-Diphosphat 20d

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (400 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23d** und 107 mg (800 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.50 mL (1.00 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 284 mg (329 μmol , 82%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 284 mg (329 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 550 μL (3.95 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 460 μL (3.92 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 550 μL (3.95 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (1.98 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 132 mg (165 μmol , 0.5 Äquiv.) (S)-HPMPG als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPGs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 31.9 mg (33.4 μmol , 20% bezogen auf das (S)-HPMPG) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 15.94 \text{ min}$.

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 8.33

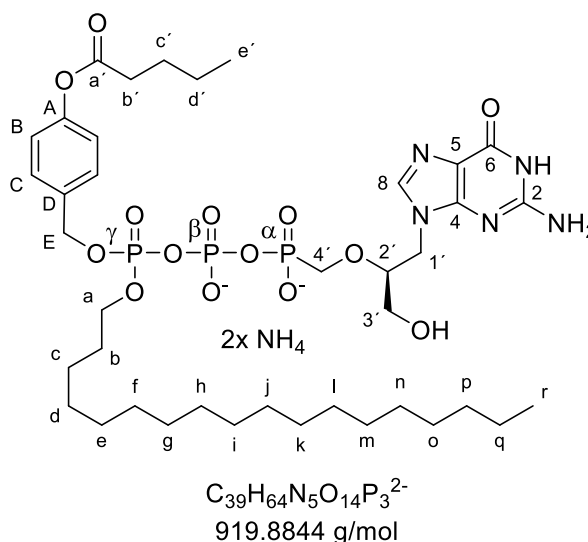
(s, 1H, H-8), 7.52 – 7.44 (m, 2H, H-C), 7.11 – 6.97 (m, 2H, H-B), 5.21 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-E), 4.35 (dd, ¹J_{H,H} = 14.4, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-1'a), 4.25 (dd, ¹J_{H,H} = 14.4, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 1H, H-1'b), 4.19 – 4.08 (m, 2H, H-a), 3.99 – 3.85 (m, 2H, H-4'), 3.80 – 3.75 (m, 1H, H-2'), 3.71 – 3.67 (m, 1H, H-3'a), 3.48 (dd, ¹J_{H,H} = 12.4, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, H-3'b), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-b'), 1.75 – 1.68 (m, 2H, H-b), 1.61 (q, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-c'), 1.52 – 1.41

(m, 2H, H-d'), 1.36 – 1.19 (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), 0.98 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-e'), 0.93 – 0.81 (m, 3H, H-r).

³¹P-NMR (162 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 7.36 (d, ²J_{P,P} = 26.2 Hz, P-α), -13.28 (d, ²J_{P,P} = 16.5 Hz, P-γ), -23.79 (dd, ²J_{P,P} = 25.3, 16.8 Hz, P-β).

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 173.66 (C-a'), 157.83 (C-6), 157.25 (C-4), 152.33 (C-A), 150.32 (C-2), 140.26 (C-8), 138.95 (C-5), 133.87 (C-D), 130.38 (C-C), 122.82 (C-B), 81.51 (C-2'), 70.07 (d, ²J_{C,P} = 55.8 Hz, C-E, C-a), 65.90 (C-4'), 61.53 (C-3'), 45.22 (C-1'), 34.76 (C-b'), 33.08, 31.35 – 30.02 (m), 28.08 (C-c'), 26.56, 23.74 (C-d'), 23.26 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q), 14.44 (C-r), 14.10 (C-e').

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 920.3746 [M+H]⁺, gef.: 920.3500.



7.3.8.4 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPG-Diphosphat 20f

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 160 mg (275 μmol, 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23f** und 73.6 mg (551 μmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 1.72 mL (689 μmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 209 mg (228 μmol, 83%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 209 mg (228 μmol, 1.00 Äquiv.) (4-Monanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 380 μL

(2.74 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 320 μL (2.28 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 380 μL (2.74 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 110 μL (1.37 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 91.4 mg (114 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPG als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPGs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 17.4 mg (17.2 μmol , 15% bezogen auf das (S)-HPMPG) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 17.48 \text{ min}$.

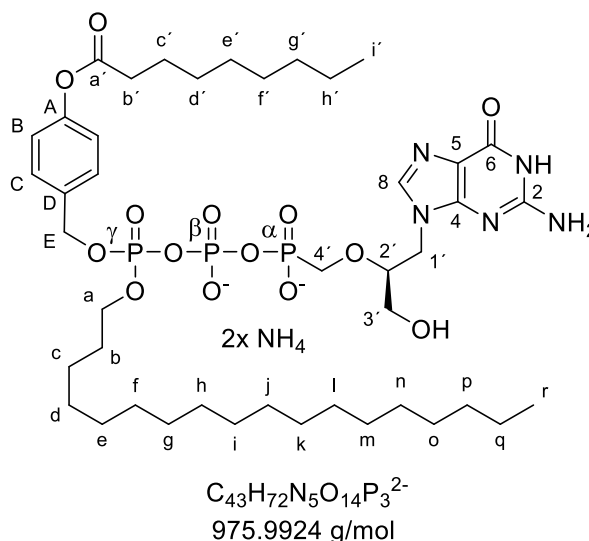
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.33 (s, 1H, H-8), 7.52 – 7.44 (m, 2H, H-C), 7.11 – 6.97 (m, 2H, H-B), 5.21 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H-E), 4.35 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.25 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 4.19 – 4.08 (m, 2H, H-a), 3.99 – 3.85 (m, 2H, H-4'), 3.80 – 3.75 (m, 1H, H-2'),

3.71 – 3.67 (m, 1H, H-3'a), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.75 – 1.68 (m, 2H, H-b), 1.61 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, H-c'), 1.36 – 1.19 (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, H-d', H-e', H-f', H-g', H-h'), 0.93 – 0.81 (m, 6H, H-r, H-i').

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.03 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.4 \text{ Hz}$, P- α), -13.28 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.3 \text{ Hz}$, P- γ), -23.79 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.7$, 17.6 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.66 (C-a'), 157.83 (C-6), 157.25 (C-4), 152.33 (C-A), 150.32 (C-2), 140.26 (C-8), 138.95 (C-5), 133.87 (C-D), 130.38 (C-C), 122.82 (C-B), 81.51 (C-2'), 70.07 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 55.8 \text{ Hz}$, C-E, C-a), 65.90 (C-4'), 61.53 (C-3'), 45.22 (C-1'), 34.76 (C-b'), 33.08, 31.35 – 30.02 (m), 28.08 (C-c'), 26.56, 23.74, 23.26 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-l, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q, C-d', C-e', C-f, C-g', C-h'), 14.44 (C-r), 14.36 (C-i').

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 976.4372$ [M+H] $^+$, $\text{gef.}: 976.4516$.



7.3.8.5 Synthese von γ -Undecanoyl-(S)-HPMPG-Diphosphat 20g

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 100 mg (346 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-phosphonat **23g** und 92.3 mg (691 μ mol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.16 mL (864 μ mol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 161 mg (257 μ mol, 74%) eines farblosen Öls erhalten.

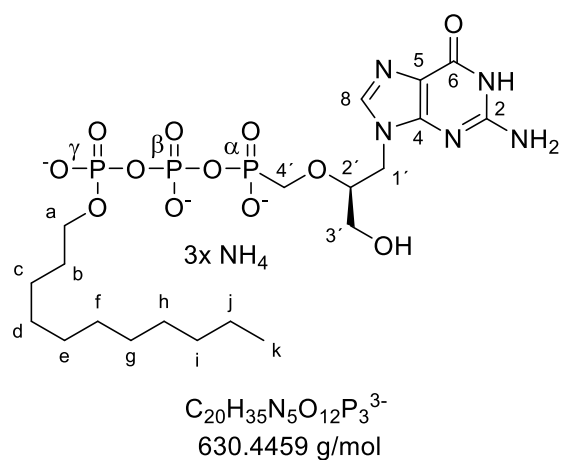
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 161 mg (257 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 430 μ L (3.09 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 360 μ L (2.57 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 430 μ L (3.09 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 120 μ L (1.54 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 103 mg (129 μ mol, 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPG als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPGs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen, mit 200 μ L (1.36 mmol, 20.0 Äquiv.) DBU versetzt und eine Stunde gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 33.0 mg (48.2 μ mol, 37% bezogen auf das (S)-HPMPG) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): λ_{\max} = 254 nm.

HPLC (Methode A): t_r = 12.56 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 8.06 (s, 1H, H-8), 4.32 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, H-1'a), 4.24 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, H-1'b), 4.02 – 3.96 (m, 2H, H-a), 3.96 – 3.84 (m, 2H, H-4'), 3.82 – 3.76 (m, 1H, H-2'), 3.71 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, 1H, H-3'a), 3.47 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, H-3'b), 1.64 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, H-b), 1.43 – 1.23 (m, 16H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-i, H-j), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3H, H-k).



^{31}P -NMR (162 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.50 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.8$ Hz, P- α), -10.78 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.3$ Hz, P- γ), -22.64 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.4$, 19.7 Hz, P- β).

^{13}C -NMR (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 159.00 (C-6), 155.43 (C-2), 152.98 (C-4), 140.95 (C-8), 115.17 (C-5), 81.77 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.8$ Hz, C-2'), 68.52 – 66.01 (m, C-a), 61.66 (C-3'), 44.66 (C-1'), 33.08, 31.85 (C-b), 31.79, 31.40 – 29.82 (m), 26.91, 23.74 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 14.44 (C-k).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 632.1657$ [$\text{M}+2\text{H}$] $^+$, $\text{gef.}: 632.1639$.

7.3.8.6 Synthese von γ -Octadecanoyl-(S)-HPMPG-Diphosphat 20h

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 150 mg (387 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-phosphonat **23h** und 106 mg (774 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.42 mL (968 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 215 mg (297 μmol , 77%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 215 mg (297 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 490 μL (3.56 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 420 μL (2.97 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 490 μL (3.56 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 μL (1.78 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 119 mg (148 μmol , 0.5 Äquiv.) (S)-HPMPG als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPGs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen, mit 200 μL (1.36 mmol, 20.0 Äquiv.) DBU versetzt und eine Stunde gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 31.8 mg (40.6 μmol , 27% bezogen auf das (S)-HPMPG) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$.

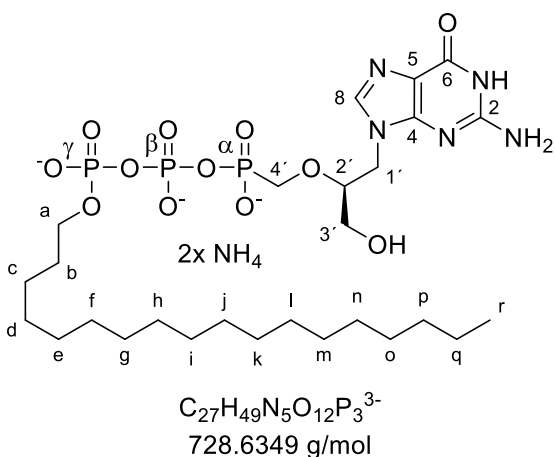
HPLC (Methode A): $t_r = 15.03 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.46 (s, 1H, H-8), 4.42 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 4.30 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.02 – 3.87 (m, 3H, H-a, H-4'a), 3.86 – 3.77 (m, 2H, H-4'b, H-2'), 3.74 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, 4.1 Hz, 1H, H-3'a), 3.51 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 1.61 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 1.43 – 1.13 (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), 0.87 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-r).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.76 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.6 \text{ Hz}$, P- α), -10.89 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.1 \text{ Hz}$, P- γ), -22.95 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.6$, 19.1 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 157.83 (C-6), 157.25 (C-4), 150.32 (C-2), 140.26 (C-8), 138.95 (C-5), 81.51 (C-2'), 70.07 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 55.8 \text{ Hz}$, C-a), 65.90 (C-4'), 61.53 (C-3'), 45.22 (C-1'), 33.08, 31.35 – 30.02 (m), 26.56, 23.26 (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), 14.44 (C-r).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 730.6498 [\text{M}+2\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 730.2498$.



7.3.9 Synthese von (S)-HPMPA-Diphosphatprodrugs

7.3.9.1 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPA-Diphosphat 13a

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 220 mg (383 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** und 102 mg (766 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.39 mL (957 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 304 mg (334 μmol , 87%) eines farblosen Öls erhalten.

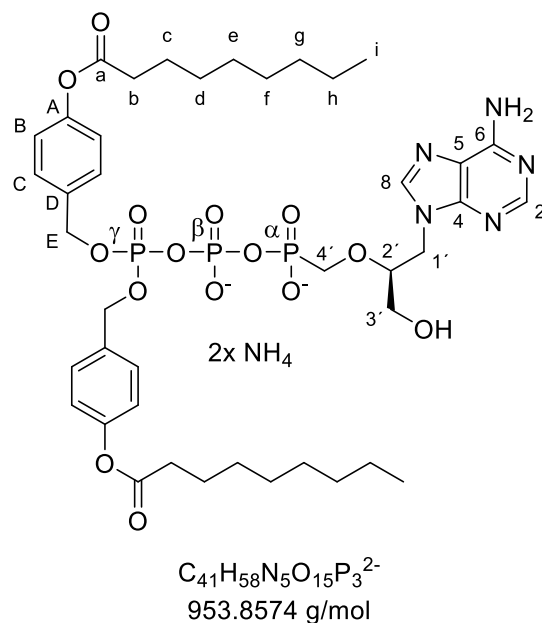
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 304 mg (334 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 550 μL (4.00 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 470 μL (3.34 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 550 μL (4.00 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 160 μL (2.00 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 155 mg (167 μmol , 0.500 Äquiv.) (S)-HPMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 41.7 mg (42.1 μmol , 25% bezogen auf das (S)-HPMPA) einer farblosen Warte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 17.16 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.37 (s, 1H, H-8), 8.21 (s, 1H, H-2), 7.42 – 7.33 (m, 4H, H-C), 7.07 – 6.97 (m, 4H, H-B), 5.15 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.1$ Hz, 4H, H-E), 4.47 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7$ Hz, 1H, H-1'a), 4.37 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 1H, H-1'b), 3.97 – 3.88 (m, 2H, H-4'), 3.83 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4$ Hz, 1H, H-2'), 3.66 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, H-3'a), 3.39 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, H-3'b), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, H-b) 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 6H, H-c), 1.46 – 1.39 (m, 4H, H-d), 1.39 – 1.24 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.95 – 0.87 (m, 6H, H-i).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.35 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.9$ Hz, P- α), -13.24 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.4$ Hz, P- γ), -23.60 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.0$, 17.4 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.70 (C-a), 152.59 (C-6), 148.91 (C-4), 146.60 (C-2), 143.95 (C-8), 152.32 (C-A), 134.92 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.5$ Hz, C-D), 130.40 (C-C), 122.82 (C-B), 119.82 (C-5), 81.62 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.9$ Hz, C-2'), 70.36 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, C-E), 67.51 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.9$ Hz, C-4'), 61.67 (C-3'), 45.50 (C-1'), 35.02, 33.01 (C-b), 31.29 – 28.78 (m), 25.97, 24.78 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 14.44 (C-i).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 956.3372$ [$\text{M}+3\text{H}$] $^+$, $\text{gef.}: 956.3819$.

7.3.9.2 Synthese von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-(S)-HPMPA-Diphosphat 13b

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 220 mg (334 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **23b** und 89.2 mg (668 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.09 mL (835 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 298 mg (300 μmol , 90%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 298 mg (300 μmol , 1.00 Äquiv.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 500 μL (3.59 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 420 μL (3.00 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt,

der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 500 μL (3.59 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 μL (1.80 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 58.9 mg (75.0 μmol , 0.250 Äquiv.) (S)-HPMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 7.2 mg (6.7 μmol , 9% bezogen auf das (S)-HPMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

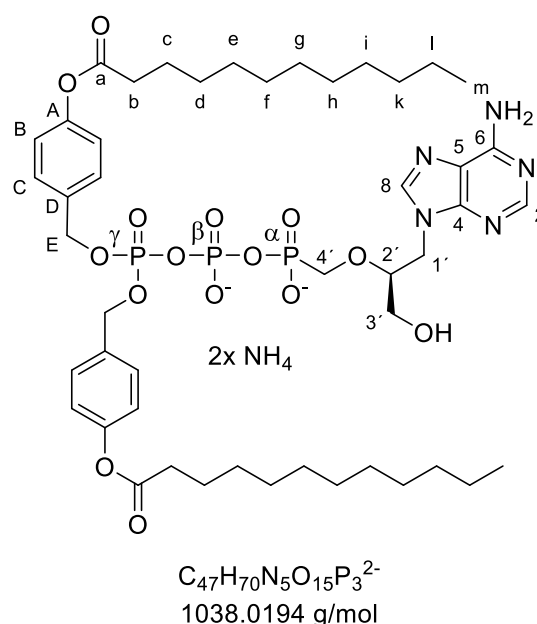
HPLC (Methode A): $t_r = 19.94 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 8.37 (s, 1H, H-8), 8.21 (s, 1H, H-2), 7.42 – 7.33 (m, 4H, H-C), 7.07 – 6.97 (m, 4H, H-B), 5.15 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.1 \text{ Hz}$, 4H, H-E), 4.47 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.37 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 3.97 – 3.88 (m, 2H, H-4'), 3.83 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4 \text{ Hz}$, 1H, H-2'), 3.66 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.39 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, H-b), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 6H, H-c), 1.46 – 1.39 (m, 4H, H-d), 1.39 – 1.24 (m, 16H, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.95 – 0.87 (m, 6H, H-i).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 7.35 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.9 \text{ Hz}$, P- α), -13.24 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.4 \text{ Hz}$, P- γ), -23.60 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 25.0$, 17.4 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD-d_4): δ [ppm]: 173.70 (C-a), 152.59 (C-6), 148.91 (C-4), 146.60 (C-2), 143.95 (C-8), 152.32 (C-A), 134.92 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.5 \text{ Hz}$, C-D), 130.40 (C-C), 122.82 (C-B), 119.82 (C-5), 81.62 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 11.9 \text{ Hz}$, C-2'), 70.36 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8 \text{ Hz}$, C-E), 67.51 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 163.9 \text{ Hz}$, C-4'), 61.67 (C-3'), 45.50 (C-1'), 35.02, 33.01 (C-b), 31.29 – 28.78 (m), 25.97, 24.78 (C-c), 23.72 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 14.44 (C-i).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 1040.4311$ $[\text{M}+3\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1040.4323$.



7.3.9.3 Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPA-Diphosphat 13d

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 210 mg (400 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23d** und 107 mg (800 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.50 mL (1.00 mmol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 306 mg (355 μmol , 89%) eines farblosen Öls erhalten.

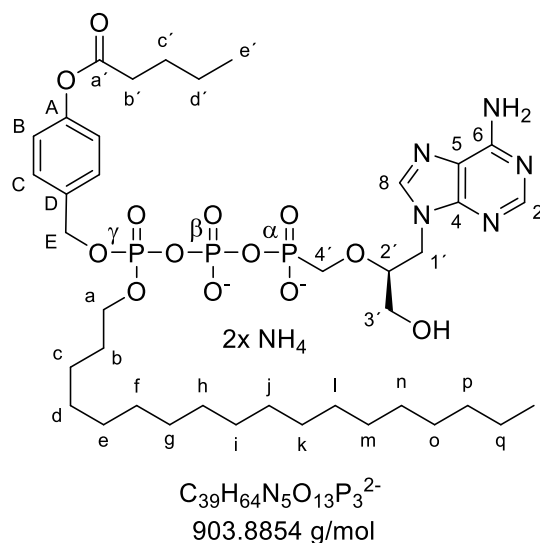
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 306 mg (355 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Pentanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 590 μL (4.26 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 500 μL (3.55 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 590 μL (4.26 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 170 μL (2.13 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 97.7 mg (124 μmol , 0.250 Äquiv.) (S)-HPMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 44.7 mg (47.6 μmol , 38% bezogen auf das (S)-HPMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 18.22 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.40 (s, 1H, H-8), 8.23 (s, 1H, H-2), 7.47 – 7.44 (m, 2H, H-C), 7.08 – 7.01 (m, 2H, H-B), 5.26 – 5.16 (m, 2H, H-E), 4.50 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, 1H, H-1'a), 4.39 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 1H, H-1'b), 4.19 – 4.05 (m, 2H, H-a), 4.03 – 3.90 (m, 2H, H-4'), 3.89 – 3.83 (m, 1H, H-2'), 3.67 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, H-3'a), 3.45 – 3.38 (m, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, H-b'), 1.80 – 1.68 (m, 4H, H-c', H-b), 1.61 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, H-d'), 1.50 – 1.40 (m, 2H, H-c), 1.38 – 1.16 (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-q, H-q), 0.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, H-r), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3H, H-e').



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.26 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.7$ Hz, P- α), -13.05 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.2$ Hz, P- γ), -23.59 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.5$, 16.7 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 172.35 (C-a'), 152.76 (C-6), 152.30 (C-A), 148.45 (C-4), 146.35 (C-2), 144.07 (C-8), 133.45 (C-D), 130.28 (C-C), 122.81 (C-B), 119.22 (C-6), 81.61 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0$ Hz, C-2'), 69.99 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 44.7$, 6.7 Hz, C-E, C-a), 67.51 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 164.4$ Hz, C-4'), 61.67 (C-3'), 59.52 (C-1'), 45.54, 34.76 (C-b), 33.08, 31.23 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.2$ Hz, C-b), 31.14 – 29.69 (m), 28.08 (C-c'), 26.55, 24.78, 23.74 (C-d'), 23.26, 20.71 (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), 14.44 (C-r), 14.11 (C-e').

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 906.3943$ [$\text{M}+3\text{H}$] $^+$, $\text{gef.}: 906.4356$.

7.3.9.4 Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-(S)-HPMPA-Diphosphat 13f

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 220 mg (379 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-phosphonat **23f** und 101 mg (758 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.37 mL (947 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 272 mg (297 μmol , 78%) eines farblosen Öls erhalten.

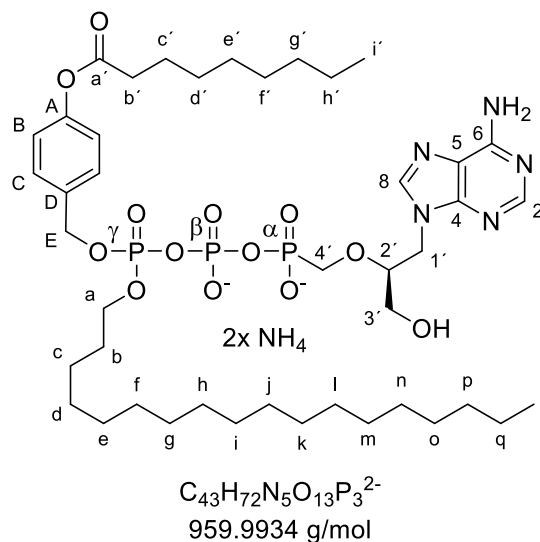
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 272 mg (297 μmol , 1.00 Äquiv.) (4-Nonanoyloxybenzyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 490 μL (3.56 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 420 μL (2.97 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 490 μL (3.56 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 μL (1.78 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 58.3 mg (74.0 μmol , 0.250 Äquiv.) (S)-HPMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch und wiederholter automatisierte RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 44.3 mg (43.8 μmol , 59% bezogen auf das (S)-HPMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 20.04 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 8.40 (s, 1H, H-8), 8.23 (s, 1H, H-2), 7.47 – 7.44 (m, 2H, H-C), 7.08 – 7.01 (m, 2H, H-B), 5.26 – 5.16 (m, 2H, H-E), 4.50 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5 \text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 4.39 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 1H, H-1'b), 4.19 – 4.05 (m, 2H, H-a), 4.03 – 3.90 (m, 2H, H-4'), 3.89 – 3.83 (m, 1H, H-2'), 3.67 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.4$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.45 – 3.38 (m, 1H, H-3'b), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-b'), 1.80 – 1.68 (m, 4H, H-c', H-b), 1.61 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, H-d'), 1.50 – 1.40 (m, 2H, H-c), 1.38 – 1.16 (m, 36H, 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-q, H-q, H-e', H-f', H-g', H-h'), 0.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 6H, H-r, H-i').



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 7.33 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.8 \text{ Hz}$, P- α), -13.01 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.6 \text{ Hz}$, P- γ), -23.56 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 24.6$, 16.6 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 172.35 (C-a'), 152.76 (C-6), 152.30 (C-A), 148.45 (C-4), 146.35 (C-2), 144.07 (C-8), 133.45 (C-D), 130.28 (C-C), 122.81 (C-B), 119.22 (C-6), 81.61 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0 \text{ Hz}$, C-2'), 69.99 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 44.7$, 6.7 Hz, C-E, C-a), 67.51 (d, $^1J_{\text{C,P}} =$

164.4 Hz, C-4'), 61.67 (C-3'), 59.52 (C-1'), 45.54, 34.76 (C-b), 33.08, 31.23 (d, $^3J_{C,P} = 7.2$ Hz, C-b), 31.14 – 29.69 (m), 28.08 (C-c'), 26.55, 24.78, 23.74 (C-d'), 23.26, 20.71 (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-e', C-f', C-g', C-h'), 14.44 (C-r, Ci').

HRMS (ESI-MS): m/z = ber.: 962.4569 [M+3H]⁺, gef.: 962.4990.

7.3.9.5 Synthese von γ -Undecanoyl-(S)-HPMPA-Diphosphat 13g

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 100 mg (346 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-phosphonat **23g** und 92.3 mg (691 μ mol, 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.16 mL (864 μ mol, 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 142 mg (227 μ mol, 66%) eines farblosen Öls erhalten.

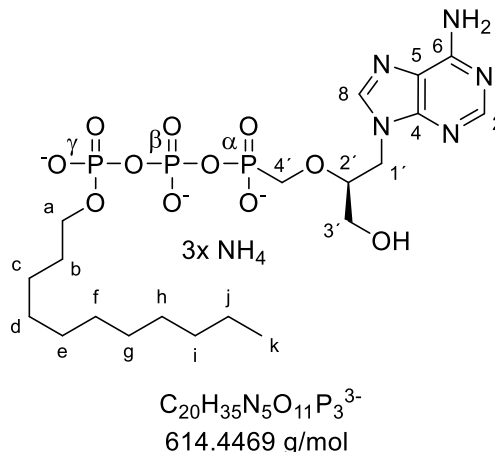
Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 142 mg (227 μ mol, 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-undecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 380 μ L (2.73 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 320 μ L (2.27 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 380 μ L (2.73 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 110 μ L (1.36 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 53.6 mg (68.0 μ mol, 0.250 Äquiv.) (S)-HPMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen, mit 200 μ L (1.36 mmol, 20.0 Äquiv.) DBU versetzt und eine Stunde gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 33.2 mg (48.2 μ mol, 71% bezogen auf das (S)-HPMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\max} = 260$ nm.

HPLC (Methode A): $t_r = 12.90$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 8.44 (s, 1H, H-8), 8.27 (s, 1H, H-2), 4.53 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.8$ Hz, 1H, H-1'a), 4.43 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1H, H-1'b), 4.03 – 3.91 (m, 5H, H-a, H-4', H-3'a), 3.84 – 3.79 (m, 1H, H-2'), 3.70 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.5$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, H-3'b), 1.65 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, 2H, H-b), 1.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2H, H-c), 1.36 – 1.23 (m, 14H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 3H, H-k).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.64 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 23.9$ Hz, P- α), -11.02 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.2$ Hz, P- γ), -22.49 - -24.10 (m, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 152.76 (C-6), 148.45 (C-4), 146.35 (C-2), 144.07 (C-8), 119.22 (C-5), 81.61 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0$ Hz, C-2'), 69.99 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 44.7$, C-a), 67.51 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 164.4$ Hz, C-4'), 61.67 (C-3'), 59.52 (C-1'), 45.54, 34.76 (C-b), 33.08, 31.23 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.2$ Hz, C-b), 31.14 – 29.69 (m), 28.08 (C-c'), 26.55, 24.78, 23.26, 20.71 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 14.44 (C-k).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 618.1853$ [$\text{M}+4\text{H}$] $^+$, $\text{gef.}: 618.2145$.

7.3.9.6 Synthese von γ -Octadecanoyl-(S)-HPMPA-Diphosphat 13h

Die Synthese wurde nach **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 150 mg (387 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-phosphonat **23h** und 106 mg (774 μmol , 2.00 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 2.42 mL (968 μmol , 2.50 Äquiv.) tetra-*n*-Butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) zugegeben. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1 M Ammoniumacetat sowie Wasser wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: Es wurden 191 mg (264 μmol , 68%) eines farblosen Öls erhalten.

Die Synthese wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 191 mg (264 μmol , 1.00 Äquiv.) (Cyanoethyl)-octadecanoyl-pyrophosphat in abs. Acetonitril gelöst und mit 440 μL (3.21 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 370 μL (2.64 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und 440 μL (3.21 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 130 μL

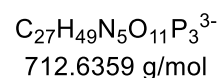
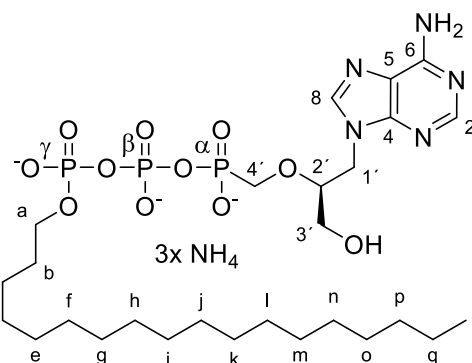
(1.59 mmol, 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 62.4 mg (79.0 μmol , 0.250 Äquiv.) (S)-HPMPA als Tetrabutylammoniumsalz zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach dem vollständigen Umsatz des (S)-HPMPAs alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen, mit 200 μL (1.36 mmol, 20.0 Äquiv.) DBU versetzt und eine Stunde gerührt. Es folgte ein Ionenaustausch und wiederholte automatisierte RP-Chromatographie.

Ausbeute: Es wurden 35.2 mg (45.9 μmol , 58% bezogen auf das (S)-HPMPA) einer farblosen Watte erhalten.

UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$.

HPLC (Methode A): $t_r = 15.24 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 8.48 (s, 1H, H-8), 8.29 (s, 1H, H-2), 4.55 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 4.44 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 14.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 1H), 4.04 – 3.96 (m, 4H, H-4', H-a), 3.82 (m, 1H, H-2'), 3.72 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 12.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1 \text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 3.48 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 11.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 1.74 – 1.61 (m, 2H, H-b), 1.46 – 1.23 (m, 30H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-k, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, H-r).



$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 7.62 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 22.7 \text{ Hz}$, P- α), -10.91 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.5 \text{ Hz}$, P- γ), -22.69 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 22.6$, 19.3 Hz, P- β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm]: 152.76 (C-6), 148.45 (C-4), 146.35 (C-2), 144.07 (C-8), 119.22 (C-5), 81.61 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 12.0 \text{ Hz}$, C-2'), 69.99 (dd, $^2J_{\text{C,P}} = 44.7$, C-a), 67.51 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 164.4 \text{ Hz}$, C-4'), 61.67 (C-3'), 59.52 (C-1'), 45.54, 34.76 (C-b), 33.08, 31.23 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.2 \text{ Hz}$, C-b), 31.14 – 29.69 (m), 28.08 (C-c'), 26.55, 24.78, 23.26, 20.71 (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), 14.44 (C-r).

HRMS (ESI-MS): $m/z = \text{ber.}: 716.2949 [\text{M}+4\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 716.3269$.

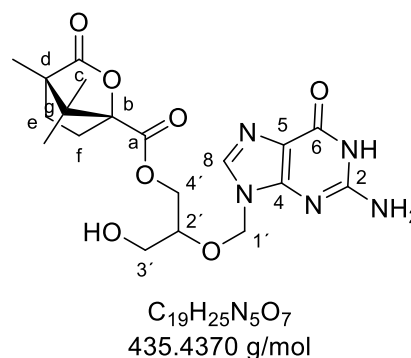
7.3.10 Weitere Synthesen

7.3.10.1 (-)-Camphanoyl-Ganciclovir 75

Unter Stickstoff als Inertgas wurde 208 mg (814 μmol , 1.10 Äquiv.) Ganciclovir **16** in siedendem abs. DMF gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 150 μL (1.11 mmol, 1.50 Äquiv.) Triethylamin, sowie tropfenweise 150 mg (740 μmol , 1.00 Äquiv.) (-)-Camphanoylchlorid gelöst in abs. DMF zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: Es wurden 32.1 mg (73.7 μmol , 10%) einer farblosen Watte erhalten.

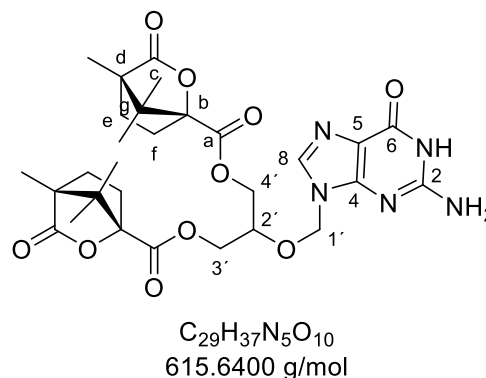
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMOS-}d_6$): δ [ppm]: 10.71 (s, 1H, N-H), 7.81 (pseudo d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 1H, H-8), 6.52 (s, 2H, NH_2), 5.44 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 2H, H-1'), 4.90 (s, 1H, O-H), 4.35 (ddd, $^1J_{\text{H,H}} = 15.3$, 11.7, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, 1H, H-4'a), 4.11 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 11.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, H-4'b), 3.93 – 3.79 (m, 1H, H-2'), 2.33 (ddd, $^1J_{\text{H,H}} = 13.3$, 10.7, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, H-3'a), 2.28 – 2.15 (m, 1H, H-3'b), 1.97 – 1.76 (m, 2H, H-f), 1.61 – 1.45 (m, 2H, H-e), 1.00 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, 6H, $-\text{CH}_3$), 0.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.89 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.78 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).



HRMS (ESI⁺): $m/z = \text{ber.}: 436.1827$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 436.1820$.

Ausbeute: Es wurden 35.7 mg (58.0 μmol , 8%) einer farblosen Watte erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 10.63 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, H-8), 6.46 (s, 2H, NH_2), 5.45 (s, 2H, H-1'), 4.45 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 11.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'a), 4.39 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 11.3$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, H-4'a), 4.27 – 4.12 (m, 3H, H-2', H-3'b, H-4'b), 2.31 – 2.17 (m, 2H, H-f a), 2.03 – 1.80 (m, 4H, H-f b, H-e a), 1.61 – 1.49 (m, 2H, H-e b), 1.00 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.99 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.91 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.89 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.80 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.77 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).



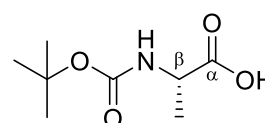
HRMS (ESI⁺): $m/z = \text{ber.}: 616.2613$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 616.2618$.

7.3.10.2 Synthese von Boc-L-Alanin

Es wurde 1.00 g (11.2 mmol, 1.00 Äquiv.) L-Alanin in 30 mL Dioxan/Wasser (2:1) suspendiert, mit 10 mL einer 1 M Natriumhydroxidlösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 0°C gekühlt, mit 943 mg (11.2 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat sowie 3.87 mL (16.8 mmol, 1.50 Äquiv.) Boc-Anhydrid versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Dioxan im Vakuum entfernt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: Es wurden 2.13 g (11.2 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 12.37 (s, 1H, COO-H), 7.08 (d, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 1H, NH), 3.92 (p, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-β), 1.37 (s, 9H, -CH₃), 1.21 (d, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, -CH₃).



C₈H₁₅NO₄
189.2110 g/mol

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 174.63 (C-α), 155.24 (C-Boc), 77.90 (C-Boc), 48.78 (C-α), 28.20 (-CH₃), 17.03 (-CH₃).

IR: ν [cm⁻¹] = 3383, 2987, 2967, 2925, 2163, 2145, 2118, 2051, 2011, 1980, 1964, 1732, 1686, 1513, 1454, 1413, 1395, 1366, 1343, 1291, 1228, 1199, 1156, 1067, 1040, 1016, 864, 830, 783, 764, 751, 636, 574, 546, 465, 432.

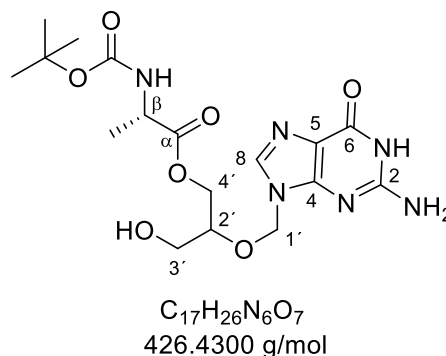
HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 399.1749 [M+H]⁺, gef.: 399.1686.

7.3.10.3 Synthese von Boc-L-Alanin-Ganciclovir 77

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 150 mg (588 μmol, 1.00 Äquiv.) Ganciclovir **16** unter Rückfluss in abs. DMF gelöst. Parallel wurden 167 mg (882 μmol, 1.50 Äquiv.) Boc-L-Alanin, 281 mg (1.47 mmol, 2.50 Äquiv.) EDC sowie 144 mg (1.18 mmol, 2.00 Äquiv.) DMAP in abs DMF gelöst und tropfenweise mit der abgekühlten Ganciclovir Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde 26 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 66.4 mg (156 μmol , 27%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 10.61 (s, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, H-8), 7.24 (pseudo t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 1H, NH), 6.47 (s, 2H, NH_2), 5.43 (s, 2H, H-1'), 4.81 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 1H, OH), 4.21 (dd, $^1J_{\text{H,H}} = 11.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, 1H, H-3'a), 4.03 – 3.87 (m, 2H, H- β , H-3'b), 3.87 – 3.71 (m, 1H, H-2'), 3.49 – 3.34 (m, 2H, H-4'), 1.37 (s, 9H, $-\text{CH}_3$), 1.15 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm]: 173.00 (C- α), 156.76 (C-5), 155.23 (C-Boc), 153.84 (C-2), 151.28 (C-4) 137.59 (C-8), 116.41 (C-5), 78.14, 76.62 (C-2'), 71.20 (C-1'), 63.93 (C-3'), 63.63 (C- β), 60.25 (C-4'), 49.14 (C-2'), 28.16 ($-\text{CH}_3$), 16.66 ($-\text{CH}_3$).

IR: ν [cm^{-1}] = 3322, 3191, 2978, 2722, 2179, 2163, 2147, 2118, 2063, 2011, 1981, 1922, 1689, 1629, 1606, 1573, 1541, 1523, 1487, 1454, 1390, 1365, 1304, 1229, 1157, 1100, 1059, 980, 899, 865, 810, 776, 746, 679, 513, 457, 438, 406.

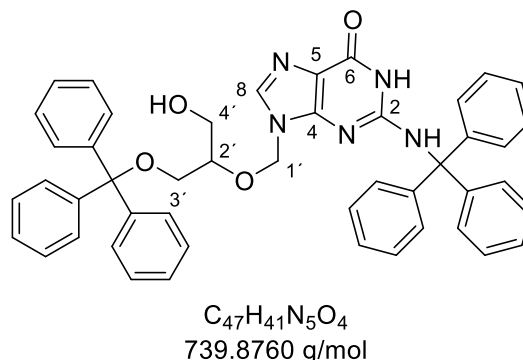
HRMS (ESI $^+$): $m/z = \text{ber.}: 427.1936$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, gef.: 427.1937.

7.3.10.4 Synthese von *N*-O-Bis-Trityl-Ganciclovir 89

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 500 mg (1.96 mmol, 1.00 Äquiv.) Ganciclovir **16** in abs. DMF suspendiert und mit 1.20 g (4.31 mmol, 2.20 Äquiv.) Tritylchlorid, 0.800 mL (5.88 mmol, 3.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 10 mol% DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol kristallisiert, säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 14:1) und anschließend noch einmal aus Ethanol kristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 0.940 g (1.27 mmol, 65%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 10.68 (s, 1H, N-H), 7.78 (s, 1H, H-8), 7.73 (s, 1H, N-H), 7.37 – 7.28 (m, 8H, H-Trityl), 7.28 – 7.19 (m, 14H, H-Trityl), 7.19 – 7.11 (m, 6H, H-Trityl), 7.09 – 7.03 (m, 3H, H-Trityl), 5.00 (d, $^1J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, 1H, H-1'a), 4.90 (d, $^1J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, 1H, H-1'b), 4.45 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, 1H, OH), 3.49 – 3.37 (m, 1H, H-2'), 3.10 –



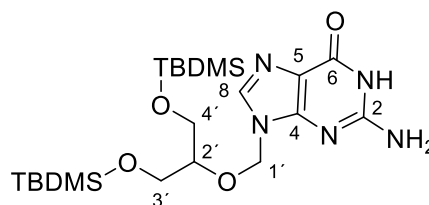
2.97 (m, 1H, H-3'a), 2.94 – 2.82 (m, 1H, H-3'b), 2.74 (dd, $^1J_{H,H} = 10.0$, $^3J_{H,H} 6.5$ Hz, 1H, H-4'a), 2.58 – 2.52 (m, 1H, H-4'b).

7.3.10.5 Synthese von TBDMS-Ganciclovir **91**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.00 g (7.84 mmol, 1.00 Äquiv.) Ganciclovir **16** in abs. DMF suspendiert und mit 4.72 g (31.3 mmol, 4.00 Äquiv.) TBDMS-chlorid sowie 5.33 g (78.4 mmol, 10.00 Äquiv.) Imidazol versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 19:1).

Ausbeute: Es wurden 2.94 g (6.08 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 10.58 (s, 1H, N-H), 7.79 (s, 1H, H-8), 6.42 (s, 2H, -NH₂), 5.40 (s, 2H, H-1'), 3.66 (p, $^3J_{H,H} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'), 3.56 (dd, $^1J_{H,H} = 10.7$, $^3J_{H,H} = 4.9$ Hz, 2H, H-3'a, H-4'a), 3.43 (dd, $^1J_{H,H} = 10.7$, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, 2H, H-3'b, H-4'b), 0.81 (s, 18H, CH₃), -0.03 (s, 6H, CH₃), -0.04 (s, 6H, CH₃).



$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}_2$
483.7600 g/mol

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 156.76 (C-6), 153.77 (C-2), 151.22 (C-4), 137.50 (C-8), 116.58 (C-5), 79.58 (C-2'), 71.57 (C-1'), 61.91 (C-3', C-4'), 25.69 (CH₃), 17.89 (CH₃).

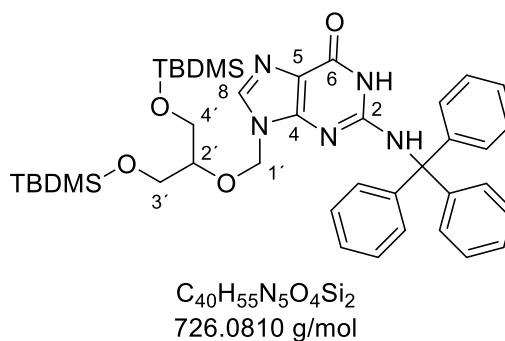
IR: ν [cm^{-1}] = 3379, 3273, 3112, 2954, 2927, 2882, 2855, 1690, 1638, 1600, 1560, 1470, 1405, 1359, 1336, 1322, 1298, 1275, 1250, 1215, 1173, 1160, 1133, 1094, 1023, 1002, 939, 903, 832, 775, 736, 686, 666, 629, 581, 552, 502, 475.

7.3.10.6 Synthese von TBDMS-N-Trityl-Ganciclovir **92**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.36 g (4.88 mmol, 1.00 Äquiv.) TBDMS-Ganciclovir **91** in abs. Dichlormethan gelöst und mit 2.04 g (7.32 mmol, 1.50 Äquiv.) Tritylchlorid, 1.36 mL (9.76 mmol, 2.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 10 mol% DMAP versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde zweimal mit Wasser gewaschen, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 19:1).

Ausbeute: Es wurden 3.48 g (4.80 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 10.60 (s, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, H-8), 7.65 (s, 1H, NH), 7.33 – 7.25 (m, 12H, H-Trityl), 7.25 – 7.18 (m, 3H, H-Trityl), 4.88 (s, 2H, H-1'), 3.28 (dd, ¹J_{H,H} = 10.4, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, 2H, H-3'a, H-4'a), 3.21 (p, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, H-2'), 3.14 (dd, ¹J_{H,H} = 10.5, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 2H, H-3'b, H-4'b), 0.81 (s, 18H, -CH₃), -0.05 (s, 6H, -CH₃), -0.07 (s, 6H, -CH₃).

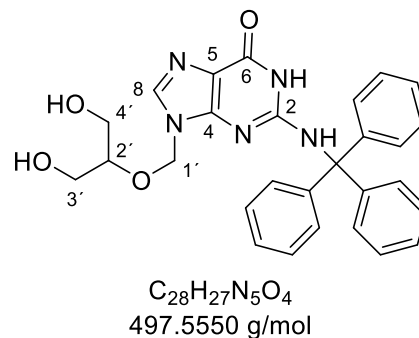


7.3.10.7 Synthese von *N*-Trityl-Ganciclovir 93

Es wurden 694 mg (956 μM, 1.00 Äquiv.) TBDMS-*N*-Trityl-Ganciclovir **92** in Dichlormethan gelöst und mit 1.87 mL (11.47 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylammonium*Trihydrofluorid versetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Kieselgel beendet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1).

Ausbeute: Es wurden 472 mg (948 μM, 99%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 10.61 (s, 1H, NH), 7.68 (s, 1H, H-8), 7.66 (s, 1H, NH), 7.36 – 7.26 (m, 12H, H-Trityl), 7.26 – 7.15 (m, 3H, H-Trityl), 4.88 (s, 2H, H-2'), 4.31 (t, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 2H, OH), 3.28 (dd, ¹J_{H,H} = 10.4, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, 2H, H-3'a, H-4'a), 3.21 (p, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, H-2'), 3.14 (dd, ¹J_{H,H} = 10.5, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 2H, H-3'b, H-4'b).

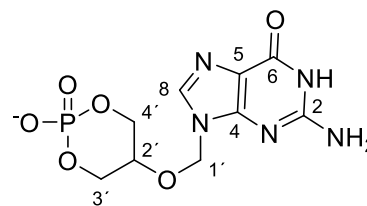


7.3.10.8 Synthese von cyclischem-Ganciclovir-Monophosphat 95

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 110 mg (431 μmol, 1.00 Äquiv.) Ganciclovir **16** in 5 mL TMP suspendiert und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 60.0 μL (646 μmol, 1.50 Äquiv.) Phosphoroxotrichlorid zugegeben. Die Reaktion wurde mittels HPLC kontrolliert und nach 3.5 Stunden abgebrochen, da kein weiterer Umsatz zu beobachten war. Die Reaktionslösung wurde auf ges. Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und dreimal mit Chloroform extrahiert. Das Wasser wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in etwas tetra-*n*-Butylammoniumacetat-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 61.0 mg (109 μmol, 25%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 7.81 (s, 1H, NH), 6.58 (s, 2H, NH₂), 5.39 (s, 2H, H-1'), 4.01 – 3.92 (m, 2H, H-3'a, H-4'a), 3.86 – 3.73 (m, 2H, H-3'b, H-4'b), 3.57 – 3.51 (m, 1H, H-2').



C₉H₁₁N₅O₆P⁻
316.1903 g/mol

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm]: 156.79 (C-6), 154.00 (C-4), 151.35 (C-2), 137.55 (C-8), 116.44 (C-5), 70.23 (d, ³J_{C,P} = 4.3 Hz, C-2'), 70.06 (C-1'), 66.48 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, C-3', C-4').

HRMS (ESI*): m/z = ber.: 316.0452 [M]⁻, gef.: 316.0447.

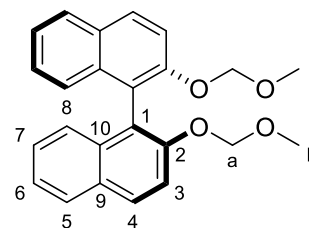
7.3.10.9 Synthese von MOM-(S)-BINOL 87

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 500 mg (1.75 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-BINOL **85** in abs. THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 105 mg (4.37 mmol, 2.50 Äquiv.) Natriumhydrid portionsweise zugegeben, 10 Minuten bei 0°C und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionslösung wurden tropfenweise 330 µL (4.37 mmol, 2.50 Äquiv.) MOM-Chlorid gelöst in abs. THF zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde in eiskaltes Wasser gegeben und anschließend die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: Es wurden 647 mg (1.73 mmol, 99%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

R_f-Wert: 0.63 (PE/EE 4:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 7.70 – 7.61 (m, 2H, H-5), 7.60 – 7.50 (m, 2H, H-4), 7.25 (pseudo-d, ³J_{H,H} = 9.0 Hz, 2H, H-3), 7.02 (pseudo-ddd, ³J_{H,H} = 8.1, 6.7, 1.3 Hz, 2H, H-7), 6.90 (pseudo-ddd, ³J_{H,H} = 8.1, 6.7, 1.3 Hz, 2H, H-6), 6.86 – 6.80 (m, 2H, H-8), 4.76 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-a'), 4.65 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-a''), 2.82 (s, 6H, H-b).



C₂₄H₂₂O₄
374.4360 g/mol

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 152.24 (C-2), 133.33 (C-10), 129.26 (C-9), 129.22 (C-5), 127.95 (C-4), 126.33 (C-6), 124.67 (C-8), 123.86 (C-7), 119.90 (C-1), 116.84 (C-3), 94.02 (C-a), 55.24 (C-b).

HRMS (ESI*): m/z = ber.: 397.1410 [M+Na]⁺, gef.: 397.1412.

IR: ν [cm^{-1}] = 3408, 3055, 2954, 2899, 2848, 2824, 1903, 1619, 1590, 1504, 1461, 1431, 1403, 1379, 1355, 1330, 1304, 1269, 1257, 1236, 1196, 1144, 1082, 1066, 1029, 1007, 917, 899, 863, 807, 774, 745, 704, 683, 665, 642, 613, 568, 533, 493, 436, 421.

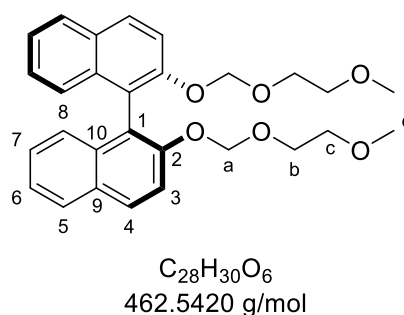
7.3.10.10 Synthese von MEM-(S)-BINOL 86

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 500 mg (1.75 mmol, 1.00 Äquiv.) (S)-BINOL **85** in abs. THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 92.2 mg (3.84 mmol, 2.20 Äquiv.) Natriumhydrid portionsweise zugegeben, 10 Minuten bei 0°C und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionslösung wurden tropfenweise 440 μL (3.84 mmol, 2.20 Äquiv.) MEM-Chlorid gelöst in abs. THF zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde in eiskaltes Wasser gegeben und anschließend die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 \rightarrow 2:1).

R_f-Wert: 0.19 (PE/EE 4:1).

Ausbeute: Es wurden 591 mg (1.28 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 8.10 – 8.02 (m, 2H, H-5), 8.01 – 7.87 (m, 2H, H-4), 7.65 (pseudo-d, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 2H, H-3), 7.36 (pseudo-ddd, ³J_{H,H} = 8.1, 6.7, 1.2 Hz, 2H, H-7), 7.24 (pseudo-ddd, ³J_{H,H} = 8.3, 6.7, 1.4 Hz, 2H, H-6), 7.07 – 6.84 (m, 2H, H-8), 5.18 (d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, H-a'), 5.11 (d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, H-a''), 3.42 – 3.36 (m, 2H, H-b'), 3.36 – 3.30 (m, 2H, H-b''), 3.25 – 3.20 (m, 4H, H-c), 3.12 (s, 6H, H-d).



¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 152.24 (C-2), 133.33 (C-10), 129.26 (C-9), 129.22 (C-5), 127.95 (C-4), 126.33 (C-6), 124.67 (C-8), 123.86 (C-7), 119.90 (C-1), 116.84 (C-3), 93.14 (C-a), 70.76 (C-c), 66.96 (C-b), 57.88 (C-d).

7.3.10.11 Synthese von 3,3'-Diethylcarboxyl-(S)-Binol 84

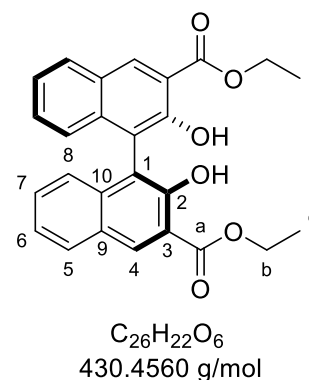
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 660 mg (1.73 mmol, 1.00 Äquiv.) MOM-(S)-BINOL **87** in abs. THF aufgenommen, auf -78°C gekühlt, tropfenweise mit 2.75 mL (4.01 mmol, 2.50 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in *n*-Hexan versetzt und 20 Minuten bei -78°C sowie eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde wieder auf -78°C gekühlt und tropfenweise 430 μL (4.01 mmol, 2.50 Äquiv.) Ethylchloroformiat über 10 Minuten zugegeben. Die Reaktion wurde 30 Minuten bei -78°C sowie 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Reinstwasser beendet und mit 6 mL 6 M wässriger Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 60°C gerührt und anschließend auf Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 9:1).

R_F-Wert: 0.13 (PE/EE 9:1).

Ausbeute: Es wurden 614 mg (1.43 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 10.46 (s, 2H, OH), 8.75 (s, 2H, H-4), 8.16 – 8.10 (m, 2H, H-5), 7.42 – 7.35 (m, 4H, H-6, H-7), 7.02 – 6.95 (m, 2H, H-8), 4.50 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 4H, H-b), 1.44 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 6H, H-c).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 169.38 (C-1), 153.25 (C-2), 136.41 (C-10), 132.34 (C-4), 129.90 (C-5), 129.54 (C-8), 126.78 (C-9), 124.05 (C-7), 123.97 (C-6), 116.66 (C-1), 114.57 (C-4), 62.02 (C-b), 14.08 (C-c).



HRMS (ESI⁺): $m/z = \text{ber.}: 431.1489$ [M+H]⁺, 453.1309 [M+Na]⁺, gef. 431.1503, 453.1314.

IR: ν [cm^{-1}] = 3154, 2938, 2871, 1672, 1625, 1601, 1577, 1502, 1479, 1431, 1392, 1370, 1337, 1314, 1276, 1250, 1219, 1206, 1141, 1069, 1030, 998, 934, 902, 869, 792, 740, 718, 647, 618, 595, 525, 468, 432.

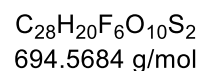
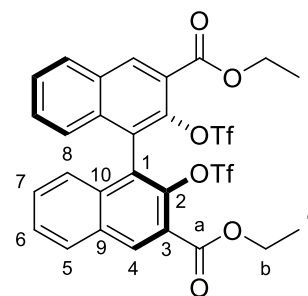
7.3.10.12 Synthese von 3,3'-Diethylcarboxyl-(S)-BINOL-triflat 88

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 610 mg (1.42 mmol, 1.00 Äquiv.) 3,3'-Diethylcarboxyl-(S)-Binol **84** in abs. Pyridin gelöst, mit 17.3 mg (142 μ mol, 0.100 Äquiv.) DMAP versetzt und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden Tropfenweise 710 μ L (4.25 mmol, 3.00 Äquiv.) Triflylanhydrid zugegeben, 30 Minuten bei 0°C und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch die Zugabe von Reinstwasser beendet und dreimal die Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 1M Salzsäure, Wasser sowie ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

R_f-Wert: 0.67 (PE/EE 9:1).

Ausbeute: Es wurden 928 mg (1.34 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 8.98 (s, 2H, H-4), 8.40 (pseudo-d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-5), 7.77 (pseudo-t, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-6), 7.61 (pseudo-t, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 2H, H-7), 7.12 (pseudo-d, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 2H, H-8), 4.49 (dq, ¹J_{H,H} = 10.9, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, H-b'), 4.38 (dq, ¹J_{H,H} = 10.9, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, H-b''), 1.39 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 6H, H-c).



¹⁹F-NMR (MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: -74.57.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 163.81 (C-a), 141.90 (C-2), 135.61 (C-4), 133.94 (C-10), 131.16 (C-9), 130.46 (C-7), 129.88 (C-5), 128.60 (C-6), 126.75 (C-8), 123.80 (C-2), 122.86 (C-1), 117.22 (d, J = 320.7 Hz, C-Tf), 62.15 (C-b), 13.86 (C-c).

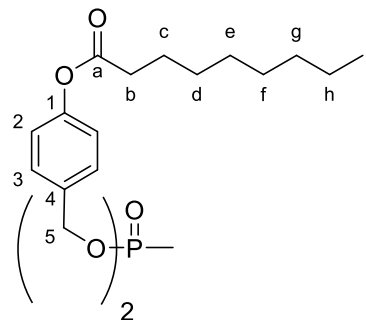
7.3.10.13 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyyl)-Methylphosphonsäure 37

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.00 g (1.74 mmol, 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **23a** in abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Anschließend wurden tropfenweise 1.91 mL (1.91 mmol, 1.10 Äquiv) einer 1 M *n*-Butyllithium-Lösung versetzt und 15 Minuten bei -78°C gerührt. Zu der Suspension wurden 120 μ L (1.91 mmol, 1.10 Äquiv.) Methylodid zugegeben, 1.5 Stunden bei -78°C sowie 30 Minuten bei 0°C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. Ammoniumchloridlösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, wobei für eine bessere Phasentrennung ges. Natriumchloridlösung zugegeben werden musste. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1).

R_f-Wert: 0.26 (PE/EE 2:1).

Ausbeute: Es wurden 592 mg (1.01 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 7.41 – 7.22 (m, 4H, H-3), 7.11 – 7.00 (m, 4H, H-4), 4.91 (qd, ³J_{H,P} = 12.1, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 4H, H-5), 2.49 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 4H, H-b), 1.56 (p, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 4H, H-c), 1.47 (d, ²J_{H,P} = 17.4 Hz, 3H, CH₃), 1.34 – 1.07 (m, 20H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.89 – 0.66 (m, 6H, H-i).



C₃₃H₅₉O₇P
588.7218 g/mol

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 32.75.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 171.74 (C-a), 150.24 (C-1), 134.16 (d, ³J_{C,P} = 6.4 Hz, C-4), 129.00 (C-3), 121.80 (C-4), 65.67 (d, ²J_{C,P} = 5.7 Hz, C-5), 33.43 (C-b), 31.19, 28.61, 28.50, 28.36, 24.29 (C-c), 22.04 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 13.91 (C-i), 10.10 (d, ¹J_{C,P} = 95.4 Hz, CH₃).

HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 611.3108 [M+Na]⁺, gef.: 611.3130.

7.3.10.14 Synthese von Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-methylenpyrophosphat 38

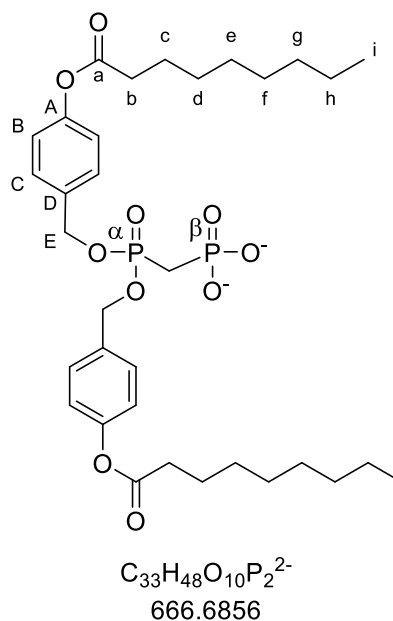
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 120 mg (204 μmol, 1.00 Äquiv.) Bis-(4-nonanoyloxybenzyl)-methylphosphonsäure in abs. THF gelöst, auf -78°C gekühlt und mit 150 μL (245 μmol, 1.20 Äquiv.) 1.6 M *n*-Buthyllithium in *n*-Hexan versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei -78°C und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie wieder auf -78°C gekühlt und mit 20.0 μL (245 μmol, 1.20 Äquiv.) Phosphorylchlorid versetzt wurde. Die Reaktion wurde 18 Stunden gerührt wobei sie auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand in Tetrabutylammoniumacetat-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 31.9 mg (27.7 μmol, 14%) eines farblosen Harzes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 7.42 – 7.37 (m, 4H, H-), 7.10 – 7.05 (m, 4H), 4.85 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 7.6$ Hz, 4H, H-E), 3.00 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 4H, H-b), 2.57 (t, $^2J_{\text{H,P}} = 7.4$ Hz, 2H, - CH_2 -), 1.64 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, H-c), 1.38 – 1.19 (m, 52H), 1.16 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H).

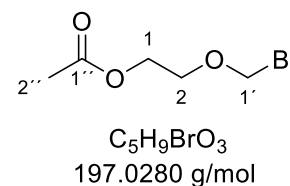
$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 20.87 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.2$ Hz), 13.80 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.7$ Hz).

Von einer weiteren Isolierung des Produktes sowie einer weitergehenden Analytik wurde aufgrund der geringen Menge an Produkt abgesehen. Es wurde so für die weitere Synthese genutzt.



7.3.10.15 Synthese von 2-(Bromomethoxy)-ethylacetat **69**

Es wurden 5.00 mL (71.6 mmol, 1.00 Äquiv.) Acetyl bromid **71** auf 0°C gekühlt und tropfenweise mit 5.83 mL (78.7 mmol, 1.10 Äquiv.) 1,3-Dioxolan **70** versetzt. Die Reaktionslösung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit Ethylacetat verdünnt und zweimal mit Wasser sowie einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



Ausbeute: Es wurden 14.0 g (71.2 mmol, 99%) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 5.70 (s, 2H, H-1'), 4.32 – 4.23 (m, 2H, H-1), 3.91 – 3.82 (m, 2H, H-2), 2.09 (s, 3H, H-2').

7.3.10.16 Synthese von Adenin-Acyclovir **69**

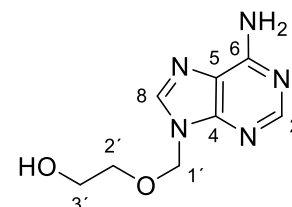
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.00 g (14.1 mmol, 1.00 Äquiv.) *N*-Benzoyladenin in abs. DMF gelöst, mit 405 mg (16.9 mmol, 1.20 Äquiv.) Natriumhydrid versetzt, 10 Minuten bei 0°C und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch wieder auf 0°C gekühlt und mit 3.33 g (16.9 mmol, 1.20 Äquiv.) 2-(Bromomethyl)-ethylacetat **72** versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 30:1). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit 1M

Natriummethanolat-Lösung in Methanol versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde filtriert und der Filterkuchen aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 2.42 g (11.6 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 8.27 (s, 1H, H-8), 8.17 (s, 1H, H-2), 7.28 (s, 2H, -NH₂), 5.55 (s, 2H, H-1'), 4.68 (s, 1H, -OH), 3.61 – 3.48 (m, 2H, H-2'a, H-3'a), 3.48 – 3.39 (m, 2H, H-2'b, H-3'b).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 156.04 (C-6), 152.89 (C-2), 149.74 (C-4), 141.17 (C-8), 118.93 (C-5), 72.21 (C-1'), 70.75 (C-2'), 59.89 (C-3').



C₈H₁₁N₅O₂
209.2090 g/mol

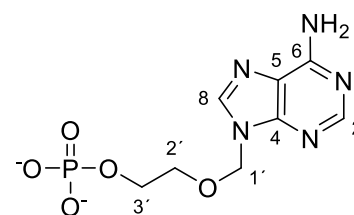
HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 210.0986 [M+H]⁺, gef.: 210.1086.

7.3.10.17 Synthese von Adenin-Acyclovir-Monophosphat 73

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 100 mg (478 μmol, 1.00 Äquiv.) Adenin-Acyclovir **69** in 5 mL Trimethylphosphan suspendiert, auf 0°C gekühlt und mit 90.0 μL (956 μmol, 2.00 Äquiv.) Tributylammin versetzt. Die Suspension wurde 10 Minuten gerührt und anschließend mit 230 μL (956 μmol, 2.00 Äquiv.) Phosphorylchlorid versetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde alle 30 Minuten mittels HPLC kontrolliert und die Reaktion nach einer Stunde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Chloroform gewaschen und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde in tetra-*n*-Butylammoniumacetat-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter RP-Chromatographie, Ionenaustausch auf Ammonium und erneuter automatisierter RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 61.2 mg (189 μmol, 40%) einer farblosen Warte erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 8.36 (s, 1H, H-8), 8.17 (s, 1H, H-2), 7.27 (s, 2H, -NH₂), 5.59 (s, 2H, H-1'), 3.75 – 3.65 (m, 2H, H-3'), 3.58 (q, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 2H, H-2').



C₈H₁₀N₅O₅P²⁻
287.1729 g/mol

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: -0.43.

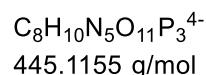
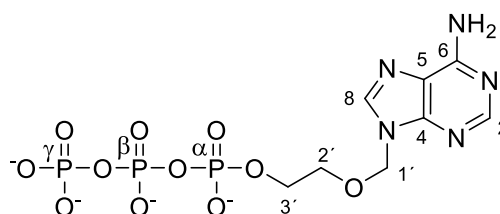
7.3.10.18 Synthese von Adenin-Acyclovir-Triphosphat 74

Die Synthese wurde nach **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 33.0 mg (102 μmol , 1.00 Äquiv.) Adenin-Acyclovir-Monophosphat **73** in abs. Acetonitril suspendiert und mit 170 μL (1.22 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 140 μL (1.02 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und mit 140 μL (1.02 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 50.0 μL (613 μmol , 6.00 Äquiv.) Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde zu einer Lösung aus 276 mg (306 μmol , 3.00 Äquiv.) Pyrophosphat in abs. Acetonitril getropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über automatisierte RP-Chromatographie, Ionenaustausch sowie einer zweiten automatisierten RP-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 53.0 mg (102 μmol , quantitativ) eines farblosen Pulvers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: 8.41 (s, 1H, H-8), 8.30 (s, 1H, H-2), 5.78 (s, 2H, H-1'), 4.21 – 4.12 (m, 2H, H-3'), 3.83 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, 2H, H-2').















$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]: -10.31 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.7$ Hz, P- α), -10.92 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.8$ Hz, P- γ), -22.77 (pseudo t, $^2J_{\text{P,P}} = 20.0$ Hz, P- β).










HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 449.9975 $[\text{M}+4\text{H}]^+$, gef.: 450.0190.

8 Gefahrstoffverzeichnis










In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Gefahrstoffe aufgelistet. Die GHS-Piktogramme sowie die H- und P-Sätze wurden der GESTIS-Stoffdatenbank und dem Sigma Aldrich-Katalog entnommen.

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
(-)-Camphanoylchlorid		314	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 363
(R)-Glycidyltritylether	Kein Gefahrstoff nach GHS		
(S)-BINOL		315, 319	302+352, 305+351+338
1,3-Dioxolan	  	225, 319, 360	201, 202, 210, 233, 305+351+338, 308+313
1.6 M Butyllithium in n-Hexan	   	260, 225, 250, 280, 314, 304, 336, 373, 411, 361f, EUH014	305+351+338, 310, 273, 210
1M Natriummethanolat in Methanol	  	228, 251, 290, 302, EUH014	210, 280, 314, 305+351+338, 310, 370+378, 402+404, 406
1-Methylimidazol	 	302, 311, 314	280, 301+312+330, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338








Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
3-Hydroxypropionitril		225, 300, 310, 331, 319	210, 280, 302+350, 304+340, 305+351+338, 310, 330
4,5-Dicyanoimidazol (0.25M) in Acetonitril		225, 302, 312, 315, 318, 332, 335	210, 261, 280, 305+351+338
4-Hydroxybenzylalkohol		319	305+351+338
5-Fluoruracil		301, 312, 315, 319, 335, 340, 360FD	261, 280, 362, 305+351+338, 405, 502
6-Chlorpurin		302	
7M Ammoniak in Methanol		225, 301, 311+331, 314, 370, 412	210, 273, 280, 301+310+330, 303+361+353, 305+351+338, +310
9-Flourenylmethanol	Kein Gefahrstoff nach GHS		
Acetonitril		225, 332, 302, 312, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233








Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Acetylbromid		290, 314	234, 280, 301+330+331, 303+364+353, 304+340+310, 305+351+338
6-N-Benzoyladenin		302, 317, 361d	202, 261, 280, 301+312, 302+352, 308+313
4-N-Benzoylcytosin		302+332, 315, 319, 335	261, 264, 301+312, 302+352, 304+340+312, 305+351+338
6-O-Benzylguanin		315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Boc-L-Alanin	Kein Gefahrstoff nach GHS		
Chloroform		351, 302, 373, 315	302+352, 314
Cidofovir ((S)-HPMPC)		301, 315	301+310
Dibenzylphosphonat		315, 319, 335	305+351+338
Dichlormethan		351	281, 308+313
Diethyl(Hydroxymethyl)- phosphonat		315, 319, 335	261, 302+352, 280, 305+351+338







Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Diethylether		224; 302; 336; EUH 019; EUH 06 6	210, 240, 403+253
Diisopropylamin		225; 332; 302; 314	210; 280; 301+330; 305+351+338
Diphenylphosphonat		302, 315, 318, 335	261, 280, 305+351+338
Di-tert-butyl dicarbonat		226, 330, 315, 314, 318, 335	210, 260, 280, 304+350+310, 305+351+338 +310, 370,+378
DMAP		310, 301, 315, 319	302+352, 305+351+338
DMF		226, 312+332, 360D	201, 280, 305+351+338, 308+313
Dodecanoylchlorid		314	280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 363, 405









Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Essigsäure		226, 314	280, 305+351+338
Ethanol		225, 319	210, 280, 305+351+338, 337+313, 403+235
Ethylacetat		225, 319, 336, EUH 066	210, 233, 240, 305+351+338, 403+235
Ethylchloroformiat		225, 301, 314, 330	210, 303+361+353, 310, 280, 301+330+331, 305+351+338
Ganciclovir		360	201, 308+313
Glycerin	Kein Gefahrstoff nach GHS		
Heptanoylchlorid		314, 330	260, 271, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Isopropanol		225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Kieselgel		350	210, 202, 281, 308, 313, 405, 501
L-Alanin	Kein Gefahrstoff nach GHS		








Gefahrstoffverzeichnis









Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
MEM-Chlorid		226, 302, 315, 319, 335, 350	210, 301+312, 303+361+353, 304+340+311, 305+351+338, 308+313
Mesylchlorid		290, 310, 311, 330, 314, 317, 335	280, 310, 305+351+338, 304+340, 301+330+331, 303+361+353
Methanol		225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 309+310
Methyliodid		301+331, 312, 315, 319, 335, 351, 410	273, 305+352, 304+340, 305+351+338, 308+310
MOM-Chlorid		225, 302+312, 330+350	201, 210, 280, 301+312+330, 302+352+312, 304+340+310
Natriumchlorid	Kein Gefahrstoff nach GHS		
Natriumhydrogencarbonat	Kein Gefahrstoff nach GHS		
Natriumsulfat	Kein Gefahrstoff nach GHS		
N-Chlorsuccinimid		302, 314	305+351+338, 310



Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
n-Octadecanol		319, 412	273, 305+351+338
Nonanoylchlorid		314	208, 305+351+338, 310
n-Undecanol		319, 410	273, 305+351+338
PBS-Puffer	Kein Gefahrstoff nach GHS		
Petrolether 50-70	 	225, 304, 340, 350, 361, 373, 412	210, 201, 273, 281, 301+310, 308+313
Phosphor(III)Chlorid		300+330, 373, 314, EUH 014, RUH 029	280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 309+310
Phosphorylchlorid		302, 330, 314, 372, EUH014, EUH029	280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 308+310
(R)-PMPA	Nicht nach GHS eingestuft		
Propionylchlorid		225, 302, 314, 331 EUH014	210, 280, 303+361+353, 301+312, 301+340+310, 305+351+338, 403+235

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Pyridin		225, 310, EUH 014	210, 233, 302+352
Schwefelsäure		290, 314	280, 301+351+338, 403+233
Solketal	Kein Gefahrstoff nach GHS		
tert-Butyldimethylsilylchlorid		228, 314	210, 240, 241, 260, 264, 280, 301+330+331, 303+36+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 363, 370+378, 405, 501
tert-Butylhydroperoxid in n-Decan		226, 242, 302, 304, 311+331, 314, 317, 341, 411	201, 210, 234, 261, 280, 305+351+338
Tetra-n-buthylammonium- hydrogenphosphat		315, 319	280, 305+351+338
Tetra-n-buthylammonium- hydroxyd (40%ig in Wasser)		314	210, 260, 303+361+353, 305+351+338
THF		225, 302, 319, 335, 351, EUH 019	210, 233, 280, 307+378, 501

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Thymin		Kein Gefahrstoff nach GHS	
Tosylchlorid		290, 315, 317, 318	234, 261, 264, 280, 302+352, 305+351+338
Tributylamin		302, 310+330, 315	260, 262, 280, 302+352, 310, 304+340+310
Triethylamin		255, 302, 311+331, 314, 335	210, 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 403+233
Triethylammonium Trihydroflourid		300+310+330, 314	260, 270, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Trifluoressigsäureanhydrid		314, 332	380, 305+351+338, 310
Triflylanhydrid		302, 314	280, 305, 351, 338, 310
Trimethylphosphan		226, 302, 315, 318, 335, EUH014	210, 233, 280, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
Trimethylsilylbromid		226, 314	280, 305+351+338, 310

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Tritylchlorid		314	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 363
Valerinylchlorid		226, 314, 331	261, 280, 305+351+338, 310

9 Literaturverzeichnis

1. Lwoff, A. The Concept of Virus. *Microbiology* **1957**, 17, 239-253.
2. Schulz, T. F. Viren – allgemeine Prinzipien. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 2020; pp 563-582.
3. Josenhans, C.; Hahn, H. Bakterien: Definition und Aufbau. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 2020; pp 229-241.
4. Quirke, V.M. (2001). History of Penicillin. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.)
5. Zhu, J.-D.; Meng, W.; Wang, X.-J.; Wang, H.-C. R. Broad-spectrum antiviral agents. *Frontiers Microbiol.* **2015**, 6.
6. Carrat, F.; Flahault, A. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine* **2007**, 25, 6852-6862.
7. Graham, B. S. Advances in antiviral vaccine development. *Immun. Rev.* **2013**, 255, 230-242.
8. UNAIDS. Kennzahlen zur weltweiten Verbreitung von AIDS/HIV-Infektionen in den Jahren 2010 bis 2021. (11.08.2022).
9. Worldometer. Entwicklung der weltweiten Fallzahl des Coronavirus (COVID-19) seit Januar 2020. (11.08).
10. Coffin, J. M. Structure and Classification of Retroviruses. In *The Retroviridae*, Levy, J. A., Ed. Springer US: Boston, MA, 1992; pp 19-49.
11. PA., M. Unresolved questions over the origin of HIV and AIDS *ASM News* **2005**, 71, 15-20.
12. Patel, P.; Borkowf, C. B.; Brooks, J. T.; Lasry, A.; Lansky, A.; Mermin, J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS* **2014**, 28, 1509-19.
13. Levy, J. A. *HIV and the Pathogenesis of AIDS* ASM Press: 2007; Vol. Washington, D.C, p 665.
14. Kirchhoff, F. HIV Life Cycle: Overview. In *Encyclopedia of AIDS*, 2013; pp 1-9.
15. Schulz, T. F.; Behrens, G. Humane Immundefizienzviren (HIV-1, HIV-2). In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 2020; pp 679-695.
16. Briggs, J. A. G.; Kräusslich, H.-G. The Molecular Architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* **2011**, 410, 491-500.
17. Murray John, M.; Kelleher Anthony, D.; Cooper David, A. Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected CD4+ T Cells in a Population of HIV-Infected Individuals. *J. Virol.* **2011**, 85, 10798-10805.
18. Zhu, J.; Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **2008**, 112, 1557-1569.
19. Aavani, P.; Allen, L. J. S. The role of CD4 T cells in immune system activation and viral reproduction in a simple model for HIV infection. *Appl. Math. Model.* **2019**, 75, 210-222.
20. Ronald, M. Oncological complications of human immunodeficiency virus disease and hematologic consequences of their treatment. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, 29, 35-43.
21. Johnson, J. A.; Sax, P. E. Beginning antiretroviral therapy for patients with HIV. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2014**, 28, 421-438.
22. Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Lehrman, S. N.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, 83, 8333-8337.
23. Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antivir. Res.* **2010**, 85, 1-18.
24. Daluge, S. M.; Good, S. S.; Faletto, M. B.; Miller, W. H.; St Clair, M. H.; Boone, L. R.; Tisdale, M.; Parry, N. R.; Reardon, J. E.; Dornsife, R. E.; Averett, D. R.; Krenitsky, T. A. 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1082-1093.

25. Sarafianos, S. G.; Marchand, B.; Das, K.; Himmel, D. M.; Parniak, M. A.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.* **2009**, 385, 693-713.
26. Cihlar, T.; Ray, A. S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antivir. Res.* **2010**, 85, 39-58.
27. Deval, J.; Götte, M. Nucleoside analogue inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. In *Antivir. Res.*, 2009; pp 51-70.
28. Hediger, M. A.; Romero, M. F.; Peng, J.-B.; Rolfs, A.; Takanaga, H.; Bruford, E. A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Arch.* **2004**, 447, 465-468.
29. Balimane, P. V.; Sinko, P. J. Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 39, 183-209.
30. Cihlar, T.; Ray, A. S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antivir. Res.* **2010**, 85, 39-58.
31. Lewis, W.; Papoian, T.; Gonzalez, B.; Louie, H.; Kelly, D. P.; Payne, R. M.; Grody, W. W. Mitochondrial ultrastructural and molecular changes induced by zidovudine in rat hearts. *Lab. Invest.* **1991**, 65, 228-36.
32. Brinkman, K.; ter Hofstede, H. J.; Burger, D. M.; Smeitink, J. A.; Koopmans, P. P. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* **1998**, 12, 1735-44.
33. Arenas-Pinto, A.; Grant, A. D.; Edwards, S.; Weller, I. V. D. Lactic acidosis in HIV infected patients: a systematic review of published cases. *Sex. Transm. Infect.* **2003**, 79, 340.
34. Boubaker, K.; Flepp, M.; Sudre, P.; Furrer, H.; Haensel, A.; Hirschel, B.; Boggian, K.; Chave, J. P.; Bernasconi, E.; Egger, M.; Opravil, M.; Rickenbach, M.; Francioli, P.; Telenti, A.; Swiss, H. I. V. C. S. Hyperlactatemia and antiretroviral therapy: the swiss HIV cohort study. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, 33, 1931-1937.
35. E, D. E. C.; Descamps, J.; P, D. E. S.; Holyacute, A. (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: An aliphatic nucleoside analog with broad-spectrum antiviral activity. *Science* **1978**, 200, 563-5.
36. Shipkowitz, N. L.; Bower, R. R.; Appell, R. N.; Nordeen, C. W.; Overby, L. R.; Roderick, W. R.; Schleicher, J. B.; Von Esch, A. M. Suppression of herpes simplex virus infection by phosphonoacetic acid. *J. Appl. Microbiol.* **1973**, 26, 264-7.
37. Holý, A. Synthesis of 5'-deoxyuridine 5'-phosphonic acid. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 881-884.
38. Holý, A. Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9 31, 2567-92.
39. De Clercq, E.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antivir. Res.* **1987**, 8, 261-72.
40. Balzarini, J.; Naesens, L.; Herdewijn, P.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Pauwels, R.; Baba, M.; Johns, D. G.; De Clercq, E. Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 332-6.
41. Krejcová, R.; Horská, K.; Votruba, I.; Holý, A. Interaction of guanine phosphonomethoxyalkyl derivatives with GMP kinase isoenzymes. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 60, 1907-1913.
42. Romana Krejcová, K. H., Ivan Votruba, Antonín Holý. Phosphorylation of purine (phosphonomethoxy)alkyl derivatives by mitochondrial AMP kinase (AK2 Type) from L1210 Cells. *ChemPlusChem* **2000**, 65, 1653-1668.
43. Votruba, I.; Bernaerts, R.; Sakuma, T.; De Clercq, E.; Merta, A.; Rosenberg, I.; Holý, A. Intracellular phosphorylation of broad-spectrum anti-DNA virus agent (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine and inhibition of viral DNA synthesis. *Mol. Pharmacol.* **1987**, 32, 524-9.
44. De Clercq, E.; Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 928-40.

45. Xiong, X.; Smith, J. L.; Chen, M. S. Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1997**, *41*, 594-9.
46. Naesens, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Neyts, J.; De Clercq, E. HPMPC (cidofovir), PMEAs (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: A review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections. *Antiviral Chem. Chemother.* **1997**, *8*, 1-23.
47. Field, A. K.; Biron, K. K. "The end of innocence" revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 1-13.
48. De Clercq, E. Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev. Med. Virol.* **1993**, *3*, 85-96.
49. Smee, D. F.; Sidwell, R. W.; Kefauver, D.; Bray, M.; Huggins, J. W. Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1329-35.
50. Nettleton, P. F.; Gilray, J. A.; Reid, H. W.; Mercer, A. A. Parapoxviruses are strongly inhibited in vitro by cidofovir. *Antivir. Res.* **2000**, *48*, 205-208.
51. De Clercq, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antivir. Res.* **2002**, *55*, 1-13.
52. De Clercq, E. Cidofovir in the therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 456-8.
53. Cullen, J. M.; Li, D. H.; Brown, C.; Eisenberg, E. J.; Cundy, K. C.; Wolfe, J.; Toole, J.; Gibbs, C. Antiviral efficacy and pharmacokinetics of oral adefovir dipivoxil in chronically woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2740-5.
54. Julander, J. G.; Sidwell, R. W.; Morrey, J. D. Characterizing antiviral activity of adefovir dipivoxil in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antivir. Res.* **2002**, *55*, 27-40.
55. Delmas, J.; Schorr, O.; Jamard, C.; Gibbs, C.; Trépo, C.; Hantz, O.; Zoulim, F. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 425-33.
56. Gilson, R. J.; Chopra, K. B.; Newell, A. M.; Murray-Lyon, I. M.; Nelson, M. R.; Rice, S. J.; Tedder, R. S.; Toole, J.; Jaffe, H. S.; Weller, I. V. A placebo-controlled phase I/II study of adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Viral Hepat.* **1999**, *6*, 387-95.
57. Benhamou, Y.; Bochet, M.; Thibault, V.; Calvez, V.; Fievet, M. H.; Vig, P.; Gibbs, C. S.; Brosgart, C.; Fry, J.; Namini, H.; Katlama, C.; Poynard, T. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study. *Lancet* **2001**, *358*, 718-23.
58. Marcellin, P.; Chang, T. T.; Lim, S. G.; Tong, M. J.; Sievert, W.; Shiffman, M. L.; Jeffers, L.; Goodman, Z.; Wulfsohn, M. S.; Xiong, S.; Fry, J.; Brosgart, C. L. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 808-16.
59. Perrillo, R.; Schiff, E.; Yoshida, E.; Statler, A.; Hirsch, K.; Wright, T.; Gutfreund, K.; Lamy, P.; Murray, A. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* **2000**, *32*, 129-34.
60. Tsai, C.-C.; Follis, K. E.; Sabo, A.; Beck, T. W.; Grant, R. F.; Bischofberger, N.; Benveniste, R. E.; Black, R. Prevention of SIV infection in macaques by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Science* **1995**, *270*, 1197-1199.
61. Tsai, C.-C.; Follis, K. E.; Beck, T. W.; Sabo, A.; Bischofberger, N.; Dailey, P. J. Effects of (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine monotherapy on chronic SIV infection in macaques. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1997**, *13*, 707-712.
62. Van Rompay, K. K.; McChesney, M. B.; Aguirre, N. L.; Schmidt, K. A.; Bischofberger, N.; Marthas, M. L. Two low doses of tenofovir protect newborn macaques against oral simian immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 429-38.

63. Schooley, R. T.; Ruane, P.; Myers, R. A.; Beall, G.; Lampiris, H.; Berger, D.; Chen, S. S.; Miller, M. D.; Isaacson, E.; Cheng, A. K. Tenofovir DF in antiretroviral-experienced patients: results from a 48-week, randomized, double-blind study. *AIDS* **2002**, *16*, 1257-63.
64. Gallant, J. E.; Staszewski, S.; Pozniak, A. L.; DeJesus, E.; Suleiman, J. M. A. H.; Miller, M. D.; Coakley, D. F.; Lu, B.; Toole, J. J.; Cheng, A. K.; for the 903 Study, G. Efficacy and safety of Tenofovir DF vs Stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients A 3-year randomized trial. *JAMA* **2004**, *292*, 191-201.
65. De Clercq, E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *119*, 1-7.
66. Ray, A. S.; Fordyce, M. W.; Hitchcock, M. J. M. Tenofovir alafenamide: A novel prodrug of tenofovir for the treatment of Human Immunodeficiency Virus. *Antivir. Res.* **2016**, *125*, 63-70.
67. De Clercq, E. Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **2003**, *1*, 21-43.
68. Ho, H. T.; Woods, K.; Bronson, J. J.; de Boeck, H.; Martin, J. C.; Hitchcock, M. J. M. Intracellular metabolism of the antih herpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 197-202.
69. Johnson, D. R.; O'Neill, B. P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J. Neuro-Oncol.* **2012**, *107*, 359-364.
70. Hadaczek, P.; Ozawa, T.; Soroceanu, L.; Yoshida, Y.; Matlaf, L.; Singer, E.; Fiallos, E.; James, C. D.; Cobbs, C. S. Cidofovir: A novel antitumor agent for glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6473-6483.
71. Clercq, E. D.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Hatse, S.; Liekens, S.; Naesens, L.; Neyts, J.; Snoeck, R. Antitumor potential of acyclic nucleoside phosphonates. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 759-771.
72. Pillay, D.; Zambon, M. Antiviral drug resistance. *BMJ* **1998**, *317*, 660-2.
73. Erice, A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 286-97.
74. Stella, V. J. Prodrugs: Some thoughts and current issues. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4755-4765.
75. Clas, S. D.; Sanchez, R. I.; Nofsinger, R. Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 79-87.
76. Rautio, J.; Kärkkäinen, J.; Sloan, K. B. Prodrugs - Recent approvals and a glimpse of the pipeline. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *109*, 146-161.
77. Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 559-587.
78. Stella, V. J. A Case for Prodrugs. In *Prodrugs: Challenges and Rewards Part 1*, Stella, V. J.; Borchardt, R. T.; Hageman, M. J.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. W., Eds. Springer New York: New York, NY, 2007; pp 3-33.
79. Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 677-694.
80. Svensson, L.-å.; Tunek, A. The design and bioactivation of presystemically stable prodrugs. *Drug Metab. Rev.* **1988**, *19*, 165-194.
81. Stella, V.J. (2007). A Case for Prodrugs. In: Stella, V.J., Borchardt, R.T., Hageman, M.J., Oliyai, R., Maag, H., Tilley, J.W. (eds) Prodrugs. Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, vol V. Springer, New York, NY.
82. Beaumont, K.; Webster, R.; Gardner, I.; Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* **2003**, *4*, 461-485.
83. Maag, H. Overcoming poor permeability – the role of prodrugs for oral drug delivery. *Drug Discov. Today* **2012**, *9*, e121-e130.
84. Serpi, M.; Pertusati, F. An overview of ProTide technology and its implications to drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2021**, *16*, 1149-1161.

85. Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. cycloSal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphate (cycloSal-d4TMP): synthesis and antiviral evaluation of a new d4TMP delivery system. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
86. Rios Morales, E. H.; Balzarini, J.; Meier, C. Stereoselective synthesis and antiviral activity of methyl-substituted cyclo sal-pronucleotides. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7245-7252.
87. Weinschenk, L.; Gollnest, T.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPPro nucleoside diphosphates of anti-HIV active nucleoside analogues. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 891-900.
88. Gollnest, T.; Dinis de Oliveira, T.; Rath, A.; Hauber, I.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Membrane-permeable triphosphate prodrugs of nucleoside analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5255-5258.
- Gollnest, T.; Dinis de Oliveira, T.; Rath, A.; Hauber, I.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Membrane-permeable triphosphate prodrugs of nucleoside analogues. *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5341-5344
89. Zhao, C.; Weber, S.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Prodrugs of γ -Alkyl-modified nucleoside triphosphates: improved inhibition of HIV reverse transcriptase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 22063-22071.
- Zhao, C.; Weber, S.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Prodrugs of γ -Alkyl-modified nucleoside triphosphates: improved inhibition of HIV reverse transcriptase. *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 22247-22255
90. Kullik, G. A. Synthese von Phosphonat-Diphosphat Prodrugs am Beispiel von (R)-[2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-1-methylethoxy]methylphosphonsäure (PMPA). Masterarbeit, Universität Hamburg, Hamburg, 2019.
91. De Clercq, E. Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 569-96.
92. Gollnest, T. Das TriPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nucleosidtriphosphat-Prodrugs. Dissertation, Universität Hamburg, **2015**.
93. Kaushik, M.; Kumar, V. tert-Butyl-N-chlorocyanamide: A novel and versatile reagent in organic synthesis. *Synlett* **2007**, 2007, 2937-2951.
94. Mohamady, S.; Taylor, S. D. General procedure for the synthesis of dinucleoside polyphosphates. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6344-6349.
95. Gavara, L.; Petit, C.; Montchamp, J.-L. DBU-promoted alkylation of alkyl phosphinates and H-phosphonates. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5000-5003.
96. Witt, J. Synthese von fluoreszenzmarkierter TriPPPro-Verbindungen für Zellaufnahmestudien und Synthese antitumoraler TriPPPro-Prodrugs. Dissertation, Universität Hamburg, **2023**.
97. Rossmeyer, M. Synthese γ -alkylierter fluoreszierender TriPPPro-Verbindungen für Zellaufnahmestudien und symmetrischer antitumoraktiver TriPPPro-Verbindungen für Zellproliferationsassays. Dissertation, Universität Hamburg, **2023**.
98. Abumrad, N. A.; Sfeir, Z.; Connelly, M. A.; Coburn, C. Lipid transporters: membrane transport systems for cholesterol and fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2000**, *3*.
99. Weising, S.; Weber, S.; Schols, D.; Meier, C. Triphosphate prodrugs of the anti-HIV-active compound 3'-Deoxy-3'-fluorothymidine (FLT). *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 12163-12175.
100. Cherrington, J. M.; Allen, S. J. W.; Bischofberger, N.; Chen, M. S. Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α , β and γ . *Antivir. Chem. Chemother.* **1995**, *6*, 217-221.
101. Garforth, S. J.; Parniak, M. A.; Prasad, V. R. Utilization of a deoxynucleoside diphosphate substrate by HIV reverse transcriptase. *PLOS ONE* **2008**, *3*, e2074.
102. Clercq, E. D.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antivir. Res.* **1987**, *8*, 261-272.

103. Holý, A.; Rosenberg, I.; Dvorská, H. Synthesis of (3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) derivatives of heterocyclic bases. *ChemPlusChem* **1989**, 54, 2470-2501.
104. Brodfuehrer, P. R.; Howell, H. G.; Sapino, C.; Vemishetti, P. A practical synthesis of (S)-HPMPC. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3243-3246.
105. Martin, J. C.; Smees, D. F.; Verheyden, J. P. H. Synthesis of 9-(4-hydroxy-2-oxobutyl)guanine, 9-(2,4-dihydroxybutyl)guanine and related acyclic nucleoside analogs. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 755-759.
106. Görbig, U. Nucleosidphosphonat-Prodrugs auf Basis des *cycloSal*-Konzepts. Dissertation, Universität Hamburg, **2007**.
107. Weising, S. Stereoselective synthesis of carbocyclic nucleoside analogues and their triphosphate prodrugs - Synthesis of γ -alkyl-modified nucleoside triphosphates. Dissertation, Universität Hamburg, **2018**.
108. Bronson, J. J.; Ghazzouli, I.; Hitchcock, M. J. M.; Webb, R. R.; Martin, J. C. Synthesis and antiviral activity of the nucleotide analog (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cystosine. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1457-1463.
109. Marasco, C. J.; Kramer, D. L.; Miller, J.; Porter, C. W.; Bacchi, C. J.; Rattendi, D.; Kucera, L.; Iyer, N.; Bernacki, R.; Pera, P.; Sufrin, J. R. Synthesis and evaluation of analogues of 5'-[(Z)-4-Amino-2-butenyl]methylamino)-5'-deoxyadenosine as inhibitors of Tumor Cell Growth, Trypanosomal Growth, and HIV-1 Infectivity. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5112-5122.
110. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 5065-5068.
111. Heuberger, B. D.; Switzer, C. A Pre-RNA Candidate Revisited: Both enantiomers of flexible nucleoside triphosphates are DNA polymerase substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 412-413.
112. Mandai, H.; Fujii, K.; Yasuhara, H.; Abe, K.; Mitsudo, K.; Korenaga, T.; Suga, S. Enantioselective acyl transfer catalysis by a combination of common catalytic motifs and electrostatic interactions. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 11297.
113. Valiaeva, N.; Beadle, J. R.; Aldern, K. A.; Trahan, J.; Hostetler, K. Y. Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of acyclic purine and pyrimidine nucleoside phosphonates against HIV-1 in vitro. *Antivir. Res.* **2006**, 72, 10-19.
114. Noordhuis, P.; Holwerda, U.; Van der Wilt, C. L.; Van Groeningen, C. J.; Smid, K.; Meijer, S.; Pinedo, H. M.; Peters, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann. Oncol.* **2004**, 15, 1025-1032.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die interessante, herausfordernde Themenstellung, sowie den zu Bearbeitung gewährten wissenschaftlichen Freiraum

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison und Frau Dr. Maria Riedner für die Teilnahme am Dissertationskolloquium bedanken.

Allen Mitgliedern der MS- und NMR-Abteilung unter der Leitung von Frau Dr. Maria Riedner, sowie Herrn Dr. Thomas Hackl danke ich darüber hinaus für die Messung von zahlreichen Spektren. Ein besonderer Dank sei an dieser Stelle an Frau Claudia Wontorra für die Messung zahlreicher labilen Proben!

Mein Dank gilt natürlich auch allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des AK Meiers für das schöne Arbeitsklima.

Als ehemalige Mitglieder des AK Meier sind Alex, Patrick, Nils und Conny zu erwähnen, ohne die ich wahrscheinlich nie den Weg in den Alltag als Doktorand gefunden hätte.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern Sa(h)ra(h), Michelle und Tobi bedanken. Ihr habt für zahlreiche nette Mittagessen gesorgt, bei denen ihr oft genug auch meine Launen aushalten musstet. Ich danke euch von ganzem Herzen für eure nette und ehrliche Art.

Letztlich gilt ein besonderer Dank meinen beiden langjährigen Kommilitonen Julian Witt und Tom Friedmann. Nicht nur für einige unvergessliche Momente während des Studiums, sondern auch für die vielen Stunden außerhalb der Universität. Weiterhin möchte ich dir, Julian, gemeinsame Zeit im AK Meier danken!

Ich möchte zusätzlich noch allen außerhalb der Universität für euer Verständnis danken. Meine Doktorarbeit hatte oft Auswirkungen auf mein Leben außerhalb der Universität. Vielen Dank für euer Verständnis!

Ich möchte auch nicht vergessen, Lavinia zu nennen. Für all dein Verständniss, Aufmunterung und die vielen kleinen Dinge. Ich danke dir einfach!

Natürlich gilt meinem Dank auch meiner Familie. Ihr habt mir den Rücken freigehalten, ohne hätte ich es wahrscheinlich nicht geschafft dieses Studium zu bestreiten. Ich danke euch für eurer Unterstützung.

Zulezte Danke ich auch meinem Großvater Edwin Kullik. Ohne es zu Wissen war er eine Forbildfunktion, auch wenn er mich oft zur Weißglut gebracht hat. Genauso danke ich meiner Großmutter Marlies Kullik. Ich kann meinen Dank nicht in Worte fassen.

11 Eidesstattliche Erklärung

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.

Datum, Ort

Unterschrift

