



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Synthese fluoreszenzmarkierter Tri*PPP*ro- Verbindungen für Zellaufnahmestudien und Synthese antitumoraler Tri*PPP*ro-Prodrugs

Synthesis of fluorescence-labelled Tri*PPP*ro-compounds for cell uptake studies and
synthesis of antitumoral Tri*PPP*ro-Prodrugs

Dissertation

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

von

Julian Witt

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Hamburg 2022

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 von April 2019 bis Januar 2023 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Datum der Disputation: 03.03.2023

Druckfreigabe: 06.03.2023

„Es ist gut möglich, keine Fehler zu machen und dennoch zu verlieren. Das ist kein Zeichen von Schwäche, das ist das Leben.“

Jean-Luc Picard

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	IX
Abstract	XII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	4
2.1 Struktur und Funktion natürlich vorkommender Nucleoside und Nucleotide	4
2.2 Biomembranen von lebenden Zellen	6
2.2.1 Struktur und Eigenschaften	6
2.2.2 Transport durch Membranen	7
2.3 Krebs	8
2.3.1 Definition und Eigenschaften von Krebszellen	8
2.3.2 Entstehung von Krebs	11
2.3.3 Tumormikroumgebung von soliden Tumoren	11
2.4 Therapie von Tumorerkrankungen	14
2.4.1 Chemotherapie bei Krebserkrankungen	14
2.4.2 Nucleosidanaloga in der Chemotherapie	16
2.4.3 Wirkmechanismus und Grenzen bei der Behandlung mit Nucleosidanaloga	17
2.5 Prodrugkonzepte für Nucleosidanaloga	20
2.5.1 Nucleosidmonophosphat-Prodrugs	21
2.5.2 Nucleosiddi- und -triphosphat-Prodrugs	23
2.6 Das DiPPro- und TriPPPro-Konzept	24
2.7 Evaluierung der Zellaufnahme mit bicyclischen Nucleosidanaloga (BNCAs)	28
3 Aufgabenstellung	31
4 Resultate und Diskussion	33
4.1 Synthese der Acyloxybenzyl-Maskierungen für TriPPPro-Verbindungen	33
4.1.1 Synthese der Bis-Acyloxybenzyl-Phosphonate	33
4.1.2 Synthese der symmetrischen Bis-Acyloxybenzyl-Pyrophosphate	36
4.2 Zellaufnahmestudien mit BCNA-TriPPPro-Verbindungen	38
4.2.1 Synthese der BCNA-5'-monophosphate	39
4.2.2 Synthese der BCNA-TriPPPro-Verbindungen	45
4.2.3 Hydrolyseverhalten der BCNA-TriPPPro-Verbindungen	50
4.2.4 Zellaufnahmestudien der BCNA-TriPPPro-Verbindungen an Krebszellen	53
4.2.5 Fazit der Zellaufnahmestudien an Krebszellen	64
4.3 Synthese antitumoraler FdU-TriPPPro-Verbindungen	66

4.3.1 Wirkungsmechanismus von 5-FU	66
4.3.2 Synthese von FdU-5'-monophosphat	68
4.3.3 Synthese der FdU-TriPPPPro-Verbindungen	73
4.4 Lipophilievergleich der FdU-TriPPPPro-Verbindungen mit den BCNA-Verbindungen	77
4.5 Hydrolyseverhalten der FdU-TriPPPPro-Verbindungen	80
4.5.1 Hydrolyse der FdU-TriPPPPro-Verbindungen in PBS-Puffer und mit PLE	80
4.5.2 Hydrolyse der FdU-TriPPPPro-Verbindungen in Zellextrakt	84
4.5.3 Fazit der Hydrolysen der FdU-TriPPPPro-Verbindungen	91
4.6 Proliferationsassays der FdU-TriPPPPro-Verbindungen	92
4.6.1 Therapeutische Bandbreite von FdU-01 32a und FdU-04 32d.	95
4.6.2 Fazit der Proliferationsassays der FdU-TriPPPPro-Verbindungen.	97
4.7 Synthese verschiedener antitumoraler TriPPPPro-Verbindungen	99
4.7.1 Synthese von 5-Fluoruridin TriPPPPro-Verbindungen	100
4.7.1.1 Synthese von 5-Fluoruridin-5'-monophosphat	100
4.7.1.2 Synthese der Fluoruridin TriPPPPro-Verbindungen	104
4.7.1.3 Antitumorale Aktivität der FU-TriPPPPro-Verbindungen	106
4.7.2 Synthese von Cladribin TriPPPPro-Verbindungen	108
4.7.2.1 Synthese von Cladribin	108
4.7.2.2 Synthese von Cladribin-5'-monophosphat	117
4.7.2.3 Synthese der Cladribin TriPPPPro-Verbindungen	118
4.7.3 Synthese von Fludarabin TriPPPPro-Verbindungen	120
4.7.3.1 Synthese von Fludarabin	120
4.7.3.2 Synthese von Fludarabin-5'-monophosphat	127
4.7.3.3 Synthese der Fludarabin TriPPPPro-Verbindungen	128
4.7.4 Synthese von Clofarabin TriPPPPro-Verbindungen	130
4.7.4.1 Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat	131
4.7.4.2 Synthese der Clofarabin TriPPPPro-Verbindungen	134
4.7.5 Synthese von Cytarabin TriPPPPro-Verbindungen	136
4.7.5.1 Synthese von Cytarabin-5'-monophosphat	137
4.7.5.2 Synthese der Cytarabin TriPPPPro-Verbindungen	140
4.7.5.3 Synthese von <i>N</i> -acetylgeschützten araC-TriPPPPro-Verbindungen	143
4.7.7 Lipophilievergleich der antitumoralen TriPPPPro-Verbindungen	149
4.7.8 Fazit der Synthesen antitumoraler TriPPPPro-Verbindungen	150
4.8 Synthese von Nucleosid-5'-di- und triphosphaten	152
4.9 Hydrolyseverhalten verschiedener antitumoraler TriPPPPro-Verbindungen	156
4.9.1 Chemische Hydrolyse der TriPPPPro-Verbindungen in PBS-Puffer	156
4.9.2 Hydrolyse der TriPPPPro-Verbindungen in Zellextrakten	159

4.10 Hydrolyseverhalten der TriPPPro-Verbindungen in Blutplasma	167
5 Experimenteller Teil	173
5.1 Edukte und Reagenzien	173
5.2 Chromatographie	174
5.3 Spektroskopie und Spektrometrie	175
5.4 Weitere Geräte	176
5.5 Bioanalytische Methoden und Hydrolysestudien	177
5.5.1 Zellaufnahmestudien an Krebszellen	177
5.5.2 Hydrolysestudien in PBS-Puffer	177
5.5.3 Hydrolysestudien in Zellextrakten	178
5.6 Synthesen	178
5.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	178
5.6.2 Synthese von Bis- <i>O</i> -(9 <i>H</i> -fluoren-9-ylmethyl)- <i>N,N</i> -diisopropylaminophosphor-amidit 60	182
5.6.3 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)alkanoaten 42	184
5.6.4 Synthese von Bis(4-alkanoyloxybenzyl)phosphonaten 40	190
5.6.5 Synthese bicyclischer Nucleosidanaloga (BCNAs)	196
5.6.6 Synthese von FdU-Monophosphat 68	204
5.6.7 Synthese von FU-5'-monophosphat 77	207
5.6.8 Synthese von Cladribin-5'-monophosphat 102	211
5.6.9 Synthese von Fludarabin-5'-Monophosphat (2FaraA-MP) 103	218
5.6.10 Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat (ClFaraA-MP) 120	227
5.6.11 Synthese von Cytarabin-5'-monophosphat 125	230
7.6.12 Synthese von <i>N</i> -Acetylcytarabin-5'-monophosphat (Ac-araC-MP) 132	233
5.6.13 Synthese von dBCNA-TriPPPro-Verbindungen	235
5.6.14 Synthese von BCNA-TriPPPro-Verbindungen	242
5.6.15 Synthese von FdU-TriPPPro-Verbindungen	249
5.6.16 Synthese von FU-TriPPPro-Verbindungen	256
5.6.17 Synthese von CdA-TriPPPro-Verbindungen	259
5.6.18 Synthese von 2FaraA-TriPPPro-Verbindungen	264
5.6.19 Synthese von ClFaraA-TriPPPro-Verbindungen	268
5.6.20 Synthese von Ac-araC-TriPPPro-Verbindungen	272
5.6.21 Synthese von Nucleosid-5'-Diphosphaten	276
5.6.22 Synthese von Nucleosid-5'-Triphosphaten	281
Gefahrstoffverzeichnis	285
Literaturverzeichnis	294
Eidesstattliche Erklärung	312

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung (NMR)
λ	Wellenlänge
2FaraA	Fludarabin
5-FU	5-Fluoruracil
A	Adenin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AB	Acyloxybenzyl
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac-araC	<i>N</i> -acetyl-Cytarabin
ACB	Acyloxybenzylcarbonat
AcOH	Essigsäure
ADA	Adenosin-Desaminase
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
araC	Cytarabin
ATP	Adenosintriphosphat
Äquiv.	Äquivalente
BCNA	Bicyclisches Nucleosidanalogen
ber.	Berechnet
BOP	Benzotriazolylxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
C	Cytosin
cb	<i>conjugated base</i>
CAF	<i>cancer-associated fibroblast</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CdA	Cladribin
CEM/0	humane T-Lymphozyten-Zelllinie (Wildtyp)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
ClFaraA	Clofarabin
CSC	<i>cancer stem cell</i>
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
cycloSal	<i>cycloSaligenyl</i>

δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
d4T	Stavudin
DAD	<i>diode array detector</i>
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dd	Duplett vom Duplett (NMR)
DHFU	Dihydrodfluoruracil
dest.	destilliert
DIPEA	<i>N,N-Diisopropylethylamin</i>
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPP	Diphenylphosphonat
EC	<i>endothelial cell</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EtOAc	Ethylacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCS	Fötale Kälberserum
FdU	5-Fluor-2'-desoxy-uridin
FLD	Fluoreszenzdetektor
Fm	9-Fluorenylmethanol
FU	5-Fluoruridin
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Heptett
H69AR	Lungenkarzinom
HCT116	Kolonkarzinom
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HOS-SKNSH	Neuroblastom
HR	<i>high resolution</i>
IC	<i>immune inflammatory cell</i>
IR	Infrarot
<i>J</i>	Skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
L	Ligand
LPC	Lysophosphatidylcholin
m	Multipllett
min	Minuten
MALDI	Matrix assistierte Laser Desorption Ionisierung
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeWo	Hautmelanom
Molm13	Akute myeloische Leukämie-Zelllinie
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie
MV3	Amelanotisches Melanom
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NA	Nucleosidanalagon
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP	Normalphase
NT	Nucleosid-Membrantransporterprotein
NTP	Nucleosidtriphosphat
Nu	Nucleophil
Nucl	Nucleosid
OVCAR-3	Ovarialkarzinom

p	Pentett
PaCa5061	Pankreaskarzinom
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC3	Prostatakarzinom
PE	Petrolether
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLE	<i>pig liver esterase</i>
PNP	Purin-Nucleosid-Phosphorylase
ppm	<i>parts per million</i>
pyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
reflux	zum Rückfluss erhitzt
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RNR	Ribonucleotidreduktase
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Reverse Transkriptase
R _t	Raumtemperatur
R _T	Retentionszeit
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
SKOV-3	Ovarialkarzinom
SW620	Kolorektales Karzinom
t _{1/2}	Halbwertszeit
t	Triplett
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAF	Tenofoviralafenamid
TBAA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumacetat
TBAF	tetra- <i>n</i> -Butylammoniumfluorid
TBAN	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumnitrat
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TDF	Tenofovirdisoproxilfumarat
TEAA	Triethylammoniumacetat

TEP	Triethylphosphat
<i>tert</i>	tertiär
Tf	Trifluormethansulfonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TI	Therapeutische Breite (<i>therapeutic index</i>)
TIPDS	1,1,3,3-Tetraisopropyl-disiloxan
TMP	Trimethylphosphat
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TOF	<i>time of flight</i>
TS	Thymidylat-Synthase
U	Uracil
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UMPS	Uridin-Monophosphat-Synthase
UTSCC-2	Mundhöhlenkarzinom
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>
Verb.	Verbindung
v/v	Volumenverhältnis
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumsalz

Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind weltweit mit knapp zehn Millionen Toten im Jahre 2020 die zweithäufigste Todesursache. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren die Anzahl der Erkrankungen stark steigen wird (Abschnitt 1, S. 1). Für die chemotherapeutische Behandlung werden derzeit häufig Nucleosidanaloga verwendet. Diese Wirkstoffklasse agiert als Antimetabolit, sodass das Zellwachstum von Krebszellen gehemmt wird (Abschnitt 2.4.2, S. 16 ff). Die Grenzen für diese Verbindungsklasse liegen vor allem in der schlechten Membrangängigkeit und Penetration des Tumorgewebes, sowie die stufenweise, intrazelluläre Phosphorylierung mittels Kinasen zum aktiven Nucleosid-5'-triphosphat. Dadurch ist meist nur eine geringe Konzentration des aktiven Metaboliten innerhalb der Zellen vorhanden. Zusätzlich sind sowohl für den Transport durch die Membran als auch für die enzymatische Aktivierung der antitumoralen Nucleosidanaloga zahlreiche Resistenzmechanismen bekannt (Abschnitt 2.4.3, S. 17 ff). Eine direkte Verabreichung von Nucleosid-5'-triphosphaten ist hingegen nicht möglich, da bedingt durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen und der damit verbundenen hohen Hydrophilie kein passiver Transport durch Zellmembranen möglich ist (Abschnitt 2.5, S. 20). Das von C. MEIER publizierte *TriPPP*o-Konzept stellt ein neues Prodrugsystem dar, durch das die Nucleosid-5'-triphosphate direkt in den Zellen bereitgestellt werden können. Hierzu werden die biologisch aktiven Triphosphate der Nucleoside lipophil an der γ -Phosphatgruppe mit zwei Acyloxybenzylgruppen maskiert, um einen passiven Transport durch die Zellmembran zu ermöglichen. Intrazellulär werden die Prodrugs enzymatisch gespalten, wodurch das biologisch aktive Nucleotid freigesetzt wird. Dieses Konzept wurde bisher erfolgreich auf zahlreiche antivirale Nucleosidanaloga angewandt (Abschnitt 2.6, S. 24 ff). In dieser Arbeit sollte das *TriPPP*o-Konzept auf die antitumorale Chemotherapie erweitert werden. Hierzu wurden zunächst bicyclische Nucleosidanaloga (BCNAs) als *TriPPP*o-Verbindungen dargestellt. Diese Nucleosidanaloga weisen fluoreszierende Eigenschaften auf. Aus diesem Grund ist ein Nachweis dieser Verbindungen auch in sehr geringen Konzentrationen im Zelllysate möglich (Abschnitt 2.7, S. 28 ff). Für die Synthese wurde ein bereits in eigenen vorangegangenen Arbeiten etabliertes Protokoll verwendet, welches auf den Arbeiten von PERTENBREITER und REIMER für die BCNAs, sowie auf der *H*-Phosphonatroute für die *TriPPP*o-Synthese von GOLLNEST beruht (Abschnitt 4.2, S. 38 ff, Abschnitt 4.2.2, S. 50 ff). Mit diesen BCNA-Verbindungen mit unterschiedlich lipophilen Maskierungseinheiten wurden Zellaufnahmestudien an zahlreichen Krebszelllinien durchgeführt. Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass alle dargestellten *TriPPP*o-Verbindungen erfolgreich in die unterschiedlichen Krebszellen gelangten und dort enzymatisch das BCNA-5'-triphosphat freigesetzt wurde. Zusätzlich konnte durch Analyse der Menge der aufgenommenen Prodrugs erstmals direkt die optimierte Maskierungseinheit

bezüglich der Zellaufnahme bedingt durch die lipophilen Eigenschaften ermittelt werden (Abschnitt 4.2.4, S. 53 ff).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Serie von TriPPPPro-Verbindungen des antitumoralen Wirkstoffs 5-FU mit unterschiedlich lipophilen Maskierungseinheiten über die *H*-Phosphonatroute dargestellt (Abschnitt 4.3, S. 66 ff). Hierbei wurde eine effiziente Syntheseroute für das FdU-5'-Monophosphat über die Amidchemie etabliert (Abschnitt 4.3.2, S. 68 ff). Diese TriPPPPro-Verbindungen wurden auf ihre chemische sowie enzymatische Stabilität in Krebszellextrakten untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass intrazellulär durch enzymatische Katalyse die Maskierungseinheiten abgespalten werden, worauf das aktive FdU-5'-triphosphat freigesetzt wird, welches ebenfalls schnell weiter zum FdU-5'-monophosphat metabolisiert wird (Abschnitt 4.5, S. 79 ff). Anschließend wurden die Prodrugs durch Bestimmung der Lipophilie mit den Leitstrukturen der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen verglichen (Abschnitt 4.4, S. 76 ff), sowie Proliferationsassays an unterschiedlichen Krebszelllinien durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass alle getesteten Verbindungen proliferationshemmende Eigenschaften an allen getesteten Krebszelllinien zeigten. Zwei der FdU-TriPPPPro-Verbindungen erwiesen sich als besonders aktiv, da sie teilweise eine 100-fach höhere Aktivität als das 5-FU selbst aufwiesen. Zusätzlich waren diese Prodrugs in der Lage, die Proliferation von bisher durch Chemotherapie kaum behandelbare triple-negative Mammakarzinome deutlich zu hemmen (Abschnitt 4.6, S. 91 ff). Ebenso erfreulich war die Tatsache, dass das aktivste Prodrug die Verbindung mit der Lipophilie war, welches durch die Lipophilievergleiche mit den BCNA-TriPPPPro-Verbindungen als potenziell aktivste Substanz ermittelt wurde (Abschnitt 4.4, S. 77). Durch diese Ergebnisse konnte das Modell der Lipophilie als entscheidender Faktor für die Zellaufnahme von TriPPPPro-Verbindungen und der damit verbundene Einfluss auf die Aktivität an Krebszellen erstmals bestätigt werden (Abschnitt 4.6.2, S. 96).

Daraufhin wurden von weiteren chemotherapeutisch relevanten Nucleosidanaloga TriPPPPro-Verbindungen dargestellt. Hier wurde jedoch keine gesamte Serie an unterschiedlich lipophilen Maskierungseinheiten dargestellt, es wurden hingegen lediglich die Verbindungen synthetisiert, die nach dem Lipophiliemodell die aktivsten Prodrugs sein sollten (Abschnitt 4.7, S. 98 ff). Für diese Prodrugs wurden zunächst neue Synthesen für die effiziente Darstellung der Nucleosid-5'-monophosphate etabliert sowie im Fall des Fludarabins ebenso eine neue und effektive Syntheseroute für das Nucleosidanalogen entwickelt (Abschnitt 4.7.3.1, S. 119 ff). Die Synthese der TriPPPPro-Verbindungen erfolgte erneut über die von MEIER und GOLLNEST etablierte *H*-Phosphonatroute. Für all diese Prodrugs wurden sowohl die chemische als auch enzymatische Stabilität in Krebszellextrakt untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass für alle dargestellten Prodrugs intrazellulär eine enzymatisch

katalysierte Spaltung der Maskierungseinheiten sowie eine Freisetzung des biologisch aktiven Nucleosid-5'-triphosphats erfolgte (Abschnitt 4.9, S. 151 ff). Zusätzlich konnten durch erneute Untersuchungen der lipophilen Eigenschaften die potenziell aktivsten Substanzen ermittelt werden (Abschnitt 4.7.7, S. 148). Für die FU-TriPPP_{ro}-Verbindungen wurden ebenso Proliferationsstudien durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass erneut alle dargestellten Prodrugs hohe proliferationshemmende Eigenschaften gegenüber HT29-Krebszellen (Kolorektales Karzinom) aufweisen, die teilweise bis zu 100-fach höher als für das 5-FU liegen (Abschnitt 4.7.1.3, S. 105 ff).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TriPPP_{ro}-Konzept, welches bereits auf antivirale Nucleosidanaloga angewendet wurde, erstmals erfolgreich auf zahlreiche antitumoral aktive Nucleoside angewendet, da die biologische Aktivität der Verbindungen deutlich gesteigert werden konnte. Zusätzlich wurde erstmals die intrazelluläre Freisetzung der Metabolite in Krebszellen bestätigt sowie ein systematischer Zusammenhang zwischen Zellaufnahme und lipophilen Eigenschaften der TriPPP_{ro}-Verbindungen hergestellt. Durch diesen Zusammenhang ist die gezielte Darstellung von weiteren potenziell antitumoral aktiven TriPPP_{ro}-Verbindungen möglich.

Abstract

Cancer is a global threat with almost ten million deaths in 2020. It must be assumed that the total count of cancer cases will increase in the next decades (chapter 1, p. 1). Nucleoside analogues are a commonly used class of drugs in antitumoral therapy. These function as antimetabolites thus inhibiting proliferation of cancer cells (chapter 2.4.2, p. 16 ff). Poor penetration through cell membranes and cancer tissue as well as slow phosphorylation to the active nucleoside-5'-triphosphate are limiting factors for this kind of drugs. Also, resistances towards different nucleoside analogues are known (chapter 2.4.3, p. 17 ff). Direct administration of nucleoside-5'-triphosphates would lead to no beneficial effect since the negative charges prevent the penetration through the lipophilic cell membranes (chapter 2.5, p. 20). To directly deliver these triphosphates into cells, C. MEIER published the *TriPPP*ro-concept. These prodrugs are masked with lipophilic acyloxybenzyl-groups at the γ -phosphate to enable the penetration through the cell membrane. Afterwards the masking units get enzymatically cleaved to directly release the biologically active nucleoside-5'-triphosphate inside the cells. This concept was successfully applied to various antiviral nucleoside analogues (chapter 2.6, p. 24 ff).

In this work, the *TriPPP*ro-concept was extended to antitumoral nucleosides. First, bicyclic nucleoside analogues (BCNAs) as *TriPPP*ro-compounds were synthesised. These fluorescent prodrugs can be detected in very low concentrations in cell lysate (chapter 4.2.2, p. 50 ff). The syntheses for the BCNAs were carried out according to the previous works of PERTENBREITER and REIMER, whereas the *TriPPP*ro-syntheses were realised with the *H*-phosphonate protocol introduced by GOLLNEST (chapter 4.2, p. 38 ff, chapter 4.2.2, p. 50 ff). With these compounds bearing various lipophilic masking units, cellular uptake studies on different cancer cells have been performed. These studies confirmed the successful uptake of the *TriPPP*ro-compounds in all the tested cancer cells as well as the intracellular release of the BCNA-5'-triphosphate. In addition, a distinct correlation between the amount of uptaken prodrug and the lipophilicity of the masking units was observed (chapter 4.2.4, p. 53 ff).

According to this result, a series of *TriPPP*ro-compounds from the antitumoral nucleobase 5-fluorouracil were synthesised (chapter 4.3, p. 66 ff). In this process, an efficient synthesis route for the FdU-5'-monophosphate via amidite chemistry was established (chapter 4.3.2, p. 68 ff). The FdU-*TriPPP*ro-compounds were analysed regarding their chemical and enzymatic stability in cancer cell extracts. In these experiments the enzymatic cleavage of the masking units and the direct release of the FdU-5'-triphosphate was proven. Also, a fast metabolism to the FdU-5'-monophosphate could be observed (chapter 4.5, p. 79 ff). In proliferation assays the FdU-*TriPPP*ro-compounds showed anti-proliferative properties in all tested cancer cell lines. Especially two compounds showed remarkable activity, which was

more than 100-fold increased compared to 5-FU. In addition, these prodrugs showed high activities in triple-negative breast cancer cell lines, which are almost untreatable with current chemotherapeutical agents (chapter 4.6, p. 91 ff). Remarkable was also the fact, that the most active prodrug showed the same lipophilicity as the most successful BCNA-TriPPPPro-compound regarding the cellular uptake (chapter 4.4, p. 77). These results not only revealed new highly potent antitumoral TriPPPPro-compounds but also the direct applicability of the correlation between cellular uptake and activity.

In the next steps, other potential antitumoral TriPPPPro-compounds of various nucleoside analogues were synthesised. For these analogues, prodrugs with specific lipophilic masking units were prepared according to the previous results in the cellular uptake studies (chapter 4.7, page. 98 ff). For these compounds, new synthesis routes for the nucleoside-5'-monophosphates were established. For the synthesis of the nucleoside analogue Fludarabine, a new synthetic approach was applied as well (chapter 4.7.3.1, p. 119 ff). The synthesis of the TriPPPPro-compounds was realised with the *H*-phosphonate route introduced by MEIER and GOLLNEST. The chemical and enzymatic stability of these compounds in cancer cell extract was determined as for the FdU-TriPPPPro-compounds. For all prodrugs, the intracellular enzymatic cleavage as well as the direct release of the nucleoside-5'-triphosphate was observed (chapter 4.9, p. 151 ff). Also, through comparison of these prodrugs with the BCNA lead structure, the potentially most active compounds could be identified (chapter 4.7.7, p. 148). For the FU-TriPPPPro-compounds IC₅₀-values were also determined. Again these prodrugs showed strong antiproliferative properties against HT29-cells with activities more than 100-fold compared to 5-FU (chapter 4.7.1.3, p. 105 ff).

In this thesis, the TriPPPPro-concept was successfully extended to antitumoral nucleoside analogues. The proliferative properties of FdU-prodrugs as well as FU-prodrugs were greatly increased. In addition, the intracellular release of the metabolites in cancer cells was proven and a systematic approach to the correlation of lipophilicity, cellular uptake and activity for TriPPPPro-compounds was established. With this model, further development of new potential antitumoral nucleoside analogues should be possible.

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind weltweit die zweithäufigste Todesursache mit nahezu 10 Millionen Toten und 20 Millionen aufgezeichneten Fällen im Jahre 2020.¹ In Deutschland wurden in 2020 allein mehr als 600 000 neue Krebsfälle und 250 000 Todesfälle im Zusammenhang mit Krebserkrankungen dokumentiert.² Obwohl besonders in den Industrieländern die Todesrate in den letzten Jahren rückläufig ist, wurde insgesamt ein Anstieg der berichteten Krebsfälle verzeichnet, wobei besonders in Entwicklungsländern von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen wird^{1,2}. Dadurch stellen Krebserkrankungen für die Gegenwart und auch für die Zukunft ein globales gesundheitliches Problem dar.^{1,2}

Estimated number of deaths in 2020, worldwide, both sexes, all ages

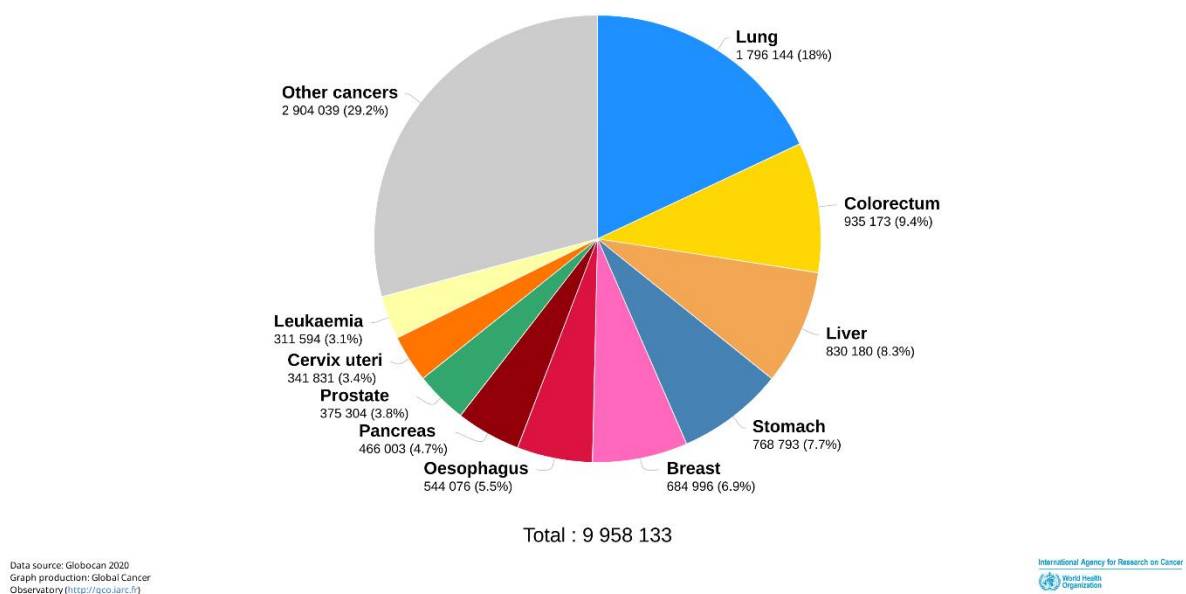


Abb. 1: Todeszahl verschiedener Krebserkrankungen weltweit.²

Als Krebserkrankungen werden allgemein die unkontrollierte Vermehrung und wucherndes Wachstum von Zellen bezeichnet. In der Medizin wird der Begriff Krebs für bösartige (maligne) Gewebeneubildungen (Neoplasie) verwendet, was zu einer Unterscheidung mit dem allgemeineren Begriff Tumor führt, unter dem jede Form von Gewebeproliferation (Hyperplasie) verstanden wird.^{3,4} Die meisten Todesfälle lassen sich auf bösartige Tumoren zurückführen, die in der Lage sind, sich invasiv auszubreiten und in entfernten Organen Tochtergeschwülste (Metastasen) zu bilden, wobei Lungen- und Darmkrebserkrankungen am häufigsten zum Tod führen (Abb. 1). Tumorzellen zeichnen sich vor allem durch ihre erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit, Resistenz gegenüber Apoptose, Induktion von Zellmigration und der Fähigkeit aus, unter ungewöhnlichen physiologischen Bedingungen (Acidität, Hyperglykämie) zu überleben und zu proliferieren.^{3,4}

Als Ursache für Krebs kann zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Karzinogenen unterschieden werden.^{1,5} Zusätzlich wurden viele verschiedene Risikofaktoren

bestimmt. Neben dem Altern spielen hierbei Tabak- und Alkoholkonsum sowie eine ungesunde Ernährung entscheidende Rollen.⁵ Außerdem können bestimmte chronische Infektionen zu Krebserkrankungen führen, was vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern einen besonderen Stellenwert einnimmt. Im Jahre 2012 konnten bis zu 15% der weltweit diagnostizierten Krebsfälle auf karzinogene Infektionen zurückgeführt werden, wie zum Beispiel das Epstein-Barr-Virus, Hepatitis-B und Hepatitis-C-Viren und humane Papillomviren.^{2,5}

Der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge können viele der auftretenden Krebserkrankungen verhindert werden, vor allem durch Vermeidung der Risikofaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum, sowie Übergewicht oder Mangelernährung, aber auch Reduzierung von karzinogenen Infektionen durch Steigerung der Hygiene und Reduzierung der Luftverschmutzung.¹ Da in Zukunft die Lebenserwartung stetig steigen wird und das Altern weiterhin eine fundamentale Rolle bei der Entstehung von Krebs spielt, wird in den nächsten Jahren mit einem weiteren Anstieg der Krebserkrankungen gerechnet.^{1,2,5}

Zur erfolgreichen Bekämpfung von Krebserkrankungen spielt neben der Prävention durch Vermeidung von Risikofaktoren die Behandlung bereits erkrankter Menschen eine entscheidende Rolle.^{2,6} Durch eine frühe Diagnose kann die Mortalitätsrate für nahezu jede Form von Krebs bereits erheblich gesenkt werden. Die Behandlungen umfassen meist eine Kombination aus Operationen, Strahlentherapie, Chemotherapie und Immunotherapie und sind für jede Form von Krebserkrankungen individuell. Diese Therapien bedeuten jedoch eine starke physiologische Belastung für die behandelten Patienten, da hierbei in der Regel Zytostatika verabreicht werden, die ihre schädigende Wirkung nicht nur auf Krebszellen, sondern auch auf gesundes Gewebe ausüben können.⁶

Unter den chemotherapeutischen Wirkstoffen sind vor allem Nucleosid- oder Nucleobasenanaloga etabliert. Diese Klasse der Wirkstoffe zählt zu den Inhibitoren der DNA-Replikation und weisen eine biologische Aktivität gegen eine Vielzahl von Tumorerkrankungen auf. Eines der ersten etablierten Zytostatika dieser Wirkstoffklasse ist das 5-Fluoruracil **1** (5-FU, Abb. 2), welches bis heute erfolgreich in verschiedenen Formen (z. B. Floxuridin **2**, Abb. 2) in der antitumoralen Therapie eingesetzt wird.^{6,7}

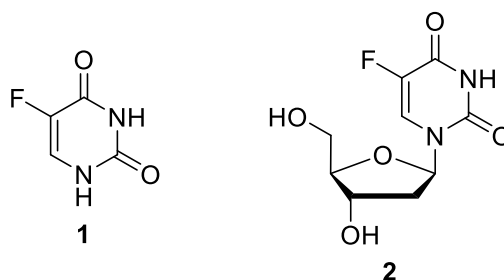


Abb. 2: 5-Fluoruracil (5-FU) **1** und 5-Fluor-2'-desoxyuridin (Floxuridin) **2**.

Obwohl inzwischen eine Vielzahl von Nucleosidanaloga für die Behandlung von Krebs mit Erfolg angewendet werden, ist die Therapie weiterhin problematisch.⁶ Dies ist vor allem auf die besonderen physiologischen Eigenschaften von Tumoren zurückzuführen. Diese führen dazu, dass oft nur geringe Mengen des Wirkstoffs in die Zellen gelangen, was zum einen an schlechter Penetration der Zellmembran, aber auch an unzureichender Distribution innerhalb des Tumorgewebes liegt. Dies verursacht, dass meist nur eine geringe Konzentration des Wirkstoffs in der Zelle vorhanden ist.^{6,8,9} Aus diesem Grund ist weitere Forschung für die Behandlung von Krebserkrankungen vor allem in Bezug auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der Chemotherapeutika besonders wichtig.^{6,9}

In dieser Arbeit wird auf die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften verschiedener antitumoraler Nucleosidanaloga eingegangen, vor allem in Hinblick auf die Synthese und Anwendung neuer Prodrug-Konzepte zur direkten Freisetzung der aktiven Wirkstoffe sowie ihrem Metabolismus innerhalb der Zellen.

2 Kenntnisstand

2.1 Struktur und Funktion natürlich vorkommender Nucleoside und Nucleotide

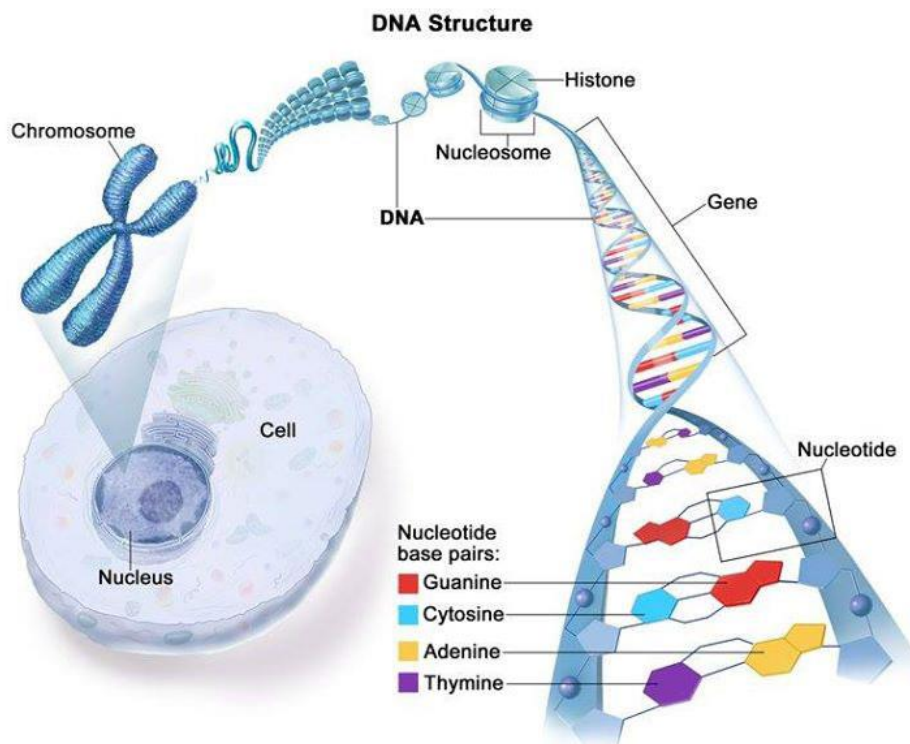


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Chromosomen aus DNA.³

Die natürlich vorkommenden Nucleotide sind die Bausteine der DNA (*deoxyribonucleic acid*) und RNA (*ribonucleic acid*), die daher als Polynucleotide bezeichnet werden. Diese Makromoleküle sind als Doppelhelix aufgebaut, die sich zunächst als Nucleosome und schließlich zu den Chromosomen anordnen (Abb. 3).³ Die DNA dient als Träger der Erbinformationen in allen lebenden Organismen sowie in einigen DNA-Viren. Die wesentliche Funktion der RNA dagegen besteht in den meisten Zellen darin, genetische Informationen in der Proteinbiosynthese, Transkription oder Translation in Form von mRNA (*messenger ribonucleic acid*) umzusetzen. Es gibt auch spezielle RNA-Formen, die an der Genregulation beteiligt sind, Funktionen von Proteinen übernehmen können (Ribozyme) oder analog zu Antikörpern wirken können (Aptamere).^{3,10}

Nucleoside bestehen aus einer Nucleobase und einer Zuckereinheit, wobei bei den Basen zwischen Pyrimidin- und Purinbasen unterschieden werden kann. Während DNA die Purinbasen Adenin **3** (A) und Guanin **4** (G), sowie die Pyrimidinbasen Cytosin **5** (C) und Thymin **6** (T) enthält, ist in der RNA das Thymin **6** durch Uracil **7** (U) ersetzt. Diese sind über eine N-glykosidische Bindung mit einer D-Ribose in der RNA und der 2'-Desoxyribose in der DNA verknüpft (Abb. 4).³ Wenn zusätzlich eine oder mehrere Phosphatgruppen mit der Pentoseeinheit verknüpft sind, wird von Nucleotiden gesprochen. Im Wesentlichen kommen Nucleotide mit einer Phosphat-Veresterung an der 5'-Position vor, es können aber auch

3'-Nucleotide als Hydrolyseprodukte von Esterasen oder cyclische Nucleotide (z. B. cAMP, cGMP) physiologisch relevant sein. Durch die Anlagerung weiterer Phosphatgruppen an das Nucleosidmonophosphat (NMP) entstehen Nucleosiddiphosphate (NDP) und Nucleosidtriphosphate (NTP).^{3,10}

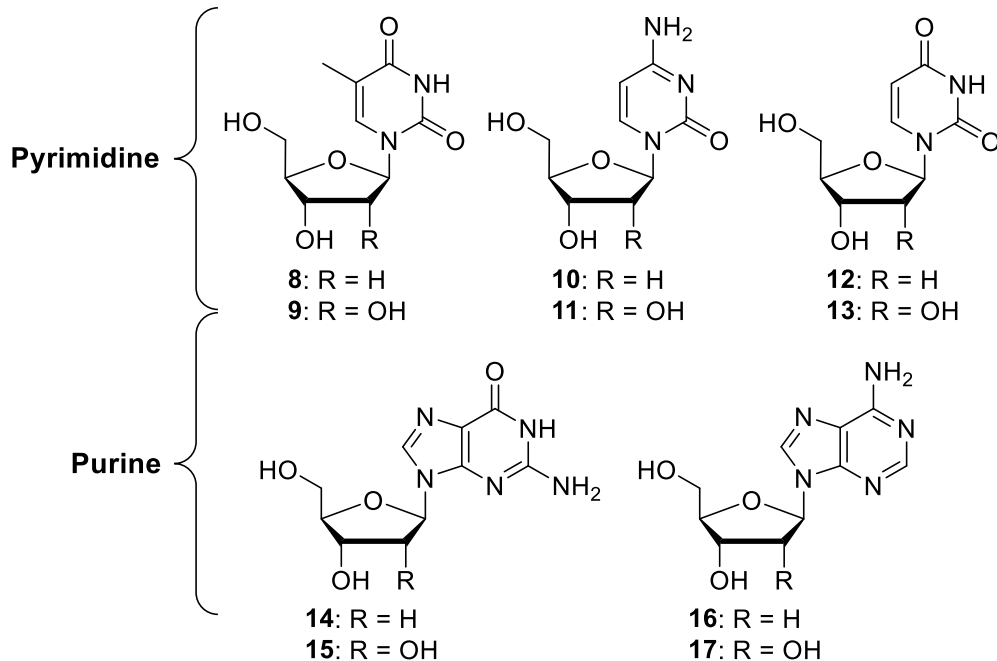


Abb. 4: Nucleoside der DNA und RNA: 2'-Desoxythymidin **8**, Thymidin **9**, 2'-Desoxycytosin **10**, Cytosin **11**, 2'-Desoxyuridin **12**, Uridin **13**, 2'-Desoxyguanosin **14**, Guanosin **15**, 2'-Desoxyadenosin **16** und Adenosin **17**.

Nucleoside und Nucleotide sind jedoch nicht nur am Aufbau der DNA und RNA beteiligt, sondern spielen auch in vielen anderen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. So besitzt vor allem das Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) eine besondere Bedeutung als universeller Energiedonor, da es sich bei den Phosphoranhydridbindungen um energiereiche Bindungen handelt, bei denen durch enzymatische Hydrolyse Energie freigesetzt wird.^{3,10} Außerdem sind Nucleosidtriphosphate an der Regulation verschiedener enzymatischer Reaktionen (z. B. Proteinkinasen) beteiligt und sind zusätzlich Bestandteile von unterschiedlichen Coenzymen wie Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD).¹¹⁻¹³

Für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nucleotiden sind verschiedene Wege möglich. Beim Purin- und Pyrimidin- *de novo*-Syntheseweg werden die entsprechenden Nucleotide schrittweise über verschiedene Enzyme aufgebaut.^{14,15} Besonders die Bereitstellung von Purinen über die Neusynthese ist mit einem ungewöhnlich hohen Energieaufwand verbunden, bietet aber auch gleichzeitig bedingt durch die Beteiligung zahlreicher multifunktionaler Proteine verschiedene Ansätze zur gezielten Regulation des Purin-Haushaltes durch pharmazeutisch aktive Substanzen.^{15,16} Energetisch favorisiert ist der sogenannte *salvage pathway*, bei dem vor allem die Nucleobasen wiederverwendet

werden, die hauptsächlich durch den intrazellulären Abbau von Nucleinsäuren oder intestinale Resorption von Nahrungsstoffen erhalten werden.³ Hierzu stehen dem Organismus eine Vielzahl an Enzymen zur Verfügung, durch den die einzelnen Nucleoside und Nucleotide je nach Bedarf energieeffizient ineinander umgewandelt werden können. Die meisten Zellen können ihren Bedarf hauptsächlich über den energetisch favorisierten *salvage pathway* decken.^{3,15} Schnell proliferierende Zellen aber, wie beispielweise Zellen des Immunsystems oder Krebszellen, greifen auch in hohem Maße auf die *de novo*-Synthese zurück, um ihre erhöhten Mengen an Nucleosiden und Nucleotiden decken zu können.^{17,18} Durch eine gezielte Unterdrückung der *de novo*-Synthese kann bei solchen Zellen die DNA- und RNA-Synthese gehemmt werden, was zu einer stark eingeschränkten Proliferation führen kann.¹⁵ „Normal“ proliferierende Zellen würden jedoch kaum beeinflusst, da diese ihren Bedarf hauptsächlich über den *salvage pathway* decken. Diese gezielte Hemmung der *de novo*-Synthese kann vor allem zur Behandlung von Krebs und Autoimmunerkrankungen ausgenutzt werden.^{17–19}

2.2 Biomembranen von lebenden Zellen

2.2.1 Struktur und Eigenschaften

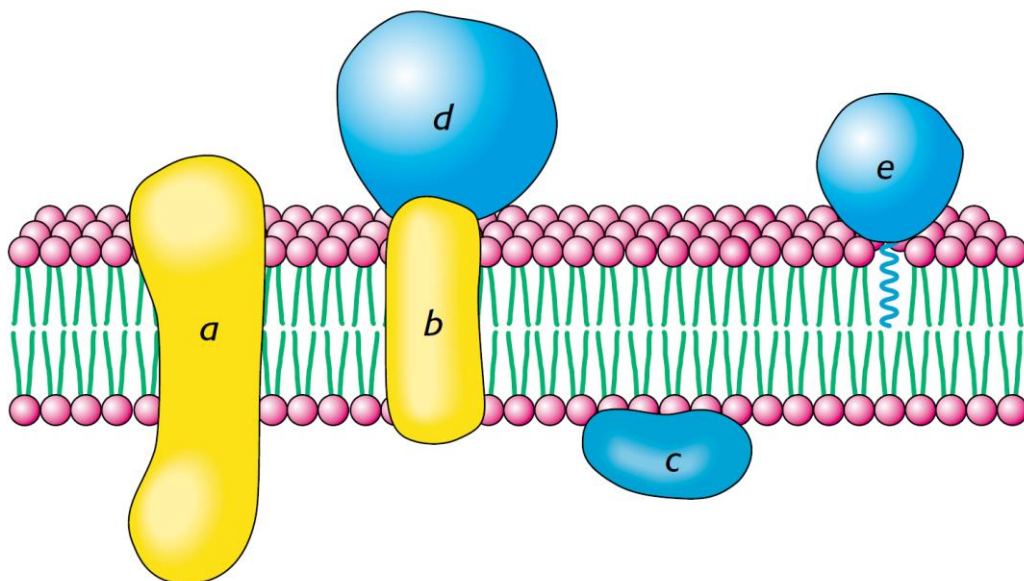


Abb. 5: Allgemeiner Aufbau von Plasmamembranen: integrale Membranproteine (a, b), periphere Membranproteine (c, d) und kovalent gebundenes, peripheres Membranprotein (e).²⁰

Um das Zellinnere von der Umgebung zu trennen, sind alle lebenden Zellen mindestens von einer Biomembran umgeben. Sie begrenzt den Stoffaustausch zwischen Zelle und Umwelt und stellt somit eine unverzichtbare Grundstruktur dar, deren irreversible Zerstörung unmittelbar zum Zelltod führt.^{3,10,20} Alle zellulären Membranen sind grundsätzlich aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut, die ihre Struktur durch die Zusammenlagerung amphiphiler

Lipide erhält. Die Zusammensetzung unterscheidet sich je nach Zellart, jedoch sind die wesentlichen Bestandteile immer verschiedene Phosphoglycerolipide, Phosphatidylcholine, Sphingolipide und Cholesterin.²¹ Beispielweise sind in Plasmamembranen hohe Anteile an Cholesterin zu finden, während mitochondriale Membranen hohe Mengen an Cardiolipin enthalten, welches in anderen Membranen kaum zu finden ist. Diese Amphiphile lagern sich so zusammen, dass die lipophilen Anteile zueinander nach innen gerichtet und die hydrophilen Anteile nach außen zum wässrigen Milieu weisen (Abb. 5).^{3,20,22,23}

Innerhalb der Plasmamembran sind eine Vielzahl an Proteinen integriert, die als Membranproteine zusammengefasst werden. Diese übernehmen verschiedene Aufgaben, wie den Kontakt zu benachbarten Zellen, den geregelten Stoffaustausch, die Bindung von Signalmolekülen und deren Weiterleitung und die Erkennung von körper- bzw. zellfremden Strukturen.^{20,24} Grundsätzlich kann zwischen integralen und peripheren Membranproteinen unterschieden werden, wobei integrale Membranproteine die Zellmembran mindestens einmal komplett durchqueren und die peripheren Proteine hauptsächlich über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der Membran verknüpft sind (Abb. 5). Vor allem die integralen Proteine spielen beim Transport von verschiedenen lebenswichtigen Stoffen eine entscheidende Rolle, wobei die hierfür verantwortlichen Strukturen auch als Transportproteine bezeichnet werden.^{10,20}

2.2.2 Transport durch Membranen

Die meisten polaren und geladenen Moleküle können die Lipidmembranen nicht durchdringen. Kleinere unpolare Moleküle wie Ethanol oder Harnstoff, die keine Ladung besitzen, oder gelöste Gase wie Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid jedoch können die Membran durchqueren. Wasser stellt als polares Molekül eine Ausnahme dar, welches trotz seiner hohen Polarität bedingt durch seine geringe Größe, fehlende Ladung und hohe Konzentration die Membranen relativ leicht passieren kann. Die meisten biologischen Moleküle wie Kohlenhydrate, Aminosäuren oder andere Makromoleküle sind in der Regel hydrophile Substanzen, die die hydrophobe Zellmembran nur mit Hilfe von spezifischen Transportproteinen überwinden können.^{20,22}

Die Transportprozesse können zum einen durch ihre Energieabhängigkeit, zum anderen durch ihre Transportrichtung unterschieden werden. Bei der Energieabhängigkeit wird zwischen aktivem und passivem Transport differenziert. Beim passiven Transport wird keine Energie benötigt, da das Substrat mit einem bestehendem Konzentrationsgefälle transportiert wird. Hierbei kann zwischen einfacher und erleichterter Diffusion unterschieden werden, wobei bei ersterem der passive Transport durch integrale Membranproteine, die auch Permeasen oder Carrier genannt werden, ermöglicht werden kann.^{3,25} Diese Membranproteine binden das Substratmolekül auf der einen Seite und transportieren durch

Konformationsänderungen das Substrat auf die andere Seite. Bei der erleichterten Diffusion wird bei den Transportproteinen auch von Kanälen gesprochen, die im Vergleich zu den Permeasen und Carriern verschließbare Poren in der Membran bilden. Für viele Prozesse, die in Form von passiver Diffusion ablaufen, gibt es zusätzlich spezifische Transportproteine, die die Substrate neben der Diffusion auch durch aktiven Transport durch die Zellmembran leiten (Fettsäuretransporter, Aquaporine).^{20,26} Beim aktiven Transport wird das Substrat gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert, weshalb Energie, in der Regel in Form von ATP, benötigt wird. Hierbei wird zwischen primär aktivem Transport und sekundär aktivem Transport unterschieden, wobei beim ersteren die Spaltung von ATP direkt mit dem Transportmechanismus verbunden ist.^{3,27} Bei der Transportrichtung wird zwischen Uniport, Symport und Antiport unterschieden. Beim Uniport wird das Substrat von der einen Seite der Membran zur anderen transportiert, wobei beim Transport von mehreren Substraten in die gleiche Richtung von Symport gesprochen wird. Wenn ein Substrat in die eine und ein anderes Substrat in die gegengesetzte Richtung transportiert wird, spricht man von Antiport.³

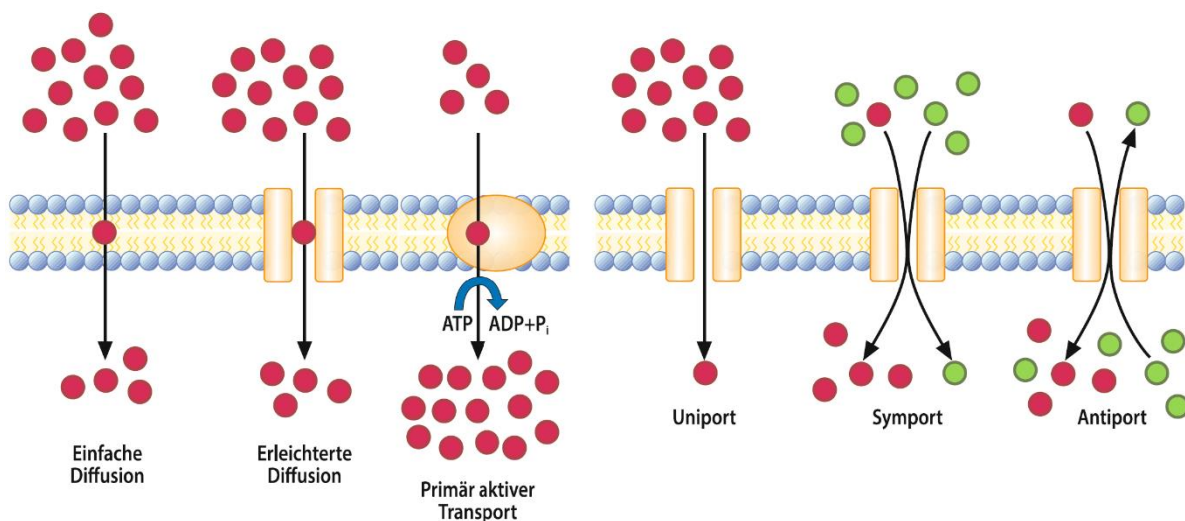


Abb. 6: Unterschiedliche Transportmechanismen nach Energieabhängigkeit und Transportrichtung.³

Die Eigenschaften dieser Vielzahl an Transportprozessen nimmt in der heutigen pharmazeutischen Moleküleentwicklung eine immer größere Rolle ein, da die Zellaufnahme und das Aufrechterhalten der Substratkonzentration sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle für die Aktivität und die Zytotoxizität entscheidende Rollen einnehmen.^{24,26–28}

2.3 Krebs

2.3.1 Definition und Eigenschaften von Krebszellen

Krebs im Allgemeinen wird als Sammelbegriff für eine Vielzahl von Erkrankungen verwendet.³ Bei gesunden Zellen ist das Zellwachstum und die Zellteilung kontrolliert. Bei Krebszellen finden diese Prozesse unkontrolliert statt, was zu einer überproportionalen Vermehrung und Ausbreitung in umliegendes Gewebe führen kann.^{29,30} Im gesunden

Organismus werden unbrauchbare, beschädigte oder abgestorbene Zellen durch neu gebildete Zellen ersetzt. Dieser geordnete Prozess wird vor allem durch wachstumskontrollierende Signale während des Zellzyklus reguliert. Dies führt zur Homöostase der Anzahl an Zellen und ist somit zur Aufrechterhaltung der gesunden Gewebestruktur und -funktion entscheidend.^{31,32} Diese Regulation ist bei der Entstehung von Krebserkrankungen gestört, sodass beschädigte Zellen nicht absterben oder aber neue Zellen entstehen, obwohl diese für den Erhalt des Gewebes nicht notwendig sind. Diese Zellen bilden die Grundlage für die Entstehung von Tumorgewebe.^{3,4}

Grundsätzlich kann zwischen gutartigen (benignen) und bösartigen (malignen) Tumoren unterschieden werden, wobei der Begriff Tumor jede Art der unkontrollierten Gewebeproliferation bezeichnet. Als Krebs (Malignom) werden in der Medizin vor allem bösartige Gewebeneubildungen (Neoplasie) bezeichnet.^{3,4} Diese besitzen im Vergleich zu den benignen Tumoren die Fähigkeit, sich invasiv in umliegendes Gewebe auszubreiten. Dies kann durch direktes Wachstum des Tumorgewebes geschehen, die Tumorzellen können aber auch in das Lymph- oder Blutssystem gelangen und dadurch weit entfernt vom ursprünglichen Gewebe neue Tumore bilden.^{30,33}

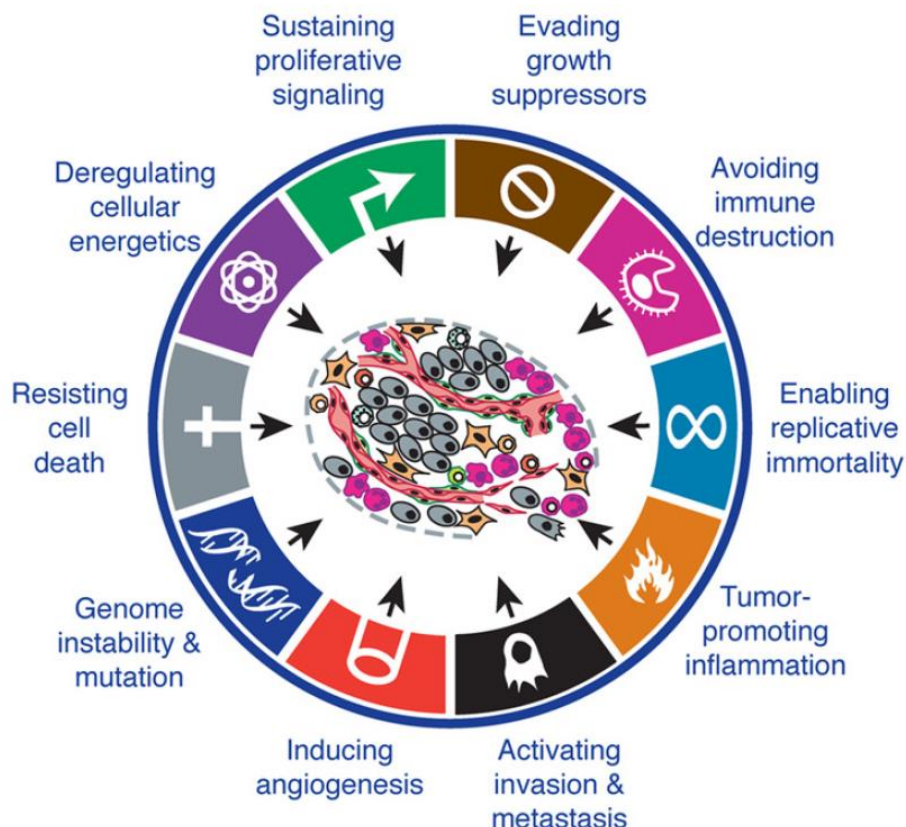


Abb. 7: Die wichtigsten Eigenschaften von Krebs zusammengefasst von A. WEINBERG *et al.* als „hallmarks of cancer“.⁴

Krebszellen zeichnen sich neben der unkontrollierten Vermehrung und Aufrechterhaltung von Proliferationsmechanismen durch viele weitere einzigartige Eigenschaften aus.³³ Viele dieser Eigenschaften wurden von A. Weinberg *et al.* zunächst als sechs „*hallmarks of cancer*“ zusammengefasst²⁹, welche inzwischen auf zehn Faktoren erweitert wurden (Abb. 7).⁴ Neben der Aufrechterhaltung der wachstumsfördernden Proliferationssignale und der Fähigkeit zu metastasieren, spielt auch das direkte Umgehen der proliferationshemmenden Signale eine wichtige Rolle.^{34,35} Hiermit verbunden ist eine weitere wichtige Eigenschaft, die es den Krebszellen ermöglicht, die Apoptose zu umgehen. Die Apoptose, also der programmierte und kontrollierte Zelltod, wird als wichtiger Faktor zur Vermeidung von Tumorbildungen charakterisiert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Apoptose vermehrt bei Zellen ausgelöst wird, die demselben physiologischem Stress wie Krebszellen während der Tumorgenese oder antitumorale Therapie ausgesetzt sind.³⁶ Häufig wird die Apoptose während des Zellzyklus eingeleitet, wenn beispielweise Schäden an der replizierten DNA vorliegen oder die Replikation unvollständig ist. Der Verlust über die Kontrolle des Zellzyklus stellt deshalb ein weiteres Charakteristikum von Tumorzellen dar.^{32,37} Weiterhin besitzen Tumorzellen die Eigenschaft, eine replikative Immortalität zu erreichen. Hierbei hat sich gezeigt, dass Telomere, die die Enden der Chromosomen und DNA-Stränge schützen eine entscheidende Rolle für die unendliche Proliferation einnehmen. Die ständige Verkürzung und die Abwesenheit von Telomeren in normalem Gewebe stellt einen Tumorsuppressor-Faktor dar, während in Tumoren die Telomerasen, die für die Synthese und den Erhalt der Telomere verantwortlich sind, stark überreguliert sind. Dies führt zu einer Verlängerung und dem Erhalt der mit der Zeit sonst immer kürzer werdenden Telomere und ermöglicht somit ein unendliches Wachstum.^{38,39} Der letzte wichtige Faktor zur Charakterisierung von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit, die Angiogenese zu induzieren.^{40,41} Als Angiogenese wird das Bilden und Wachstum von Blutgefäßen aus bereits vorgebildeten Gefäßen bezeichnet. Diese Eigenschaft ist für eine ausreichende Versorgung der Zellen und des Gewebes mit Sauerstoff und anderen wichtigen Nährstoffen entscheidend, auch wenn viele Krebszellarten unter unnatürlichen Wachstumsbedingungen wie Sauerstoffmangel (Hypoxie), erhöhter Acidität oder stark vermehrten Mengen an Glucose (Hyperglykämie) in der Lage sind, zu überleben und sogar zu proliferieren.^{40,42}

Neben diesen beschriebenen Charakteristika hat sich vor allem in den letzten Jahren gezeigt, dass auch die Umprogrammierung des zellulären Energiemetabolismus wichtig für ein kontinuierliches Wachstum der Zelle ist.⁴³ Des Weiteren besitzen Tumorzellen die Fähigkeit, unerkannt vom körpereigenen Immunsystem zu bleiben, wodurch sie nicht durch dieses zerstört werden und ungehindert proliferieren können.⁴ Durch die Erforschung der Charakteristika von Tumorzellen und Tumorgewebe wird die Entwicklung neuer Medikamente mit diesen speziellen Eigenschaften als Target gefördert, was in den letzten

Jahren zu neuen Arzneimitteln geführt hat, die derzeit in klinischen Studien oder bereits zugelassen sind.^{4,6}

2.3.2 Entstehung von Krebs

Krebs wird durch Mutationen von Genen verursacht, die hauptsächlich verantwortlich für die Zellfunktionen wie Wachstum und Zellteilung sind.⁴⁴ Grundsätzlich kann, wie in Abschnitt 1 erwähnt, zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Karzinogenen unterschieden werden. Physikalische Karzinogene sind beispielsweise UV- oder ionisierende Strahlung, chemische Karzinogene hingegen sind unterschiedliche Substanzen wie Asbest oder bestimmte Bestandteile von Tabakrauch. Als biologische Karzinogene werden Infektionen mit Viren oder Bakterien eingestuft, die zu Krebserkrankungen führen können.³ Außerdem können genetische Veränderungen Krebs hervorrufen, die bereits in den Keimzellen vorhanden sind. Schließlich führt steigendes Alter ebenfalls zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken, da im Alter Fehler in der Replikation der DNA seltener erkannt werden und somit Schäden im Erbgut entstehen, die Krebs auslösen können.⁴⁵ Inzwischen konnten mehrere wesentliche Gentyphen identifiziert werden, bei denen eine Mutation zur Krebsentstehung und -progression beitragen kann.³

- **Onkogene:** Die Onkogene sind entscheidend für die Regulation der Zellteilung und des Zellwachstums. Mutationen innerhalb dieser Gene können das Wachstum über die regulierenden, gewebespezifischen Faktoren hinaus fördern.
- **Tumorsuppressorgene:** Diese Gene hemmen das Wachstum von Zellen mit chromosomalen oder DNA-Aberrationen. Zusätzlich sind sie für das Einleiten der Apoptose bei irreparablen Schäden verantwortlich.
- **Mutatorgene:** Diese Gene sind verantwortlich für den Erhalt und die Reparatur des Genoms, indem durch sie Reparaturenzyme exprimiert werden. Treten hier Fehler auf, hat dies eine erhöhte Fehlerquote bei der Replikation zur Folge, was schließlich zu einer erhöhten Mutationsrate bei anderen wichtigen Gentyphen führt.

2.3.3 Tumormikroumgebung von soliden Tumoren

Sowohl gutartige als auch bösartige Tumoren werden als solide Tumoren bezeichnet, wenn sie organähnliche Strukturen aufweisen. Damit wird lokalisiertes Tumorgewebe (Sarkome, Lymphome, Karzinome) von Leukämie unterschieden.³ Ein Tumor ist nicht wie ursprünglich angenommen eine reine Ansammlung homogener Tumorzellen, sondern vielmehr eine heterogene Zusammensetzung aus lokalisierten und infiltrierenden Zellen mit verschiedenen Graden an Differenzierung, Proliferation und Inflammation sowie Sekretionsfaktoren und extrazellulärer Matrix (*extracellular matrix*, ECM).⁴⁶

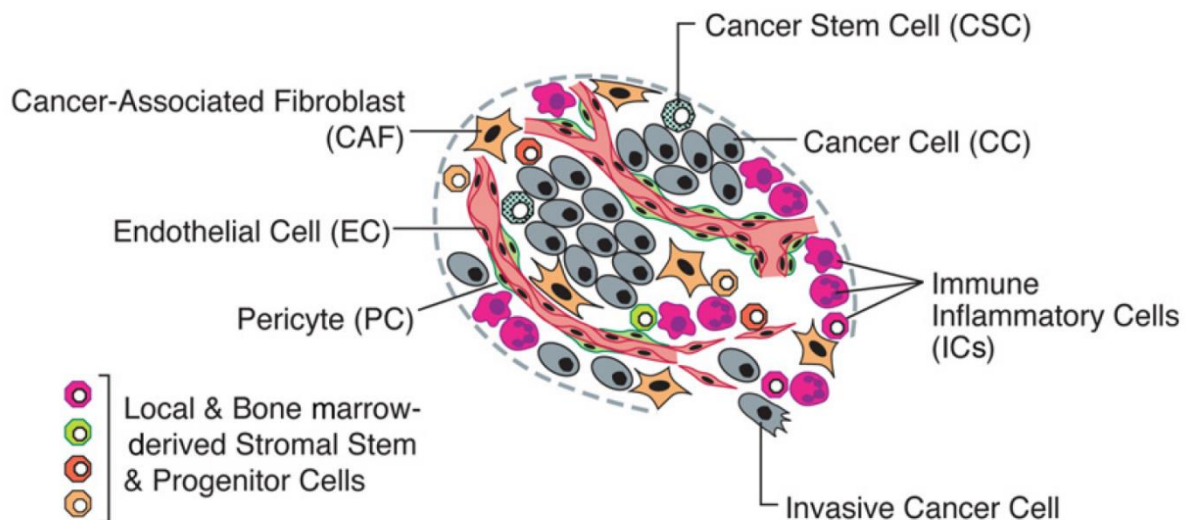


Abb. 8: Schematische Darstellung von Tumorzellen und ihre Tumormikroumgebung.⁴

Solide Tumore setzen sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen, die zusammen das Wachstum und das Voranschreiten des Tumors fördern.³³ In den letzten Jahren konnten neben den Krebszellen auch sogenannte Krebsstammzellen (*cancer stem cell*, CSC) identifiziert werden, die die Charakteristika von gesunden Stammzellen aufweisen, jedoch die Fähigkeiten besitzen, das Wachstum und die Proliferation bestimmter Krebszellen in dem spezifischen Gewebe zu fördern.⁴⁷ Die Eigenschaften dieser Krebsstammzellen tragen dazu bei, dass Tumore metastasieren und trotz erfolgreicher Behandlungen die Tumore erneut auftreten, da die Stammzellen meist nicht von der Therapie betroffen sind, dennoch einen maßgeblichen Anteil an der Tumorbildung und dem -wachstum haben.⁴⁸ Auch wenn die Existenz dieser CSCs länger umstritten war, konnten in den letzten Jahren zahlreiche Nachweise für Ihre Existenz und Bedeutung für die Tumorprogression erbracht werden.^{49,50} Daneben sind im Tumorgewebe Endothelzellen zu finden (*endothelial cell*, EC), die für den Aufbau des vaskulären Systems des Tumors verantwortlich sind.⁵¹ Des Weiteren sind im Tumor inflammatorische Immunzellen (*immune inflammatory cell*, IC) und tumorspezifische Fibroblasten (*cancer-associated fibroblast*, CAF) zu finden, die verschiedene Wachstumsfaktoren produzieren können.⁵² All diese Zellen machen in ihrer spezifischen und komplexen Zusammensetzung das gesamte Tumorgewebe aus (Abb. 8).^{4,46,53}

Das Tumorgewebe selbst ist abgesehen von der Zusammensetzung der Zellen ebenfalls nicht homogen strukturiert. Die einzelnen Komponenten in der Tumormikroumgebung unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Position im Gewebe stark. Charakteristisch sind zum Beispiel unterschiedlich schnell proliferierende Zellen, unterschiedliche Durchsetzung von extrazellulärer Matrix und unterschiedliche Hypoxie und Azidität.^{54,55} Die Struktur der ECM ist ein wichtiger Faktor dafür, dass innerhalb des Tumorgewebes der osmotische Druck stark erhöht ist, was das Eindringen von Makromolekülen in das Gewebe erschwert.⁹

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die dreidimensionale Gesamtstruktur von soliden Tumoren und ihre unterschiedliche Zusammensetzung von Zellen und ECM einen starken Einfluss auf die Behandlung von diesen besitzt.⁵⁶

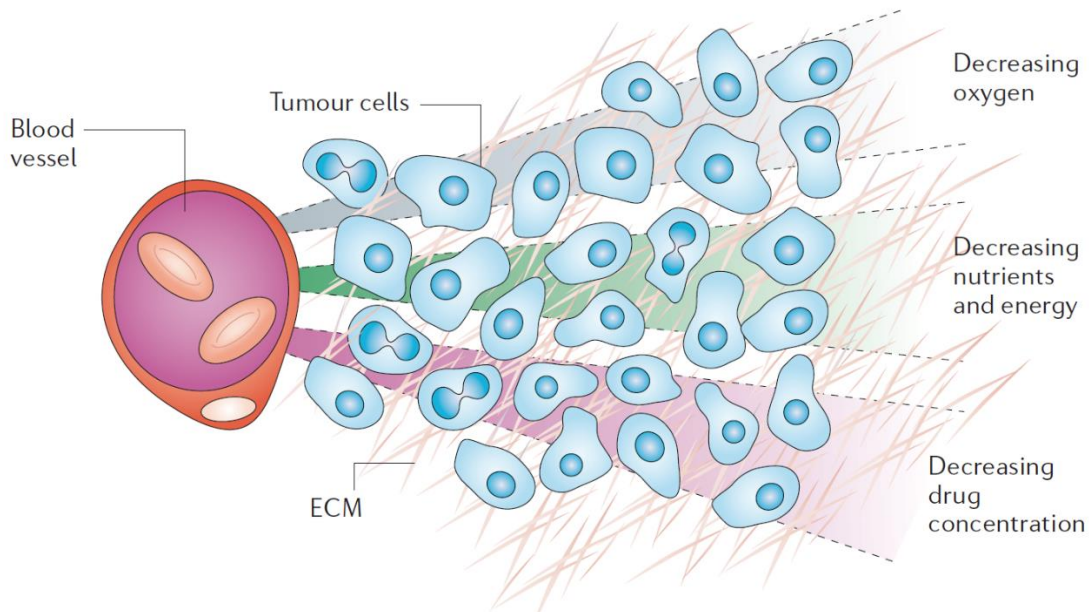


Abb. 9: Unterschiedliche Verteilung von Tumorzellen und ECM in Relation zum vaskulären System.⁵⁷

Eine weitere Besonderheit von soliden Tumoren ist das vaskuläre System, welches auch einen besonderen Stellenwert in der Behandlung von Tumorerkrankungen einnimmt.⁵⁸ Die Blutgefäße sind undefiniert und unstrukturiert, sind nicht in Arterien und Venen unterteilt und in der Regel stark verschachtelt und geweitet.^{9,58} Es wurde beispielweise beschrieben, dass die Tumorzellen direkt in die Gefäßwände eingebunden sind.⁵⁹ Diese Strukturen führen dazu, dass die Flussrate innerhalb der Gefäße stark sinkt und somit eine geringere Blutversorgung gegenüber normalem Gewebe gewährleistet wird.^{59,60}

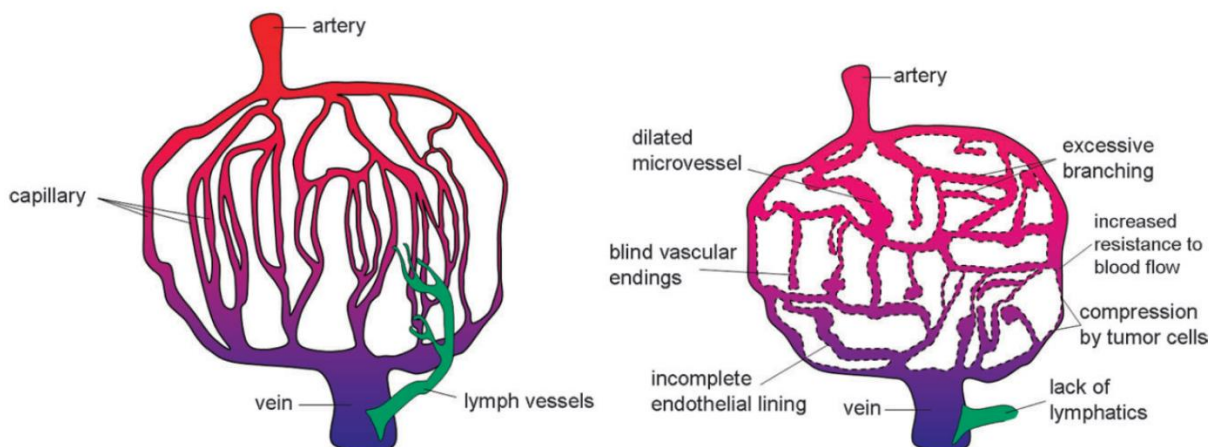


Abb. 10: Vaskuläres System in gesundem Gewebe (links) und soliden Tumoren (rechts).⁹

Aufgrund dieser besonderen, von gesundem Gewebe stark abweichenden Eigenschaften, sowohl von einzelnen Tumorzellen als auch vom gesamten Tumorgewebe und seiner Mikroumgebung ist eine effektive Behandlung besonders erschwert.^{9,46}

2.4 Therapie von Tumorerkrankungen

Für die Behandlung von Krebserkrankungen gibt es eine Vielzahl an therapeutischen Ansätzen.⁶¹ Hierbei kann zwischen verschiedenen Therapien unterschieden werden. Durch Operationen können das ganze oder bestimmte Teile des Tumorgewebes entfernt werden.³ Des Weiteren wird häufig die sogenannte Strahlentherapie verwendet, bei der das Tumorgewebe einer hoch energetischen Strahlung ausgesetzt wird, um es zu zerstören.⁶² Eine neuere Form der Behandlung ist die Immuntherapie, bei der das körpereigene Immunsystem angeregt wird, um das Tumorgewebe zu vernichten.^{17,63} Eine derzeit am häufigsten angewendete Form der Therapie ist die Chemotherapie, bei der Medikamente verabreicht werden, die in der Lage sind, Krebszellen zu zerstören.^{6,61,64}

Für jede Tumorerkrankung ist eine individuelle Behandlung wichtig, die meist eine Kombination aus verschiedenen Therapieansätzen darstellt, wodurch die Überlebensrate häufig deutlich gesteigert werden kann.^{61,65} In dieser Arbeit wurde sich hauptsächlich mit Aspekten der Chemotherapeutika beschäftigt, weshalb in den folgenden Kapiteln im Schwerpunkt auf die Chemotherapie auf zellulärer Ebene eingegangen wird.

2.4.1 Chemotherapie bei Krebserkrankungen

Bei der Chemotherapie kommen Zytostatika zum Einsatz, die möglichst spezifisch auf Krebszellen wirken sollen und diese abtöten oder im Wachstum hemmen.¹⁸ Zytostatika sind eine Stoffklasse, die verschiedene Stoffwechselforgänge der Zellteilung oder des Zellwachstums stören können. Dadurch sind diese Substanzen hochtoxisch.⁶⁶ Da Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen aber eine stark erhöhte Zellteilungsrate sowie eine eingeschränkte Reparaturfähigkeit besitzen, sind diese besonders anfällig gegenüber dieser Wirkstoffklasse.^{29,64} Aus diesem Grund können Zytostatika erfolgreich für die Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden.^{61,64,66}

In der heutigen antitumoralen Chemotherapie kommen eine Vielzahl an Zytostatika zum Einsatz.⁶ Hierbei kann zwischen einem breiten Spektrum von Wirkmechanismen unterschieden werden, wobei diese grundsätzlich in DNA-reaktive Wirkstoffe, mitotische Gifte und Inhibitoren der DNA-Replikation unterteilt werden.⁶⁴ DNA-reaktive Wirkstoffe sind vor allem alkylierende Substanzen, wodurch meist eine Hemmung der Replikation erfolgt.^{67,68} Beispiele für diese Wirkstoffklasse sind das 1962 zugelassene Cyclophosphamid⁶⁹ oder das 1999 zugelassene Temozolomid⁷⁰, welches zur Behandlung von Gehirntumoren verwendet wird. Die heutzutage häufig eingesetzten Platinanaloga werden auch zu den Alkylantien

gezählt, da diese durch Quervernetzungen der DNA-Stränge ebenfalls die Apoptose in schnell proliferierenden Zellen einleiten.⁷¹ Mitotische Gifte wie das 1958 erstmals isolierte Vinblastin verhindern die Verteilung der Chromosomenpaare bei der Zellteilung, oder blockieren durch ähnliche Mechanismen den Mitosevorgang. Zu dieser Wirkstoffklasse zählen auch die Taxane, die an die Tubuline binden und somit den Abbau der Mikrotubuli verhindern.

Die wahrscheinlich bedeutendste chemotherapeutische Wirkstoffklasse stellen die Inhibitoren der DNA-Replikation dar.⁶ Zu diesen zählt das durch rationales Design entwickelte Thymin-Analogon 5-Fluoruracil^{72,73} **1** und die Purin-Analoga 8-Azaguanin **18** und 6-Mercaptopurin **19** (Abb. 11)^{74,75}. Diese stellen sogenannte Antimetabolite dar, da sie an der DNA-Synthese beteiligte, intrazelluläre Enzyme inhibieren oder in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Der Einbau nicht natürlich vorkommender Nucleotide kann zum Abbruch der Verlängerung des DNA-Stranges führen, was letztendlich zur Induktion der Apoptose führt.^{18,76} Die erfolgreiche Anwendung vor allem von 5-FU in der Behandlung von Krebs führte in den letzten Jahrzehnten zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Nucleosidanaloga, die bis heute eine große Bedeutung in der Behandlung von Tumoren haben.^{15,76}

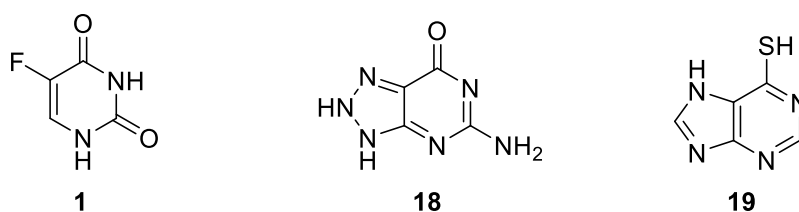


Abb. 11: Nucleobasenanaloga 5-Fluoruracil **1**, 8-Azaguanin **18** und 5-Mercaptopurin **19**.

Alle Chemotherapeutika haben jedoch das Problem, dass durch ihre zytotoxischen Eigenschaften nicht nur schnell proliferierende Zellen betroffen sein können, sondern im verminderten Maße auch gesunde Zellen beschädigt werden.⁷⁷ Dies führt zu Nebenwirkungen, die stark abhängig von der Art der Therapie und der individuellen Verträglichkeit sind. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Erbrechen, Erschöpfung, Geschmackstörungen, Haarausfall und Blutbildveränderungen.^{78–80} Viele Zytostatika sind außerdem auch Karzinogene, was zu Zytostatika induzierten Leukämien führen kann.⁸¹ Bei über 50% der Tumorpatienten tritt auch eine durch die Chemotherapie bedingte Anämie auf.⁸²

Um die Nebenwirkungen minimal zu halten, ist die richtige Dosierung der Wirkstoffe entscheidend.⁶⁶ Ziel ist es, so viele Krebszellen wie möglich zu töten und den Schaden dabei auf gesunde Zellen zu mindern.⁸³ Hierbei beschreibt die therapeutische Breite (*therapeutic index*, TI) das Verhältnis zwischen der toxischen Dosis (B) und der therapeutischen Dosis (A) des Wirkstoffs.⁸⁴ Bei den meisten chemotherapeutischen Wirkstoffen ist dieser Wert nahe

1. Um den Schaden am gesunden Gewebe möglichst gering zu halten, wird in der Regel die sichere Dosis (C) des Wirkstoffs verabreicht (Abb. 12).^{77,84}

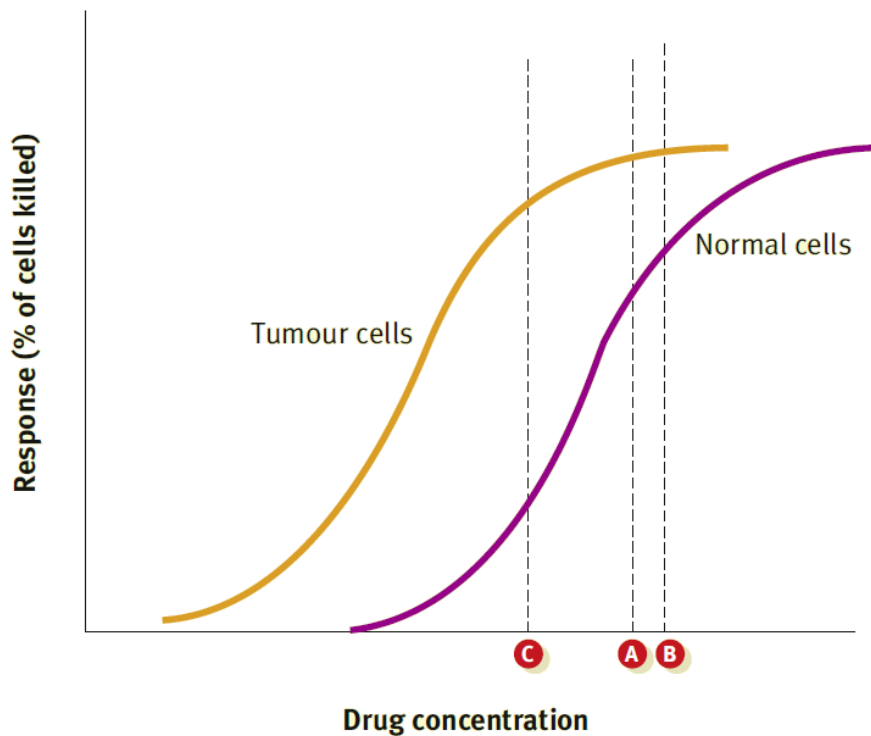


Abb. 12: Dosis-Effekt-Kurven für chemotherapeutische Wirkstoffe die auf gesunde und Tumorzellen wirken. A: therapeutische Dosis, B: toxische Dosis, C: sichere Dosis.⁶⁶

Aufgrund dieser Tatsachen ist die Forschung an neuen Wirkstoffen oder der Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften von etablierten Wirkstoffen weiterhin unverzichtbar und wichtiger Bestandteil aktueller, antitumoraler Forschung.

2.4.2 Nucleosidanaloga in der Chemotherapie

Nucleobasen- und Nucleosidanaloga sind ein elementarer Bestandteil in der modernen Chemotherapie und werden gegen eine Vielzahl von verschiedenen Tumorerkrankungen eingesetzt.^{18,76} Diese wirken, wie in Abschnitt 2.3.1 erwähnt, als sogenannte Antimetabolite durch das direkte Inhibieren der DNA-Synthese oder das Inhibieren der Synthese von DNA-precursors über den *de novo*-Syntheseweg.

5-Fluoruracil **1** (Abb. 11) war das erste etablierte, als Antimetabolit wirkende Zytostatikum. Dieses wird anstelle der Pyrimidinbasen in die DNA und RNA eingebaut.⁷² Zusätzlich hemmt das 5-Fluoruridin-Monophosphat **20** (FdU-MP) die Thymidylat-Synthase, was ebenfalls zur Inhibition der DNA-Synthese führt.⁸⁵ Inzwischen wird das 5-FU **1** häufig als nucleosidisches Prodrug eingesetzt, beispielsweise das Nucleosid Floxuridin⁸⁶ **2** oder Capecitabin^{86,87} **21** (Abb. 13). Das seit 1969 zugelassene Cytarabin **22** (ara-C) weist eine Arabinosyl-Zuckereinheit als Modifikation auf und wird anstelle von Cytosin **11** in die DNA und RNA

eingebaut.⁸⁸ Außerdem inhibiert es verschiedene DNA- und RNA-Polymerasen sowie Nucleotidreductasen.⁸⁹ Ein weiteres Beispiel für ein Pyrimidinanalogon ist das Gemcitabin **23**, welches an der 2'-Position zweifach fluoriniert ist.⁹⁰ Beispiele für Purinanaloga sind das 1993 zugelassene Cladribin **24** (CdA), welches an der 2-Position eine Chlormodifikation aufweist.⁹¹ Das 1991 zugelassene Fludarabin **25** (FaraA) enthält sowohl eine Arabinosyl-Zuckereinheit sowie eine Fluormodifikation an der 2-Position und wird vor allem für die Therapie von Leukämien und non-Hodgkins-Lymphomen eingesetzt.⁹² Ähnlich hierzu ist das Clofarabin **26** (ClFaraA), welches eine Weiterentwicklung von Fludarabin **25** darstellt.⁹³ Neben dem Einsatz bei akuter lymphatischer Leukämie wird Clofarabin **26** derzeit auch bei anderen Krebsformen in klinischen Studien getestet.⁹³

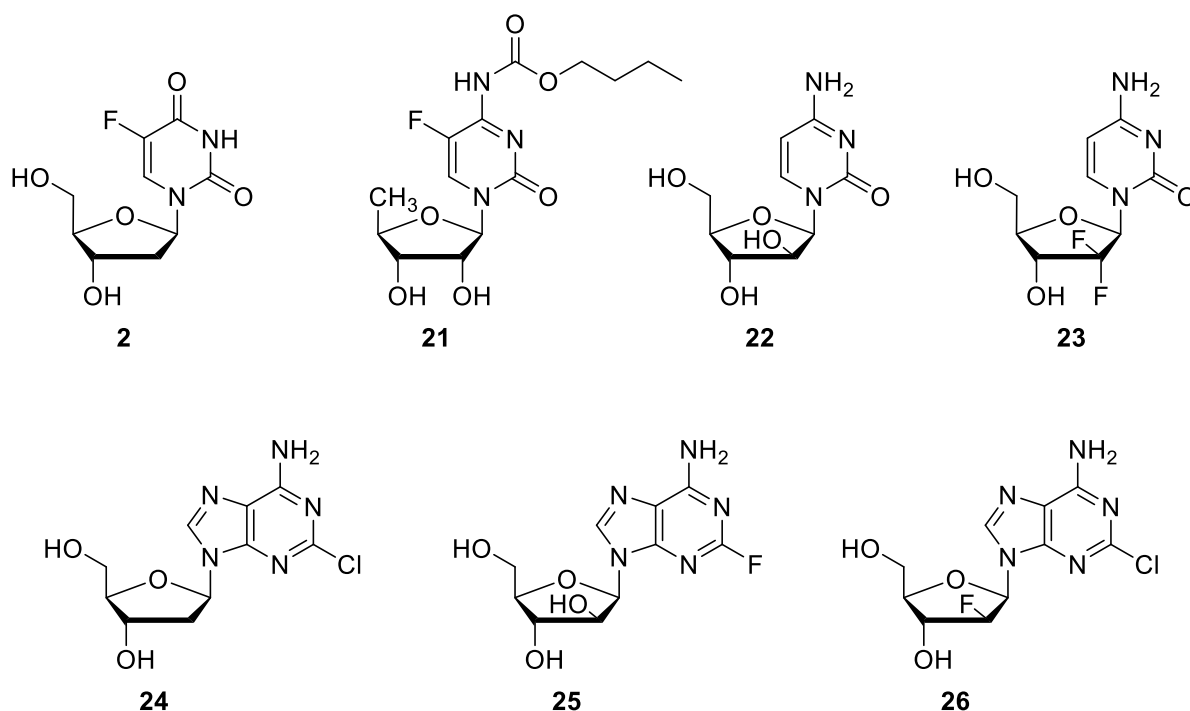


Abb. 13: Nucleosidanaloga in der antitumoralen Chemotherapie: Floxuridin **2**, Capecitabin **21**, Cytarabin **22**, Gemcitabin **23**, Cladribin **24**, Fludarabin **25** und Clofarabin **26**.

2.4.3 Wirkmechanismus und Grenzen bei der Behandlung mit Nucleosidanaloga

Nucleosidanaloga werden hauptsächlich intravenös oder oral verabreicht. Da die Targets der Wirkstoffe im intrazellulären Bereich liegen, ist die erste Hürde die Aufnahme in die Zellen, welche zum einen über konzentrationsabhängige, passive Diffusion oder Nucleosid-Membrantransportproteine (NTs) erfolgen kann.⁹⁴ Bei diesen Proteinen konnten bisher zwei Haupttypen identifiziert werden, die äquilibrierenden NTs (*equilibrative NTs*, ENTs) und die konzentrierenden NTs (*concentrative NTs*, CNTs). Bei den meisten Nucleosidanaloga ist die passive Diffusion bedingt durch ihre Hydrophilie stark limitiert, weshalb die Aufnahme über Transportproteine entscheidend ist.^{95,96} Aufgrund dieser Abhängigkeit der Nucleosidanaloga

von der Aufnahme in die Zellen konnten die Nucleosidtransporter bei unterschiedlichen Wirkstoffen für Resistenzen und Toxizität verantwortlich gemacht werden.^{96,97}

Die Nucleosidanaloga (NAs) sind sogenannte Prodrugs, sie werden also durch den zellulären Metabolismus in ihre aktiven Substrate umgewandelt. Der genaue Prozess ist schematisch in Abb. 14 dargestellt.⁹⁸ Grundsätzlich ist bei den meisten NAs das Nucleosidtriphosphat ein aktiver Metabolit, welcher durch schrittweise Phosphorylierung mittels Kinasen in den Zellen gebildet wird.^{99,100} Dies geschieht hauptsächlich über den *salvage pathway*, bei der im ersten Schritt das Nucleosid zum 5'-Monophosphat phosphoryliert wird. Dieser Schritt ist auf dem Weg zum Triphosphat in der Regel geschwindigkeitsbestimmend.¹⁰¹ Diese Phosphorylierung kann von verschiedenen Kinasen durchgeführt werden, am häufigsten aber von der 2'-Deoxycytidinkinase. Es konnte gezeigt werden, dass Krebszellen in der Regel eine drei- bis fünffache Konzentration dieser Kinase im Vergleich zu gesunden Zellen besitzen.¹⁰² Über weitere Kinasen wird dann das Nucleotid über das 5'-Diphosphat bis zum 5'-Triphosphat phosphoryliert. Diese sind Substrate für die DNA-Polymerasen und werden während der Replikation oder Reparatur in die DNA eingebaut. Daraus resultieren sowohl Kettenabbrüche als auch blockierte Replikationsgabeln, sodass die Apoptose induziert wird.⁹⁹ Da die meisten Krebszellen ihr Genom deutlich häufiger replizieren als gesunde Zellen, kann durch diesen Wirkmechanismus ein gewisser Grad an Selektivität erreicht werden.¹⁰³ Bestimmte Nucleosid-5'-Triphosphatanaloga werden auch in die RNA eingebaut, was zu einem Abbruch der Transkription, oder zu fehlerhafter mRNA oder rRNA führen kann.^{104,105}

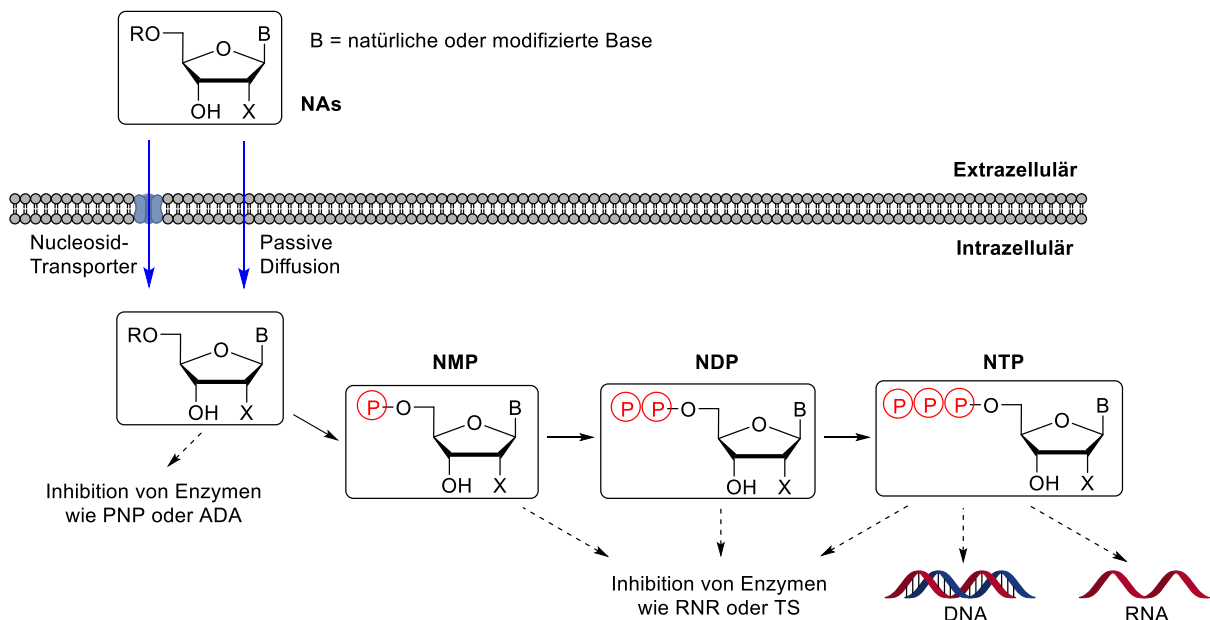


Abb. 14: Allgemeiner biologischer Wirkmechanismus von antitumoralen Nucleosidanaloga.¹⁰⁶

Neben dem Einbau der 5'-Triphosphate in die DNA und RNA, können auch die Nucleoside, sowie die Mono- und Diphosphate Enzyme inhibieren, die für die Zellproliferation wichtig

sind. Dadurch ergeben sich neben dem Wirkmechanismus als sogenannte *chain terminators* weitere Wirkmechanismen, um das Zellwachstum zu blockieren. Zu diesen Enzymen zählen beispielweise die Ribonucleotidreductase (RNR)¹⁰⁷ oder die Purin-Nucleosid-Phosphorylase (PNP), die von verschiedenen Nucleotiden der Nucleosidanaloga inhibiert werden.¹⁰⁸ Hierzu zählen auch die Adenosin-Desaminase (ADA) und die Thymidylat-Synthase (TS).⁷ Die Nucleotide können auch durch verschiedene Nucleotidasen wieder dephosphoryliert werden, was zu einer Regulierung von zellulären Nucleotid-Leveln wichtig ist.¹⁰⁹ Jedoch trägt dies dazu bei, dass die Konzentration des aktiven Metaboliten der Nucleosidanaloga generell niedrig ist.

Durch große Fortschritte in der Chemotherapie, die auch auf die Anwendung von Nucleosidanaloga zurückzuführen sind, konnte in den letzten 50 Jahren die 5-Jahres-Überlebensrate von Krebspatienten um fast 40% gesteigert werden.^{110,111} Dennoch ist der Einsatz der Nucleoside in der Chemotherapie durch viele verschiedene Faktoren begrenzt. Neben der Abhängigkeit von Nucleosidtransportern um in die Zellen zu gelangen, müssen die Wirkstoffe erst durch die Blutgefäße das tumorale Gewebe erreichen. Die meisten Nucleosidanaloga weisen bedingt durch schnelle enzymatische Spaltung nur geringe systemische Halbwertszeiten auf.^{112,113} Zusätzlich werden immer wieder Resistenzen von Krebszellen gegenüber verschiedener Nucleosidanaloga beobachtet, welche zum einen durch eine geringere Expression von Nucleosidtransporterproteinen¹¹⁴ oder zum anderen durch verstärkte Expression von 5'-Nucleotidasen zustande kommen können. Ebenfalls wurden verringerte Konzentrationen von Nucleosidkinasen beobachtet und mit Resistenzen gegenüber Nucleosidanaloga in Verbindung gebracht.^{115,116}

Neben den intrazellulären Faktoren spielt auch die in Abschnitt 2.2.3 erläuterte Tumormikroumgebung und die Gesamtstruktur des Tumorgewebes eine wichtige Rolle in der Limitierung der Nucleosidanaloga.^{9,46,53} Ein wichtiger Faktor für den Transport des Wirkstoffs durch das Blut ist die Konvektion, welche das Mitführen des Wirkstoffs im zirkulären Blutsystem beschreibt. Die Konvektion ist vom osmotischen und hydrostatischen Druck zwischen vaskulären und interstitiellen Bereich abhängig.⁹ Ein weiterer Faktor ist die Diffusion des Wirkstoffs. Hierbei ist die Verteilung im Tumorgewebe vom Konzentrationsgradienten der Substanzen abhängig. Im Fall von soliden Tumoren ist dadurch die Aufnahme der Wirkstoffe stark erschwert, da der Gradient des osmotischen Drucks gegenüber dem vaskulären Druck des Tumorgewebes nahe null liegt. Diese Tatsache wirkt einer Diffusion des Wirkstoffs bedingt durch einen Konzentrationsgradienten entgegen.^{57,117} Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine stark mit Kollagenfasern durchzogene Mikrotumorumgebung eine geringere Aufnahme von Wirkstoffen mit hohem Molekulargewicht zur Folge hat.¹¹⁸ Schließlich konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Dichte der Tumorzellen und der Konzentration des Wirkstoffs in diesem Gewebe

festgestellt werden, wobei mit steigender Zelldichte die Penetration des Wirkstoffs abnimmt.^{118,119}

All diese Faktoren können in der Regel nur durch eine höhere Konzentration des Wirkstoffs kompensiert werden, was bedingt durch die zytotoxischen Eigenschaften der Nucleosidanaloga eine Verstärkung der Nebenwirkungen an gesundem Gewebe zur Folge hat.^{18,19} Außerdem liegt bei den zugelassenen Nucleosidanaloga der therapeutische Index nahe bei 1, weshalb die Erhöhung der Dosis bis hin zur toxischen Dosis meist nur beschränkt möglich ist.⁸³ Daher stellt vor allem die Behandlung von soliden Tumoren mit nucleosidischen Wirkstoffen weiterhin ein großes Problem der Chemotherapie dar, wobei vor allem die Distribution des Wirkstoffs im Tumorgewebe und die Aufnahme in die Krebszellen von zentraler Bedeutung zur Steigerung der Effektivität von Nucleosidanaloga sind.^{18,94,106}

2.5 Prodrugkonzepte für Nucleosidanaloga

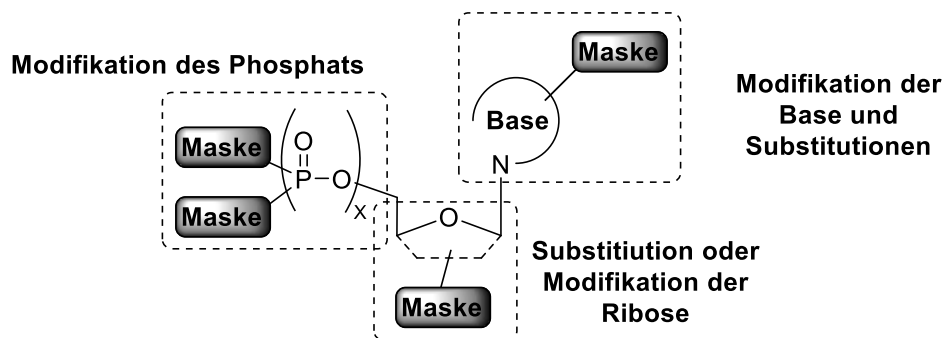


Abb. 15: Nucleotide und ihre möglichen strukturellen Modifikationen als Prodrugs.¹²⁰

Wie in Abschnitt 2.3.3 erläutert, ist der aktive Metabolit der meisten Nucleosidanaloga das Nucleosidtriphosphat, welches erst über mehrere Phosphorylierungsschritte ausgehend vom Nucleosid metabolisiert werden muss. Die Menge an gebildetem NTP durch Phosphorylierung ist bedingt durch viele intrazelluläre Prozesse. Diese sind abhängig von der Konzentration und der Umsatzgeschwindigkeit der phosphorylierenden und dephosphorylierenden Enzyme. Durch die bereits erwähnten Hürden für eine hohe Konzentration an aktiven Metaboliten und Resistenzen, die in die Phosphorylierung eingreifen, ist das Umgehen dieser Schritte wünschenswert. Die direkte Verabreichung von Nucleotiden ist jedoch nicht möglich, da Phosphate sehr anfällig gegenüber enzymatischem Abbau sind.¹⁸ Zusätzlich verhindert die negative Ladung der Phosphatgruppe die Diffusion durch die Zellmembran, wobei zusätzlich bei den meisten Zellen auch keine Transport-Mechanismen für Nucleotide vorhanden sind.⁷⁶ Deshalb wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Nucleotid-Prodrugkonzepte entwickelt, um diese Probleme zu umgehen. Prodrugs sind definitionsgemäß Substanzen, die biologisch selbst inaktiv sind, aber enzymatisch oder chemisch im Organismus in die aktive Form überführt werden. Die Prodrugs müssen zum einen eine ausreichende Stabilität außerhalb der Zellen besitzen,

gleichzeitig eine schnelle intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoff gewährleisten.^{77,120} Hierzu sind sowohl Modifikationen an der Nucleobase oder der Ribose, sowie an der Phosphateinheit möglich (Abb. 15).¹²⁰ Hierfür kommen meist sogenannte Maskierungseinheiten zum Einsatz, welche im Organismus chemisch oder enzymatisch abgespalten oder aktiviert werden können, um schließlich das aktive Nucleosidtriphosphat bereitzustellen (Abb. 15). Hierbei ist es wichtig, dass die abgespaltenen Maskierungseinheiten für den Organismus nicht toxisch sind.¹²⁰

2.5.1 Nucleosidmonophosphat-Prodrugs

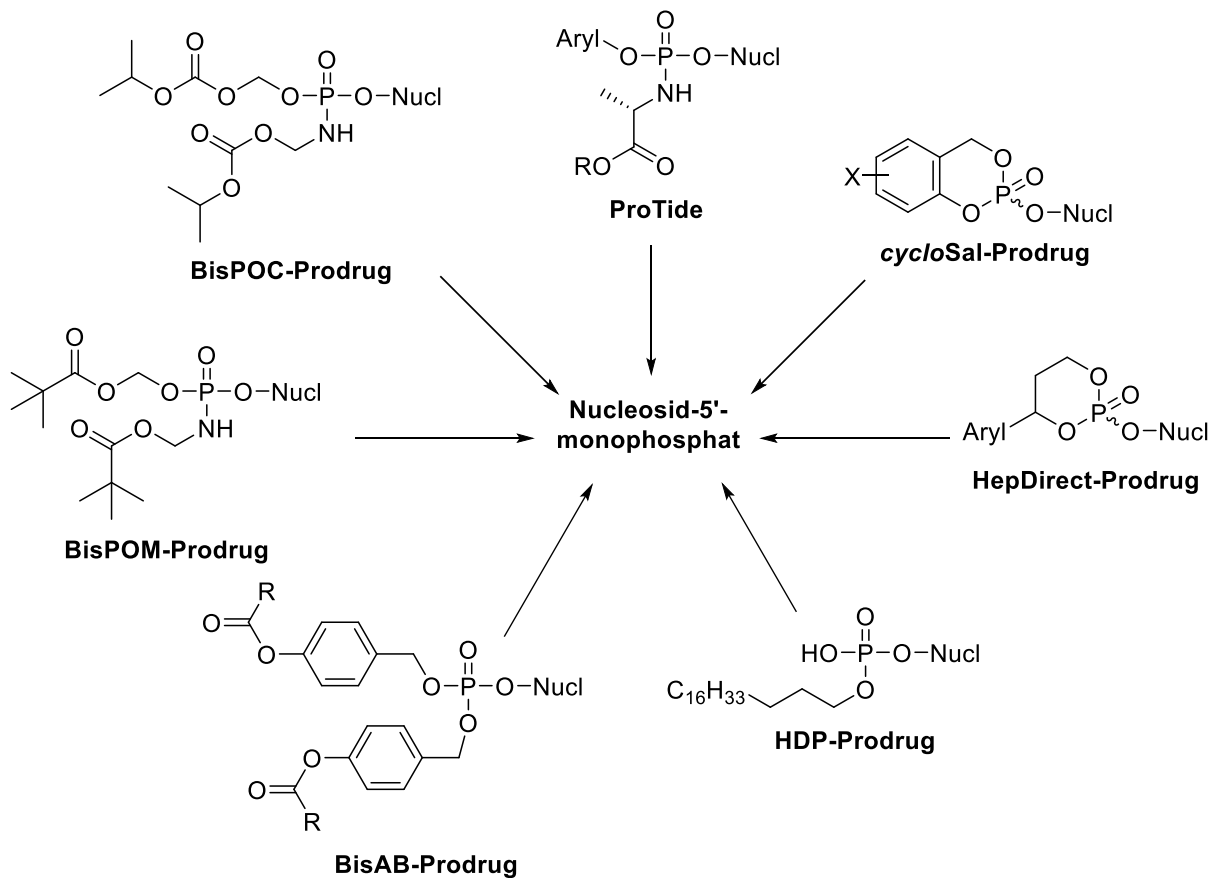


Abb. 16: Prodrugkonzepte für Nucleosid-5'-monophosphate.¹²¹

In den letzten Jahrzehnten sind vor allem im Bereich der antiviralen Chemotherapie verschiedene Prodrug-Konzepte für Nucleosid-5'-monophosphate entwickelt worden (Abb. 16). Das erste Pronucleotidkonzept ist das von SRIVASTVA veröffentlichte BisPOM-Prodrug, welches heutzutage in der Form von Adefovirdipivoxil zur Behandlung von Hepatitis-B-Viren eingesetzt wird.^{122,123} Bei diesen Pronucleotiden wird zunächst durch eine Esterase die erste Pivaloylgruppe abgespalten, worauf das entstandene Hydroxymethylalkoholat anschließend zu Formaldehyd und dem Nucleosidmonophosphat zerfällt.¹²² Ähnlich hierzu sind die BisPOC-Prodrugs, wobei hier Isopropylcarbonoxymethyl-Gruppen als Maskierungseinheiten verwendet werden.¹²⁴ Ein Beispiel für solch ein Prodrug, welches

erfolgreich zur Behandlung von Viruserkrankungen eingesetzt wird, ist das Tenofoviridisoproxilfumarat (TDF).¹²⁵

Bei sogenannten HDP-Prodrugs sowie den HepDirect-Prodrugs werden im Vergleich jeweils nur eine Maskierungseinheit pro Nucleotid freigesetzt. Bei den HDP-Prodrugs handelt es sich um Alkoxyalkylmonoester, die das Lysophosphatidylcholin (LPC) imitieren sollen. Somit können diese Prodrugs das Aufnahmesystem der Zellen für LPCs nutzen, wobei dann intrazellulär die Metabolisierung zum Monophosphat über Phospholipasen erfolgt.¹²⁶ HepDirect-Prodrugs haben die Besonderheit, dass sie organspezifische Freisetzung gewährleisten. Diese Prodrugs werden hauptsächlich durch Cytochrom P450-Enzyme in der Leber metabolisiert. Hierbei handelt es sich um cyclische 1,3-Propanylester, die zusätzlich eine Arylsubstitution besitzen. Aufgrund ihres speziellen Mechanismus der Freisetzung werden diese Prodrugs vor allem bei Krankheiten verwendet, die leberspezifisch auftreten. Ein Beispiel ist das Pradefovir, welches sich derzeit in klinischen Studien für Hepatitis-Infektionen befindet, sowie das MB07133, welches gegen hepatozelluläre Karzinome eingesetzt werden soll.¹²⁶

Ein weiteres wichtiges Beispiel sind die von McGUIGAN entwickelten ProTides. Bei diesen Prodrugs sind die Ladungen am Phosphat durch einen Arylsubstituenten und einen Aminosäurester maskiert, welche eine Diffusion des Prodrugs durch die Zellmembran ermöglichen.¹²⁷ Die Freisetzung des Nucleosidanalogs erfolgt intrazellulär zunächst durch Hydrolasen, wobei das dabei entstehende Phosphoramidat durch eine Phosphoramidase schließlich zum freien Nucleosidmonophosphat metabolisiert wird.¹²⁷ Verschiedene Phosphoramidat-Prodrugs werden derzeit erfolgreich zur Behandlung verschiedener Viruserkrankungen eingesetzt, beispielweise Tenofovirafenamid (TAF) gegen HIV-Erkrankungen sowie Sofosbuvir gegen Hepatitis-C-Virus Infektionen.¹²⁸ Zusätzlich befinden sich ProTides von Floxuridin **2** und Gemcitabin **12** in verschiedenen klinischen Studien zur antitumoralen Therapie.^{129,130}

Ein weiteres wichtiges Prodrugkonzept stellen die von MEIER entwickelten *cycloSal*-Prodrugs dar. Bei diesen Prodrugs fungiert ein Salicylalkohol als cyclische Maskierungseinheit, weshalb auch nur eine Maske pro Nucleotid abgespalten wird. Im Vergleich zu den bisher vorgestellten Konzepten erfolgt beim *cycloSal*-Konzept die Abspaltung der Maskierung pH-Wert-abhängig und nicht enzymatisch, es erfolgt also eine chemische Hydrolyse.^{131,132} Nach erfolgreicher Anwendung auf verschiedene Nucleosidanaloga wie das Stavudin (d4T)¹³² wurden *cycloSal*-Prodrugs der zweiten und dritten Generation entwickelt, welche eine zusätzliche durch Esterasen spaltbare Acylgruppe tragen.¹³³ Durch diese sogenannten „lock-in“-*cycloSal*-Pronucleotide soll eine erhöhte Konzentration der Prodrugs ermöglicht werden, indem die enzymatische Abspaltung der lipophilen Maskierung intrazellulär schnell erfolgt, während die chemische Spaltung der polarerer Intermediate der Prodrugs langsamer erfolgt

und somit eine intrazelluläre Anreicherung stattfinden kann.^{133,134} Jedoch konnte für die Prodrugs der zweiten und dritten Generation im Vergleich zur ersten Generation keine verbesserte antivirale Aktivität beobachtet werden.¹³⁵

Ein weiteres Konzept für Monophosphat-Prodrugs ist das BisAB-Konzept. Hierbei werden zwei 4-Acyloxybenzyl-Maskierungen verwendet.¹³⁶ Auf der Grundlage dieses Konzeptes wurden vielversprechende Di- und Triphosphat-Prodrug-Konzepte entwickelt, auf die im Abschnitt 2.4.2 genauer eingegangen wird.

2.5.2 Nucleosiddi- und -triphosphat-Prodrugs

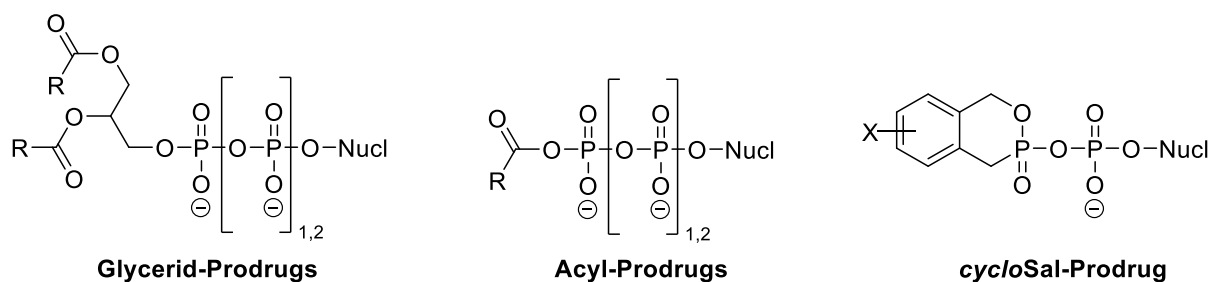


Abb. 17: Konzepte für Nucleosid-5'-di- und triphosphate.¹²¹

Bis vor wenigen Jahren wurden im Vergleich zu Nucleosidmonophosphat-Prodrugs nur wenige Prodrug-Konzepte für Nucleosid-5'-di- oder triphosphate publiziert, obwohl die Umgehung des zweiten und dritten Phosphorylierungsschrittes von großer Bedeutung sein kann. Grund hierfür ist unter anderem die instabile Phosphoranhydridbindung. Diese Bindungen sind bedingt durch die negativen Ladungen weniger anfällig für nucleophile Angriffe. Wenn die Ladungen aber lipophil maskiert werden, erfolgt eine Destabilisierung. Aus diesem Grund wurde bei den meisten bisher publizierten Konzepten für Di- und Triphosphat-Prodrugs nur die endständige Phosphatgruppe maskiert. Dadurch können die Phosphoranhydridbindungen durch die verbliebene negative Ladung etwas ihrer Stabilität im Vergleich zu unmaskierten Phosphaten beibehalten.

Ein früher von ELLIS¹³⁷ publizierter Ansatz basiert auf der Nutzung von Acyl- und Alkylglyceriden als Maskierungseinheit. Sowohl für die NDP-Glyceride als auch für die NTP-Glyceride wurde jedoch beobachtet, dass die Spaltung der Phosphoranhydridbindung schneller abläuft als die Metabolisierung der Maskierungseinheiten durch Enzyme, weshalb intrazellulär hauptsächlich die Freisetzung von NMP beobachtet wurde.^{137,138}

Bei den sogenannten Acyl-Prodrugs sollten lipophile Acylketten die Diffusion durch die Zellmembran ermöglichen. Bei diesen Verbindungen wurde die erfolgreiche Freisetzung von NDP und NTP im extrazellulären Raum beobachtet. Dennoch konnten für diese Verbindungen im Vergleich zu ihren Nucleosidanaloga keine gesteigerte Aktivität beobachtet werden. Als Grund hierfür wird ein mangelhafter Transport in die Zellen vermutet, da der Großteil der Prodrugs schon extrazellulär metabolisiert wird.¹³⁹

Das *cycloSal*-Konzept, welches bereits erfolgreich bei Nucleosidmonophosphaten eingesetzt wurde, wurde auch für die Entwicklung von Nucleosiddiphosphat-Prodrugs angewendet. Jedoch konnte hier beobachtet werden, dass bereits im Phosphatpuffer hauptsächlich Monophosphat und nicht wie gewünscht das Diphosphat freigesetzt wurde.¹⁴⁰

Die ersten erfolgreichen Prodrugkonzepte, die eine intrazelluläre Freisetzung von NDP und NTP ermöglichten, waren das *DiPPro*- bzw. *TriPPro*-Konzept, welche ebenfalls von MEIER erstmals publiziert wurden.^{141,142} Besonders auf das *TriPPro*-Konzept soll im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden.

2.6 Das *DiPPro*- und *TriPPro*-Konzept

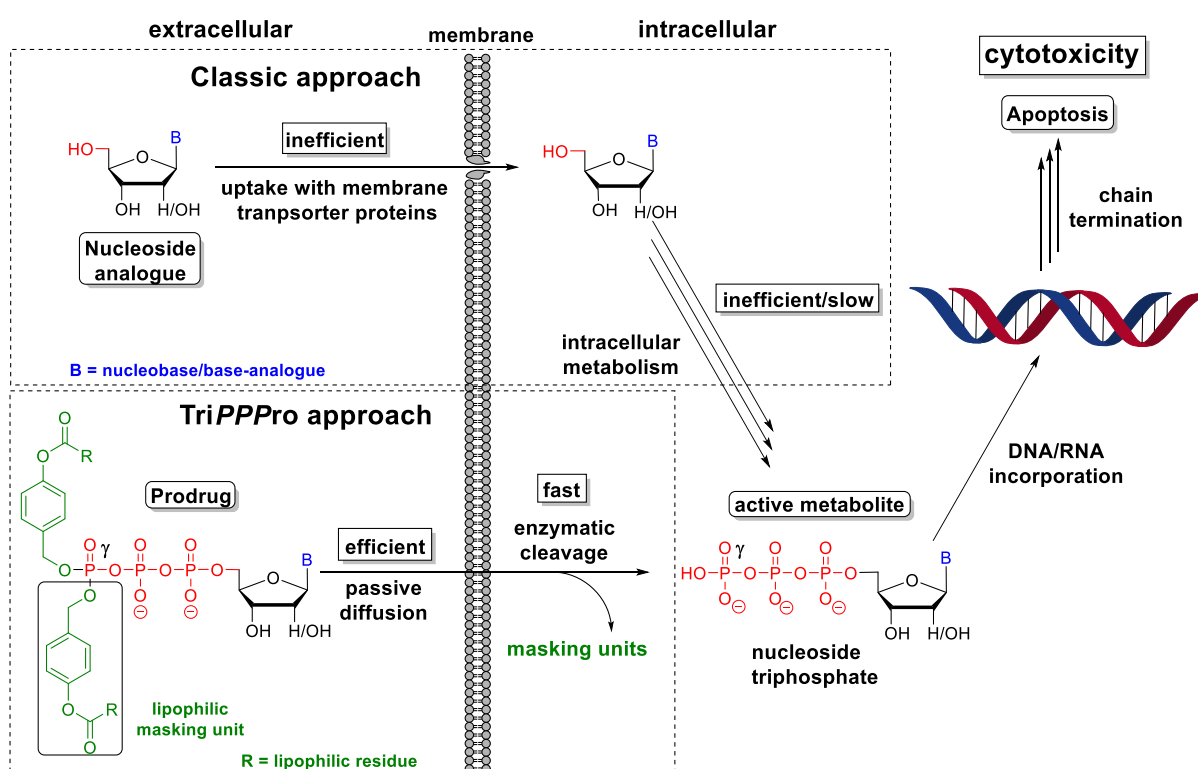


Abb. 18: Das *TriPPro*-Konzept im Vergleich zum klassischen Ansatz der direkten Verabreichung von Nucleosidanaloga.

Die ersten *DiPPro*-Verbindungen wurden erstmals von JESSEN und MEIER im Jahre 2008 publiziert.¹⁴¹ Dieses Konzept wurde dann von SCHULZ, GOLLNEST und MEIER erfolgreich auf Triphosphate angewendet und als *TriPPro*-Konzept veröffentlicht.^{142,143} Diese Verbindungen beruhen wie im Abschnitt 2.4.1 erwähnt auf dem BisAB-Konzept, welches von THOMSON für Monophosphat-Prodrugs entwickelt wurde.¹³⁶ Die negativen Ladungen der Nucleotide werden am β - bzw. γ -Phosphat mit 4-Acyloxybenzylmasken versehen, welche enzymatisch abgespalten werden können. Dadurch, dass nur die endständigen Phosphatgruppen maskiert werden, erhalten die Phosphoranhydridbindungen durch die verbleibenden negativen Ladungen eine ausreichende Stabilität gegenüber chemischer

Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen. Durch diese Maskierungen wird den TriPPPro-Verbindungen eine direkte Diffusion durch die Zellmembran ermöglicht. Innerhalb der Zelle wird die erste Maske enzymatisch schnell gespalten, wodurch ein „lock-in“-Effekt für die Metaboliten erreicht wird. Nach dem Abspalten der zweiten Maske wird direkt das Nucleosidtriphosphat freigesetzt, welches als aktiver Metabolit direkt wirken kann. Hierdurch werden alle in der Regel langsam ablaufenden Phosphorylierungsschritte sowie die Transporter abhängige Aufnahme der Wirkstoffe umgangen (Abb. 18).

Der Mechanismus der enzymatischen Abspaltung der AB-Masken ist in Abb. 19 dargestellt. Zunächst wird der phenolische Acylester der ersten Maskierungseinheit durch Esterasen hydrolysiert. Diese Spaltung führt zu einer Destabilisierung, da der Akzeptorsubstituent zu einem Donorsubstituent wird. Daraus resultiert eine 1,6-Eliminierung, bei der 4-Hydroxybenzylalkohol und das monomaskierte Triphosphat entstehen, welches bei ursprünglich doppelt maskierten TriPPPros auch als Intermediat bezeichnet wird. Die Abspaltung der zweiten AB-Maske erfolgt analog, wobei am Ende das freie Nucleosidtriphosphat freigesetzt wird.^{136,141}

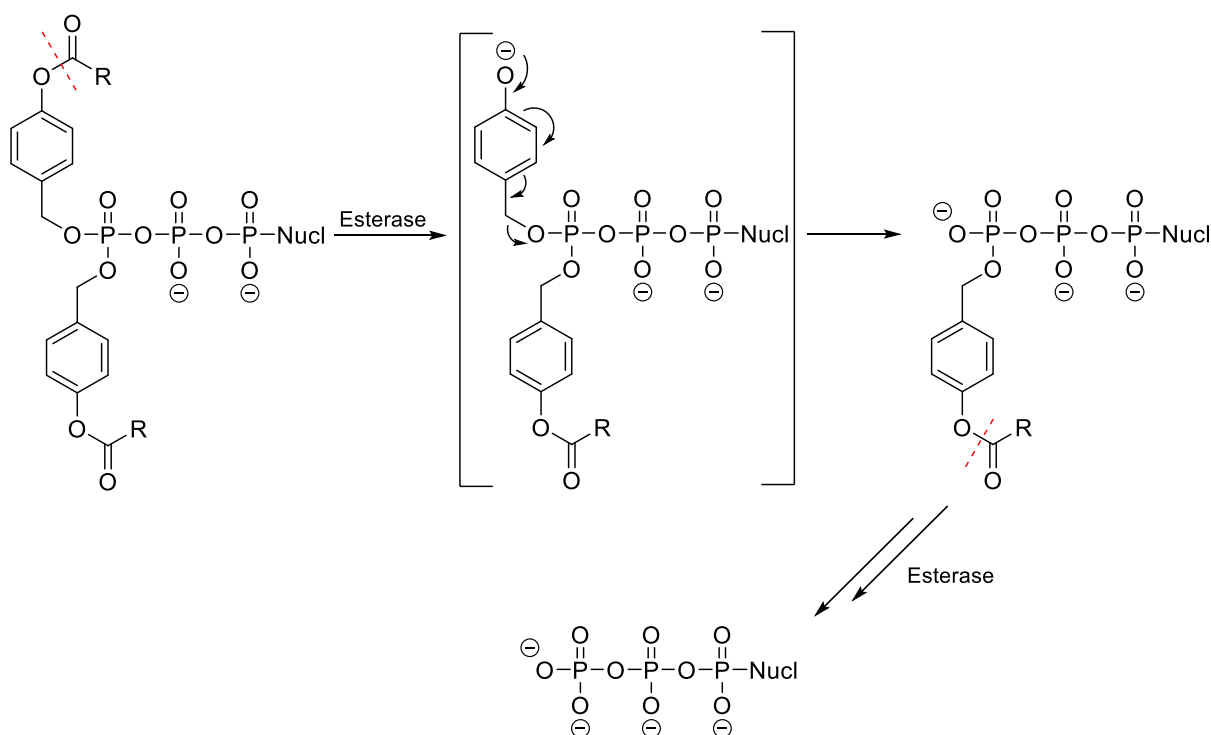


Abb. 19: Enzymatische Hydrolyse von TriPPPro-Verbindungen.^{141,144}

Neben der enzymatischen Spaltung der Maskierungseinheiten kann auch eine chemische Hydrolyse der TriPPPro-Verbindungen erfolgen.¹⁴⁵ Hierbei erfolgt die Spaltung der beiden AB-Masken über jeweils unterschiedliche Mechanismen. Aus diesem Grund läuft die Abspaltung der zweiten Maskierung deutlich langsamer ab als die der ersten. Der Mechanismus der chemischen Hydrolyse ist in Abb. 20 dargestellt. Bei der Hydrolyse der

ersten Maske findet eine nucleophile Substitution am Benzylkohlenstoffatom (A) oder die Spaltung des Acylesters mit anschließender 1,6-Eliminierung (B) statt. Die Reaktion (A) erfolgt hierbei deutlich schneller als die Spaltung des Acylesters. Neben den Spaltungen der Masken kann auch die Hydrolyse der Phosphoranhydridbindungen durch einen nucleophilen Angriff erfolgen (B), was jedoch nicht gewünscht ist, da hierbei hauptsächlich Nucleosidmonophosphat oder Nucleosiddiphosphat entstehen. Sobald die Abspaltung der ersten Maske erfolgt ist, findet diese Reaktion aber nur noch in geringem Maße statt, da durch die Spaltung der ersten Maskierung eine weitere negative Ladung gebildet wird. Diese schirmt die Anhydridbindungen und das Benzylkohlenstoffatom der zweiten AB-Maske gegen nucleophile Angriffe weitestgehend ab. Beim Intermediat hingegen findet die Spaltung hauptsächlich am Acylester statt (C), worauf selektiv das Nucleosidtriphosphat freigesetzt wird.^{143,145,146}

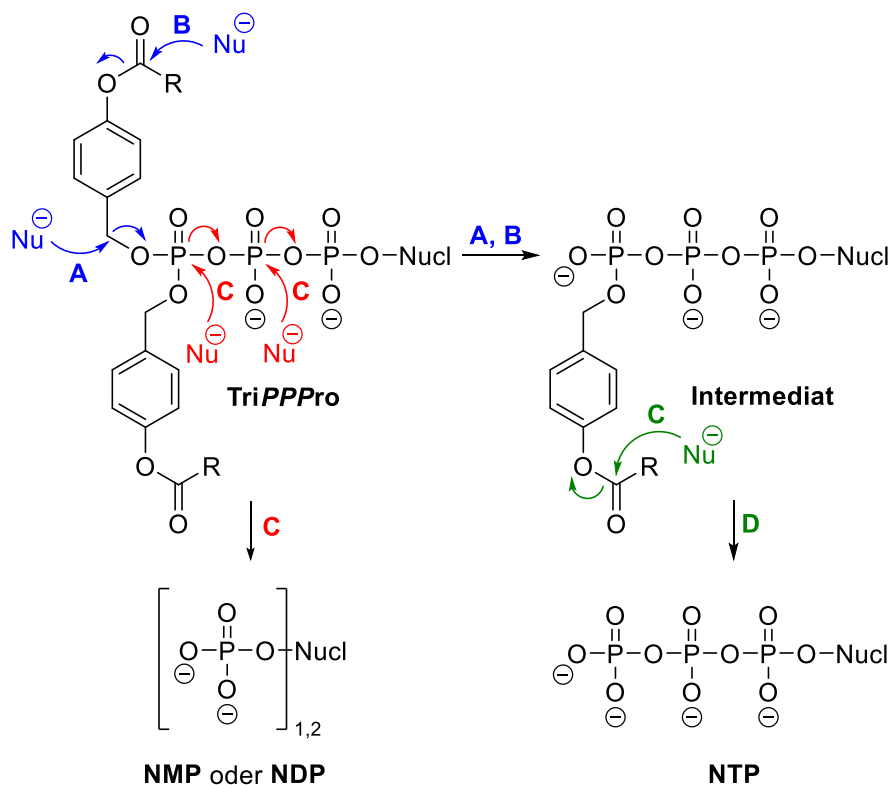


Abb. 20: Chemische Hydrolyse von TriPPPPro-Verbindungen.^{121,143}

Die enzymatische Freisetzung von Nucleosidtriphosphat aus dem Prodrug konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden.^{143,146} Hierzu wurden verschiedene TriPPPPro-Verbindungen sowohl mit Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE), als auch in Wildtyp T-Lymphozyt-CEM-Zellextrakt (CEM/0) inkubiert. Zusätzlich wurde das Verhalten der chemischen Hydrolyse in physiologischem Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*, PBS) bei einem pH-Wert von 7.4 untersucht.¹⁴³ Hierbei konnte mit Hilfe der bestimmten Hydrolysehalbwertszeiten gezeigt werden, dass die chemische Hydrolyse im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse deutlich langsamer abläuft. Dabei wurde auch festgestellt, dass

die Stabilität der Verbindungen auch mit der Länge der Acylketten korreliert. Durch höhere Kettenlängen wird die Stabilität der Esterbindungen insgesamt erhöht, jedoch findet auch gleichzeitig eine vermehrte Bildung von Mono- und Diphosphat statt.^{141–143} Diese Beobachtung legt nahe, dass durch längere Acylketten und somit einer einhergehenden erhöhten Lipophilie der Masken die negativen Ladungen der α - und β -Phosphatgruppen stärker abgeschirmt werden, was die Stabilität der Phosphoranhydridbindungen insgesamt vermindert. Des Weiteren ist es möglich, dass bei langen Kettenlängen eine Mizellenbildung der TriPPPPro-Verbindungen in wässrigem Medium stattfindet, wodurch die nach außen zeigenden Phosphoranhydridbindungen ebenfalls leichter zugänglich für nucleophile Angriffe sind.¹⁴⁶

Zusätzlich wurden zahlreiche TriPPPPro-Verbindungen mit der BisAB-Maskierung von unterschiedlichen antiviralen Nucleosidanaloga bezüglich ihrer Aktivität evaluiert. Viele dieser Verbindungen zeigen im Vergleich zu ihren Nucleosidanaloga eine deutlich erhöhte antivirale Aktivität, wodurch das TriPPPPro-Konzept und seine Wirksamkeit bedingt durch verbesserte Zellaufnahme und direkte Freisetzung der aktiven Metabolite bestätigt wird.^{146,147} Ebenso konnte indirekt die Freisetzung des NTPs bestätigt werden, da die antiviralen TriPPPPro-Verbindungen nicht nur in den CEM/0-Zellen hohe Aktivitäten zeigten, sondern auch in Thymidinkinase-defizienten CEM/TK-Zellen.^{142,146}

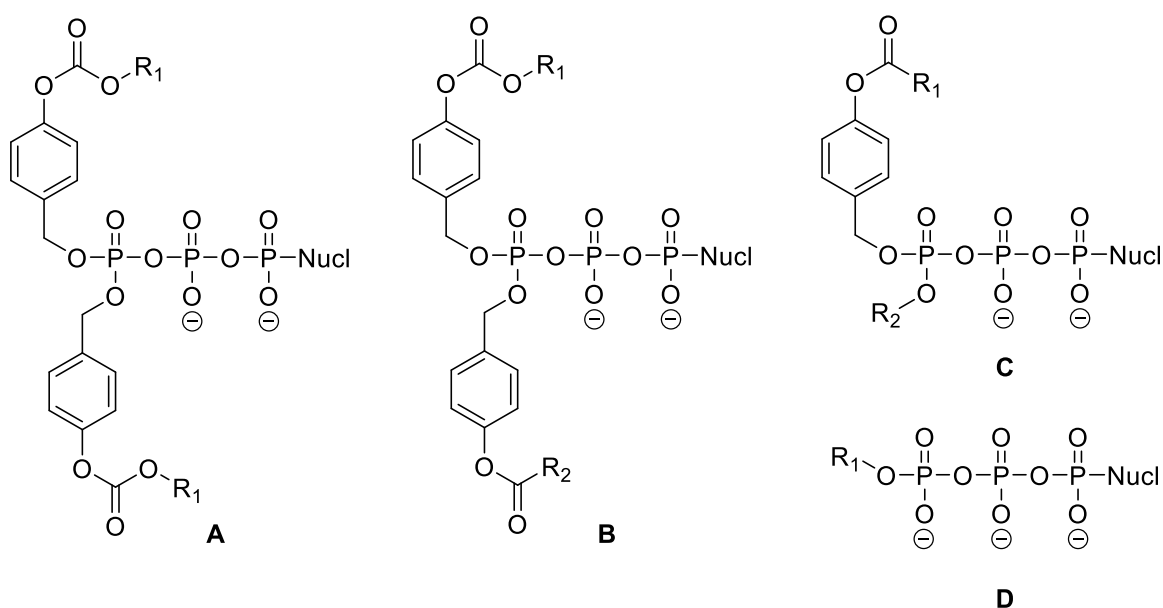


Abb. 21: Verschiedene von MEIER *et al.* entwickelte Maskierungseinheiten für TriPPPPro-Verbindungen: BisACB-TriPPPPros (A), γ -AB- γ -ACB-TriPPPPros (B), γ -AB- γ -alkyl-TriPPPPros (C), γ -alkyl-TriPPPPros (F).

Neben den AB-Maskierungseinheiten wurde in den letzten Jahren von MEIER *et al.* weitere Maskierungssysteme für die TriPPPPro-Verbindungen publiziert. Unter anderem wurden Prodrugs mit Acyloxybenzylcarbonat-Masken (ACB) entwickelt, die insgesamt eine höhere

chemische Stabilität als die AB-Maskierungen aufweisen.^{148,149} Außerdem wurde eine Reihe von γ -AB- γ -ACB- (B), γ -AB- γ -alkyl- (C) sowie γ -alkyl-TriPPPro-Verbindungen (D) entwickelt.¹⁵⁰⁻¹⁵² Die Besonderheit an γ -alkyl-TriPPPros besteht vor allem darin, dass die Alkyl-Maskierung nicht enzymatisch spaltbar ist, die γ -alkyl-Nucleotide dennoch ein Substrat für die HIV-Reverse Transkriptase (HIV-RT) darstellen. Somit kann zum einen eine Membranpermeabilität und zum anderen eine Selektivität gegenüber der HIV-RT gewährleistet werden, da die γ -alkyl-Verbindungen keine Substrate für die humanen Polymerasen darstellen.^{148,153} Basierend auf diesem Konzept wurden zahlreiche, antiviral aktive Nucleotid-Prodrugs entwickelt, bei denen durch die Wahl der einzelnen Masken und deren Kettenlänge sehr spezifische Eigenschaften erhalten werden können, was die Wirksamkeit des TriPPPro-Konzeptes und sein breites Anwendungsspektrum weiter unterstreicht.^{148-152,154}

Da die γ -alkyl-TriPPPro-Verbindungen keine Substrate für humane Polymerasen sind, eignet sich dieses Konzept jedoch nicht für die Entwicklung von antitumoral aktiven TriPPPro-Verbindungen, da die Tumorzellen für die Proliferation auf die humanen Polymerasen zurückgreifen.¹⁸ Generell ist aber davon auszugehen, dass das TriPPPro-Konzept mit BisAB- oder ACB-Maskierung, also mit enzymatisch spaltbaren Masken, die das NTP freisetzen, auch für antitumoral aktive Nucleosidanaloga anwendbar ist.

2.7 Evaluierung der Zellaufnahme mit bicyclischen Nucleosidanaloga (BNCAs)

Generell sprechen die bisherigen Ergebnisse (Abschnitt 2.6) eindeutig für den Erfolg des TriPPPro-Konzeptes. Dennoch bietet die antivirale Aktivität auch in den Thymidinkinase-defizienten Zellen nur einen indirekten Nachweis für die erfolgreiche Aufnahme der Prodrugs. Aus diesem Grund ist eine weitere Evaluation der Zellaufnahme von TriPPPro-Verbindungen notwendig.

Zellaufnahmestudien für Nucleosidanaloga sind auf verschiedene Arten möglich. Ein gut etablierter Ansatz ist die Fluoreszenzmarkierung, da die meisten Biomoleküle über keine ausgeprägte Fluoreszenz verfügen. Aus diesem Grund lassen sich die markierten Substanzen gut von natürlich vorkommenden Bestandteilen der Zelle unterscheiden. Zusätzlich kann durch Fluoreszenzmarkierung eine hohe Sensitivität erreicht werden. Im Vergleich zur UV/Vis-Spektroskopie ist beispielweise eine bis zu 1000-fache Sensitivität möglich.¹⁵⁵

Die Fluoreszenz kann als optische Anregung von Chromophoren und einer anschließenden Abgabe von Energie als Photonen beschrieben werden. Meistens wird durch eine spezifische Anregungswellenlänge der Chromophor aus einem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt, wobei die anschließende Relaxation entweder strahlungslos oder als Emission von Photonen stattfinden kann. Bei einer Relaxation mit

Photonenemission wird von Fluoreszenz gesprochen. Jedoch entspricht die Anregungswellenlänge nicht der Wellenlänge der wieder abgegebenen Strahlung, da vor der Emission ein Teil der Anregungsenergie über thermische Relaxation wieder verloren wird. Hierbei wird vom sogenannten *Stokes Shift* gesprochen. Bei organischen Molekülen liegt die Dauer dieser Prozesse in der Regel bei wenigen Nanosekunden.^{155,156}

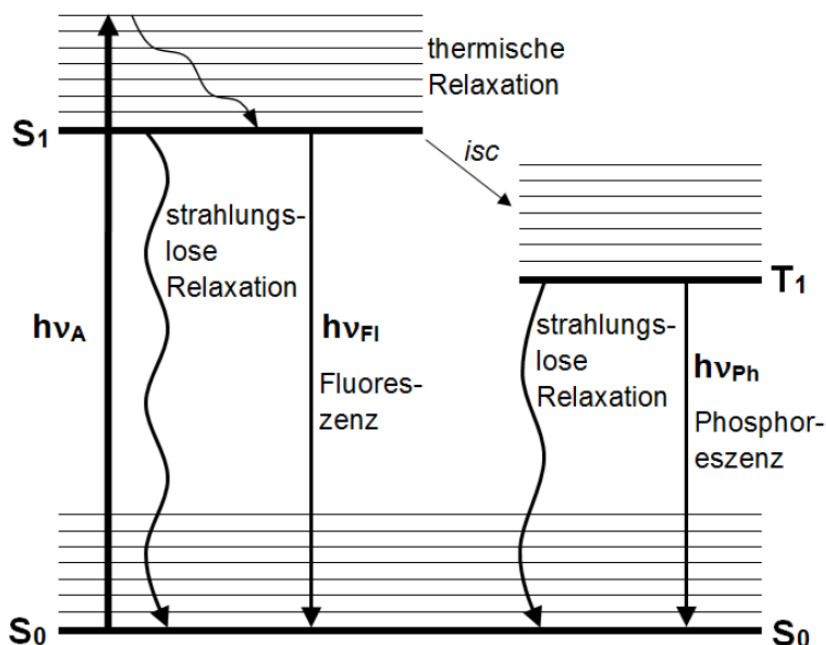


Abb. 22: Anregung und Relaxation bei Fluoreszenz dargestellt als Jablonski-Diagramm.^{121,156}

Um eine repräsentative Evaluierung von Zellaufnahmen durchführen zu können, müssen die Eigenschaften der Fluoreszenzsonden bestimmten Kriterien entsprechen. Hierbei sind Faktoren wie Lipophilie, Hydrolyseeigenschaften und Molekulargewicht entscheidend. Im Idealfall sind diese Eigenschaften mit den nicht fluoreszenzmarkierten Prodrugs sehr ähnlich. Zusätzlich sollte das Absorptionsmaximum über 300 nm liegen, sodass eine Abgrenzung von natürlich fluoreszierenden Bestandteilen der Zelle möglich ist.^{156,157}

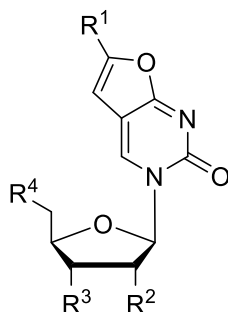


Abb. 23: Allgemeine Struktur von bicyclischen Nucleosidanaloga (BCNAs).

Als Verbindungen, die die meisten dieser Kriterien erfüllen, haben sich die bicyclischen Nucleosidanaloga (BCNAs) erwiesen. In der Arbeitsgruppe von MEIER wurden von PERTENBREITER¹⁵⁸, GOLLNEST¹⁴³ und REIMER¹²¹ bereits verschiedene BCNA-Verbindungen

dargestellt, mit denen die Zellaufnahme von Prodrugs untersucht wurden. PERTENBREITERS *cycloSal*- und *DiPPro*-Verbindungen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, bei denen zwar eine intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden konnte, aber keine Aussage über die Metabolisierung möglich war.¹⁵⁸ Die von GOLLNEST und REIMER dargestellten *TriPPro*-Verbindungen sind in Abb. 24 dargestellt.^{121,143} In Zellaufnahmestudien wurden alle Verbindungen mit T-Lymphozyten inkubiert und anschließend das Zelllysats mittels Fluoreszenzdetektion über RP-HPLC untersucht. Dabei konnte die intrazelluläre Freisetzung von Nucleosidtriphosphat beobachtet werden. Da die BCNAs keine Substrate für die intrazellulären Kinasen darstellen,¹⁵⁹ muss das Triphosphat durch direkte Freisetzung aus dem Prodrug entstanden sein. Diese Ergebnisse konnten mit den BCNA-Verbindungen von REIMER bestätigt werden.¹²¹ Zusätzlich konnte durch unterschiedliche Inkubationszeiten Aussagen über den intrazellulären Metabolismus getroffen werden. Bei den von GOLLNEST und REIMER dargestellten BCNA-*TriPPro*-Verbindungen **27-29** handelt es sich um 2',3'-Dideoxy-Verbindungen, welche sich als Sonden für antivirale Nucleosidanaloga als besonders geeignet herausgestellt haben.^{121,143}

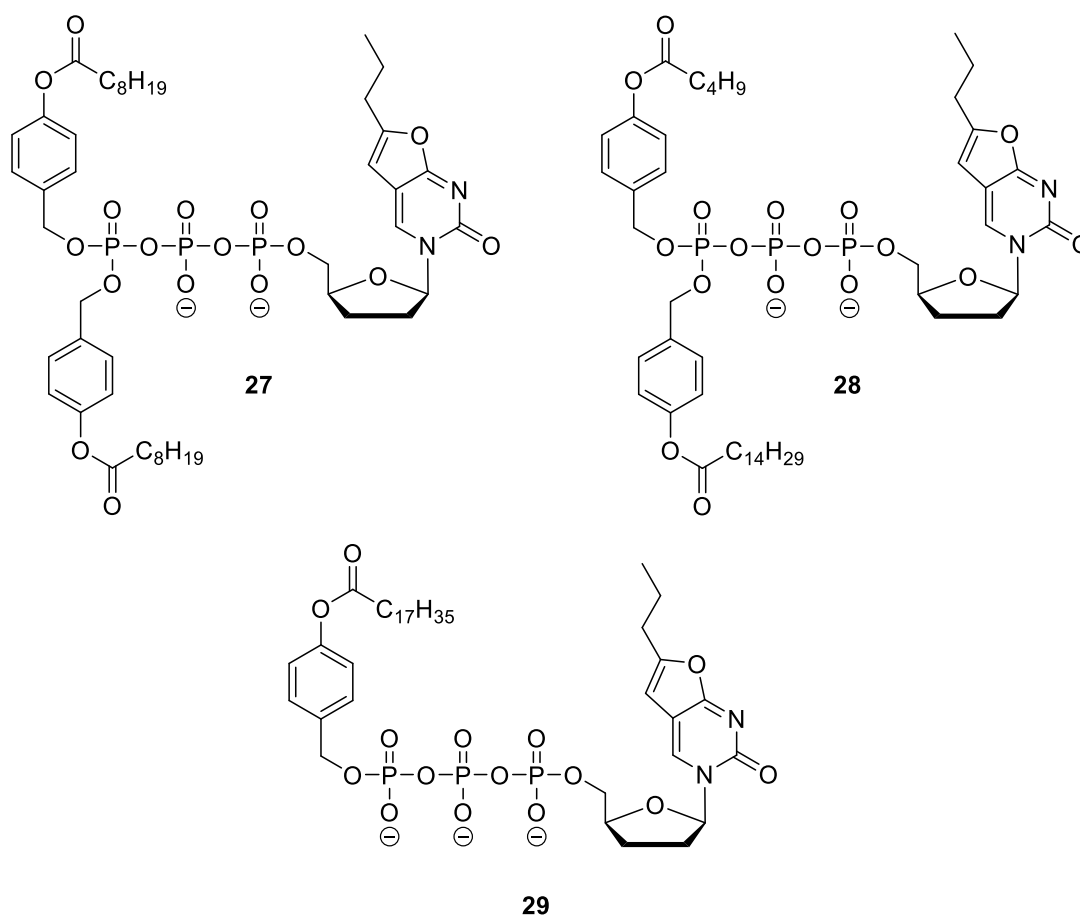


Abb. 24: Von GOLLNEST und REIMER dargestellte 2',3'-Dideoxy-BCNA-*TriPPro*-Verbindungen.^{121,143}

3 Aufgabenstellung

In den letzten Jahrzehnten haben sich Nucleosidanaloga als effektive Stoffklasse in der Chemotherapie etabliert. Trotz großer Fortschritte bleibt die Behandlung vieler Tumorerkrankungen mit diesen Medikamenten weiterhin schwierig und ist mit vielen Nebenwirkungen sowie Resistenzbildungen verbunden. Ein vielversprechendes Konzept zur Verbesserung der Aktivität und Umgehung von Resistenzen stellt für die Nucleosidanaloga das TriPPP-Pro-Konzept dar, welches in den letzten Jahren von MEIER *et al.* etabliert wurde. Dieses wurde erfolgreich auf Arzneimittel für die antivirale Therapie angewendet und sollte im Zuge dieser Arbeit auf antitumorale Wirkstoffe erweitert werden.

In vorangegangenen Arbeiten wurden bicyclische Nucleosidanaloga von GOLLNEST und REIMER dargestellt, mit denen die Zellaufnahme der TriPPP-Pro-Verbindungen in T-Lymphozyten und der TriPPP-Pro-Verbindung **27** in Tumorzellen nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund sollten zunächst die Ergebnisse von GOLLNEST bezüglich der Zellaufnahme in Krebszellen mit der Synthese und Evaluierung von BCNA-TriPPP-Pro-Verbindungen in dieser Arbeit vertieft werden. Hierzu sollten die TriPPP-Pro-Derivate **30** und **31** mit unterschiedlichen Kettenlängen der Acyloxybenzylgruppen dargestellt werden, um anschließend durch Zellaufnahmestudien die beste Maskierung zu ermitteln. Die darzustellenden BCNA-TriPPP-Pro-Verbindungen **30** und **31** sind in Abb. 25 dargestellt.

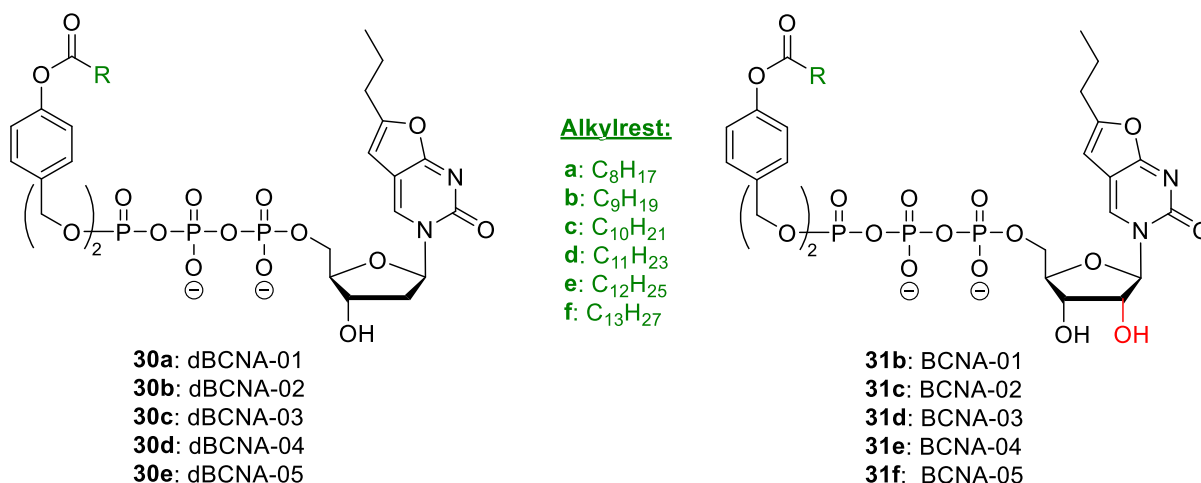


Abb. 25: Darzustellende BCNA-TriPPP-Pro-Verbindungen zur Evaluation der Zellaufnahme.

Insgesamt sollten zehn unterschiedliche BCNA-Verbindungen dargestellt werden, fünf davon als 2'-Desoxy-BCNAs **30a-e** und fünf als Ribo-BCNAs **31b-f**. Die Alkylreste der AB-Maskierungen wurden zwischen C₈ und C₁₃ gewählt, da für die Zellaufnahme in Tumorzellen und die Penetration von Tumorgewebe eine hohe Stabilität sowie Lipophilie erforderlich ist. Zusätzlich handelt es sich im Vergleich zu den von GOLLNEST und REIMER dargestellten BCNAs nicht um 2',3'-Didesoxy-Verbindungen, da in der Chemotherapie meist 2'-Desoxy- oder Ribo-Nucleosidanaloga verwendet werden. Somit sollte eine bestmögliche Imitation und Vergleichbarkeit erreicht werden. Zusätzlich sollten ausschließlich BisAB-Maskierungen

verwendet werden, da die in Abschnitt 2.6 erwähnten γ -Alkyl-Maskierungen keine geeigneten Substrateigenschaften für Tumorzellen aufweisen.

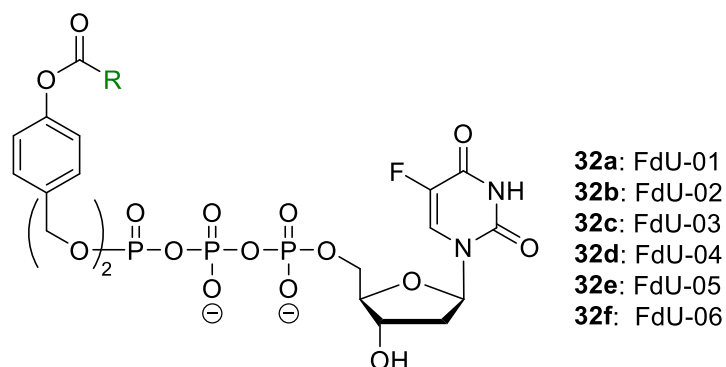


Abb. 26: Darzustellende TriPPPPro-Verbindungen **32a-f** als FdU-Derivate.

Nach der Evaluierung der besten Maskierungseinheiten für die erfolgreiche Zellaufnahme in Krebszellen, sollte eine Reihe an FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32a-f** dargestellt werden (Abb. 26). Diese Prodrugs sollten anschließend auf ihre zytostatischen Eigenschaften in Proliferationsassays an Krebszellen untersucht werden. Dadurch sollte sowohl die Beziehung zwischen Lipophilie, Zellaufnahme und Aktivität bestätigt sowie die Anwendbarkeit des TriPPPPro-Konzeptes auf antitumoral aktive Nucleosidanaloga untersucht werden.

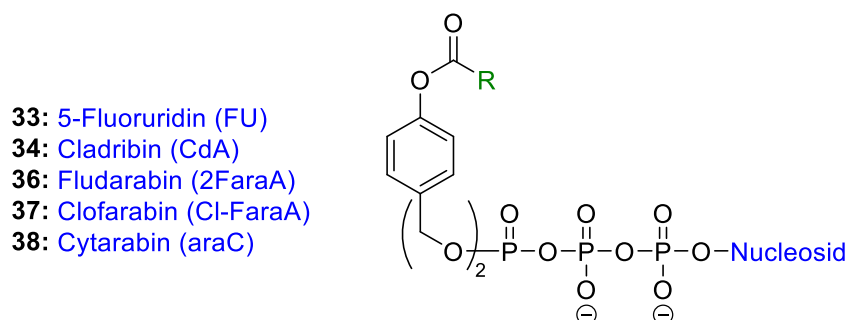


Abb. 27: Darzustellende Derivate verschiedener antitumoral aktiver Nucleosidanaloga.

Zusätzlich sollten verschiedene TriPPPPro-Verbindungen von weiteren antitumoral aktiven Nucleosidanaloga zugänglich gemacht werden. Bei diesen sollten die Maskierungen und somit lipophilen Eigenschaften für die Zellaufnahme abhängig von den zuvor erhaltenen Zellaufnahmestudien und Proliferationsassays gewählt werden.

4 Resultate und Diskussion

4.1 Synthese der Acyloxybenzyl-Maskierungen für TriPPPro-Verbindungen

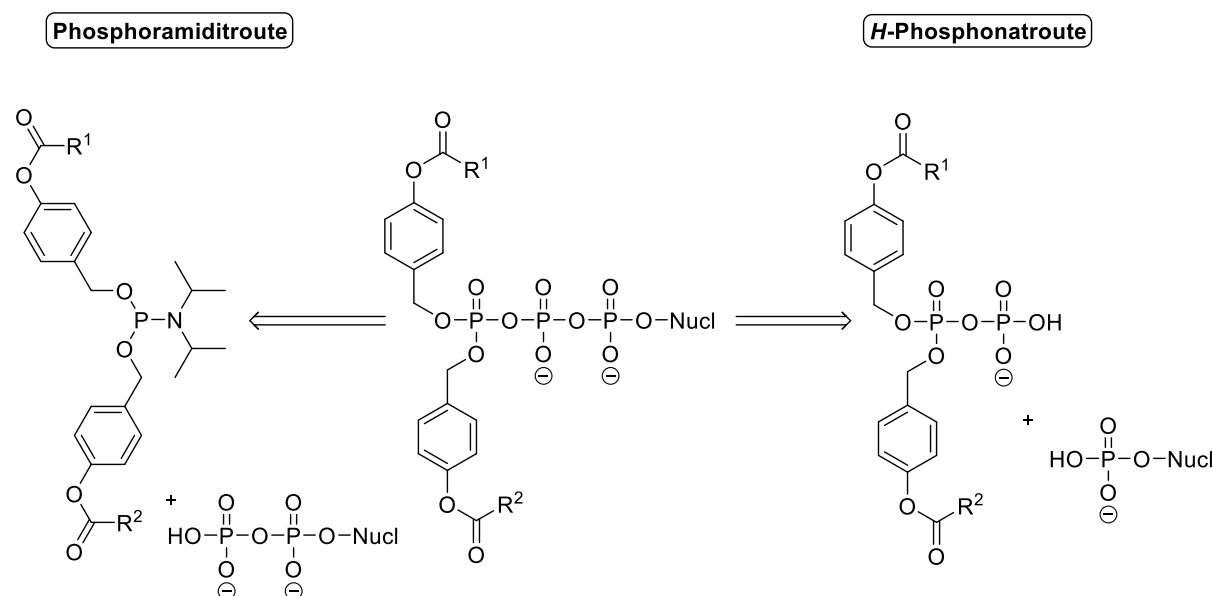


Abb. 28: Mögliche Syntheserouten für TriPPPro-Verbindungen.^{143,144}

Für die Synthese von TriPPPro-Verbindungen wurden verschiedene Routen etabliert (Abb. 28).^{143,146} Zum einen können sie über die Phosphoramiditroute dargestellt werden, bei der das Nucleosiddiphosphat mit einem maskierten Phosphoramidit gekuppelt wird. Diese Route stellt eine Erweiterung der Synthese der DiPPPro-Verbindungen dar, bei der das Nucleosidmonophosphat mit dem entsprechenden Amidit umgesetzt wurde.¹⁴⁰ Ein weiterer Weg stellt die *H*-Phosphonatroute dar, bei der das Nucleosidmonophosphat mit einem maskierten Pyrophosphat gekuppelt wird. Da die Monophosphate in der Regel einfacher zugänglich sind als die Diphosphate, hat sich die *H*-Phosphonatroute oft als vorteilhaft erwiesen, obwohl im letzten Kupplungsschritt die Ausbeuten in der Regel unterhalb der Phosphoramiditroute liegen. In dieser Arbeit sollten aus diesem Grund alle symmetrischen TriPPPro-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute dargestellt werden. Für die Synthese von asymmetrischen BisAB-TriPPPro-Verbindungen wiederum hat sich aus verschiedenen Gründen die Synthese über die Phosphoramiditroute bewährt.

4.1.1 Synthese der Bis-Acyloxybenzyl-Phosphonate

Für die Synthese von AB-maskierten TriPPPro-Verbindungen müssen zunächst die Acyloxybenzylester mit verschiedenen Kettenlängen in ausreichenden Mengen zugänglich gemacht werden. Für die symmetrisch maskierten Verbindungen hat es sich ebenfalls bewährt, die *H*-Phosphonate in größeren Mengen darzustellen, da diese lange gelagert werden können und eine hohe Stabilität aufweisen. Das Retrosyntheschema der symmetrischen *H*-Phosphonate ist in Abb. 29 dargestellt.

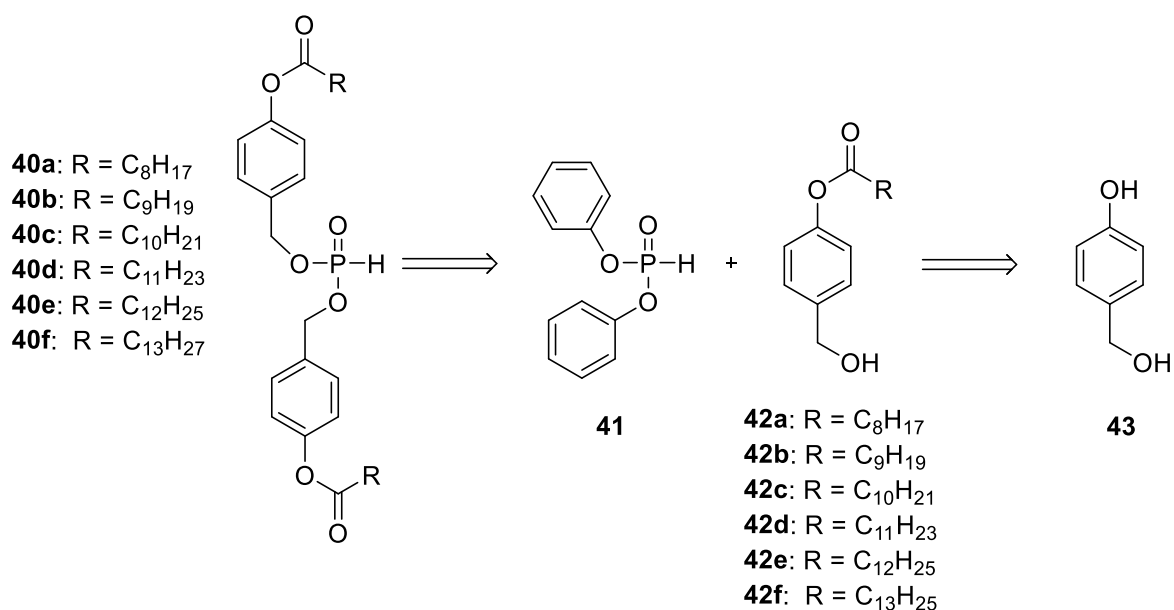


Abb. 29: Retrosyntheseschema der symmetrischen *H*-Phosphonate.¹⁴⁴

Die Synthese der Phosphonate wurde erstmals von GOLLNEST¹⁴³ etabliert und in der Gruppe von MEIER weiter verbessert. Hierbei sollen die symmetrischen *H*-Phosphonate **40a-f** durch eine Additions-Eliminierungs-Reaktion von Diphenylphosphonat (DPP) **41** mit den entsprechenden Acyloxybenzylestern **42a-f** erhalten werden. Die Verbindungen **42a-f** wiederum sollten aus einer einfachen Veresterung von 4-Hydroxybenzylalkohol **43** mit den entsprechenden Carbonsäurechloriden erhalten werden.

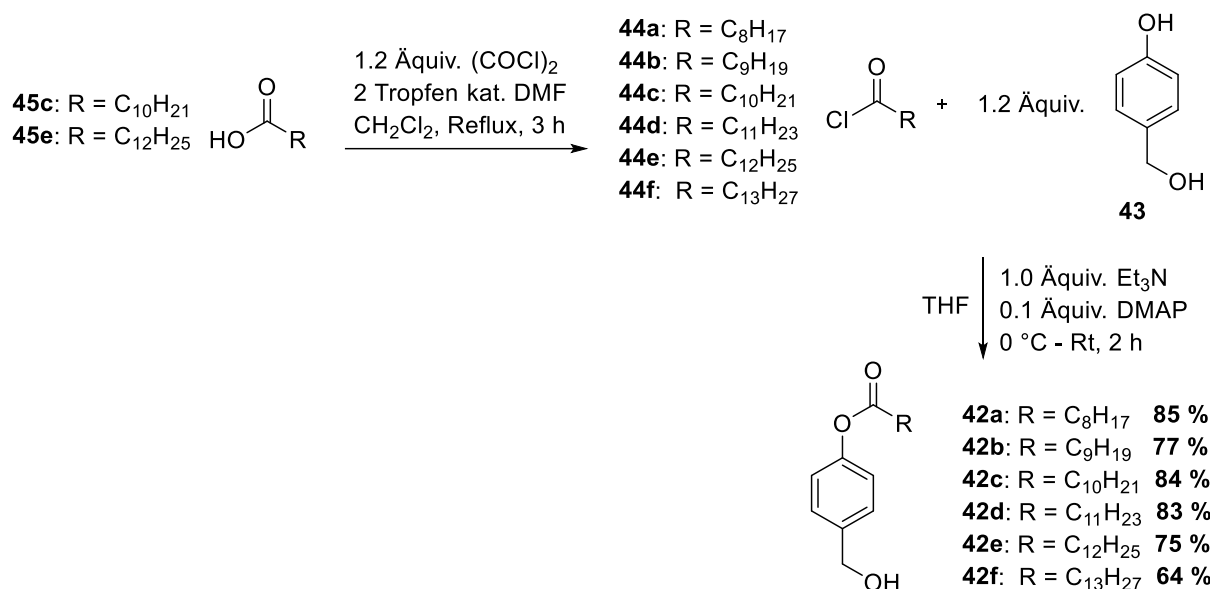


Abb. 30: Optimierte Synthesen der Acyloxybenzylester **42a-f**.

Die Reaktionsbedingungen für die Veresterung sind in Abb. 30 dargestellt. Bis auf **44c** und **44e** konnten alle Säurechloride kommerziell erhalten werden. Verbindungen **44c** und **44e** wiederum mussten zunächst aus den Carbonsäuren **45c** und **45e** dargestellt werden. Dies erfolgte mit Hilfe von Oxalylchlorid unter DMF-Katalyse. Die so erhaltenen Chloride können

nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile ohne weitere Reinigung für die nächsten Reaktionsschritte eingesetzt werden und wurden daher nicht isoliert und charakterisiert.¹⁴⁴

Die Veresterung zum Acyloxybenzylester beruht auf den Reaktionsbedingungen, die von JESSEN und SCHULZ¹⁴¹ in der Arbeitsgruppe von MEIER etabliert und von GOLLNEST¹⁴³ leicht modifiziert wurden. Unter diesen Bedingungen wurden verschiedene Nebenprodukte beobachtet, was zu mäßigen Ausbeuten führte. Daher wurde von ZHAO¹⁵³ eine weitere Anpassung vorgenommen, bei der die Äquivalente variiert wurden, sowie ein Austausch des Lösungsmittels von Tetrahydrofuran (THF) auf Dichlormethan. In seinen Arbeiten konnten dadurch verbesserte Ausbeuten erzielt werden. Die Ergebnisse von ZHAO konnten in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Vor allem für die längeren Kettenlängen erwies sich Dichlormethan als schlechtes Lösungsmittel, was sich negativ auf die Ausbeuten auswirkte. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit wieder auf THF als Lösungsmittel verwendet. Außerdem wurden die Anzahl der Äquivalente des Hydroxybenzylalkohols **43** erhöht und eine stärkere Verdünnung der Reaktionslösung gewählt, um die Wahrscheinlichkeit einer doppelten Veresterung zu minimieren. Schließlich wurden, wie von ZHAO beschrieben 0.1 Äquivalente von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) hinzugefügt, was mit dem Triethylamin zu einer stärker selektiven Veresterung an der phenolischen Position führte. Unter diesen Bedingungen war schließlich kaum noch die Bildung von Nebenprodukten zu beobachten. Mit diesen angepassten Reaktionsbedingungen konnten die Ausbeuten für alle in dieser Arbeit dargestellten Acyloxybenzylester im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten deutlich gesteigert werden.

Für die Synthese der *H*-Phosphonate **40a-f** wurden die Reaktionsbedingungen GOLLNEST¹⁴³ gewählt, die eine leicht modifizierte Synthese der von XIAO¹⁶⁰ publizierten Methode darstellt. Hierbei wurde ein Äquivalent des Acyloxybenzylesters mit 0.5 Äquivalenten von Diphenylphosphonat **41** in Pyridin umgesetzt, worauf das erhaltene Rohprodukt aus Methanol kristallisiert wurde. Hierbei variierten die Ausbeuten in eigenen Arbeiten zwischen 35 % bis 60 %. Durch eine Erhöhung der Äquivalente des Acyloxybenzylesters **42** auf 1.1 Äquivalente und sorgfältiges koevaprieren des Rohproduktes mit Toluol und Dichlormethan konnten in dieser Arbeit die Ausbeuten auf 50 % bis 85 % gesteigert werden. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 31 dargestellt. Vor allem für die langkettigen BisAB-*H*-Phosphonate konnten sehr gute Ausbeuten erzielt werden. Insgesamt konnten alle benötigten symmetrischen *H*-Phosphonate **40a-f** in guten Ausbeuten und hoher Reinheit erhalten werden.

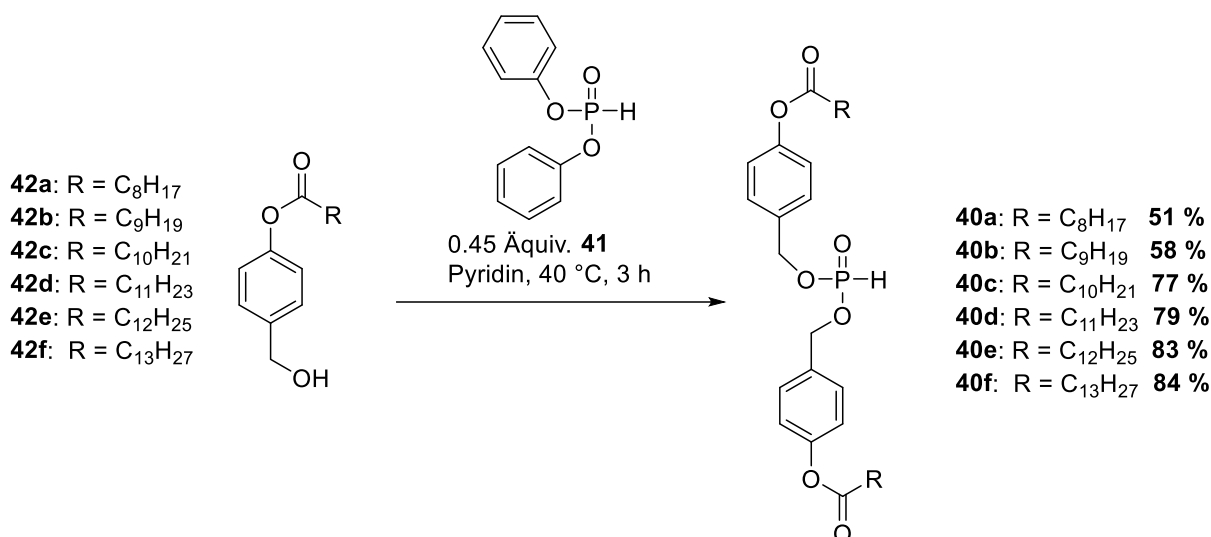


Abb. 31: Optimierte Synthesen der symmetrischen *H*-Phosphonate **40a-f**.

4.1.2 Synthese der symmetrischen Bis-Acyloxybenzyl-Pyrophosphate

Die Synthese der symmetrisch maskierten Pyrophosphate **46a-f** erfolgte nach der etablierten Syntheseroute von GOLLNEST.¹⁴³ Hierbei werden die maskierten *H*-Phosphonate mit Tetra-*n*-butylammonium-Phosphat **47** zur Reaktion gebracht. Die allgemeinen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 32 dargestellt.

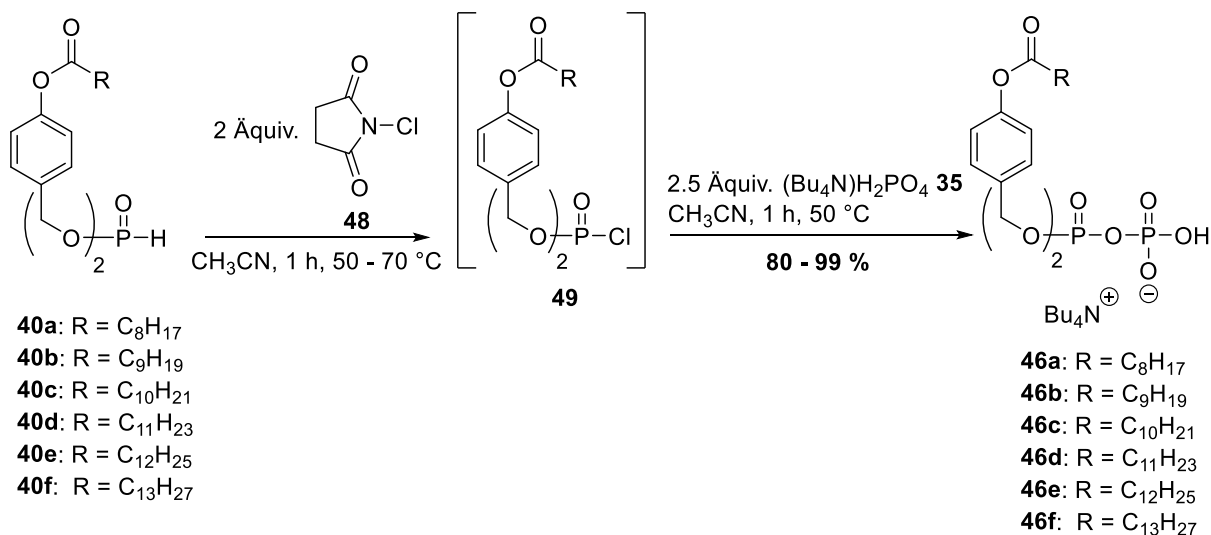


Abb. 32: Synthese der maskierten Pyrophosphate **46a-f**.¹⁴⁴

Der erste Reaktionsschritt ist die Umsetzung des *H*-Phosphonats mit *N*-Chlorsuccinimid **48** (NCS). Dadurch wird die Verbindung durch eine oxidative Chlorierung in das aktivierte Intermediat **49** überführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die von GOLLNEST verwendete Temperatur von 50 °C nicht ausreichte, um die lipophileren *H*-Phosphonate in Lösung zu bringen, daher wurde bei den Phosphonaten **27c-f** eine Reaktionstemperatur von 60 °C bzw.

70 °C gewählt. Dadurch konnte eine ausreichende Löslichkeit und somit Aktivierung gewährleistet werden. Anschließend erfolgte die Zugabe des Tetra-*n*-butylammoniumphosphats **47**, welches nucleophil an der aktivierten Spezies angreift und unter Eliminierung eines Chloridions das gewünschte Pyrophosphat bildet. Die so gebildeten Verbindungen **46a-f** sind sehr hydrolyseempfindlich,¹⁴³ weshalb eine zügige Reinigung der Substanzen aus der Reaktionslösung notwendig war. Hierzu wurde bei der wässrigen Aufarbeitung, bei der das überschüssige NCS **48** und Phosphatsalz entfernt werden, Zentrifugation zur schnelleren Phasentrennung eingesetzt. Da die Pyrophosphate trotz Lagerung unter Stickstoff und gekühlten Bedingungen nur bedingt stabil sind, wurden sie jeweils frisch für die Synthese der entsprechenden TriPPP_{ro}-Verbindungen hergestellt und spätestens zwei Tage später für die nächste Reaktion eingesetzt. Insgesamt konnten die Pyrophosphate in guten Ausbeuten zwischen 80 % und 99 % erhalten werden, was den Ausbeuten der Literatur entspricht.^{143,149} Es war jedoch auch zu beobachten, dass bei den lipophileren Pyrophosphaten verglichen mit den hydrophileren Verbindungen die Ausbeuten meist etwas geringer ausfielen. Dies könnte zum einen durch die geringere Löslichkeit der lipophilen Pyrophosphate zurückzuführen sein. Außerdem ist es möglich, dass die Pyrophosphate beim Waschen mit Puffer und Wasser Mizellen bilden, wodurch sie wieder in die wässrige Phase übergehen würden. Generell wirken sich diese Effekte negativ auf die Ausbeuten der Pyrophosphate aus, insgesamt sind aber alle Ausbeuten immer noch in einem sehr guten Bereich und die Edukte leicht in ausreichenden Mengen zugänglich, weshalb auf eine weitere Optimierung der Reinigungsprozedur verzichtet werden kann.

4.2 Zellaufnahmestudien mit BCNA-TriPPPPro-Verbindungen

Bicyclische Nucleosidanaloga (BCNAs) haben sich bereits bei der Verwendung zur Untersuchung der Zellaufnahme und Metabolisierung von Nucleotid-Prodrugs bewährt. Zum einen sind sie bedingt durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften besonders gut als Sonde zwischen den übrigen Zellbestandteilen detektierbar, zum anderen stellen sie keine Substrate für die zellulären Kinasen dar. Dadurch kann bei der Detektion von phosphorylierten BCNA-Verbindungen davon ausgegangen werden, dass diese durch intrazelluläre Metabolisierung freigesetzt wurden.

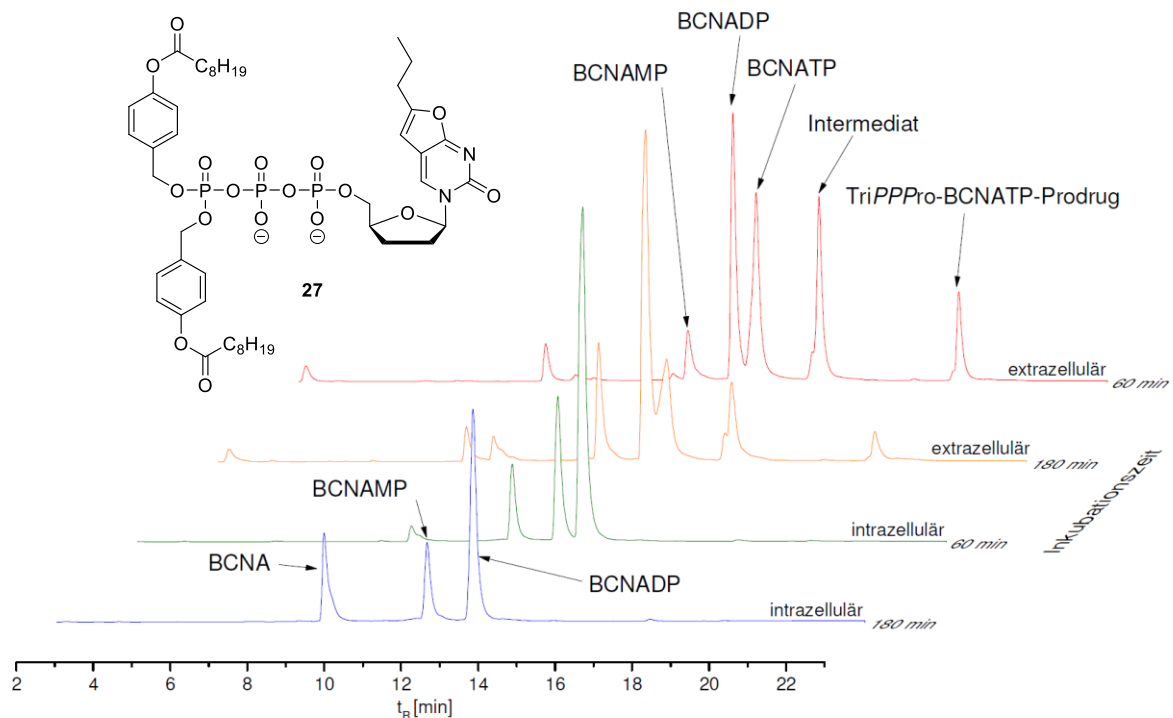


Abb. 33: Ergebnisse der von GOLLNEST durchgeführten Zellaufnahmestudien von BCNA-TriPPPPro **27** in CEM-Zellextrakt.¹⁴³

In Zellaufnahmestudien von GOLLNEST mit Verbindung **27** in CEM-Zellextrakten konnte erstmalig die Zellaufnahme der TriPPPPro-Verbindungen und die intrazelluläre Freisetzung des Nucleosidtriphosphats nachgewiesen werden (Abb. 33).¹⁴³ Da bei diesen Studien lediglich mit einer Verbindung gearbeitet wurde, konnten jedoch keine Rückschlüsse auf die Auswirkungen unterschiedlicher Maskierungseinheiten auf die Zellaufnahme von TriPPPPro-Verbindungen gezogen werden. Zusätzlich lässt sich durch diese Studien erkennen, dass das Prodrug **27** extrazellulär sehr schnell zersetzt wird, was von Gollnest auf das RPMI-Medium und das Fötale Kälberserum (FCS) als Zusatz zurückgeführt wurde.¹⁴³ Dies ist vor allem bei den längeren Inkubationszeiten zu beobachten.

Bei den von REIMER durchgeführten Zellaufnahmestudien mit Verbindung **28** und **29** in CEM-Zellextrakt konnte ebenso eine Freisetzung des Nucleosidtriphosphats beobachtet werden. Jedoch wurden hier die asymmetrisch maskierte TriPPPPro-Verbindung **28** und die

monomaskierte TriPPPPro-Verbindung **29** verwendet. Aus diesem Grund lässt sich aus diesen Studien ebenfalls keine ausreichende Beziehung zwischen Lipophilie der Prodrugs und Zellaufnahme für symmetrisch maskierte BisAB-TriPPPPro-Verbindungen herstellen. Des Weiteren wurden diese Zellaufnahmen in CEM/0-Zellextrakt durchgeführt, wodurch eine Übertragung auf antitumorale Nucleoside nur bedingt möglich ist. Aus diesem Grund sollten die BCNA-Verbindungen **30a-e** und **31b-f** dargestellt werden (Abb. 34). Durch die systematische Verwendung von unterschiedlichen Kettenlängen zwischen C₈ und C₁₃ der AB-Maskierungen sowohl für die 2'-Desoxy- als auch für Ribo-BCNA-Verbindungen bei der Zellaufnahme in unterschiedlichen Krebszellen sollte erstmals ein Zusammenhang zwischen Lipophilie und Zellaufnahme der TriPPPPro-Prodrugs hergestellt werden. Auf die Synthese der Verbindungen sowie die anschließend durchgeführten Zellaufnahmestudien wird in den nächsten Abschnitten eingegangen.

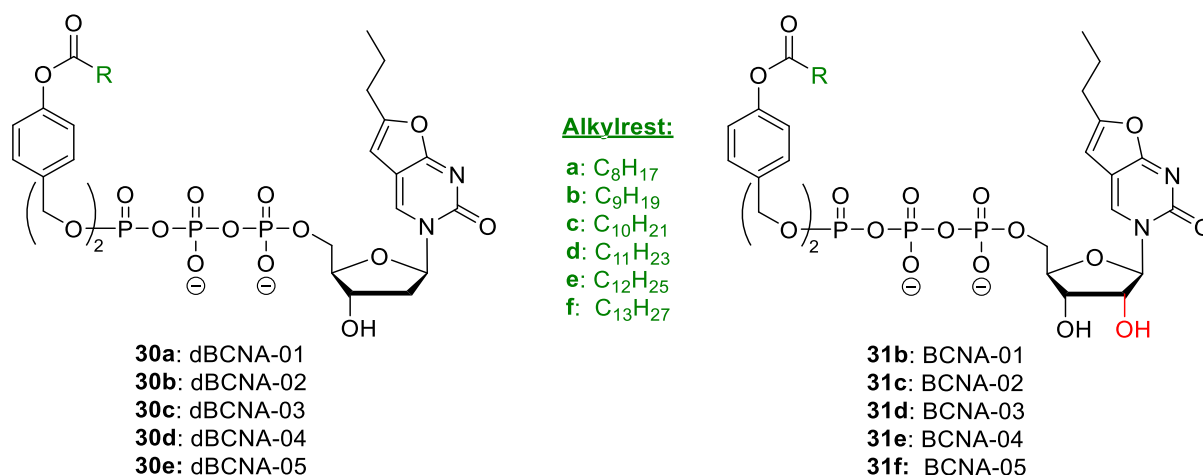


Abb. 34: 2'-Desoxy-BCNAs **30a-e** (dBCNAs-01 bis -05) sowie die Ribo-BCNAs **31b-f** (BCNA-01 bis -05) für Zellaufnahmestudien an Krebszellen.

Von GOLLNEST wurde bei der Synthese von BCNA-TriPPPPro-Verbindung **27** über die Phosphoramiditroute eine schlechte Zugänglichkeit des BCNA-Diphosphats beschrieben,¹⁴³ weshalb in den Arbeiten von REIMER¹²¹ und in eigenen vorangegangenen Arbeiten¹⁴⁴ die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute dargestellt wurden. Diese Synthesen konnten insgesamt bessere Ausbeuten und eine einfachere Handhabung der einzelnen Reinigungsschritte liefern. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **30a-e** und **31b-f** ebenfalls über die *H*-Phosphonatroute dargestellt werden.

4.2.1 Synthese der BCNA-5'-monophosphate

Für die Synthese der TriPPPPro-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute muss zunächst das 5'-Monophosphat zugänglich gemacht werden. Für die Synthese von Nucleosid-5'-monophosphaten haben sich in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Methoden zur

selektiven 5'-Phosphorylierung etabliert. Die bekanntesten Methoden stellen hierbei die Phosphorylierung nach SOWA&OUCHI¹⁶¹ oder nach YOSHIKAWA¹⁶² dar. Bei diesen Methoden erfolgt die Phosphorylierung ohne Schutzgruppenchemie direkt mit Phosphorylchlorid. In vorangegangenen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die glycosidische Bindung der BCNAs unter sauren Bedingungen leicht gespalten wird.¹⁶³ Die Didesoxy-BCNA-monophosphate wurden von GOLLNEST über die *cycloSal*-Technik dargestellt.¹⁴³ Diese Methode wurde von REIMER ebenfalls in ihren Arbeiten verwendet, jedoch wurden von Beiden moderate Ausbeuten und signifikante Mengen an Nebenprodukt erhalten. Für die Synthese von Didesoxy-BCNAs wurde von REIMER schließlich die Phosphorylierung über ein Phosphoramidit und anschließender Oxidation etabliert, wobei im Vergleich zur *cycloSal*-Methode gute Ausbeuten erhalten wurden. Aus diesem Grund wurde in vorherigen Arbeiten für die Synthese des 2'-Desoxy-BCNA-monophosphats **50** ebenfalls der Ansatz über die Amiditchemie erprobt, wobei gute Resultate erzielt wurden.¹⁴⁴ Deshalb wurden in dieser Arbeit die BCNA-Monophosphate ausschließlich über diese Syntheseroute dargestellt. Ein Retrosyntheschema ist in Abb. 35 dargestellt.

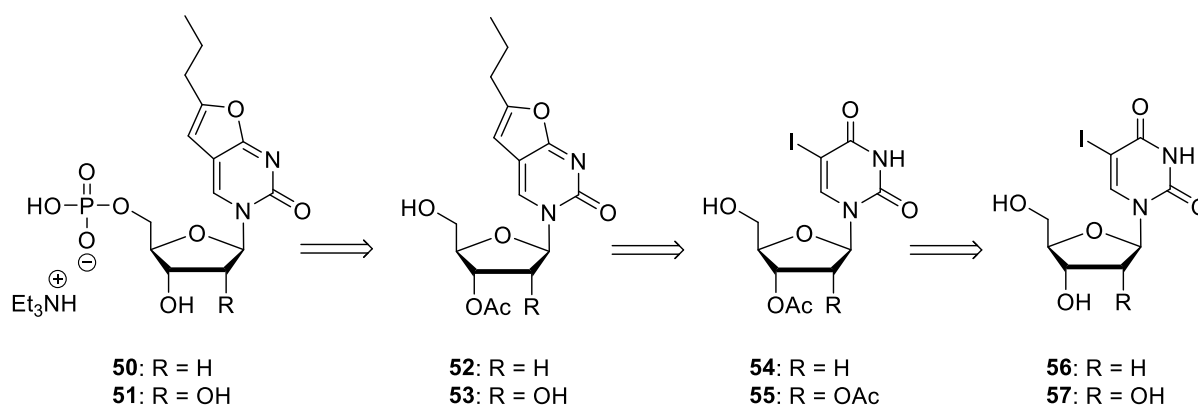


Abb. 35: Retrosyntheschema für BCNA-5'-Monophosphate **50** und **51**.

Die Monophosphate **50** und **51** sollten über eine Phosphorylierung mit einem Amiditreagenz und anschließender Oxidation ausgehend von den selektiv an 3'- bzw. 2'- und 3'-acetylierten BCNAs **52** und **53** erhalten werden. Die Synthese der BCNAs sollte in einer angepassten Syntheseroute für 2',3'-Didesoxy-BCNAs von PERTENBREITER¹⁶³ und REIMER¹²¹ erfolgen, welche in vorangegangenen Arbeiten etabliert wurde. Hierzu sollen die Verbindungen **52** und **53** ausgehend von den Verbindungen **54** und **55** durch eine Sonogashira-Reaktion und anschließender 5-*endo-dig*-Cyclisierung in einer *one-pot* Reaktion basierend auf den Arbeiten von MCGUIGAN¹⁵⁹ dargestellt werden. Um Nebenreaktionen an der 3'-Hydroxyfunktion bei der Phosphorylierung im letzten Schritt zu vermeiden, sollten zuvor die Nucleoside **54** und **55** durch eine selektive Schützung an der OH-Gruppe erhalten werden. Dies sollte durch eine orthogonale Schutzgruppenstrategie der 5'-Hydroxygruppe mit einer *tert*-Butyldimethylsilyl-Funktion (TBDMS) und Schützung der 2'- und 3'-Hydroxygruppe mit

einer Acetylfunktion an den kommerziell erhältlichen 5-Iod-2'-desoxyuridin **56** und 5-Ioduridin **57** erfolgen, wobei anschließend die TBDMS-Gruppe selektiv wieder gespalten wurde.

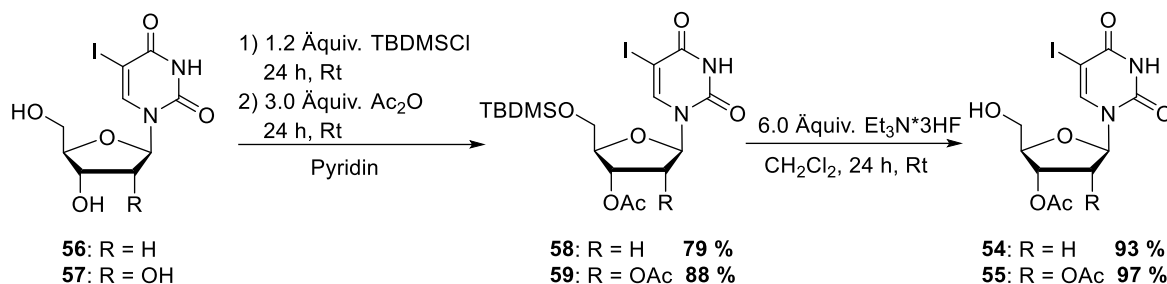


Abb. 36: Synthese der selektiv geschützten Nucleoside **54** und **55** über eine orthogonale Schutzgruppenstrategie.

Die Einführung der orthogonalen Schutzgruppen erfolgte nach dem typischen Protokoll^{121,143} zur Einführung der gewählten Schutzgruppen, welche auf die Eigenschaften des Nucleosids für diese Arbeit abgestimmt wurden. Zunächst wurden in einem Reaktionsschritt die TBDMS-Schutzgruppe an 5'-Position mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und die Acetyl-Schutzgruppen an der 3'-Position bzw. an der 2'- und 3'-Position mittels Essigsäureanhydrid in Pyridin eingeführt. Für beide Reaktionen konnten die gewünschten Nucleoside **58** und **59** in guten Ausbeuten von 79 % und 88 % nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. Zur selektiven Spaltung der TBDMS-Schutzgruppe wurden die Nucleoside **58** und **59** mit einem Fluoridionendonator umgesetzt. In der gängigen Literatur sowie in den Desilylierungen von GOLLNEST¹⁴³ kommt in der Regel Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) zum Einsatz. Für das Nucleosid **58** konnte jedoch dünnschichtchromatographisch eine vollständige Zersetzung des Eduktes beobachtet werden. Daher wurde die Entschützung mit Triethylammonium-trihydrofluorid durchgeführt, wobei für beide Nucleoside das gewünschte Produkt **54** und **55** nach einfacher säulenchromatographischer Reinigung in sehr guten Ausbeuten erhalten werden konnte.

Die *one-pot*-Synthese der BCNAs **52** und **53** erfolgte analog zu den von REIMER¹²¹ und GOLLNEST¹⁴³ beschriebenen Reaktionsbedingungen für die Synthese der Didesoxy-BCNAs. Zunächst wird das iodierter Nucleosid mit Pent-1-in unter Palladium-Katalyse in einer Sonogashira-Reaktion zusammen mit Kupferiodid und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) umgesetzt. Anschließend wurde direkt eine weitere Menge Kupferiodid und Triethylamin als Base zur Reaktion gegeben, um eine nach BALDWIN¹⁶⁴ klassifizierte 5-*endo-dig*-Cyclisierung durchzuführen. Die Zahl beschreibt die Größe des Ringes, während das folgende „*endo*“ oder „*exo*“ beschreibt, ob die bei der Reaktion gesplattene Bindung exocyclisch oder endocyclisch bezüglich des kleinsten entstandenen Ringes liegt. Das „*dig*“ wiederum beschreibt die Hybridisierung des Kohlenstoffatoms, welches am Ringschluss beteiligt ist. Für beide Nucleoside **54** und **55** konnte nach 24 Stunden ein vollständiger Umsatz sowohl für die Kreuzkupplung als auch für die Cyclisierung beobachtet werden. Hierbei wurde in

vorangegangenen Arbeiten festgestellt, dass für die Reinigung des 2'-Desoxy-BCNAs **52** mehrere säulenchromatographische Reinigungsschritte notwendig waren, um das Produkt in ausreichender Reinheit erhalten zu können. Dieses Verhalten konnte ebenfalls für das BCNA **53** beobachtet werden. Dennoch konnten beide BCNA-Verbindungen insgesamt in guten Ausbeuten von 87 % und 85 % in hoher Reinheit isoliert werden.

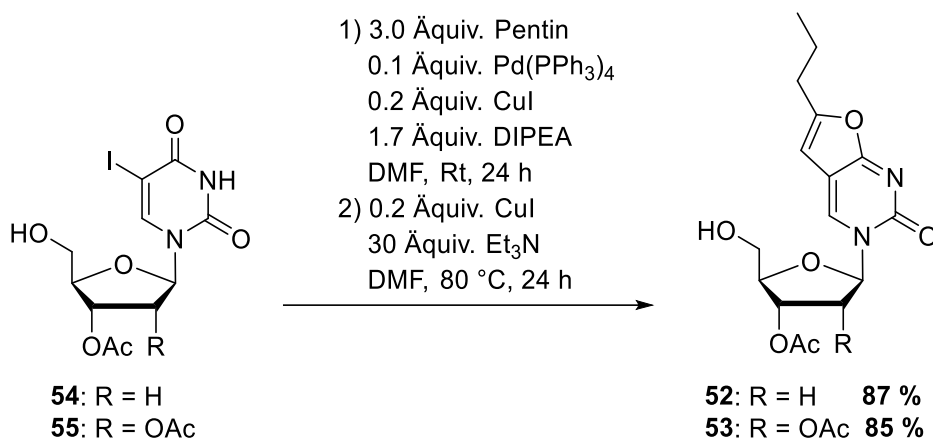


Abb. 37: Synthese der selektiv geschützten BCNAs **52** und **53** mittels Sonogashira-Reaktion.

Nach der erfolgreichen selektiven Schützung der 3'-Hydroxyfunktion sollte die Phosphorylierung an der 5'-Position erfolgen. Dies sollte wie beschrieben mit Hilfe von Amiditreagenzien durchgeführt werden, die zunächst mit den geeigneten Schutzgruppen dargestellt werden mussten. Hierfür hat sich, das in vorangegangenen Arbeiten erprobte, Bis(fluorenylmethyl)-phosphoramidit **60** (Fm-Amidit) bewährt. Die Fm-Schutzgruppen finden vor allem in der Peptidsynthese Verwendung, wobei der Abspaltungsmechanismus unter basischen Bedingungen nach einer E1_{cb}-Eliminierung erfolgt.¹⁶⁵ Dadurch wird eine gleichzeitige Abspaltung der Fm-Gruppen mit den Acetylschutzgruppen ermöglicht, da diese ebenfalls unter basischen Bedingungen gespalten werden. Der allgemeine Mechanismus für ein Fm-geschütztes Nucleosidmonophosphat ist in Abb. 38 dargestellt.

Als Erstes wird das acide Proton an der Fm-Einheit abstrahiert, wodurch über eine E1_{cb}-Eliminierung das Dibenzofulven **61** und das ungeschützte Phosphat freigesetzt werden.¹⁶⁵ Die Abspaltung der zweiten Schutzgruppe am Phosphat läuft analog, jedoch findet diese wesentlich langsamer im Vergleich zur Ersten statt. Grund hierfür ist die durch die erste Abspaltung entstandene negative Ladung an der Phosphateinheit, welche die Abstraktion des Protons an der zweiten Schutzgruppe durch eine Base deutlich erschwert. Sowohl in vorangegangenen als auch in eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung der ersten Fm-Gruppe innerhalb von wenigen Minuten erfolgt, während für die zweite Schutzgruppe Reaktionszeiten von mindestens 24 Stunden benötigt wurden.^{121,144}

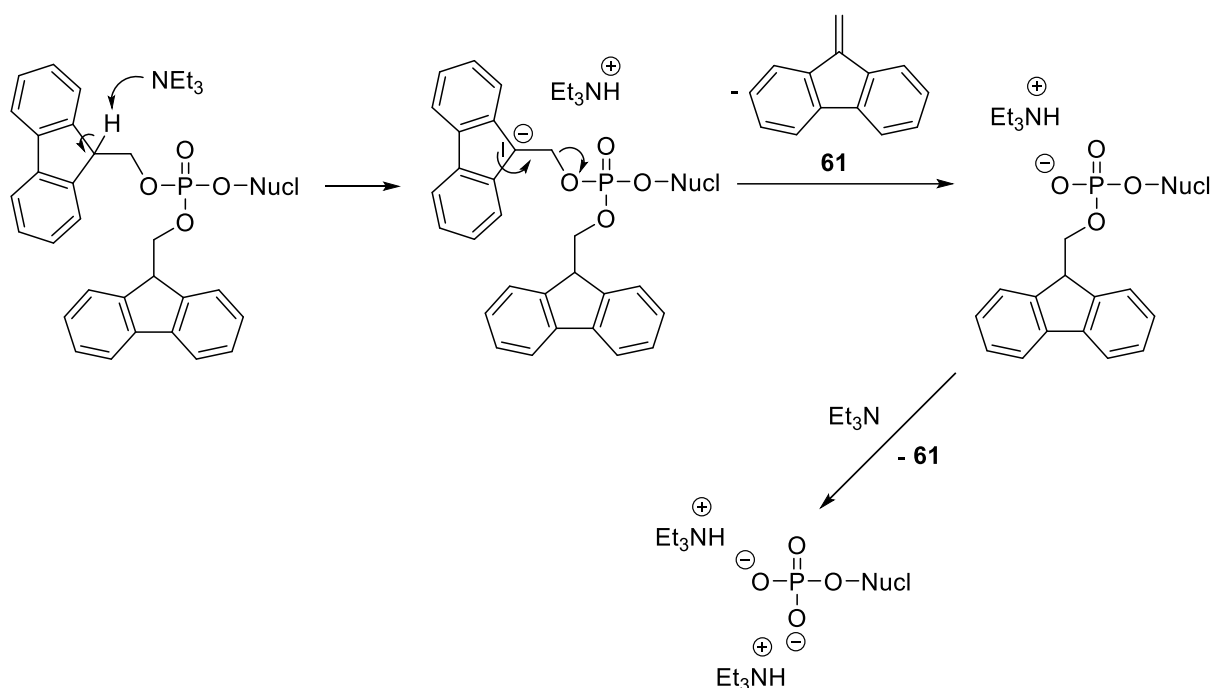


Abb. 38: Mechanismus der Abspaltung von Fm-Schutzgruppen an Phosphaten.^{144,165}

Um das Bis(fluorenylmethyl)-phosphoramidit **60** darzustellen, musste zunächst das Dichlor-*N,N*-diisopropyl-dichlorophosphoramidit **62** synthetisiert werden, was nach einer in der Arbeitsgruppe von MEIER etablierten und häufig angewendeten Synthese erfolgte. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 39 dargestellt. Zunächst wird Phosphortrichlorid **63** mit Diisopropylamin **64** umgesetzt. Hierbei ist es wichtig, unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluss zu arbeiten, da das Produkt **62** sowie das Edukt **63** hydrolyse- und oxidationsempfindlich sind. Für die Reinigung wurde deshalb nur eine Filtration durchgeführt und auf weitere Schritte verzichtet. Das Produkt **62** wurde so in einer Ausbeute von 65 % erhalten. Im nächsten Schritt wurde das Amidit **62** mit 9-Fluorenylmethanol (Fm-OH) **65** und Triethylamin umgesetzt. Nach Waschen der Reaktionslösung mit einem PBS-Puffer (pH = 7.3) und säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Amidit **60** in guter Ausbeute und sehr hoher Reinheit gewonnen werden. Wichtig hierbei ist jedoch, dass die Reinigungsschritte zügig und die Chromatographie mit einem leichten Zusatz von Triethylamin durchgeführt werden muss, da Amidite unter den leicht sauren Bedingungen der chromatographischen Reinigung an Kieselgel nicht stabil sind. Ein zu hoher Zusatz an Base würde jedoch eine Spaltung der Fm-Gruppen zur Folge haben. REIMER¹²¹ schlug für die Reinigung des Amidits **60** vor, vollständig auf die Chromatographie zu verzichten, da hierbei wesentliche Ausbeuteverluste hingenommen werden mussten und auch nach dem Waschen mit dem PBS-Puffer bereits eine ausreichende Reinheit vorlag. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, stattdessen wurde beobachtet, dass durch eine automatisierte Chromatographie und einem Lösungsmittel mit hoher Elutionskraft nur geringe

Ausbeuteverluste entstehen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass beim Amidit **60**, welches nur durch Waschen mit dem Puffer gereinigt wurde, die Reinheit wesentlich geringer war und die Ausbeuten in folgenden Reaktionen negativ beeinflusst wurden. Insgesamt konnte das Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit **60** trotz chromatographischer Reinigung in einer guten Ausbeute von 81 % erhalten werden.

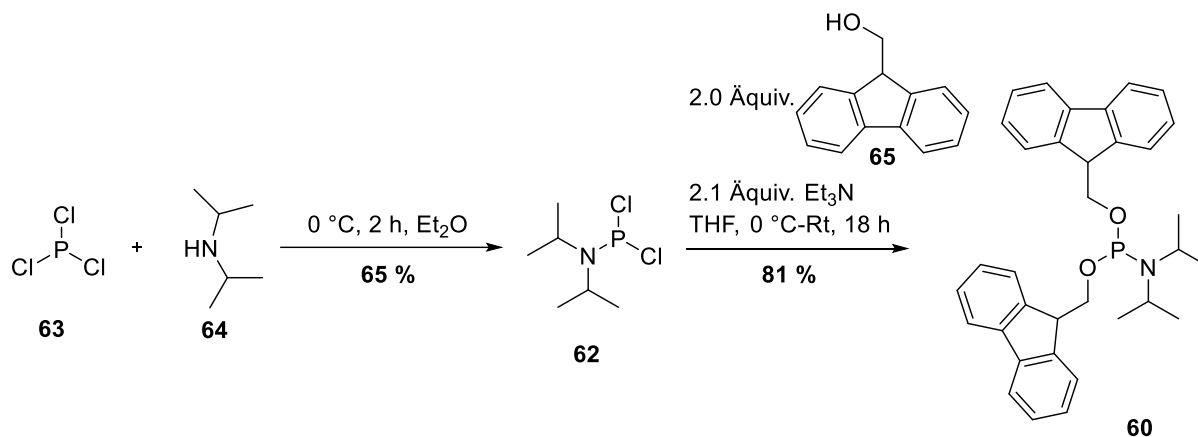


Abb. 39: Synthese von Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit **60**.¹⁴⁴

Nach der erfolgreichen Synthese der selektiv geschützten Nucleosidanaloga **52** und **53** und des Fm-Amidits **60** konnte die Phosphorylierung an der 5'-Position erfolgen. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 40 dargestellt. Hierzu wurden die Nucleoside **52** und **53** zusammen mit dem Fm-Amidit **60** in Dichlormethan gelöst und anschließend 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) als Aktivator zugegeben. Diese Phosphorylierung erfolgte nach dem optimierten Protokoll von WEINSCHENK,¹⁶⁶ bei der die Zugabe des Aktivators tropfenweise in 0.2 Äquivalenten in Abständen von fünf Minuten zugegeben wird. Nach der vollständigen Zugabe erfolgte die Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid.

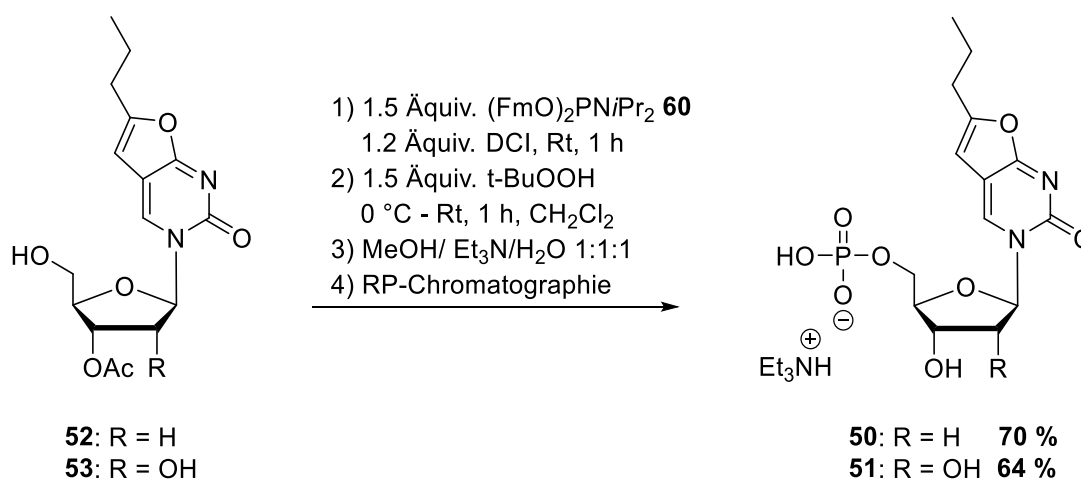


Abb. 40: Synthesen der BCNA-Monophosphate **52** und **53**.

Bei der Synthese der Didesoxy-BCNAs von REIMER¹²¹ wurde das Fm-geschützte Phosphat vollständig isoliert und in guter Reinheit erhalten. In vorangegangenen Arbeiten zur Synthese der 2'-Desoxy-BCNAs¹⁴⁴ wurde jedoch festgestellt, dass die Reinigung des geschützten

Phosphats große Schwierigkeiten bereitete. Aus diesem Grund wurde das Fm-Phosphat nur einmal mittels automatisierter Säulenchromatographie gereinigt. Das hierbei erhaltene Produkt war noch verunreinigt, jedoch hat sich gezeigt, dass diese bei der Entschützung und anschließenden RP-Chromatographie die Verunreinigungen problemlos abgetrennt werden konnten und keinen weiteren Einfluss auf die Entschützungsreaktion nehmen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Fm-geschützten Phosphate nicht vollständig charakterisiert und leicht verunreinigt für die nächsten Reaktionen eingesetzt.

Die von REIMER durchgeführten Entschützungen in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser/Triethylamin 2:2:1 v/v/v gingen insgesamt mit sehr langen Reaktionszeiten und teilweise sehr langsamer oder gar keiner Spaltung der Acetylgruppen einher. Daher wurde ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Triethylamin 1:1:1 erprobt. Mit diesem Lösungsmittelgemisch konnten für alle in dieser Arbeit dargestellten Monophosphate mit dem Fm-Amidit gute Reaktionsgeschwindigkeiten sowohl für die Spaltung der Fm-Gruppen als auch der Acetylfunktionen erzielt werden. Hiermit war in der Regel eine vollständige Abspaltung aller Schutzgruppen nach 24 Stunden zu beobachten. Das bei der Reaktion entstehende Dibenzofulven (Abb. 38) ist nur sehr schwer wasserlöslich und kann nach Beenden der Reaktion durch eine Extraktion entfernt werden. Ebenfalls bewährt hat sich die Filtration der wässrigen Suspension durch Watte und Spritzenfilter nach dem Entfernen von Methanol und Wasser. Für beide Monophosphate **52** und **53** konnte so das Produkt nach einer RP-Chromatographie in hoher Reinheit mit Ausbeuten von 70 % und 64 % erhalten werden. Diese Ausbeuten stellen eine Verbesserung von allen Synthesen bisheriger BCNA-Monophosphate von PERTENBREITER¹⁶³, GOLLNEST¹⁴³ und REIMER¹²¹ dar, was vor allem mit der Wahl des Fm-Amidits als Phosphorylierungsreagenz und der optimierten Reinigungsprozedur zu begründen ist.

4.2.2 Synthese der BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Nachdem sowohl die Pyrophosphate **46a-f** als auch die BCNA-Monophosphate **52** und **53** zugänglich gemacht wurden, sollten die TriPPPro-Verbindungen **30a-e** (dBCNA-01 bis 05) und **31b-f** (BCNA-01 bis 05) dargestellt werden. Hierfür sollte die von GOLLNEST¹⁴³ etablierte *H*-Phosphonatroute angewendet werden. Das Retrosyntheschema für alle BCNA-TriPPPro-Verbindungen ist in Abb. 41 dargestellt. Bei dieser Route sollte wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, das BisAB-maskierte Pyrophosphat mit dem Nucleosidmonophosphat gekuppelt werden. Die Reaktion erfolgt hierbei in Anlehnung an eine von MOHAMADY *et al*¹⁶⁷ etablierte Methode für die Synthese von Nucleosidtriphosphaten, wobei eine der beiden Phosphatspezies mit 1-Methylimidazol aktiviert wird, während die andere Spezies als Nucleophil dient. Diese Reaktionsbedingungen wurden von GOLLNEST¹⁴³ in Zuge seiner Arbeiten für die Synthese von maskierten Triphosphaten optimiert. Unter anderem dient bei

MOHAMADY das Pyrophosphatsalz als Nucleophil, während das Nucleosidmonophosphat die aktivierte Spezies darstellt. Von GOLLNEST wurde jedoch festgestellt, dass sich das maskierte Pyrophosphat nicht als Nucleophil eignet.¹⁴³ Aus diesem Grund wird bei der *H*-Phosphonatroute das Pyrophosphat aktiviert, während das Nucleosidmonophosphat als Nucleophil dient.

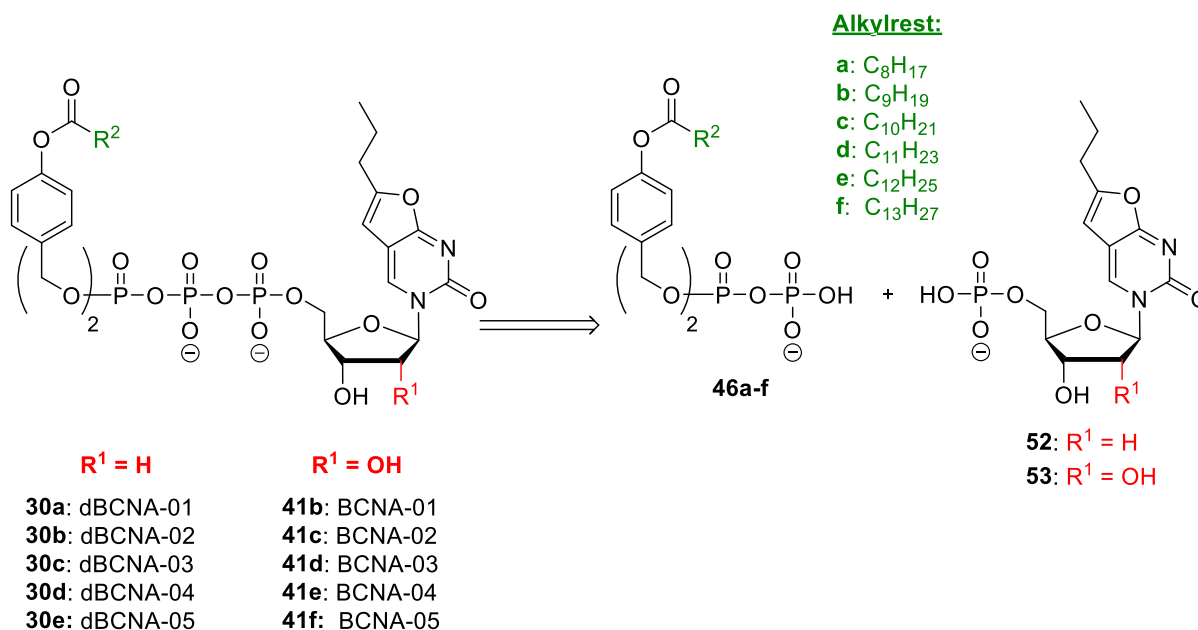


Abb. 41: Retrosyntheseschema für die Synthese der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen dBCNA-01 bis 05 **30a-e** und BCNA-01 bis 05 **41b-f** über die *H*-Phosphonatroute.

Die genaue Reaktionssequenz ist in Abb. 42 dargestellt. Zunächst wird das Pyrophosphat mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und Triethylamin versetzt. Bei den Synthesen von MOHAMADY dient die Bildung des gemischten Anhydrids **66** vor allem zur Erhöhung der Löslichkeit durch die *in situ*-Schützung der Hydroxy- und Aminofunktionen der Nucleotide. Zusätzlich werden dadurch mögliche Rückstände an Wasser aus der Reaktion entfernt, was bei Synthesen mit Nucleotiden häufig ein großes Problem darstellt. Bei der *H*-Phosphonatroute wird neben der Entfernung von möglichen wässrigen Rückständen durch die Zugabe des Anhydrids vor allem eine stufenweise Aktivierung ermöglicht, die sich als vorteilhaft erwiesen hat. Während von MOHAMADY und GOLLNEST alle Aktivierungen mit TFAA bei 0 °C durchgeführt wurden, wurden in dieser Arbeit alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch die Anpassung der Reaktionstemperatur konnten keine negativen Effekte auf die Reaktion beobachtet werden, jedoch konnte das Problem der geringen Löslichkeit von manchen Pyrophosphatverbindungen überwunden werden. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt, worauf das Pyrophosphat im zweiten Schritt in die aktivierte Spezies als Imidazolidat **67** überführt wurde. Das Imidazolidat stellt hierbei eine sehr gute Abgangsgruppe dar und macht das Phosphat zugänglich für nucleophile Angriffe. Schließlich erfolgte jeweils die Zugabe des

Monophosphats **52** und **53**, worauf unter Eliminierung von 1-Methylimidazol die gewünschte TriPPPPro-Verbindung gebildet wird. Für die Reinigung wird üblicherweise zunächst eine automatisierte RP-Chromatographie auf Tetra-*n*-butylammoniumionen durchgeführt, worauf die Gegenionen über ein DOWEX-Ionenaustcherharz zu Ammoniumionen überführt werden. In der Regel wird dann durch eine weitere RP-Chromatographie die gewünschte TriPPPPro-Verbindung erhalten.

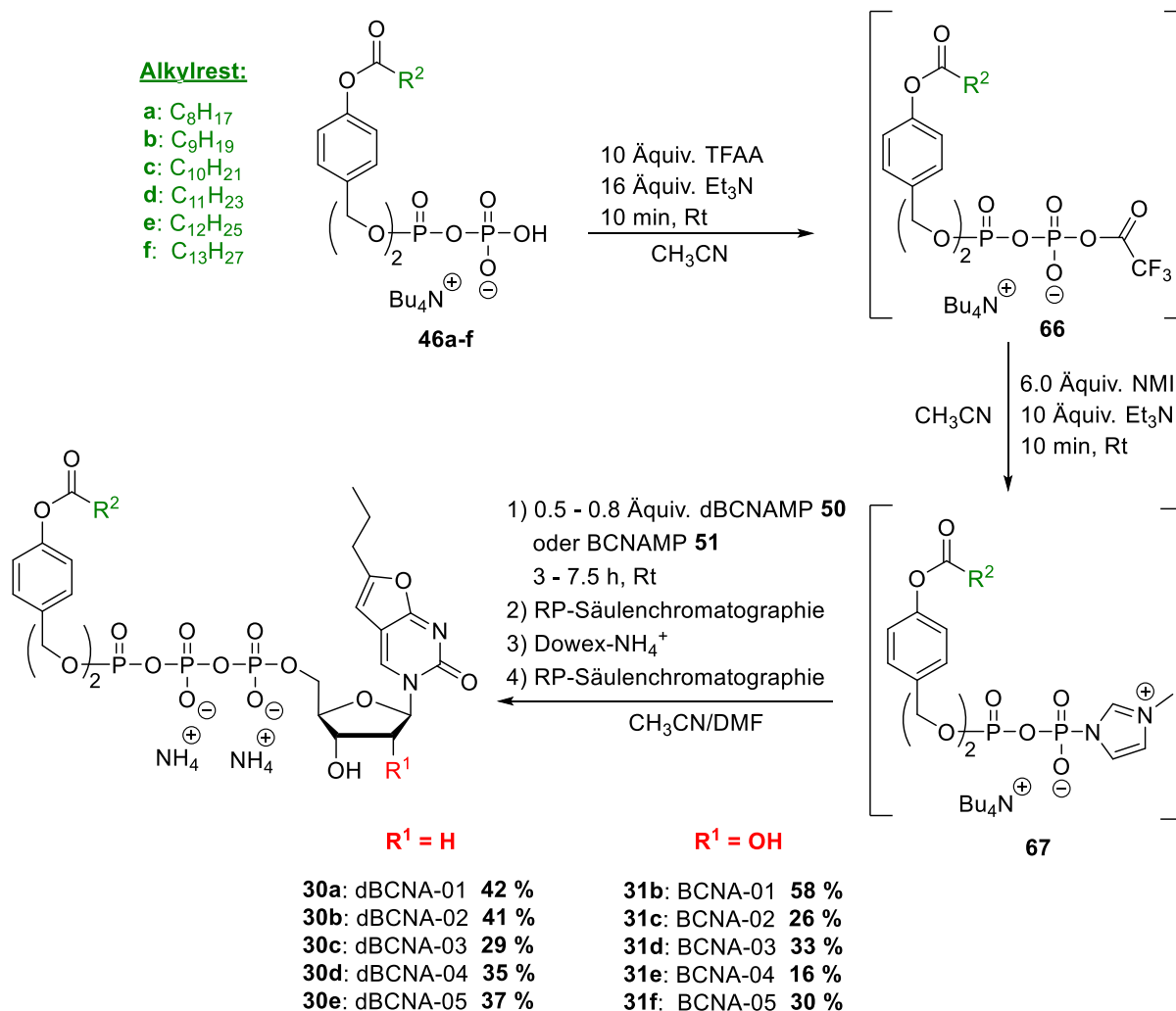


Abb. 42: Synthesen der BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **30a-e** und **31b-f**.

Unter diesen Reaktionsbedingungen konnten alle gewünschten TriPPPPro-Verbindungen **30a-e** und **31b-f** erhalten werden. Die Ausbeuten hierbei liegen im Bereich der erzielten Ausbeuten von REIMER¹²¹ und GOLLNEST¹⁴³ für die Didesoxy-BCNAs. Wie bereits in eigenen vorherigen Arbeiten für die dBCNA-TriPPPPro-Verbindungen wurde auch für die BCNA-TriPPPPro-Derivate eine längere Reaktionszeit bei längeren Alkylresten der Maskierungseinheiten beobachtet. Hierbei wurde der Umsatz mittels RP-HPLC verfolgt. Zusätzlich wies das BCNA-Monophosphat **51** im Vergleich zu Monophosphat **50** eine geringere Löslichkeit in Acetonitril auf, weshalb der finale Kupplungsschritt für die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **31b-f** in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) durchgeführt wurde. Auffällig

sind die vergleichsweise geringen Ausbeuten von Verbindung **30c** und **31e**. Dies ist vor allem damit zu begründen, dass sich bei diesen Verbindungen die Reinigung als schwierig erwies, weshalb mehrere säulenchromatographische Reinigungen durchgeführt werden mussten. Die Verunreinigungen beinhalten hauptsächlich bei der Reaktion gebildete Imidazoliumsalze, die zusammen mit dem Produkt eluieren. Dennoch konnten nach mehreren Reinigungsschritten alle Verbindungen in hoher Reinheit erhalten werden.

Für die Verbindung **31f** musste das Reinigungsprotokoll zusätzlich variiert werden. Aufgrund der hohen Lipophilie der Verbindung eluierte das Produkt auf Tetra-*n*-butylammoniumionen nicht auf der C₁₈-RP-Säule, weshalb eine C₈-RP-Säule verwendet werden musste. Dadurch konnte eine Elution des Produktes erhalten werden, was schließlich zur erfolgreichen Isolierung von Verbindung **31f** führte.

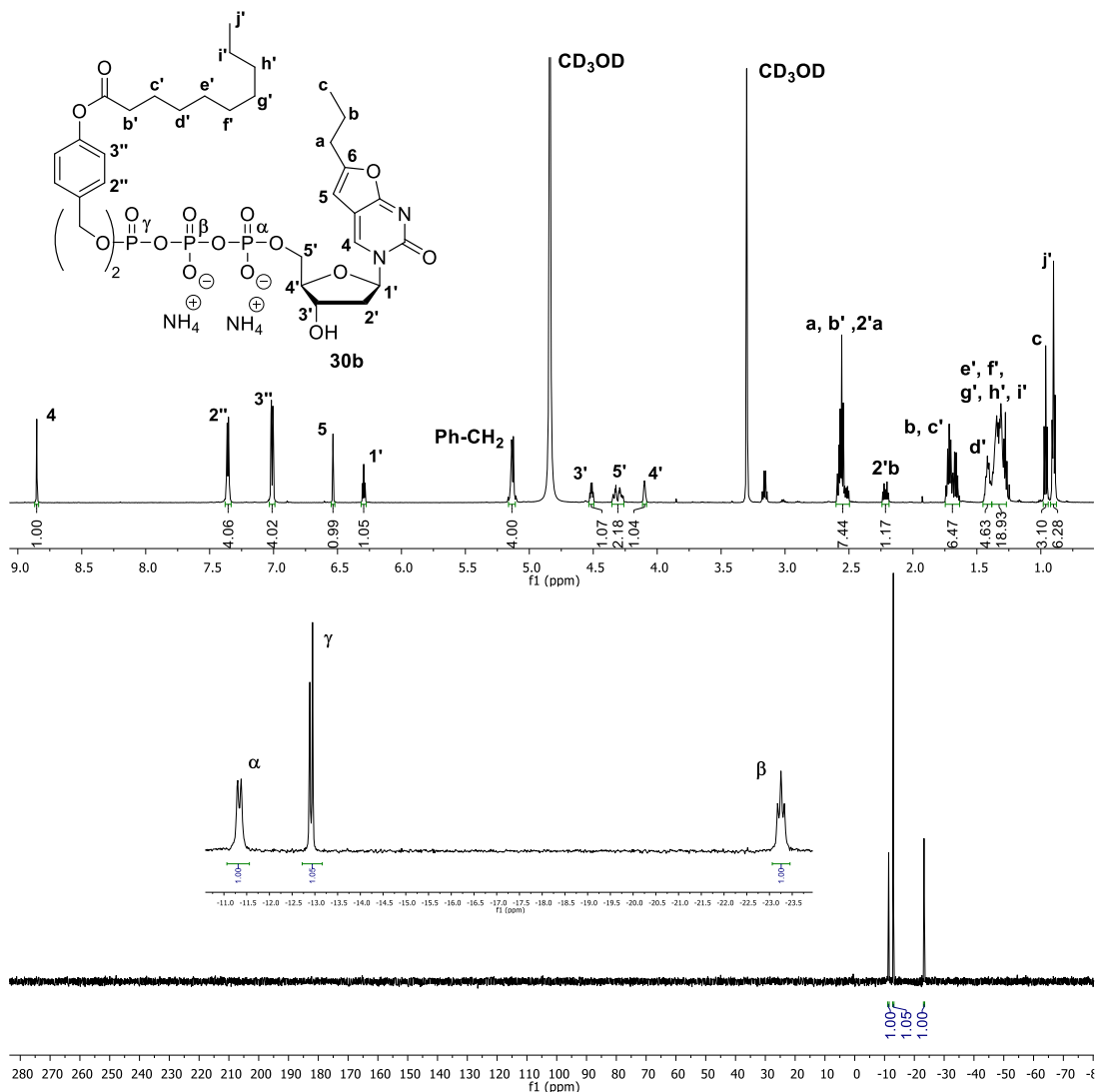


Abb. 43: ¹H- und ³¹P-NMR-Spektrum von dBCNA-TriPPPro-Verbindung **30b**.¹⁴⁴

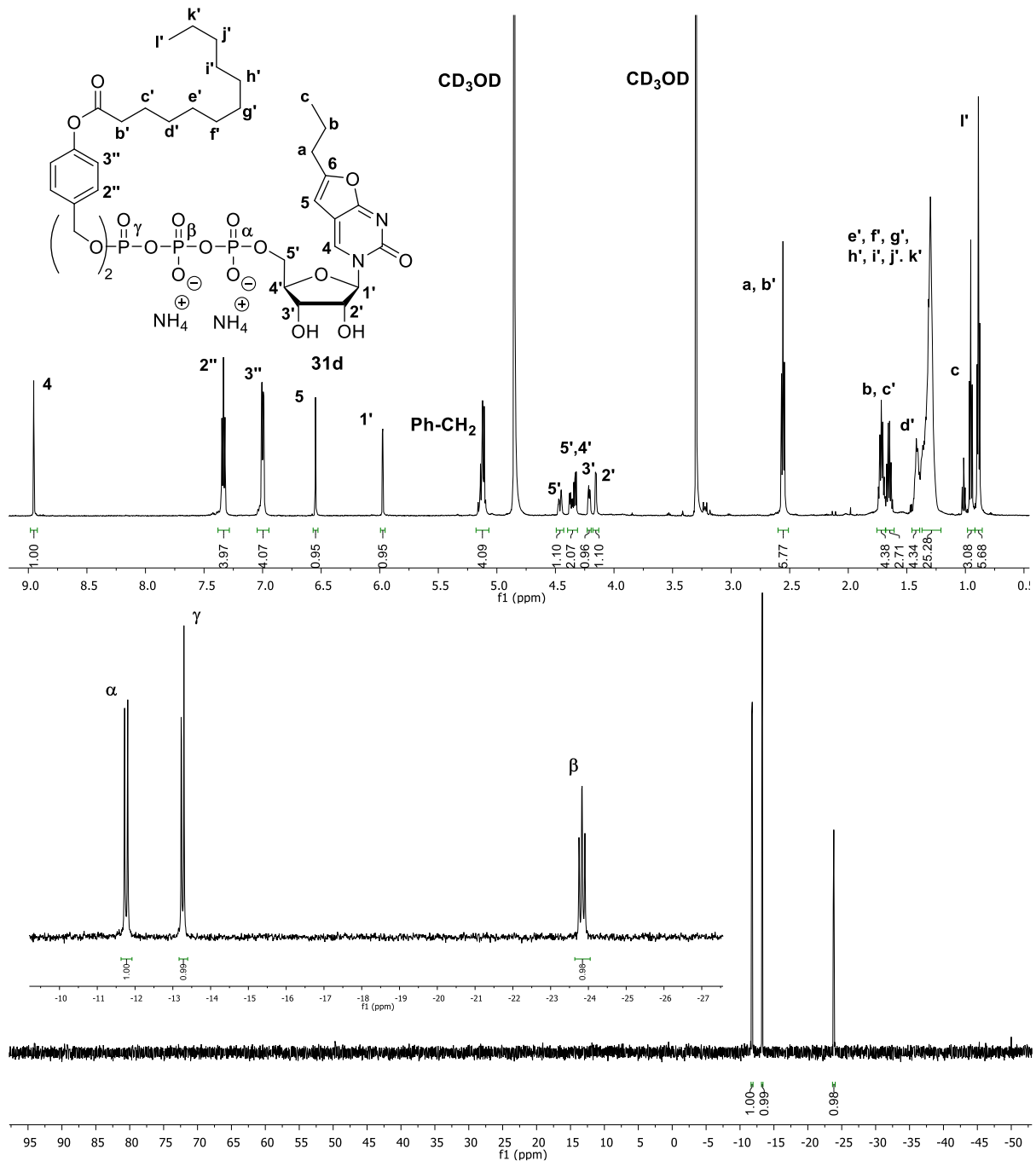


Abb. 44: ¹H- und ³¹P-NMR-Spektrum von BCNA-TriPPPPro-Verbindung **31d**.

In Abb. 43 und Abb. 44 sind beispielhaft das ¹H- und ³¹P-NMR-Spektrum von dBCNA-TriPPPPro **30b** und BCNA-TriPPPPro **31d** dargestellt. Im ¹H-NMR-Spektrum sind alle charakteristischen Signale für das BCNA-Nucleotid sowie die Protonen der doppelten AB-Maskierungseinheiten zu erkennen. Das ³¹P-NMR-Spektrum beinhaltet die für TriPPPPro-Verbindungen typischen Signale. Während das α- und β-Phosphoratom jeweils ein Duplett bilden, ist das β-Phosphoratom als Pseudotriplett erkennbar. Auch die Verschiebungen zwischen -10 ppm und -25 ppm sind für solche Triphosphatverbindungen typisch. Außerdem ist anhand dieser Spektren die hohe Reinheit erkennbar, in der die TriPPPPro-Verbindungen erhalten werden konnten.

4.2.3 Hydrolyseverhalten der BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Um festzustellen, ob die BCNA-TriPPPro-Verbindungen geeignete Sonden zur Evaluierung für Zellaufnahmen sind, müssen diese bezüglich ihrer Lipophilie, Stabilität und Hydrolyseeigenschaften untersucht werden. Idealerweise sollten diese Eigenschaften mit anderen Triphosphaten und TriPPPro-Verbindungen, die für mögliche antitumorale Aktivität eingesetzt werden sollen, ähneln. Wie bereits in Abschnitt 2.6 erwähnt, kann hierzu die chemische sowie die enzymatische Stabilität untersucht werden. Für die Bestimmung der chemischen Stabilität werden die zu untersuchenden Verbindungen in der Regel in physiologischen PBS-Puffer (pH = 7.3) inkubiert, während für die enzymatische Stabilität Inkubationen mit PLE oder Zellextrakt gewählt werden. Die genauen Mechanismen sind bereits in Abschnitt 2.6 beschrieben und erneut in Abb. 45 zusammengefasst.

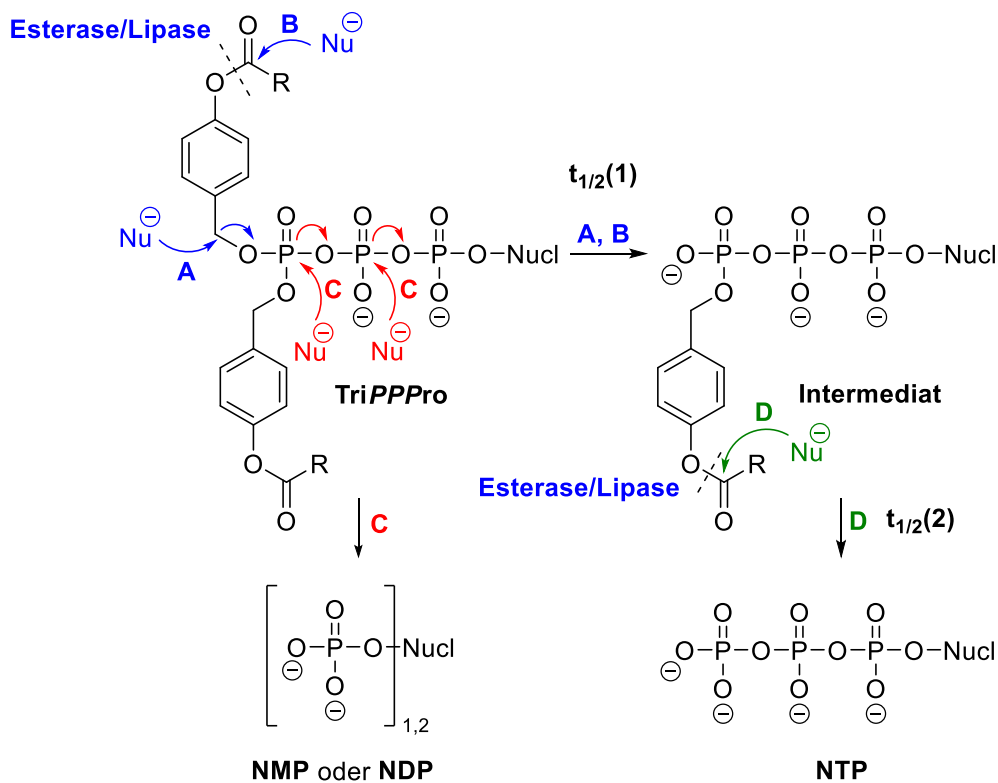


Abb. 45: Mögliche Hydrolysewege von symmetrisch maskierten BisAB-TriPPPro-Verbindungen.

Bei den symmetrischen TriPPPro-Verbindungen kann zwischen zwei verschiedenen Halbwertszeiten unterschieden werden. Bei der Abspaltung der ersten Maskierungseinheit, was sowohl durch Esterasen und Lipasen oder aber chemisch induziert erfolgen kann, entsteht das monomaskierte Intermediat. Hierbei spricht man von der Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$. Bei der Abspaltung der zweiten Maske aus dem Intermediat, was über dieselben Mechanismen erfolgt, spricht man von der Halbwertszeit $t_{1/2}(2)$. Von PERTENBREITER¹⁶³ und REIMER¹²¹ wurde das Hydrolyseverhalten von BCNA-*cycloSal*- und BCNA-DiPPPro-Verbindungen bereits untersucht, deren Ergebnisse die Eignung der BCNAs als Modellsysteme unterstreichen. GOLLNESTS Untersuchungen an BCNA-TriPPPro-

Verbindung **27** (Abschnitt 2.7) konnten diese Ergebnisse bestätigen. Für die dBCNA-Verbindungen **30a-e** und die BCNA-Verbindungen **31b-f** wurden zunächst ebenfalls die chemischen Stabilitäten in einem PBS-Puffer (pH = 7.3) untersucht. Hierzu wurden die Substanzen in dem Puffer gelöst und anschließend in einem Thermocycler bei 37 °C inkubiert, um physiologische Bedingungen zu imitieren. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote der Inkubationslösung entnommen und mittels RP-HPL-Chromatographie eine Quantifizierung der entstandenen Hydrolyseprodukte durchgeführt. Hierbei wurden im Arbeitskreis etablierte Methoden zur chromatographischen Analyse von TriPPPro-Verbindungen verwendet. Das genaue Protokoll ist im experimentellen Teil dieser Arbeit (Abschnitt 7.2, 7.5.1 und 7.5.2) nachzulesen. Mit Hilfe dieser Methoden konnten die Halbwertszeiten für die TriPPPro-Verbindungen ($t_{1/2}(1)$) und die der Intermediate ($t_{1/2}(2)$) bestimmt werden. Die bestimmten Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Chemische Hydrolysehalbwertszeiten der dBCNA-TriPPPro-Verbindungen **30a-e** und BCNA-TriPPPro-Verbindungen **31b-f**.

	$t_{1/2}(1)$ in PBS [h]					
	C₈ (a)	C₉ (b)	C₁₀ (c)	C₁₁ (d)	C₁₂ (e)	C₁₃ (f)
dBCNA (30)	26	30	38	37	29	-
BNCA (31)	-	32	37	31	34	31

Für alle Verbindungen wurde lediglich die Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ zur Bildung des Intermediates bestimmt, da die Abspaltung der zweiten Maskierungseinheit ($t_{1/2}(2)$) sehr langsam und daher außerhalb physiologisch relevanten Zeiträumen abläuft. Insgesamt liegen alle Halbwertszeiten für die dBCNA- und BCNA-Verbindungen etwas unterhalb der Zeiten, die für die von GOLLNEST¹⁴³ synthetisierte Didesoxy-BCNA-Verbindung **27** und andere TriPPPro-Verbindungen ermittelt wurden. Dennoch liegen diese in akzeptablen Bereichen und können insgesamt als chemisch ausreichend stabil betrachtet werden. Interessant hierbei ist auch, dass die Verbindungen **30** und **31** sich im Vergleich zur Verbindung **27** hauptsächlich in der 3'- bzw. 2'- und 3'-Hydroxyfunktion unterscheiden. Diese scheinen also einen negativen Einfluss auf die chemische Stabilität der getesteten Verbindungen zu haben. Auch auffällig ist, dass bei den BCNA-Verbindungen **31b-f** im Vergleich zu den Desoxy-BCNA-Verbindungen **30a-e** eine vermehrte Bildung von Diphosphat beobachtet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die zusätzliche Hydroxygruppe an der 2'-Position eine vermehrte Mizellenbildung zur Folge hat, was eine chemische Spaltung der Phosphoranhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat begünstigt. Dieser Effekt wird auch zunehmend, wie in vorherigen Arbeiten bereits ermittelt, bei den Verbindungen mit längeren Acylresten beobachtet.^{143,144} In Abb. 46 ist der Hydrolyseverlauf von TriPPPro-Verbindung **31f**

beispielhaft dargestellt. Hierbei ist vor allem die vermehrte Bildung von Diphosphat gut zu erkennen.

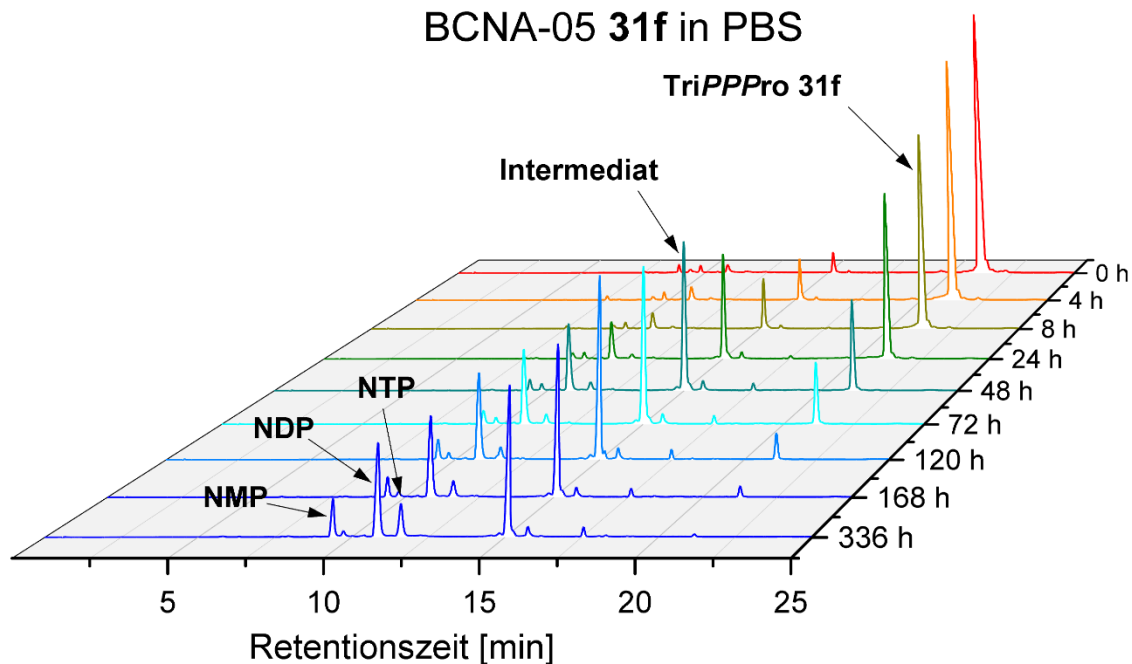


Abb. 46: Hydrolyseverlauf von BCNA-05 31f in PBS-Puffer.

Neben der Hydrolyse in PBS-Puffer wurden einige der BCNA-Verbindungen auch mit Schweineleberesterase (PLE) inkubiert. Hierdurch lässt sich bestimmen, ob die Maskierungseinheiten generell durch enzymatische Hydrolyse gespalten werden können. Dies wurde nicht für alle Verbindungen durchgeführt, da in zahlreichen vorherigen Studien die generelle Spaltbarkeit der AB-Masken mit PLE bereits untersucht wurde. Hierbei wurde vor allem festgestellt, dass bei längeren Kettenlängen die Geschwindigkeit der Spaltung abnimmt, bis sie schließlich gar nicht mehr gespalten werden. Dieser Trend konnte ebenfalls für die BCNAs **30a-e** und **31b-f** beobachtet werden. In vorherigen Arbeiten wurde ebenfalls festgestellt, dass ab einer Kettenlänge von C₁₂ die Maskierungseinheiten nicht mehr enzymatisch durch die PLE gespalten werden. Da es sich aber hierbei nur um ein Modellenzym handelt, kann trotzdem von einer enzymatischen Spaltung innerhalb der Zellen ausgegangen werden, da hier zusätzlich auch Lipasen vorhanden sind.

Insgesamt konnte durch die Hydrolysestudien an den TriPPPPro-Verbindungen **30a-e** und **31b-f** gezeigt werden, dass die Verbindungen eine ausreichende chemische Stabilität besitzen und zeitgleich eine enzymatische Spaltbarkeit der Maskierungseinheiten gegeben ist. Dadurch konnte eine generelle Eignung dieser BCNAs als Sonden für TriPPPPro-Verbindungen in Zellaufnahmestudien bestätigt werden.

4.2.4 Zellaufnahmestudien der BCNA-TriPPPro-Verbindungen an Krebszellen

Erste Zellaufnahmestudien mit BCNA-Verbindungen wurden von PERTENBREITER und REIMER durchgeführt. Durch diese Studien konnte vor allem für *cycloSal*- und *DiPPPro*-Nucleotide eine erfolgreiche Membrangängigkeit bestätigt werden. Diese Zellaufnahmen wurden jedoch in CEM-Zellen durchgeführt, weshalb eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf antitumorale Nucleosidanaloga nur bedingt gegeben ist. GOLLNEST führte zudem erfolgreich eine Zellaufnahmestudie mit BCNA-Verbindung **27** durch, die erstmalig eine Zellaufnahme einer symmetrisch maskierten BisAB-TriPPPro-Verbindung bestätigte.¹⁴³ In bisher unveröffentlichten Studien wurden die Metabolite dieser Verbindung auch erstmals in Krebszellen nachgewiesen. All diese Zellaufnahmen waren jedoch Einzeluntersuchungen und ließen keine Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen variierender Maskierung und Zellaufnahme zu. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Verbindungen **30a-e** und **31b-f** verwendet, um erstmalig einen Zusammenhang zwischen Lipophile und Zellaufnahme von symmetrisch maskierten TriPPPro-Verbindungen herzustellen.

Die Inkubation der verschiedenen Krebszellen mit den Prodrugs wurde von der Arbeitsgruppe von Udo Schumacher am Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie der Universitätsklinik Eppendorf durchgeführt. Eine schematische Zusammenfassung des Prozesses der Zellaufnahmestudien ist in Abb. 47 dargestellt. Hierzu wurden die jeweiligen Krebszelllinien mit den entsprechenden BCNA-TriPPPro-Verbindungen zunächst in T175-Zellkulturflaschen ohne fötales Kälberserum inkubiert. Hierbei wurde eine Konzentration des Prodrugs von 10 μM gewählt, obwohl in den Studien von GOLLNEST eine Konzentration von 100 μM verwendet wurde. Diese Konzentration übersteigt den mittleren CC_{50} -Wert der d4T-TriPPPro-Verbindungen von 45 μM um mehr als das doppelte, weshalb bei einer so hohen Konzentration toxische Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können. Diese könnten sich zum Beispiel negativ auf zelluläre Enzyme oder das Diffusionsverhalten auswirken, was die Ergebnisse verfälschen würde. Von REIMER wurde in ihren Studien ebenfalls eine Konzentration von 10 μM gewählt, wobei ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Nach der Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C wurde der Überstand für spätere Analysen abgenommen. In den vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedene Inkubationszeiten gewählt, teilweise bis zu sechs Stunden. Dabei konnte bereits eine vollständige Metabolisierung der Prodrugs beobachtet werden. Die besten Ergebnisse würden sowohl von GOLLNEST¹⁴³ als auch von REIMER¹²¹ bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten für TriPPPro-Verbindungen erzielt, weshalb in dieser Arbeit derselbe Zeitraum gewählt wurde. Die Zellpellets wurden mit einem PBS-Puffer (pH = 7.3) gewaschen, trypsinisiert und anschließend zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden erneut mehrfach mit einem PBS-Puffer gewaschen und die so durch erneute Zentrifugation

erhaltenen Pellets eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das genaue Protokoll ist ebenfalls im experimentellen Teil dieser Arbeit (Abschnitt 5.5.1) ausführlich beschrieben.

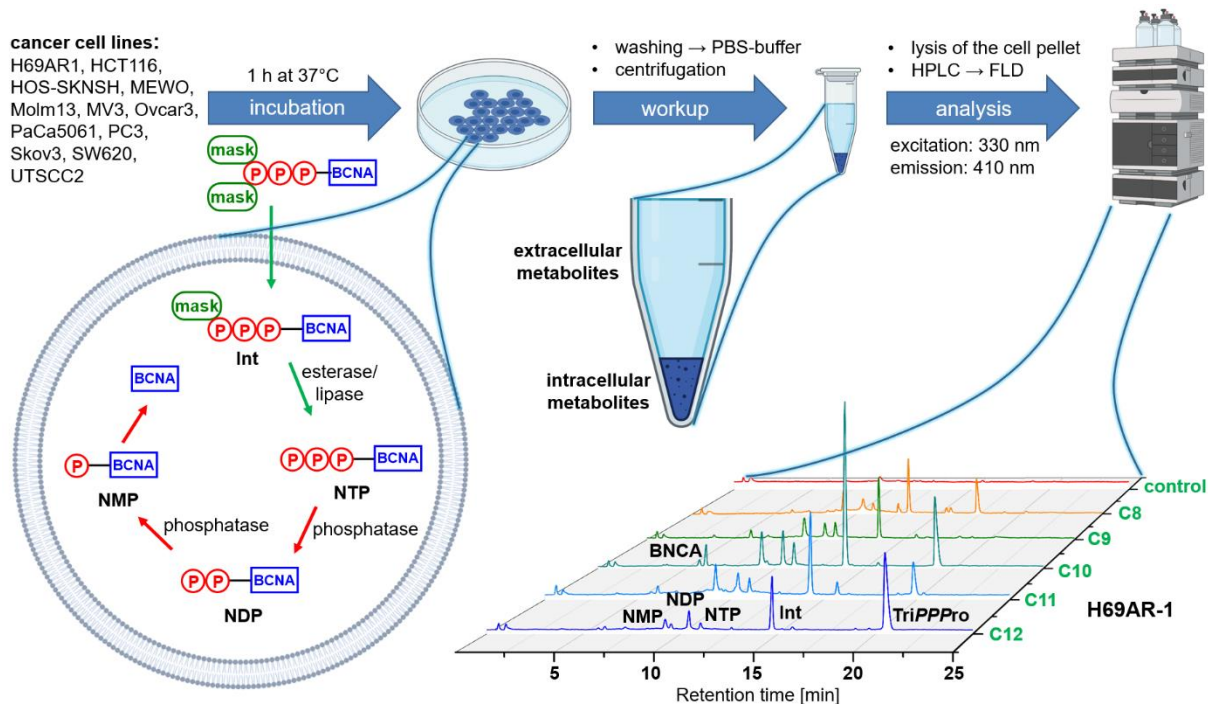


Abb. 47: Allgemeiner Prozess für die Zellaufnahmestudien mit BCNA-Verbindungen.

Die darauffolgenden Arbeiten zur weiteren Analyse wurden selbstständig durchgeführt. Es kann der Überstand der Inkubation untersucht werden, der alle Metabolite enthält, die während der Inkubationszeit nicht in die Zellen gelangt sind. Die Zellpellets wiederum enthalten das Prodrug und alle entstandenen Metabolite, die während der Inkubation in die Zellen gelangt sind. Für die Untersuchung des Überstands wurde dieser lediglich einmal über einen Spritzenfilter (Chromafil RC-20/15 MS, 0.2 µm der Firma Macherey-Nagel) filtriert und direkt mittels RP-HPL-Chromatographie untersucht. Die Zellpellets mussten zunächst aufgeschlossen werden, um sie für die Analyse verwenden zu können. Hierzu wurde das Pellet in 170 µL eines Methanol/Wasser-Gemisches (2:1 v/v) suspendiert und für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgte zur Fällung für eine zehnminütige Lagerung auf Eis, worauf sich eine Zentrifugation (14000 rpm, 0 °C, 10 min) anschloss. Der so erhaltene Überstand wurde über einen Spritzenfilter filtriert und mit einem Injektionsvolumen von 100 µL mittels RP-HPL-Chromatographie untersucht. Für die Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet, wobei die Anregungswellenlänge 330 nm betrug, während die Emissionswellenlänge bei 410 nm lag. Als Laufmittel wurde ein Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer (pH = 6.0, 2 mmol/L) und Acetonitril verwendet, der Gradient entspricht hierbei den im Arbeitskreis etablierten Methoden zur Trennung von Nucleotid-Prodrugs und deren Metaboliten (Abschnitt 5.2).

Für die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **30a-e** und **31b-f** wurden Untersuchungen in verschiedenen Krebszelllinien durchgeführt. Eine Zusammenfassung aller verwendeten Krebszelllinien ist in Tab. 2 dargestellt. Hierbei handelt es sich um eine Vielzahl verschiedener Karzinome und Krebszelltypen, um eine allgemeine Anwendbarkeit des Prodrugsystems bestätigen zu können. Auch hervorzuheben ist, dass es sich bei manchen Zelllinien um gegen herkömmliche Chemotherapeutika resistente Zellen (H69AR) oder bisher nur schwer behandelbare Karzinome (PaCA5061) handelt. Während die BCNAs 01-05 in allen aufgeführten Zelllinien inkubiert wurden, wurden die dBCNAs 01-05 lediglich in einigen getestet. Grund hierfür ist die Verfügbarkeit der Zellkulturen, da zum Zeitpunkt der Zellaufnahmestudien, die für die Verbindungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, nicht alle Zelllinien in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Dennoch lassen sich auch für diese Verbindungen ausreichend Rückschlüsse auf die Zellaufnahme in Krebszellen ziehen, sodass weitere Untersuchungen mit diesen Verbindungen in den fehlenden Zelllinien nicht angestrebt wurden.

Tab. 2: Verwendete Krebszelllinien für Zellaufnahmestudien aller BCNA-Verbindungen.

Bezeichnung	Typ	dBCNA	BCNA
H69AR	Lungenkarzinom	✓	✓
HCT116	Kolonkarzinom	✗	✓
HOS-SKNSH	Neuroblastom	✓	✓
MEWO	Hautmelanom	✗	✓
MOLM13	Akute myeloische Leukämie (AML)	✓	✓
MV3	Amelanotisches Melanom	✗	✓
OVCAR3	Ovariakarzinom	✗	✓
PACA5061	Pankreaskarzinom	✓	✓
PC3	Prostatakarzinom	✓	✓
SKOV3	Ovariakarzinom	✓	✓
SW620	Kolorektales Karzinom	✗	✓
UTSCC2	Mundhöhlenkarzinom	✓	✓

Die durchgeführten Zellaufnahmestudien haben gezeigt, dass alle getesteten BCNA-TriPPPPro-Verbindungen in der Lage waren, in alle Zellen aufgenommen zu werden. Wie erwartet, unterscheidet sich die Aufnahme jedoch sowohl nach Lipophilie der Substanzen, sowie der verwendeten Krebszelllinien. Dies führte ebenfalls zu einer Variation der Metabolite, die innerhalb der Zellen gefunden wurden. Für einige der Krebszelllinien und Verbindungen sind die Ergebnisse der Zellaufnahmen beispielhaft in den folgenden Grafiken dargestellt.

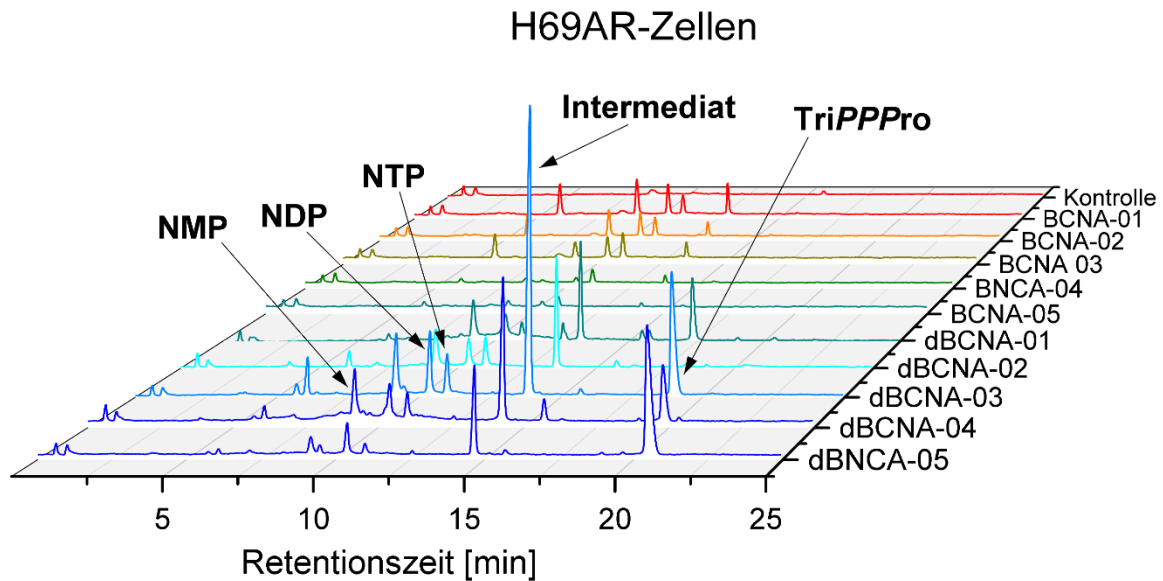


Abb. 48: Chromatogramme der Zellpellets der Zellaufnahmestudien an H69AR-Zellen.

In Abb. 48 sind die Chromatogramme der analysierten Zellpellets für die H69AR-Zelllinie für alle Fluoreszenzverbindungen dargestellt. Hierbei ist sehr gut zu erkennen, dass für alle getesteten Verbindungen Metabolite innerhalb der Zellen gefunden wurden. Auffällig ist auch, dass die 2'-Desoxy-Verbindungen (dBCNAs) nach einer Stunde teilweise noch vollständig als Prodrug vorhanden waren, während bei den Ribo-BCNAs (BCNAs) nahezu vollständig das Intermediat und die Nucleotide nachgewiesen wurden. Dies lässt auf eine geringere intrazelluläre Stabilität der BCNAs im Vergleich zu den dBCNAs in dieser Zelllinie schließen. Auffällig ist hier auch, dass bei den dBCNAs für die Prodrugs mit einem ungeraden Acyloxybenzylrest der Maskierungseinheit (**30a**, **30c**, **30e**) die Metabolisierung langsamer abzulaufen scheint als für die Prodrugs mit geraden Einheiten (**30b**, **30d**). Dies lässt auf eine höhere Selektivität der Enzyme bezüglich ungerader Säurereste schließen. Für andere Zelllinien konnte dieser Effekt in dem Ausmaß allerdings nicht beobachtet werden. Außerhalb der Zelle war nach einer Stunde kein Prodrug mehr vorhanden. Die Chromatogramme des Überstandes der H69AR-Zelllinie (Lungenkarzinom) sind in Abb. 49 dargestellt. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass die TriPPPPro-Verbindungen sehr schnell in die Zellen gelangen und zum anderen eine relativ geringe Stabilität im Zellmedium besitzen. Wie von GOLLNEST beobachtet, wurde hauptsächlich BCNA-Diphosphat und in geringen Mengen das Monophosphat sowie das Triphosphat gefunden. Dies wurde von GOLLNEST mit einer geringen Stabilität in fötalem Kälberserum begründet.¹⁴³ Da aber bei diesen Zellaufnahmestudien ohne Zusatz von FCS gearbeitet wurde, muss die Hydrolyse der Substanzen anders begründet sein. Auch in dem bei diesen Studien eingesetzten Nährmedium sind eine Vielzahl von Zusatzstoffen enthalten. In diesem Fall begründet sich

der Zerfall zum Diphosphat vermutlich durch verschiedene Salze, vor allem aber Magnesiumchlorid. Das Magnesium als zweiwertiges Kation ist in der Lage, an die Phosphateinheiten der TriPPP-Verbindungen zu koordinieren und somit einen nucleophilen Angriff zwischen dem β - und γ -Phosphat zu erleichtern. Diese Beobachtung konnte in unabhängigen Hydrolysestudien von TriPPP-Verbindungen in Puffer mit Magnesiumchlorid als Zusatz bestätigt werden. Für fast alle in diesen Studien untersuchten Überstände konnte im extrazellulären Raum hauptsächlich das Nucleosiddiphosphat nachgewiesen werden, was einen Metabolismus unabhängig von den Zellen und in Abhängigkeit vom Zellmedium weiter unterstreicht.

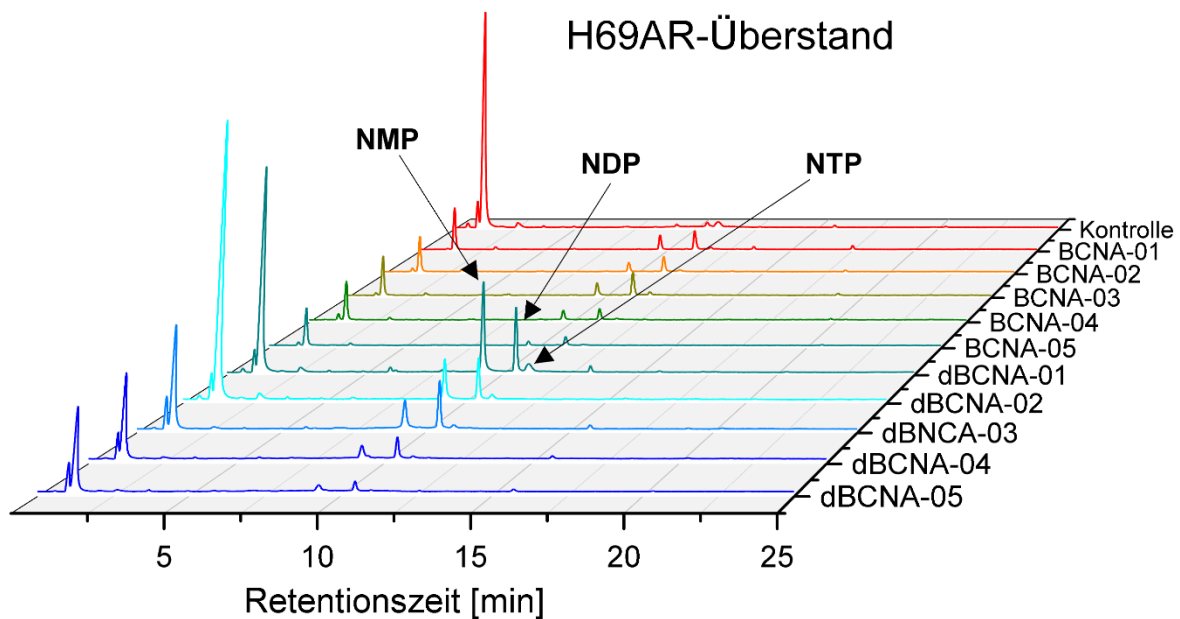


Abb. 49: Chromatogramme des Überstands der Zellaufnahmestudien an H69R-Zellen.

Zusätzlich wurde in nahezu allen untersuchten Zelllinien das Triphosphat der Fluoreszenzsonde nachgewiesen. Da die BCNA-Verbindungen wie in Abschnitt 2.7 erwähnt keine Substrate für die zellinneren Kinasen sind, müssen diese aus dem Prodrug freigesetzt worden sein. Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass die Metabolisierung der Prodrugs in den verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich abläuft. Während wie in Abb. 48 dargestellt in der H69AR-Zelllinie für die dBCNAs Prodrug und hauptsächlich das Intermediat nachgewiesen wurden, konnten in der PaCA5061-Zelllinie hauptsächlich die freien Nucleotide und sogar das Nucleosid nachgewiesen werden. Die Chromatogramme sind in Abb. 50 dargestellt. Besonders für das dBCNA-03 **30c** ist die Freisetzung vom Nucleosidtriphosphat aber auch vom Nucleosid selbst gut erkennbar.

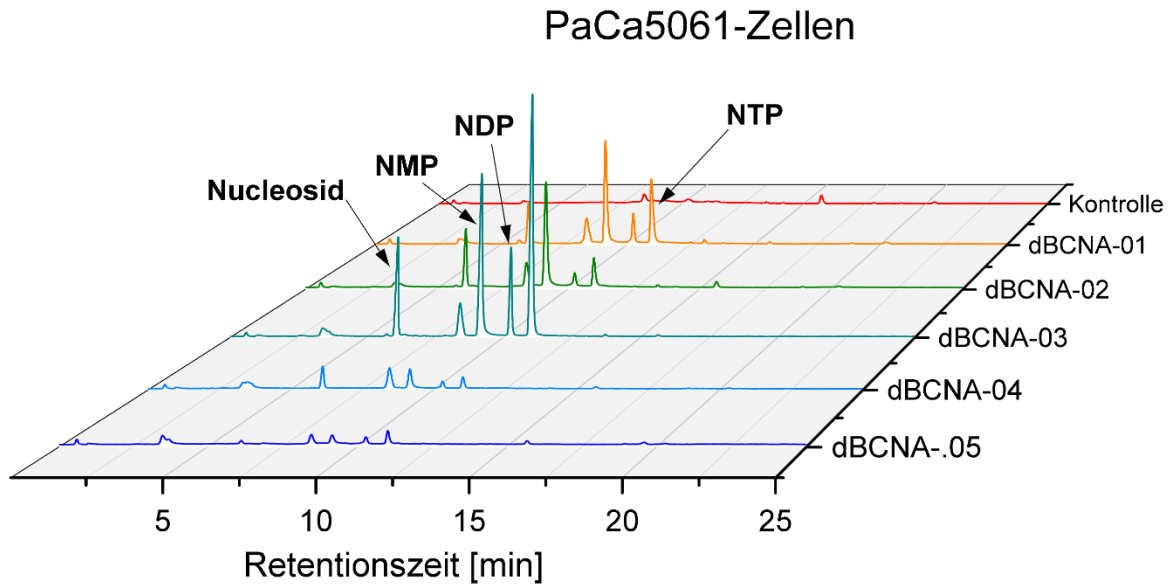


Abb. 50: Chromatogramme der Zellpellets der Zellaufnahmestudien an PaCa5061-Zellen mit dBCNA-TriPPPro-Verbindungen.

Die hier gezeigten Zelllinien bilden in der Regel Karzinome, die letztendlich gewebeartige Strukturen darstellen. Hiermit unterscheiden diese sich zum Beispiel stark von Blutkrebszellen. Die Zellaufnahmestudien mit den TriPPPro-Verbindungen haben jedoch gezeigt, dass die Prodrugs in der Lage sind, in beide Zelltypen einzudringen. Hierzu sind beispielhaft die Chromatogramme in Abb. 51 dargestellt.

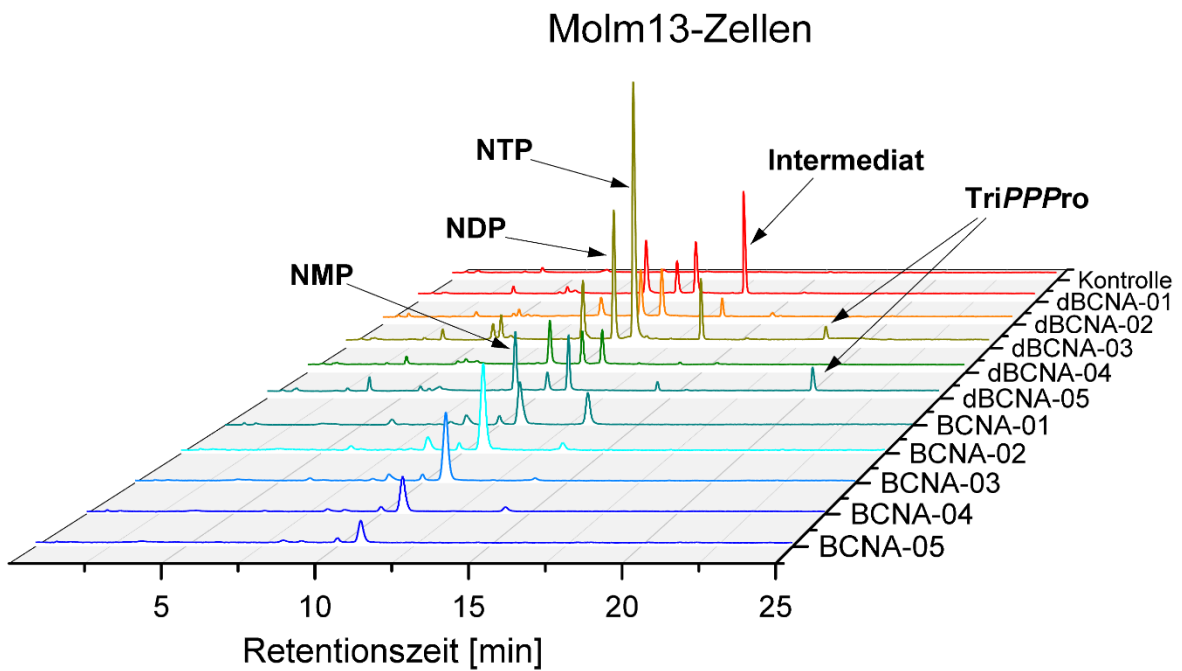


Abb. 51: Chromatogramme der Zellpellets der Zellaufnahmestudien an Molm13-Zellen.

Anhand der Chromatogramme ist gut zu erkennen, dass alle getesteten Substanzen in der Lage waren, in die Molm13-Zellen (Akute myeloische Leukämie) zu gelangen. Während bei den dBCNA-Verbindungen neben dem Triphosphat auch Intermediat und sogar noch geringen Mengen das Prodrug detektierbar sind, ist bei den BCNA-Substanzen hauptsächlich das Triphosphat zu erkennen. Wie bei den anderen abgebildeten Krebszelllinien ist hier eindeutig auch der Trend zu erkennen, dass TriPPPPro-Verbindungen mit einer Kettenlänge von C₁₀ (**30c**, **31c**) die größten Signalintensitäten aufweisen und somit offenbar am besten in die Zellen aufgenommen werden.

Wie bereits erwähnt und aus den vorherigen Chromatogrammen erkennbar, ist der Trend des unterschiedlichen Metabolismus aber nicht nur von der Zelllinie abhängig, sondern auch stark vom Nucleosid selbst. Dies soll anhand der Zellaufnahmen in den Molm13-Zellen noch einmal veranschaulicht werden. Die Chromatogramme sind in Abb. 52 dargestellt. Während für das BCNA-02 **31c** das Triphosphat der hauptsächlich nachgewiesene Metabolit ist, wurden für das Desoxy-BCNA-03 **30c** auch erhebliche Mengen an Diphosphat, Monophosphat und dem Intermediat gefunden. Dies lässt zum einen auf eine unerwartet schnellere Spaltung der Maskierungseinheiten aufgrund der zusätzlichen 2'-Hydroxyfunktion schließen, zum anderen auch auf eine schnellere Metabolisierung des Triphosphats zum Di- und Monophosphat. Ebenfalls möglich wäre eine direkte Freisetzung des Diphosphats aus dem Prodrug oder des Intermediats. Dieses doch recht unterschiedliche metabolische Verhalten der einzelnen Verbindungen könnte für die Entwicklung von TriPPPPro-Prodrugs je nach Zelllinie ausgenutzt werden.

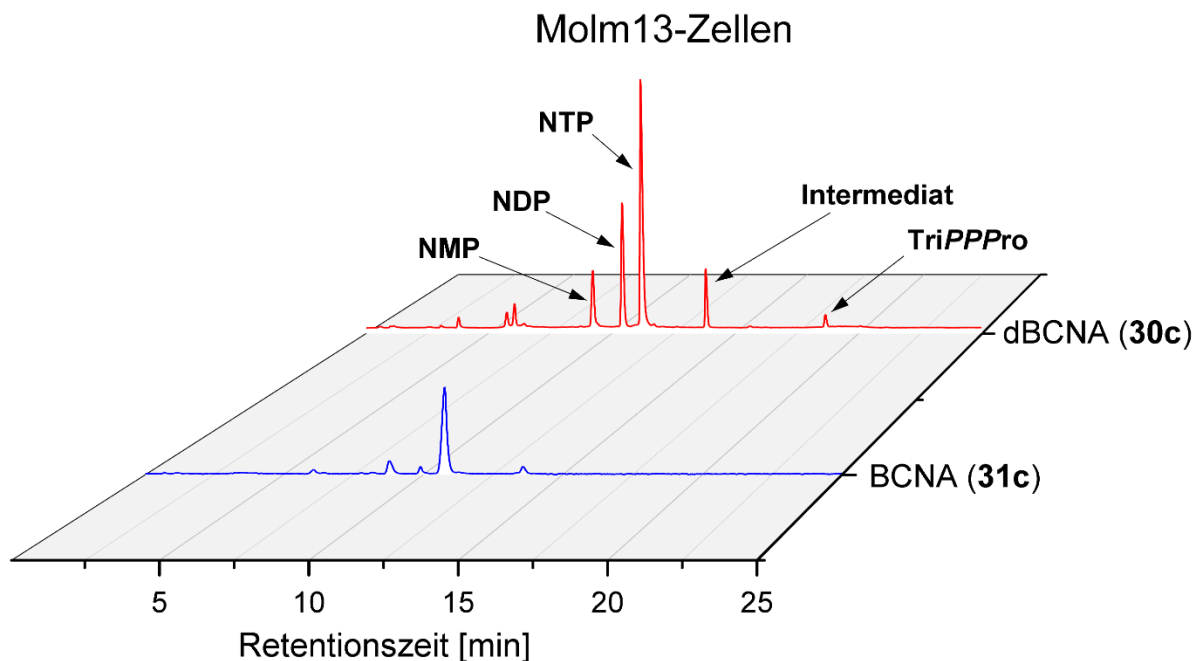


Abb. 52: Chromatogramme der Zellpellets der Zellaufnahmestudien an Molm13-Zellen für Verbindung **30c** und **31c**.

Neben dem Metabolismus der BCNA-Verbindungen ist aber besonders der Umfang der Zellaufnahme je nach Maskierungseinheit von großer Bedeutung. Um zu ermitteln, welche Substanzen am besten in die Zellen gelangten, wurden die Integrale der einzelnen Metaboliten bestimmt. Sowohl bei UV/Vis- als auch bei der Fluoreszenzspektroskopie steht die Intensität der gemessenen Signale im direkten Zusammenhang mit der Konzentration der gemessenen Substanzen. Somit kann durch die Addition der einzelnen Peakflächen der Prodrugs und Metabolite der unterschiedlichen Substanzen untereinander direkt auf die aufgenommene Substanzmenge geschlossen werden. Die zusammengefassten Werte, die für die Vergleichbarkeit auf pro 1000 Zellen berechnet wurden, sind für alle getesteten Verbindungen **30a-e** und **31b-f** über alle inkubierten Zelllinien in Abb. 53 dargestellt.

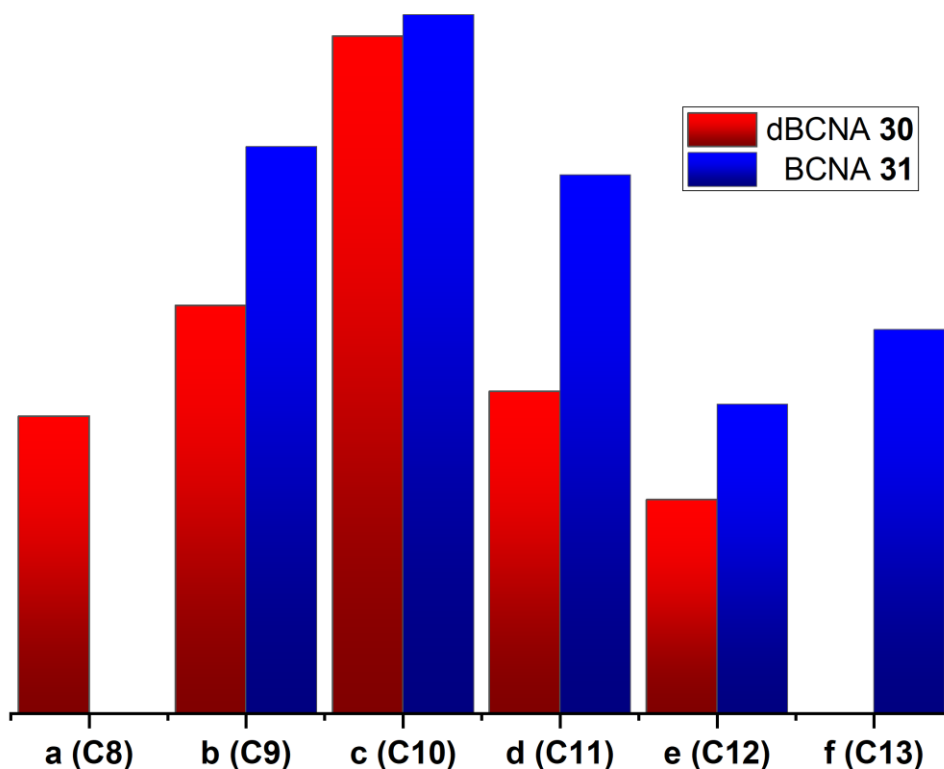


Abb. 53: Darstellung aller zusammengefassten Peakflächen für Verbindungen **30a-e** und **31b-f** über alle inkubierten Zelllinien pro 1000 Zellen.

Anhand dieser Werte kann man erkennen, dass von beiden Verbindungsreihen die Substanzen **30c** und **31c** (C₁₀) und ihre Metaboliten am besten in die Zellen gelangten. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Maskierungseinheit mit einer C₁₀-Alkylkette die besten Eigenschaften besitzt, um die getesteten Krebszellen zu gelangen. Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass dies relativ unabhängig von der Riboseeinheit der Verbindung zu sein scheint. Zwar sind Unterschiede in der Gesamtaufnahme zwischen den dBCNAs **30a-e** und den BCNAs **31b-f** für unterschiedliche Maskierungseinheiten erkennbar, insgesamt konnten aber für beide Substanztypen die AB-Einheit **c** die besten Ergebnisse erzielen. Während bei den dBCNAs dieser Trend relativ eindeutig ist, ist die Verteilung bei

den BCNAs weniger stark ausgeprägt, was nur auf das Vorhandensein der zusätzlichen 2'-Hydroxyfunktion zurückgeführt werden kann.

Anhand dieser Ergebnisse kann dennoch davon ausgegangen werden, dass für die erfolgreiche Zellaufnahme die Beschaffenheit der Maskierungseinheit von zentraler Bedeutung ist. Zusätzlich kann angenommen werden, dass die durch die Masken erzeugte Lipophilie der entscheidende Faktor ist. Somit sollten Substanzen ähnlicher Lipophilie eine ähnlich gute Zellaufnahme zeigen. Um Substanzen bezüglich ihrer Lipophilie zu vergleichen, wird meist der Verteilungskoeffizient (P-Wert, log P) verwendet, der die Konzentrationsverteilung einer Substanz zwischen einer organischen Phase und einer wässrigen Phase beschreibt. Da es sich bei den TriPPPro-Verbindungen aber um stark amphiphile Verbindungen handelt, ist die Bestimmung dieses Wertes erschwert und nur bedingt aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde die Lipophilie der TriPPPro-Verbindungen in dieser Arbeit über ihre Retentionszeit bei der RP-HPL-Chromatographie (R_T) charakterisiert. Die Retentionszeit in einem System mit definierter stationärer und mobiler Phase ist für jede Substanz spezifisch. Da sich das Elutionsverhalten einer Substanz bei einer *reversed phase* Chromatographie über die Lipophilie von dieser definiert, kann unter gleich bleibenden Bedingungen die Retentionszeit als Wert für die Gesamtlipophilie einer Substanz verwendet werden. Um alle BCNA-Substanzen bezüglich der Lipophilie untereinander vergleichen zu können, wurden diese zusammen coeluiert und ihre Retentionszeiten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 54 zusammengefasst

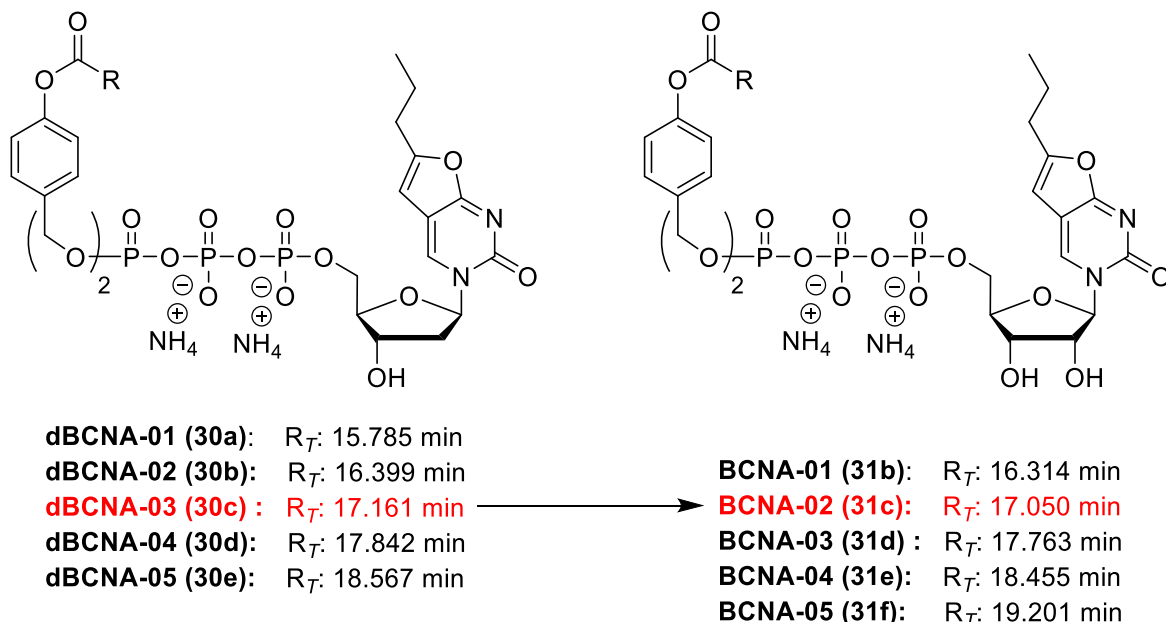


Abb. 54: Lipophilievergleich ausgewählter BCNA-Verbindungen mittels Retentionszeit (R_T) über die RP-HPL-Chromatographie.

Anhand dieser Ergebnisse in den Zellaufnahmestudien ist zu erkennen, dass die Retentionszeiten der besten Substanzen **30c** und **31c** nahezu identisch sind. Daraus folgt,

dass die Lipophilie der Substanzen ebenfalls nahezu identisch ist. Somit kann die Annahme, dass die Gesamtlipophilie einer Substanz entscheidend für die Zellaufnahme in Tumorzellen ist, bestätigt werden. Ebenfalls kann hierdurch die Annahme untermauert werden, dass die Maskierungseinheit für das Lipophilieverhalten der Substanz eine entscheidende Rolle einnimmt, die 2'-Hydroxyfunktion hingegen eine untergeordnete Rolle spielt. Es ist also anzunehmen, dass generell TriPPPro-Verbindungen, die sich hauptsächlich in ihrer Riboseinheit, nicht aber in der Maskierung unterscheiden, ähnliches Verhalten bezüglich der Zellaufnahme zeigen. Auch interessant ist die Tatsache, dass sich für jede zusätzliche Methylen-Gruppe an der Maskierungseinheit die Retentionszeit der TriPPPros um ungefähr 0.7 Minuten erhöht. Mit dieser Kenntnis lässt sich die Retentionszeit von TriPPPro-Verbindungen und somit auch die Lipophilie zuverlässig steuern. Welchen Einfluss die Nucleobase der Substanz im Vergleich zu den Maskierungseinheiten auf die Gesamtlipophilie hat, wird im Abschnitt 4.7.7 eingegangen.

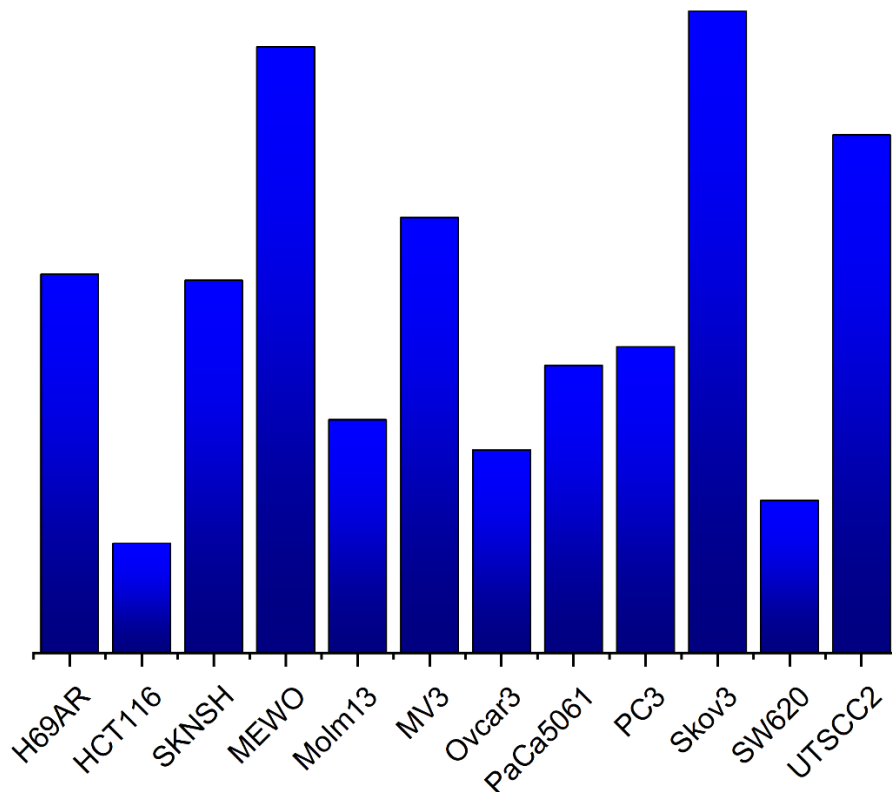


Abb. 55: Menge an detektierten Metaboliten von BCNA-02 **31c** über die Integrale in allen inkubierten Zelllinien pro 1000 Zellen.

In Abb. 55 ist die Menge an detektierten Metaboliten von BCNA-02 **31c** für alle in den Zellaufnahmestudien getesteten Zelllinien dargestellt. Hierbei wurde wieder die aufgenommene Menge auf 1000 Zellen berechnet, um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können. Insgesamt konnte in allen getesteten Zelllinien das Prodrug oder seine Metaboliten nachgewiesen werden. Es ist sehr gut zu erkennen, dass sich die

aufgenommene Menge der TriPPPPro-Verbindung je nach Zelllinie stark unterscheidet. Während besonders für die MEWO-, SkoV3- und UTSCC2-Zelllinien sehr hohe Zellaufnahmen festgestellt wurden, fällt diese bei den HCT116- und SW620-Zelllinien verhältnismäßig schlechter aus.

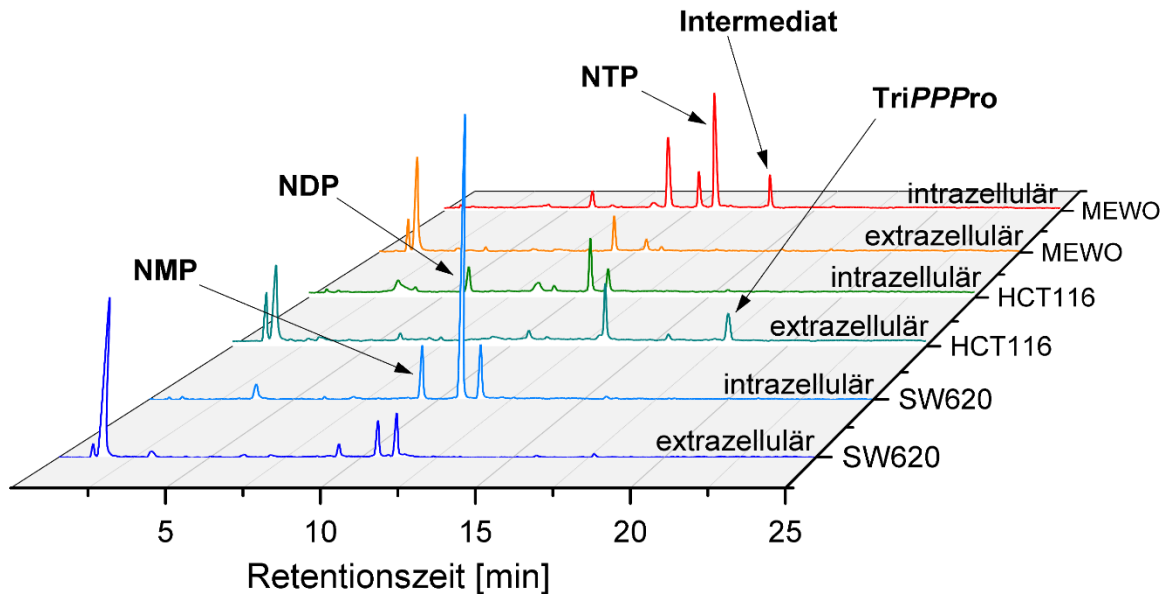


Abb. 56: Chromatogramme vom intra- und extrazellulären Raum für die MEWO-, HCT116- und SW620-Zelllinien von BCNA-02 **31c**.

Ein eindeutiger Grund für dieses Verhalten konnte in diesen Zellaufnahmestudien jedoch nicht ermittelt werden. Bei diesen Zelllinien wurde ebenfalls wie im Gesamttrend festgestellt, dass BCNA-02 **31c** insgesamt die beste Aufnahme zeigte. Die dennoch so verhältnismäßig geringe Aufnahme könnte an einer generell eher schlechten Diffusion der Prodrugs durch die Zellmembran dieser bestimmten Zelltypen zu erklären sein. Für die HCT116 kann dies anhand der Chromatogramme in Abb. 56 bestätigt werden. Hier ist zu erkennen, dass im Vergleich zur MEWO-Zelllinie, in der eine sehr gute Aufnahme festgestellt wurde, noch Prodrug außerhalb der Zellen nach einer Stunde Inkubationszeit nachgewiesen werden konnte. Für die SW620-Zelllinie hingegen konnte weder im Überstand, noch innerhalb der Zellen das Prodrug oder das Intermediat nachgewiesen werden. Da alle Zellen im gleichen Medium inkubiert wurden, kann die geringe Zellaufnahme auch nicht durch die relativ geringe Stabilität in diesem erklärt werden. Es wäre möglich, dass die Prodrugs in oder an der Zellmembran binden, und somit weder innerhalb der Zellen oder außerhalb der Zellen nachgewiesen werden können. Auch wäre es denkbar, dass die SW620-Zellen extrazelluläre Enzyme besitzen, die den Zerfall des Prodrugs außerhalb der Zelle beschleunigen. Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Studien ist dies jedoch nicht abschließend zu klären.

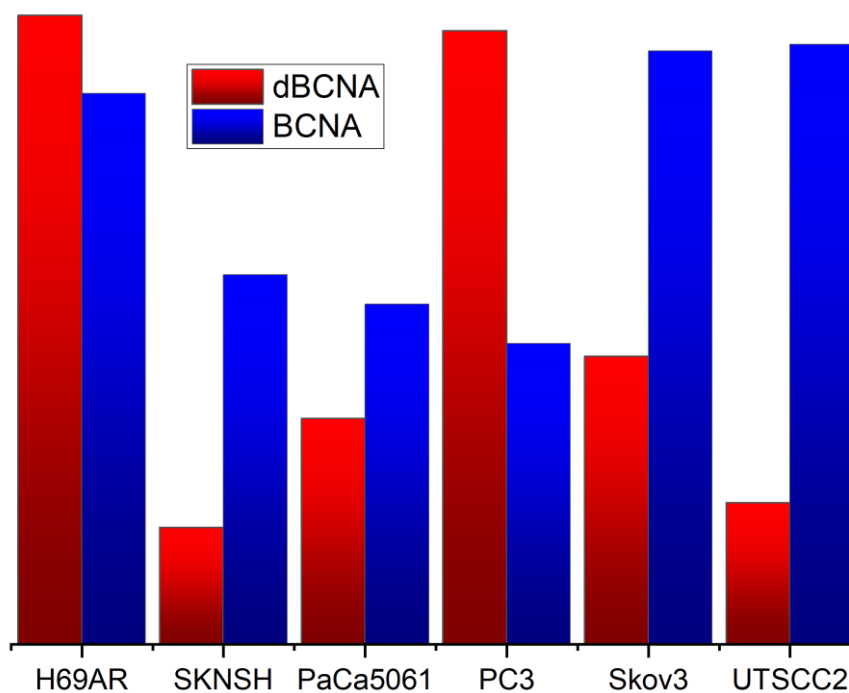


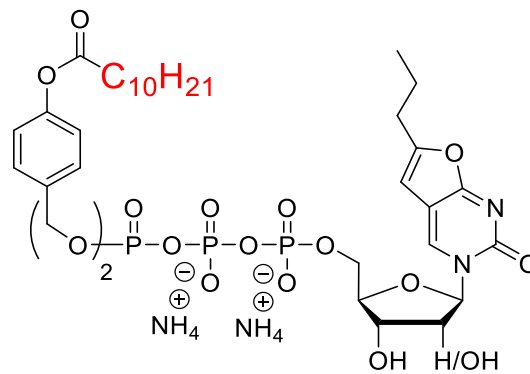
Abb. 57: Vergleich der Aufnahme zwischen dBCNAs **30** und BCNAs **31** in unterschiedlichen Zelllinien pro 1000 Zellen.

Ebenfalls interessant ist der direkte Vergleich zwischen den dBCNAs **30** und BCNAs **31**. In Abb. 57 sind die integrierten Werte für alle getesteten Verbindungen in den jeweiligen Zelllinien berechnet auf pro 1000 Zellen gegeneinander dargestellt. Hierbei kann man erkennen, dass die aufgenommene Menge an Prodrug sich teilweise stark unterscheidet, obwohl sich die getesteten Substanzen jeweils nur in der 2'-Hydroxyfunktion unterscheiden. Dies lässt den Schluss zu, dass neben der durch die Maskierungseinheiten bedingten Lipophilie der Prodrugs auch die zusätzliche OH-Funktion je nach Zelllinie von Bedeutung sein kann. Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass im Zuge dieser Arbeit keine Quantifizierungen durchgeführt wurden und auch der direkte Vergleich der Peakflächen untereinander trotz Normierung auf pro 1000 Zellen starke Abweichungen haben kann.

4.2.5 Fazit der Zellaufnahmestudien an Krebszellen

Insgesamt konnte für alle inkubierten Prodrugs in allen getesteten Zelllinien eine Zellaufnahme beobachtet werden. Ebenso wurde eine intrazelluläre Freisetzung von Nucleosidtriphosphat aus den TriPPPro-Verbindungen in allen Krebszellen nachgewiesen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl für die Ribo-BCNAs **31** als auch für die Desoxy-BCNAs **30** eine BisAB-Maskierungseinheit mit einer Kettenlänge von C₁₀ (**c**) die beste Zellaufnahme für nahezu alle getesteten Krebszelllinien darstellt. Durch eine Bestimmung der Lipophilie mittels der Retentionszeiten über RP-HPL-Chromatographie konnte für die besten Verbindungen

30c und **31c** nahezu identische lipophile Eigenschaften ermittelt werden. Hieraus lässt sich schließen, dass für die Zellaufnahme die Lipophile der Verbindungen eine entscheidende Rolle einnimmt. Zusätzlich können anhand dieser Ergebnisse Voraussagen über eine mögliche Zellaufnahme und somit Aktivität von antitumoralen TriPPPro-Verbindungen gemacht werden. Mit den neuen Leitstrukturen **30c** und **31c** können basierend auf den Ergebnissen gezielt TriPPPro-Verbindungen mit den geeigneten Maskierungseinheiten dargestellt werden, um eine beste Zellaufnahme der Substanzen zu ermöglichen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Zellaufnahme selbst, aber auch die Metabolisierung der TriPPPro-Verbindungen je nach Zelllinie stark variierte. Dies ist vor allem auf die unterschiedliche Beschaffenheit der Zellen zurückzuführen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass außerhalb der Zellen hauptsächlich das Diphosphat detektiert wurde, was auf eine Zersetzung beschleunigt durch zweiwertige Ionen im Nährmedium zurückzuführen sein könnte.



30c/31c

Abb. 58: Neue Leitstrukturen **30c** und **31c**, die bei allen Inkubationen die besten Zellaufnahmen zeigten.

4.3 Synthese antitumorale FdU-TriPPPro-Verbindungen

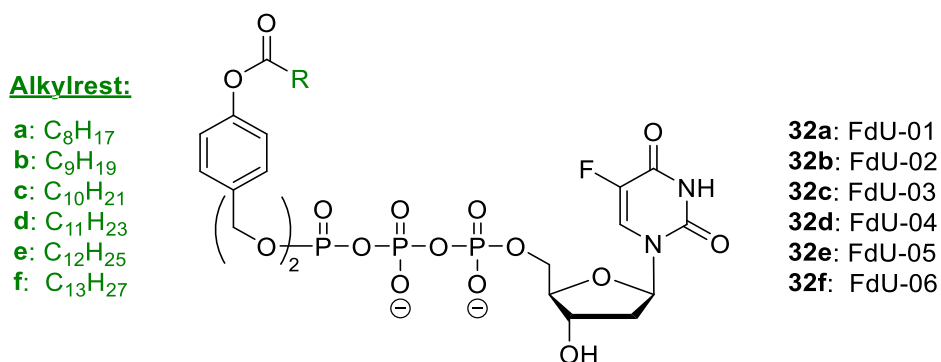


Abb. 59: Darzustellende FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a-f**.

Nachdem wie in Abschnitt 4.2 beschrieben erfolgreich gezeigt werden konnte, dass TriPPPro-Verbindungen effektiv das Nucleosidtriphosphat in verschiedenen Krebszellen freisetzen, sollte diese Strategie für antitumorale Nucleosidanaloga angewendet werden. Erste Ansätze dazu wurden in vorherigen eigenen Arbeiten am 5-FU **1**, bzw. am Floxuridin **2** (FdU) durchgeführt.¹⁴⁴ Hierbei wurde erstmals das FdU-01-TriPPPro **32a** erfolgreich über die *H*-Phosphonatroute dargestellt. Aus diesem Grund sollten alle in dieser Arbeit benötigten FdU-TriPPPro-Verbindungen ebenfalls über die *H*-Phosphonatroute erhalten werden. Die Verbindungen **32a-f** mit den Alkylresten C₈-C₁₃ sind in Abb. 59 dargestellt. Die Maskierungseinheiten wurden hierbei zwischen C₈ und C₁₃ variiert, um alle in den Zellaufnahmen verwendeten Maskierungseinheiten abzudecken. Der anschließende Vergleich der Lipophilien mit den dBCNAs **30a-e** und der Aktivität der Verbindungen **32a-f** sollte ein Beweis für den in Abschnitt 4.2 postulierten direkten Zusammenhang zwischen Lipophilie, Zellaufnahme und Aktivität erbringen. Zugleich sollte anhand dieser Verbindung erstmals die generelle Anwendbarkeit des TriPPPro-Konzeptes auf antitumorale Nucleosidanaloga ermittelt werden.

4.3.1 Wirkungsmechanismus von 5-FU

5-FU **1** wird inzwischen fast 60 Jahre in der antitumoralen Therapie eingesetzt. Dementsprechend sind die Wirkmechanismen dieses Pyrimidinanalogons sehr gut erforscht.¹⁶⁸ 5-FU **1** wirkt als Antimetabolit, wobei es als Nucleosid-5'-triphosphat in die DNA sowie RNA eingebaut wird oder es ist an der Inhibition von essenziellen biosynthetischen Prozessen beteiligt. Beim 5-FU **1** handelt es sich hierbei um die Inhibition der Thymidylat-Synthase (TS) als FdU-5'-monophosphat **68**. Der genaue Wirkmechanismus ist in Abb. 60 dargestellt. Zunächst gelangt die Verbindung durch passiven und aktiven Transport in die Zellen.¹⁶⁹ Jedoch wird bereits im Blut bis zu 80% des verabreichten 5-FU **1** in der Leber zu Dihydrofluoruracil (DHFU) **69** katabolisiert und wieder ausgeschieden, bevor es in die Zellen gelangen kann.¹⁷⁰ Innerhalb der Zellen wird 5-FU **1** zu verschiedenen aktiven Metaboliten

umgewandelt. Zum einen wird das 5-Fluoro-2'-desoxy-5'-monophosphat (FdUMP) **68** gebildet, welches die Thymidylat-Synthase inhibiert. Dieses Enzym nimmt eine entscheidende Rolle in der *de-novo*-Synthese der Pyrimidine ein, weshalb eine Inhibierung zu einer starken Unterregulierung von Thymidintriphosphat innerhalb schnell proliferierender Zellen führt. Daraus folgt eine Unterbrechung der DNA-Synthese sowie Reparatur, was in der Regel den Zelltod bewirkt.¹⁶⁸

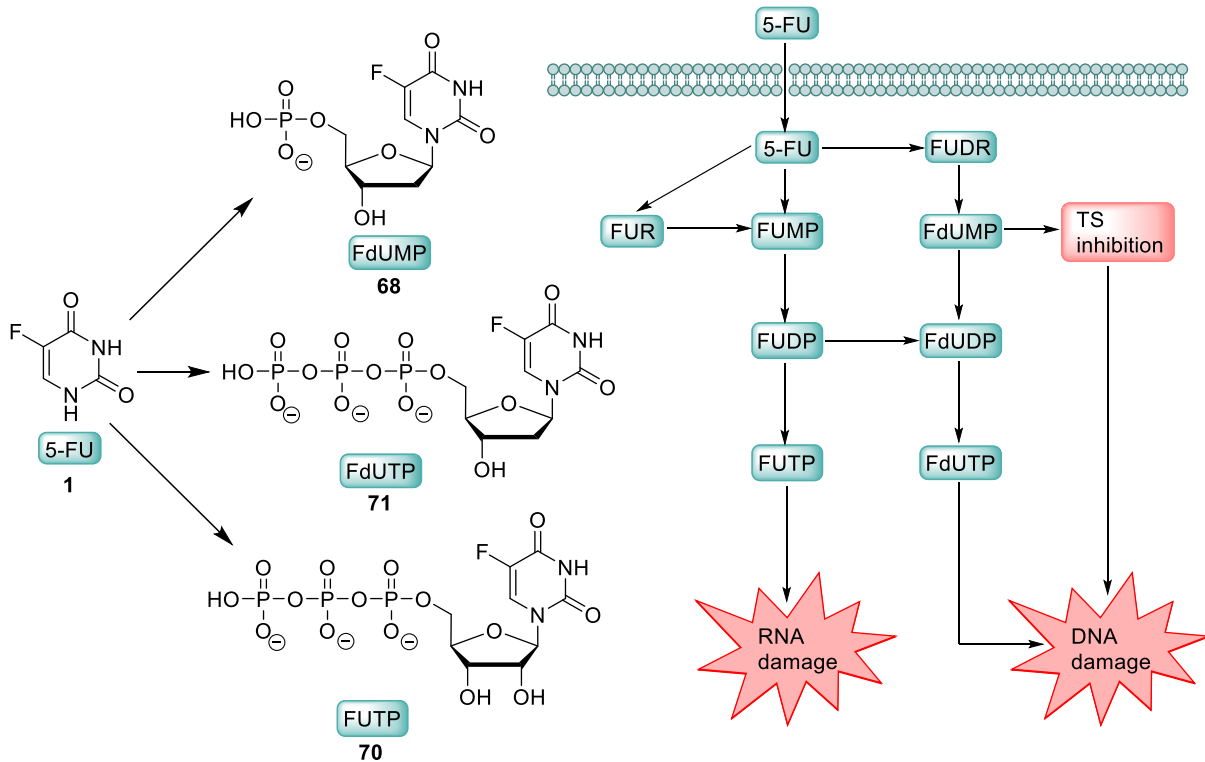


Abb. 60: Wirkungsmechanismus von 5-FU **1**.¹⁶⁸

Zusätzlich werden sowohl das FUTP **70** und das FdUTP **71** durch Glycosylierung und anschließende Phosphorylierung durch zelleigene Kinasen gebildet, die anschließend als Antimetaboliten in die DNA oder RNA eingebaut werden.¹⁶⁸ Durch die Inhibierung der TS wird innerhalb der Zellen dadurch eine große Menge an FdUTP **71** aber auch dUTP **72** akkumuliert, was zu irreparablen DNA-Schäden führt.¹⁷¹ Im Fall des Einbaus von Uracil- und 5-FU-Nucleotiden in die DNA führen die Reparaturmechanismen, in diesem Fall das Enzym Uracil-DNA-Glycosylase (UDG), sogar zu weiteren Schäden, was unweigerlich zum Zelltod führt.¹⁷² Der Einbau von FUTP **70** in die RNA führt auf vielen Ebenen der RNA-Synthese, aber auch Translation und anderer RNA-Prozessierung zu Schäden, die ebenfalls den Zelltod zur Folge haben.^{173,174}

Anhand dieser Wirkungsmechanismen ist auch gut erkennbar, warum für 5-FU **1** trotz seines großen Erfolges in der antitumoralen Therapie neue Strategien und Konzepte zur Verabreichung und verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften dringend notwendig sind. Der wichtigste Faktor für den erfolglosen Einsatz von 5-FU **1** in der Therapie sind Resistenzen. Zum einen sind manche Krebszellen in der Lage, durch verminderte

Transporteraktivität den Eintritt von 5-FU **1** in die Zellen zu erschweren. Zum anderen wurde in vielen 5-FU-resistenten Zellen eine Überexpression der Thymidylat-Synthase beobachtet.¹⁷⁵ Diese Zellen decken zusätzlich ihren Bedarf an TMP vermehrt über den *salvage pathway* durch eine Überexpression von Thymidin-Kinasen.¹⁷⁶ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Unterregulierung der Uridin Monophosphat Synthase (UMPS) die Phosphorylierung vom FdU **2** zum FdUMP **68** verhindert wird, was zu einer hohen Chemoresistenz gegenüber 5-FU **1** in zahlreichen Kolonkarzinomen führt.¹⁷⁷

Aus diesem Grund stellt das TriPPP-Pro-Konzept einen vielversprechenden Ansatz zur Steigerung der Effektivität von 5-FU **1** als antitumoralem Wirkstoff dar. Zum einen wird die Zellaufnahme durch passive Diffusion erleichtert und umgeht somit eine Abhängigkeit von Membrantransportproteinen. Zusätzlich werden alle Phosphorylierungsschritte umgangen, sodass der Wirkstoff nicht mehr so stark von zelleigenen Enzymen abhängig ist, um den aktiven Metaboliten freizusetzen. Entscheidend ist hier der erste Phosphorylierungsschritt zum FdUMP **68** durch die UMPS, da dieser Schritt oftmals der Grund für 5-FU-Resistenzen darstellt. Außerdem kann durch die direkte Freisetzung von FdU-TP **71** die zellinterne Konzentration dieses TP's erhöht werden, was die Überexpression der TS kompensiert. Zusätzlich kann angenommen werden, dass innerhalb der Zelle das freigesetzte FdUTP **71** auch zum FdUMP **68** durch zelleigene Phosphatasen gebildet wird, was den zusätzlich wichtigen Wirkungsmechanismus der TS-Inhibition auch für FdU-TriPPP-Verbindungen ermöglicht.

4.3.2 Synthese von FdU-5'-monophosphat

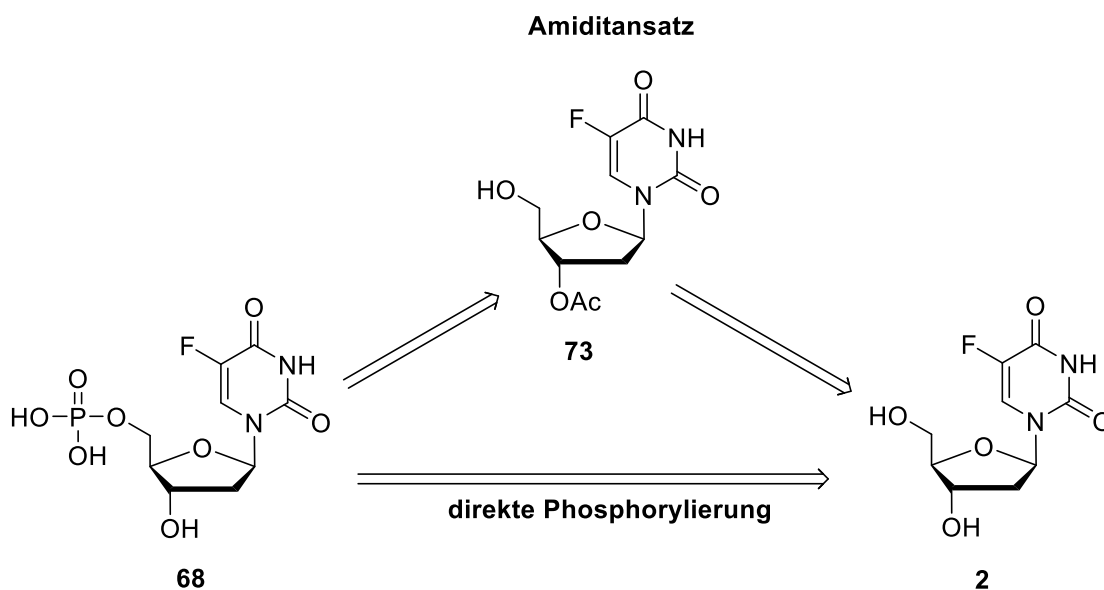


Abb. 61: Retrosyntheschema zur Darstellung von FdU-MP **68** über die Amiditchemie oder die direkte Phosphorylierung ausgehend von FdU **2**.

Wie bereits in Abschnitt 4.3 erwähnt, wurde in vorherigen Arbeiten das FdU-01 **32a** über die *H*-Phosphonatroute zugänglich gemacht. Hierfür wurde FdU-Monophosphat **68** analog zu den BCNA-Monophosphaten **52** und **53** über die selektive Schützung und anschließende Phosphorylierung mit dem Fm-Amidit **60** erhalten. Generell sind in der Literatur abgesehen von enzymatischen Reaktionen keine Synthesen zur Darstellung von FdU-MP **68** bekannt. Da in dieser Arbeit aber große Mengen an Monophosphat **68** benötigt wurden, sollten neben der Darstellung mit Hilfe der Amiditchemie auch andere Ansätze zur Phosphorylierung erprobt werden. Hierzu sollten für allem die Synthesen nach SOWA&OUCHI¹⁶¹ und YOSHIKAWA¹⁶² durchgeführt werden. Das Retrosyntheseschema ist in Abb. 61 dargestellt.

Für den Amiditansatz wird das Monophosphat **68** analog zu den BCNA-Synthesen durch Phosphorylierung mit dem Fm-Amidit-Reagenz **60** ausgehend von dem selektiv geschützten Nucleosid **73** erhalten. Dies sollte zuvor über die bereits erprobte orthogonale Schutzgruppenstrategie zur selektiven Schützung der 3'-Hydroxyfunktion mit TBDMS-Chlorid und Essigsäureanhydrid ausgehend von Floxuridin **2** erhalten werden. Da diese Phosphorylierung insgesamt drei Reaktionsschritte benötigt, erscheint die Wahl einer Methode zur direkten Phosphorylierung sinnvoll. Hierfür wurde in vorherigen Arbeiten die Methode nach SOWA&OUCHI¹⁶¹ erprobt, mit der vor allem GOLLNEST¹⁴³ gute Ergebnisse zur Phosphorylierung von Nucleosiden erzielte. Hierbei wird *in situ* Tetrachlorpyrophosphat **74** als Phosphorylierungsreagenz gebildet, indem man ein Gemisch aus Phosphorylchlorid, Wasser und Pyridin (2:1:2 v/v/v) in Acetonitril herstellt (Abb. 62). Durch die Zugabe des Nucleosids wird zunächst das Nucleosid-Pyrophosphat-Addukt erhalten, welches durch eine wässrige Aufarbeitung zum Monophosphat hydrolysiert wird.¹⁶¹

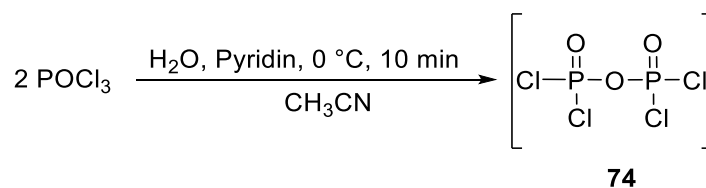


Abb. 62: *In situ*-Bildung des Tetrachlorpyrophosphats nach SOWA&OUCHI.¹⁶¹

Für diese Methode konnte jedoch nicht das gewünschte FdU-Monophosphat **68** erhalten werden. Obwohl die Umsetzung zum Monophosphat erfolgte, wurde auch das unerwünschte 3',5'-diphosphorylierte Nebenprodukt in erheblichen Mengen gebildet. Dies ließ sich auch nach mehreren Reinigungsschritten nicht vollständig vom gewünschten 5'-Produkt abtrennen. Weitere Ansätze über die Methode nach SOWA&OUCHI wurden im Zuge dieser Arbeit nicht erprobt.

Die zweite Möglichkeit zur direkten Phosphorylierung stellt der Ansatz nach YOSHIKAWA¹⁶² dar. Hierbei wird ebenfalls Phosphorylchlorid als Phosphorylierungsreagenz verwendet. Als Lösungsmittel werden Trialkylphosphate eingesetzt, meistens Trimethylphosphat (TMP) oder

Triethylphosphat (TEP). YOSHIKAWA konnte feststellen, dass in diesen Lösungsmitteln in der Regel eine hohe Löslichkeit für Nucleoside gewährleistet ist, zum anderen verkürzte sich die Reaktionszeit deutlich. Grund hierfür ist die Bildung der aktivierten Spezies **75**, welche in Abb. 63 dargestellt ist.¹⁷⁸

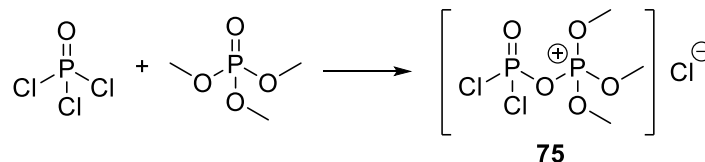


Abb. 63: Von YOSHIKAWA postuliertes aktives Reagenz **75** gebildet aus POCl_3 und TMP.

Ebenfalls beschrieb YOSHIKAWA, dass durch eine Zugabe von geringen Mengen Wasser die Selektivität gegenüber der 5'-Position deutlich erhöht wird. Dies ist vor allem dadurch zu erklären, dass das durch die Reaktion freiwerdende HCl in Verbindung mit Wasser zu sauren Reaktionsbedingungen führt. Dadurch werden die 2'- und 3'-Hydroxyfunktionen in ihrer protonierten Form gehalten, was ihren nucleophilen Charakter stark verringert und somit lediglich die 5'-Position nucleophil genug ist, um eine Substitution am Phosphorylchlorid zu vollziehen.^{162,178} Nach dem Beenden der Reaktion wird das gebildete Phosphordichloridat durch eine wässrige Aufarbeitung in das freie 5'-Monophosphat überführt.

Bei einigen Nucleosiden wurde jedoch in späteren Arbeiten festgestellt, dass die Zugabe von Wasser und damit einhergehenden sauren Reaktionsbedingungen zur Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung führt.¹⁷⁹ Es konnte gezeigt werden, dass durch wasserfreies Arbeiten und Zugabe von verschiedenen Basen auch säureempfindliche Nucleoside erfolgreich zu ihren 5'-Nucleotiden umgesetzt werden konnten. Bewährt haben sich Tributylamin und 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalen (Protonenschwamm). Hierbei handelt es sich um nicht nucleophile starke Basen, weshalb die Deprotonierung hauptsächlich an der 5'-Position erfolgt.¹⁸⁰

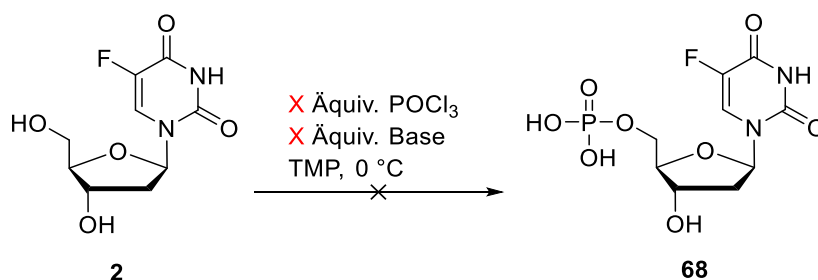


Abb. 64: Versuch der Synthese von FdU-MP **44** über die YOSHIKAWA-Reaktion mit Zusatz von Base.

Auch über die YOSHIKAWA-Reaktion konnte das FdU-MP **68** nicht durch direkte Phosphorylierung erhalten werden. Hierzu wurden zunächst Reaktionsbedingungen mit einer relativ hohen Anzahl an Äquivalenten an POCl_3 und Protonenschwamm verwendet, da mit diesen Bedingungen in der Arbeitsgruppe bei anderen Nucleosiden gute Ergebnisse erzielt wurden (Abb. 64). Hierbei wurde jedoch nach kurzer Reaktionszeit von 30 min bereits eine

Vielzahl an Nebenprodukten beobachtet, weshalb der Ansatz direkt verworfen wurde. Auch die Verringerung der Äquivalentzahl an POCl_3 und das Wechseln der Base von Protonenschwamm zu Tributylamin führte kaum zur Verringerung der Nebenprodukte. Bei einzelnen Isolationsversuchen nach Beenden der Reaktion konnte kein sauberes Produkt erhalten werden.

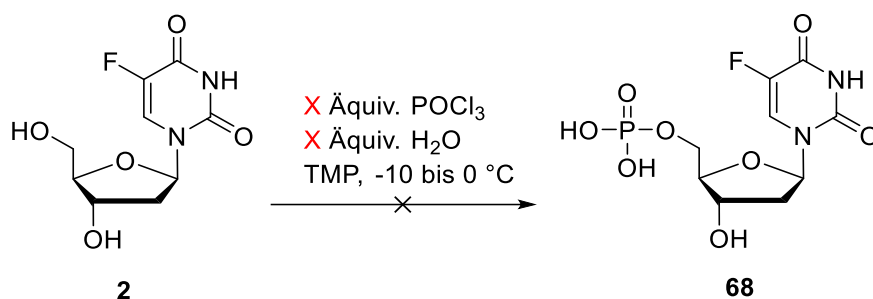


Abb. 65: Versuch der Synthese von FdU-MP **68** über die YOSHIKAWA-Reaktion ohne Base und mit Zusatz von Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen.

Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen weiter variiert. Da eine vermehrte Phosphorylierung an der 3'- und 5'-Position beobachtet wurden, sollte in den nächsten Ansätzen auf die Base als Zusatz verzichtet werden (Abb. 65). Da das Nucleosid unter sauren Bedingungen stabil ist und somit eine Selektivität der Phosphorylierung erzielt wird, erschien dieser Ansatz sinnvoll. Jedoch konnte auch hier das FdU-MP **68** nicht sauber isoliert werden. Wie bei den vorherigen Versuchen wurde während der Reaktion bereits eine Vielzahl an Produkten beobachtet, die nicht identifiziert werden konnten. Auch die gezielte Zugabe von wenigen Äquivalenten Wasser konnte nicht wie von YOSHIKAWA beschrieben zur Verbesserung der Selektivität beitragen.¹⁶² Ebenso schien die Reaktionstemperatur keinen Einfluss auf die Reaktion selbst zu nehmen. Da aber neben der unerwünschten Phosphorylierung an der 3'-Position auch andere nicht identifizierte Produkte entstanden sind, wurde auf weitere Versuche der direkten Phosphorylierung verzichtet. Insgesamt konnte durch zahlreiche Versuche gezeigt werden, dass weder die Methode nach SOWA&OUCHI, noch die nach YOSHIKAWA geeignete Phosphorylierungsreaktionen für die Synthese von FdU-MP **68** sind.

Somit wurde wieder auf die Amidchemie zurückgegriffen. Hierzu musste zunächst das selektiv geschützte Nucleosid **73** dargestellt werden (Abb. 61). Die Reaktionsbedingungen orientierten sich dabei an den vorherigen Arbeiten¹⁴⁴ und sind den Reaktionsbedingungen für die selektive 3'-Acetyl-Schätzung in Abschnitt 4.2.1 identisch. Die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 66 dargestellt.

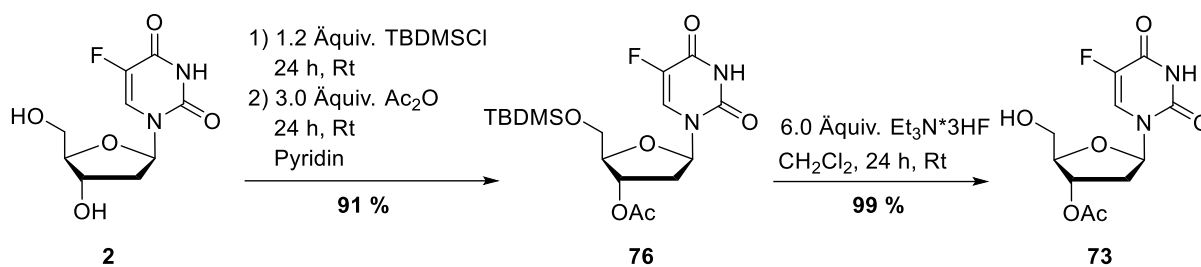


Abb. 66: Synthese des 3'-acetylierten FdUs **73** über orthogonale Schutzgruppenstrategie.

Zunächst wird mit TBDMS-Chlorid und Essigsäureanhydrid das orthogonal geschützte Nucleosid **76** dargestellt, welches anschließend mit einem Fluoridendonator wieder desilyliert wird. Beide Reaktionen gelangen in sehr guten Ausbeuten und nach Optimierungen der Reinigungsprozesse auch mit wenig Aufwand. Das zur Phosphorylierung benötigte 3'-geschützte FdU **73** konnte somit in einer Gesamtausbeute von 90 % über zwei Stufen in ausreichenden Mengen erhalten werden.

Anschließend erfolgte die Phosphorylierung zum FdU-MP **68**. Dies erfolgte wieder über die Amiditchemie, wie sie in Abschnitt 4.2 für die Synthese der BCNA-Monophosphate verwendet wurde. Die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 67 dargestellt.

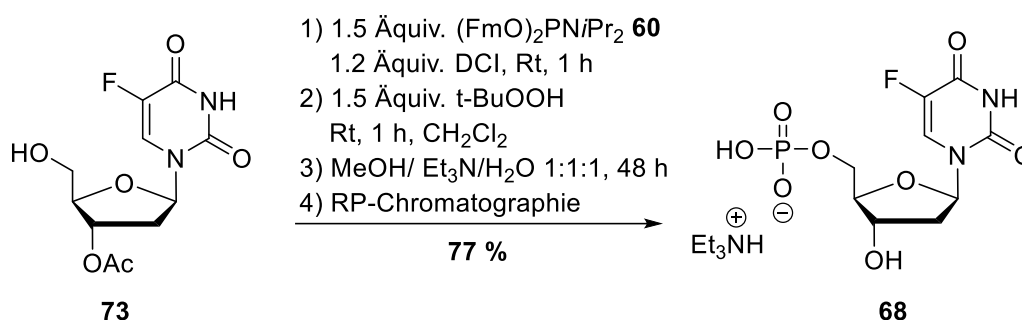


Abb. 67: Synthese von FdU-MP **68** mit dem Fm-Amidit **60**.

Das Nucleosid **73** wurde hierbei mit 1.5 Äquivalenten des Fm-Amidits **60** und 1.2 Äquivalenten nach dem Protokoll von WEINSCHENK¹⁶⁶ versetzt. Nach der Oxidation wird so das vollständig geschützte Monophosphat erhalten, welches jedoch wie in Abschnitt 4.2 beschrieben nicht vollständig isoliert wurde. Nach einer automatisierten Säulenchromatographie an Kieselgel wurde das noch verunreinigte Monophosphat zur Entschützung in einem Wasser/Methanol/Triethylamin-Gemisch 1:1:1 aufgenommen, um sowohl die Acetylgruppe als auch die Fm-Schutzgruppen vollständig abzuspalten. Hierbei wurde beobachtet, dass im Vergleich zu den BCNAs in Abschnitt 4.2 die zweite Fm-Schutzgruppe nach 24 Stunden in größeren Reaktionsansätzen noch nicht vollständig gespalten war. Aus diesem Grund wurde für dieses Nucleosid eine Reaktionszeit von mindestens 48 Stunden gewählt, um stets eine vollständige Abspaltung aller Schutzgruppen zu gewährleisten. Für die Reinigung wurde das bei der Reaktion ausfallende Dibenzofulven **61** mittels Filtration abgetrennt und anschließend eine automatisierte

Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel durchgeführt. Bei größeren Ansätzen musste die Chromatographie in der Regel ein zweites Mal durchgeführt werden, um eine ausreichende Reinheit erreichen zu können. Insgesamt konnte das FdU-Monophosphat **68** so über die Amidchemie in einer sehr guten Ausbeute von 77 % zugänglich gemacht werden, welche durch ein optimiertes Reaktions- und Reinigungsprotokoll im Vergleich zu vorherigen Arbeiten um fast 20 % gesteigert werden konnte.¹⁴⁴ Für größere Ansätze wurde außerdem kein Abfall der Ausbeute beobachtet, was bei Phosphorylierungen ansonsten häufig der Fall ist. Diese Ergebnisse zeigen erneut, dass für die Synthese von Monophosphaten die Amidchemie ein zuverlässiges Werkzeug darstellt, sogar dann wenn die gängigen Phosphorylierungsmethoden wie die Reaktionen nach SOWA&OUCHI und YOSHIKAWA nicht erfolgreich sind.

4.3.3 Synthese der FdU-TriPPPro-Verbindungen

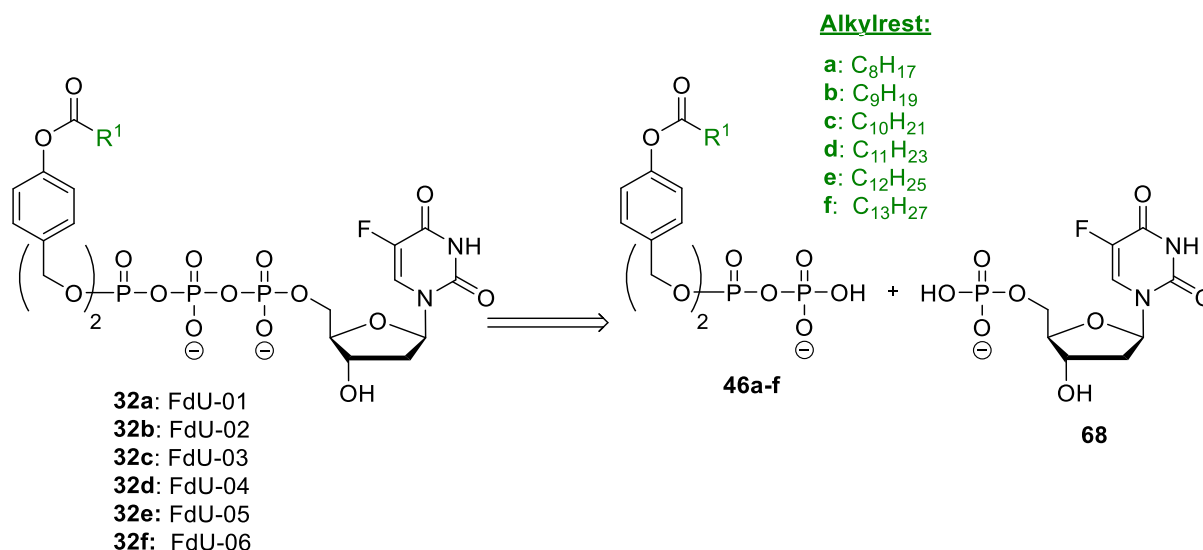


Abb. 68: Retrosyntheschema der FdU-TriPPPro-Verbindungen FdU-01 bis FdU-06 **32a-f**.

Für die Synthese der FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a-f** wurde wieder der Ansatz über die *H*-Phosphonatroute gewählt. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 68 dargestellt. Hierbei sollten die Pyrophosphate **46a-f** (Abschnitt 4.1.2) mit dem FdU-Monophosphat **68** umgesetzt werden. Dies erfolgte über die stufenweise Aktivierung der maskierten Pyrophosphate **46a-f** mit TFAA und 1-Methylimidazol, wie sie im Detail bereits in Abschnitt 4.2.2 erläutert wurde. Die genauen Reaktionsbedingungen sind Abb. 69 dargestellt. Nach der Aktivierung wurde das FdU-Monophosphat **68** zur Reaktionslösung gegeben. Hierbei stellte sich heraus, dass das Monophosphat **68** auf Triethylammoniumionen nur eine sehr geringe Löslichkeit besitzt. Aus diesem Grund wurde für alle Reaktionen ab dem zweiten Aktivierungsschritt *N,N*-Dimethylformamid (DMF) anstatt Acetonitril als Lösungsmittel verwendet, was insgesamt eine gute Löslichkeit aller verwendeten Komponenten gewährleistete. Die Reaktionen wurden mittels RP-HPL-Chromatographie bezüglich ihres Umsatzes kontrolliert, der je nach

Maskierungseinheit stark variierte. Nach Beenden der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Rohprodukt zunächst über eine automatisierte RP18-Säulenchromatographie auf Tetra-*n*-butylammoniumionen gereinigt, worauf sich ein Ionenaustausch über DOWEX-Ionenaustauscherharz auf Ammoniumionen und eine zweite automatisierte RP-Säulenchromatographie anschloss.

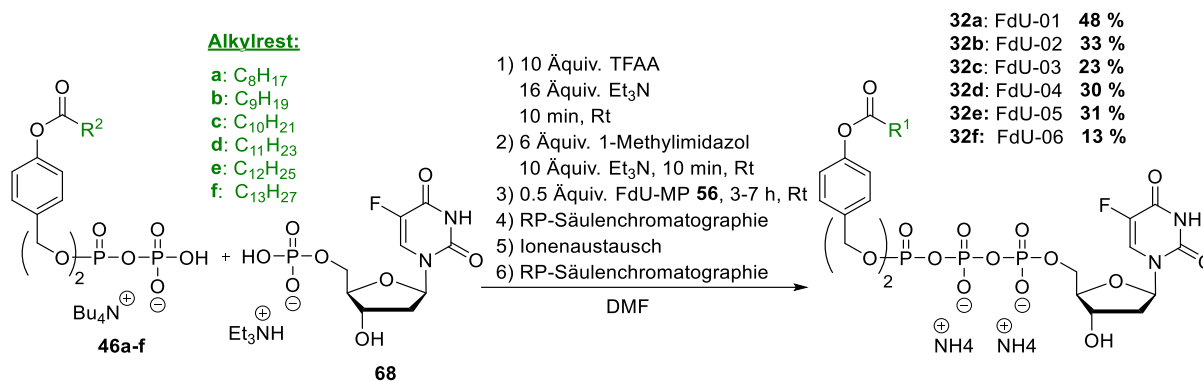


Abb. 69: Synthese von FdU-01 bis FdU-06 **32a-f**.

Insgesamt konnten alle TriPPPro-Verbindungen **32a-f** mit Hilfe dieses Reaktionsprotokolls in Ausbeuten von 13-48 % erhalten werden. Ebenso wie bei den BCNA-Verbindungen wurde auch hier beobachtet, dass bei längeren Maskierungseinheiten sich zum einen die Löslichkeit des Pyrophosphats verringerte, zum anderen wurden längere Reaktionszeiten für den Kupplungsschritt benötigt. Für das FdU-TriPPPro **32f** wurde insgesamt eine Reaktionszeit von sieben Stunden benötigt, um einen nahezu vollständigen Umsatz zu bekommen. Des Weiteren wurden bei diesen Verbindungen im Vergleich zu den BCNAs oftmals mehr als zwei Chromatographieschritte benötigt, da nach dem Ionenaustausch und der zweiten säulenchromatographischen Reinigung oftmals noch Tetra-*n*-butylammoniumionen vorhanden waren. In diesem Fall wurden ein erneuter Ionenaustausch und eine weitere RP18-Säulenchromatographie durchgeführt, bis das Produkt in ausreichender Reinheit erhalten wurde. Die schlechte Ausbeute von Verbindung **32f** mit gerade einmal 13 % kann auf mehrere Gründe zurückzuführen sein. Einerseits war der Umsatz wie auch bei BCNA **31f** nicht vollständig. Hierbei wurde die Ursache bei der geringeren Löslichkeit und der stärkeren sterischen Abschirmungen gegenüber dem Nucleophil gesehen. Die Tatsache, dass bei der FdU-Verbindung **31f** derselbe Effekt zu beobachten war, unterstreicht diese Hypothese. Interessant ist auch, dass bei der TriPPPro-Verbindung **32f** im Vergleich zur Verbindung **31f** die säulenchromatographische Reinigung an RP18-Kieselgel durchgeführt werden konnte. Für Verbindung **31f** mit derselben Maskierungseinheit war ein Wechsel auf RP8-Kieselgel notwendig, um eine Retention des Produktes auf Tetra-*n*-butylammoniumionen zu erhalten. Daher ist davon auszugehen, dass bedingt durch die unterschiedliche Nucleobase, Verbindung **32f** eine geringere Lipophile als die Verbindung **31f** aufweist.

In Abb. 70 sind beispielhaft das ^1H - sowie das ^{31}P -NMR-Spektrum der FdU-TriPPPro-Verbindung **32b** dargestellt. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt die für das Nucleosid und die AB-Maskierungen die typischen Signale und eine hohe Reinheit. Außerdem sind im ^{31}P -NMR-Spektrum die für die TriPPPro-Verbindungen typischen Signale mit den zu erwartenden Verschiebungen und Aufspaltungsmustern zu erkennen. Während das α - und γ -Phosphoratom ein Duplett bilden, ist das β -Phosphoratom als Pseudotriplett erkennbar.

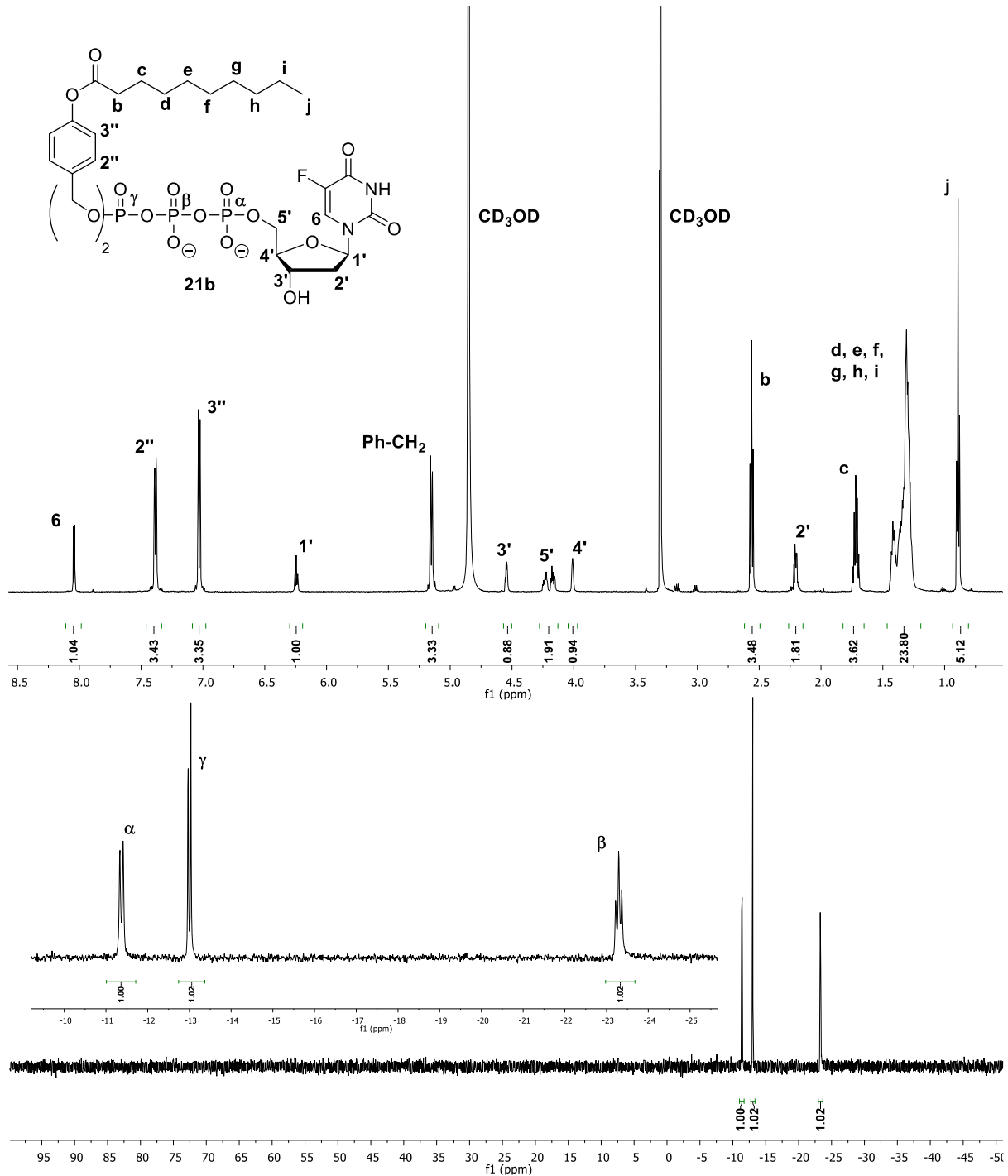


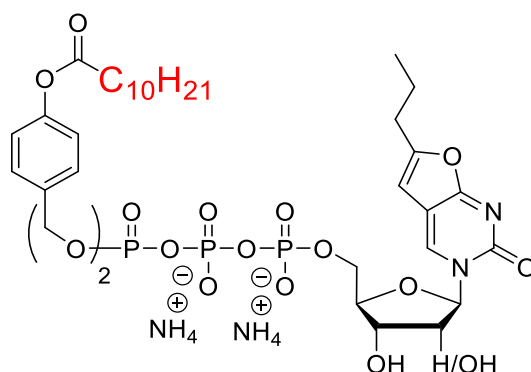
Abb. 70: ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektrum von FdU-TriPPPro-Verbindung **32b**.

Insgesamt konnten alle gewünschten FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a-f** über die *H*-Phosphonatroute in guten bis mäßigen Ausbeuten erhalten werden. Jedoch gestaltete sich

vor allem die Reinigungsprozedur im Vergleich zu den BCNAs aufwendiger, worauf die vergleichsweise etwas schlechteren Ausbeuten zurückzuführen sind. Dennoch waren nach mehrfach durchgeführten Ionentausch-Prozeduren und wiederholten automatisierten Säulenchromatographien alle FdU-Tri*PPP*o-Verbindungen **32a-f** über diese Syntheseroute in hoher Reinheit zugänglich.

4.4 Lipophilievergleich der FdU-TriPPPro-Verbindungen mit den BCNA-Verbindungen

Wie bereits in Abschnitt 4.2.4 erwähnt, konnte durch die Ergebnisse der Zellaufnahmestudien eine direkte Korrelation zwischen Lipophilie und Zellaufnahme in allen getesteten Krebszelllinien festgestellt werden. Da ebenfalls davon ausgegangen werden kann, dass eine gute Zellaufnahme zu einer hohen Aktivität führt, ist die Lipophile der Substanzen ebenfalls mit der Aktivität verknüpft. Einen Hinweis hierfür liefern bereits Aktivitätstests mit antiviralen Nucleosidanaloga. Bei diesen Tests hat sich gezeigt, dass bestimmte Acylreste unabhängig vom Nucleosid selbst gute Aktivitäten erzielen.^{142,152} In dieser Arbeit wurde jedoch erstmals mit Hilfe von Zellaufnahmestudien eine direkte Korrelation zwischen Lipophilie und Zellaufnahme bestätigt. Wie in Abschnitt 4.2.4 ermittelt, haben sich für die Zellaufnahme die dBCNA-Verbindung **30c** und die BCNA-Verbindung **31c** als geeignetste Substanzen erwiesen (Abb. 71). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass antitumorale TriPPPro-Verbindungen mit ähnlichen lipophilen Eigenschaften eine gute Zellaufnahme und somit eine hohe antitumorale Aktivität besitzen.



30c/31c

Abb. 71: Ermittelte Leitstrukturen **30c** und **31c**, die bei den Zellaufnahmestudien die höchste Zellaufnahme zeigten.

Um eine Prognose der Aktivitäten der dargestellten FdU-Verbindungen **32a-f** zu erhalten, musste ihre Lipophilie ermittelt und direkt mit den BCNA-Verbindungen **30a-e** und **31b-f** verglichen werden. Hierzu sollte die Lipophilie wieder anhand der Retentionszeit über RP-HPL-Chromatographie charakterisiert werden. Beim Vergleich der Lipophilien ist wichtig, dass die zu vergleichenden Substanzen direkt zusammen oder direkt hintereinander analysiert werden. Es konnte beobachtet werden, dass trotz standardisierter Bedingungen, unter denen die HPLC betrieben wurde, durch geringste Veränderungen starke Schwankungen in der Retentionszeit entstehen. Beispiele hierfür können der Wechsel der Säule aber auch leichte Schwankungen im pH-Wert des verwendeten Puffers darstellen. Aus diesem Grund können die jeweils ermittelten Retentionszeiten gleicher Substanzen in einzelnen Abschnitten dieser Arbeit unterschiedlich ausfallen, da diese zu unterschiedlichen

Zeitpunkten gemessen wurden. Die Retentionszeiten im direkten Vergleich sind in Abb. 72 gegenübergestellt.

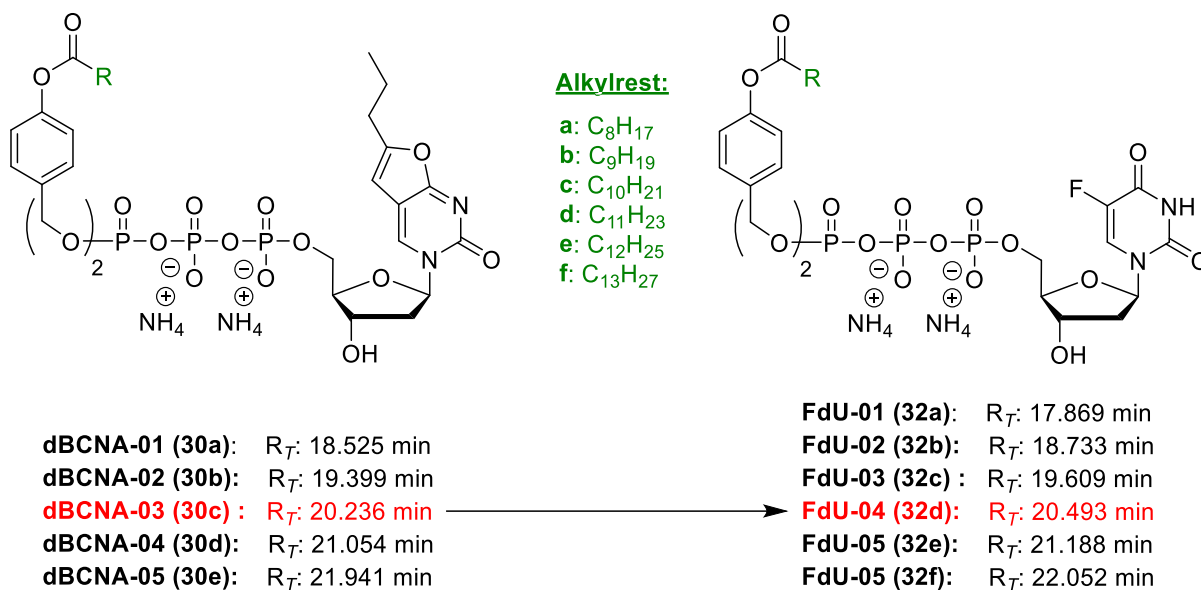


Abb. 72: Lipophilievergleich der dBCNAs 01-05 **30a-e** mit den FdU-Verbindungen 01-06 **32a-f**.

Anhand der ermittelten Retentionszeiten ist auffällig, dass Verbindung FdU-04 **32d** die ähnlichsten lipophilen Eigenschaften verglichen mit der Leitstruktur **30c** aufweist. Interessant ist hierbei, dass es sich dabei nicht um den Acylrest **c** (C₁₀) wie bei den BCNA-Verbindungen handelt, sondern um Acylrest **d** (C₁₁). Bei den BCNA-Verbindungen konnte beim Lipophilievergleich kein oder nur ein sehr geringer Einfluss der 2'-Hydroxyfunktion auf die Gesamtlipophilie der TriPPPPro-Verbindung festgestellt werden. Bei einer gänzlich unterschiedlichen Nucleobase hingegen scheint der Einfluss größer zu sein. Es ist also davon auszugehen, dass die 5-FU-Nucleobase im Vergleich zur BCNA-Nucleobase eine wesentlich geringere Lipophilie aufweist, was somit durch einen lipophileren Acylrest der Maskierungseinheiten kompensiert werden muss. Dieser Sachverhalt ist bei der Synthese weiterer TriPPPPro-Verbindungen mit unterschiedlichen Nucleosiden zu berücksichtigen.

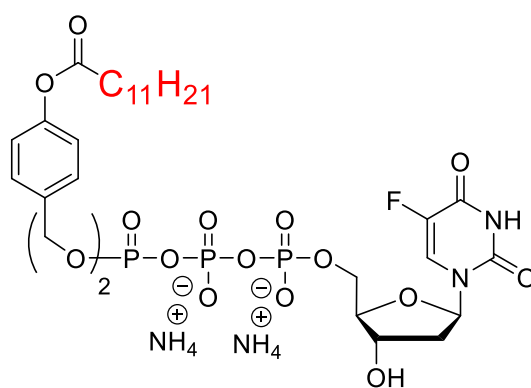
Ebenfalls interessant ist die Verschiebung der Retentionszeit für jede Methylengruppe, die dem Acylrest hinzugefügt wird. Wie in Abschnitt 4.2.4 beobachtet, erhöht sich die Retentionszeit bei jeder Methylengruppe pro Maskierungseinheit um durchschnittlich 0.7 bis 0.8 Minuten. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt wie die 2'-Hydroxyfunktion unabhängig von der Nucleobase der TriPPPPro-Verbindung ist. Um diesen Effekt deutlicher darzustellen, sind die Retentionszeiten in Tab. 3 zusammengefasst und gegenübergestellt.

Tab. 3: Retentionszeiten R_7 [min] der dBCNA-Verbindungen **30a-e** im Vergleich zu den FdU-Verbindungen **32a-f**.

	a (C ₈)	b (C ₉)	c (C ₁₀)	d (C ₁₁)	e (C ₁₂)	f (C ₁₃)
dBCNA	18.525	19.399	20.236	21.054	21.941	
FdU	17.869	18.733	19.609	20.493	21.188	22.052

Die Verbindungen mit den gleichen Retentionszeiten sind hier mit den gleichen Farben dargestellt. Anhand dieser Daten ist eindeutig zu erkennen, dass die Lipophilien der einzelnen Verbindungen auch mit steigender Acylrestlänge immer um eine Methylengruppe verschoben sind. Somit kann jeder FdU-TriPPPro-Verbindung anhand ihrer ermittelten Lipophilie eine gute oder weniger gut zu erwartende Zellaufnahme zugeordnet und somit auch ihre vermutliche Aktivität prinzipiell vorhergesagt werden.

Anhand der Lipophilievergleiche der BCNA-Verbindungen aus den Zellaufnahmestudien und den dargestellten, potenziell antitumoral aktiven FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a-f** kann davon ausgegangen werden, dass das Prodrug FdU-04 **32d** (Abb. 73) am besten in die Krebszellen eindringen kann. Dadurch sollte bei den Proliferationsessays erwartungsgemäß diese Verbindungen auch die besten Resultate erzielen. Wäre dies der Fall, könnte erstmals ein eindeutiger Nachweis vom Zusammenhang von Lipophilie, Zellaufnahme und Aktivität erbracht werden. Tatsächlich konnte in Proliferationsstudien gezeigt werden, dass die Substanz FdU-04 **32d** in allen getesteten Krebszelllinien die besten antitumoralen Eigenschaften aufweist (Abschnitt 4.6).



32d

Abb. 73: Durch Lipophilievergleich ermitteltes, prognostiziert antitumoral aktivstes FdU-TriPPPro-Prodrug **32d**.

4.5 Hydrolyseverhalten der FdU-TriPPPro-Verbindungen

Wie für alle TriPPPro-Verbindungen sollte für die Prodrugs FdU-01 bis FdU-06 **32a-f** das chemische und enzymatische Hydrolyseverhalten untersucht werden. Die FdU-Verbindungen sollten dafür zur Bestimmung der chemischen Stabilität wie bereits für die BCNA-TriPPPro-Verbindungen in PBS-Puffer (pH = 7.3) inkubiert werden. Für die enzymatische Stabilität wurden exemplarisch einige der Prodrugs mit Schweineleberesterase inkubiert. Zusätzlich wurden die Substanzen FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** in Zellextrakt inkubiert. Des Weiteren wurden Hydrolysestudien in humanem Blutplasma und Inkubationen mit humanem Albumin zur Analyse von Proteinbindungseigenschaften durchgeführt. Auf diese Hydrolysen wird in Abschnitt 4.10 genauer eingegangen.

4.5.1 Hydrolyse der FdU-TriPPPro-Verbindungen in PBS-Puffer und mit PLE

Für die Untersuchung der chemischen Stabilität der FdU-Prodrugs wurden zunächst alle Substanzen in PBS-Puffer unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.3, 37 °C) inkubiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden anschließend Aliquote entnommen und die Metabolite anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Hierbei wurde für die UV/Vis-Detektion eine Wellenlänge von 270 nm gewählt, da dies das spezifische Absorptionsmaximum der FdU-Nucleotide darstellt. Die dadurch ermittelten Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der einzelnen Verbindungen sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Chemische Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ für FdU-01 bis 06 (**32a-f**) in PBS.

		$t_{1/2}(1)$ in PBS [h]				
FdU-01 bis 06	C₈ (a)	C₉ (b)	C₁₀ (c)	C₁₁ (d)	C₁₂ (e)	C₁₃ (f)
32	55	55	50	52	55	51

Für alle getesteten Verbindungen beträgt die Halbwertszeit zwischen 50 und 55 Stunden. Daraus kann geschlossen werden, dass alle FdU-Prodrugs **32a-f** eine ausreichende chemische Stabilität unter physiologischen Bedingungen besitzen. Diese Halbwertszeiten entsprechen den meisten von GOLLNEST ermittelten Halbwertszeiten für diese Maskierungen an anderen Nucleosidanaloga, wobei sie teilweise etwas höher oder niedriger sind (44 - 90 h für d4T-TriPPPro-Verbindungen).¹⁴³

In Abb. 74 sind exemplarisch die genauen Hydrolyseverläufe von FdU-01 **32a** (R = C₈) und FdU-05 **32e** (R = C₁₂) abgebildet. Für FdU-01 **21a** ist eindeutig zu erkennen, dass das hauptsächlich gebildete Produkt nach 350 Stunden das Intermediat darstellt, während bei FdU-05 **32e** größtenteils bereits das Nucleosidtriphosphat vorhanden ist. Da die Hydrolysehalbwertszeit $t_{1/2}(1)$ für beide Substanzen nahezu identisch ist, muss dieser Sachverhalt in der stark unterschiedlichen Halbwertszeit $t_{1/2}(2)$ des Intermediats, begründet

sein. Diese Halbwertszeiten wurden aber nicht eindeutig bestimmt, da vor allem bei der Verbindung **32a** diese außerhalb physiologisch relevanter Zeiten liegt und die Messungen dafür erheblich verlängert werden müssten.

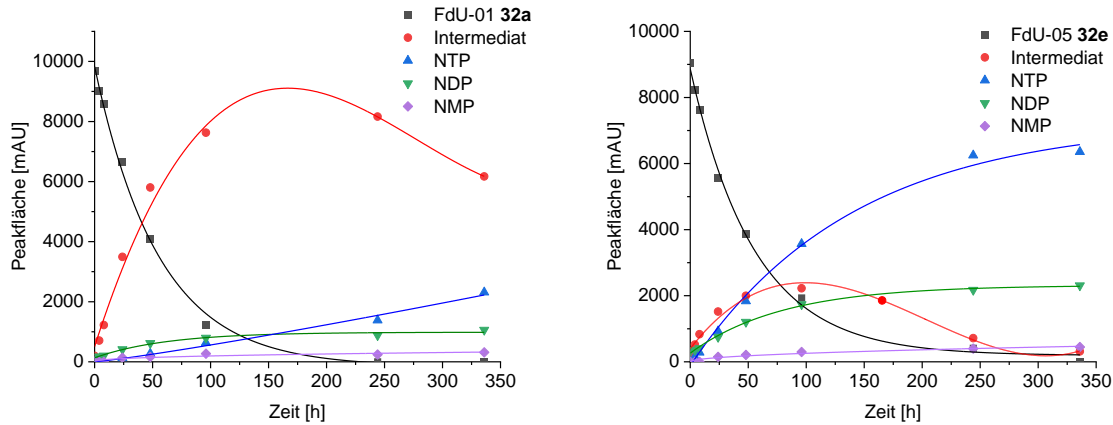


Abb. 74: Diagramme der chemischen Hydrolyse in PBS-Puffer von FdU-01 **32a** und FdU-05 **32e**.

Auch interessant ist die Bildung höherer Konzentrationen von FdU-DP für Prodrug das FdU-05 **32e**. Dieses Phänomen wurde bei langkettigen BisAB-Prodrugs bereits in vorherigen Arbeiten beobachtet.^{143,152} Ursache hierfür ist vermutlich die stärkere Abschirmung der negativen Ladungen der Phosphateinheiten, wodurch ein nucleophiler Angriff auf die Phosphoranhydridbindung zwischen β - und γ -Phosphat begünstigt wird. Diese unterschiedlichen Hydrolyseverhalten sind bereits nach 24 Stunden erkennbar.

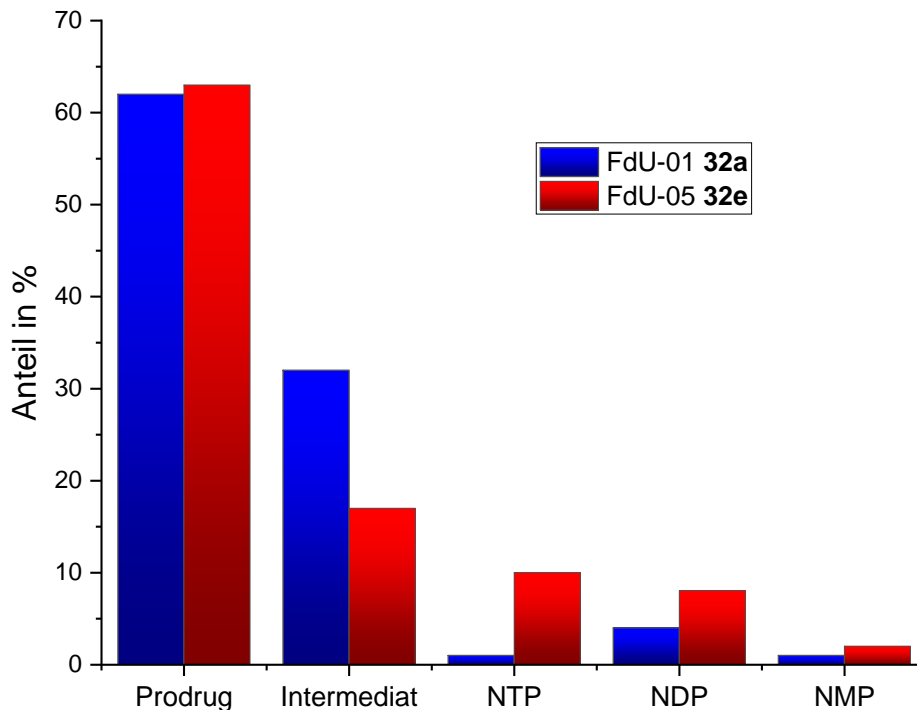


Abb. 75: Prozentuale Verteilung der Hydrolyseprodukte von FdU-01 **32a** und FdU-05 **32e** in PBS (pH 7.3) nach 24 Stunden bei 37 °C.

Verdeutlicht wird dies durch eine prozentuale Gegenüberstellung der vorhandenen Hydrolyseprodukte für Prodrug FdU-01 **32a** und FdU-05 **32e** in Abb. 75. Hier ist eindeutig trotz der gleichen Anteile an übrigen Prodrug zu erkennen, dass nach 24 Stunden für Verbindung FdU-01 **32a** das Intermediat das hauptsächliche Zerfallsprodukt darstellt. Für die Verbindung FdU-05 **32e** hingegen sind die Hydrolyseprodukte weniger eindeutig. Während für **32a** über 30 % an Intermediat detektiert werden konnten, sind es für **32e** gerade einmal 17 %. Dafür sind deutlich höhere Anteile an NTP, NDP und NMP erkennbar, wie es bereits in Abb. 74 zu erkennen war.

Insgesamt kann durch die durchgeführten Hydrolysen in PBS-Puffer geschlossen werden, dass alle dargestellten FdU-Verbindungen **32a-f** eine ausreichende chemische Stabilität besitzen, da die erste Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ für alle Substanzen zwischen 50 und 55 Stunden beträgt. Die Halbwertszeit $t_{1/2}(2)$, also die Spaltung der zweiten Maskierungseinheit, läuft bei den verschiedenen Substanzen mit länger werdender AB-Maskierung auch deutlich schneller ab. Zusätzlich ist eine erhöhte Spaltung der Phosphoranhydridbindungen auch ausgehend vom Prodrug selbst zu beobachten. Für die Gesamteignung als Prodrug ist dieser Fakt jedoch nicht von großer Bedeutung, da die Hydrolyse des initialen Prodrugs im selben Zeitraum abläuft. Da weder das Intermediat noch die verschiedenen Nucleotide in der Lage sind die Zellmembran zu passieren, ist das resultierende Produkt von nebensächlicher Bedeutung für die langsame chemische Hydrolyse.

Um eine enzymatische Spaltung der AB-Maskierungen nachzuweisen, wurden ebenfalls exemplarisch Hydrolysen mit PLE durchgeführt. Hierbei wurde in vorherigen Studien (siehe Abschnitt 4.2.3) bereits festgestellt, dass längere Acylreste der AB-Maskierungen nicht mehr durch die PLE gespalten werden. Dennoch sollten exemplarisch an zwei Verbindungen die Hydrolyse durchgeführt werden, um diese Ergebnisse zu bestätigen. Hierfür wurden die Verbindungen FdU-01 **32a** ($R = C_8$) und FdU-04 **32d** ($R = C_{11}$) nach dem in der Arbeitsgruppe standardisiertem Protokoll durchgeführt (Abschnitt 5.5). Die Prodrugs wurden zunächst in einem PBS-gepufferten PLE-Medium gelöst und anschließend für insgesamt 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Wasserfalldiagramme der enzymatisch induzierten Hydrolysen sind in Abb. 76 und Abb. 77 abgebildet. Anhand dieser Chromatogramme ist eindeutig zu erkennen, dass für beide Maskierungseinheiten eine enzymatische Spaltung durch die PLE erfolgt. Jedoch sind wie erwartet die Geschwindigkeiten der Spaltung stark unterschiedlich. Während die Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ für **32a** gerade einmal 1.2 Minuten beträgt, liegt diese für **32d** bei 4.4 Stunden. Dies entspricht den Erwartungen, da bereits in zahlreichen vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die AB-Maskierungen mit länger werdendem Acylrest ein schlechteres Substrat für die PLE darstellen. Dennoch kann nach 24 Stunden für beide Verbindungen hauptsächlich das Nucleosidtriphosphat detektiert werden, was die enzymatische Spaltung der AB-Masken und somit die Freisetzung

aus dem Prodrug bestätigt. In Abb. 78 sind zur besseren Ansicht die Menge der Metaboliten von **32a** und **32d** als Punktediagramm gegenübergestellt.

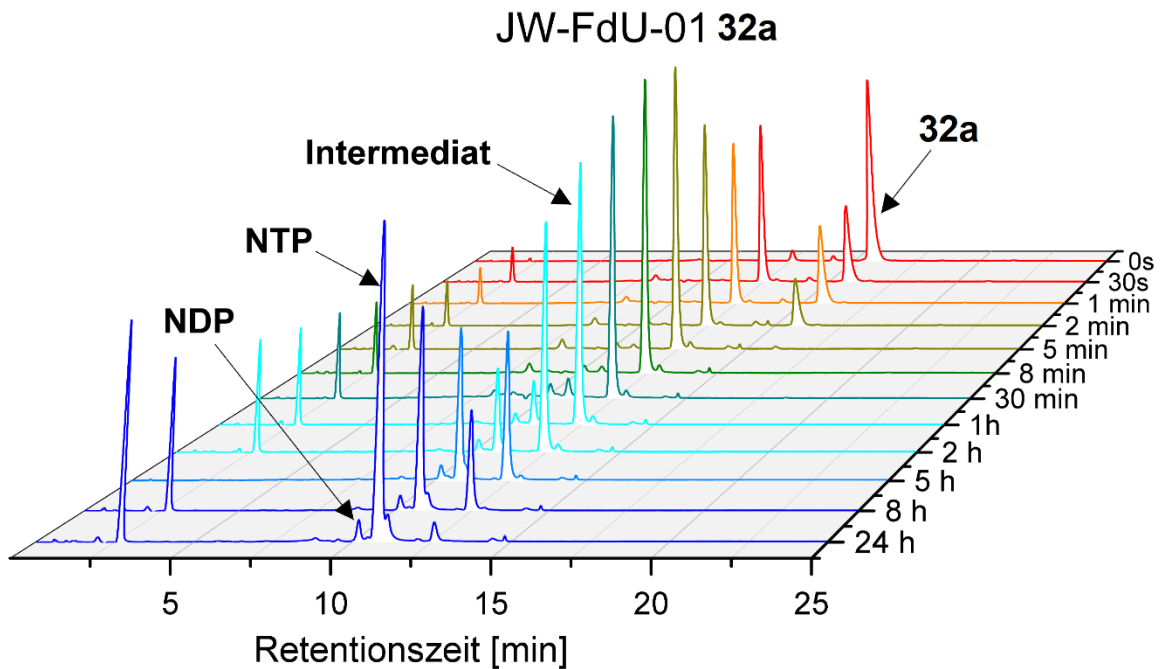


Abb. 76: Chromatogramme der Hydrolyse von FdU-01 **32a** mit PLE.

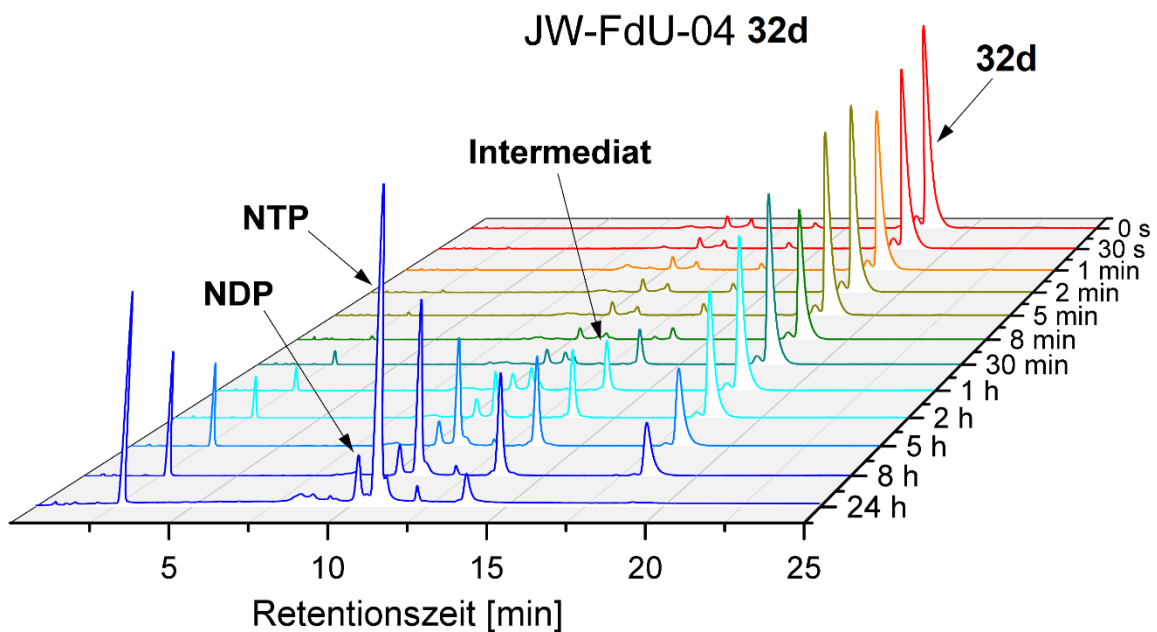


Abb. 77: Chromatogramme der Hydrolyse von FdU-04 **32d** mit PLE.

Durch die Betrachtung der beiden Graphen in Abb. 78 ist deutlich zu erkennen, dass für das Prodrug **32a** die erste Maskierungseinheit innerhalb von wenigen Minuten gespalten und das Intermediat freigesetzt wird. Dem gegenüber steht Prodrug **32d**, wo die eindeutig langsamere Spaltung und die daraus folgende Freisetzung von Intermediat auffällt. Anhand

dieser Diagramme ist auch gut erkennbar, dass die Bildung von Nucleosiddiphosphat hauptsächlich durch chemische Hydrolyse aus dem Prodrug bedingt ist. Des Weiteren kann durch die exemplarische Hydrolyse der Substanzen **32a** und **32d** und vorangegangenen Studien mit anderen Nucleotid-Prodrugs davon ausgegangen werden, dass die Prodrugs **32a-f** auf dem enzymatischen Weg das Nucleosidtriphosphat direkt freisetzen können.

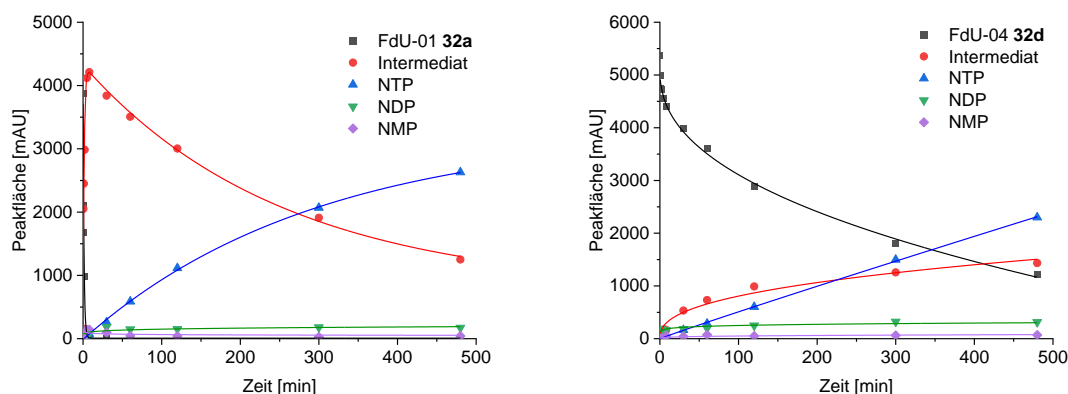


Abb. 78: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von Verbindung FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d**

4.5.2 Hydrolyse der FdU-TriPPPro-Verbindungen in Zellextrakt

Um das metabolische Verhalten von Prodrugs innerhalb der Zellen bestmöglich ermitteln zu können, haben sich Hydrolysen in Zellextrakten bewährt. Der Extrakt stellt mit seiner Vielzahl an Enzymen und weiteren Zellstrukturen die bestmögliche Umgebung dar, um einen intrazellulären Metabolismus zu simulieren. In vorherigen Studien von diversen TriPPPro-Verbindungen wurde bisher wie in Abschnitt 2.5 erwähnt auf CEM/0-Zellextrakten zurückgegriffen. Diese Zellen wurden auch für die Evaluation der antiviralen Aktivität der entsprechenden Verbindungen verwendet. Für die FdU-TriPPPro-Verbindungen **32** sollten andere Zelllinien zum Einsatz kommen. Da das 5-FU **1** bei einer Vielzahl von kolorektalen und Kolonkarzinomen in der Therapie verwendet wird, erschien eine Hydrolyse in derartigen Zellen sinnvoll. Hierfür wurden von der Arbeitsgruppe von U. Schumacher am UKE Zellpellets der SW620- und HT29-Zelllinie zur Verfügung gestellt.

Da Zellpellets die noch intakten Zellen enthalten, müssen diese erst aufgeschlossen werden, damit die intrazellulären Enzyme sich frei in Lösung befinden. Dazu muss zum einen die Zellmembran und bestimmte Zellbestandteile zerstört und gefällt werden, die Enzyme dürfen jedoch nicht beschädigt werden. Hierzu wurden die Pellets in PBS-Puffer (pH 7.3, 15×10^6 Zellen/mL) suspendiert und anschließend im Ultraschallbad bei 0 °C behandelt (6x30 s). Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (16000 g, 30 min, 4 °C) und der so erhaltene Überstand als Zellextrakt verwendet. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass der Großteil der für den Metabolismus relevanten Enzyme und Proteine noch intakt und in Lösung sind.

Anschließend wurde für die Hydrolyse das standardmäßig eingesetzte Protokoll verwendet. Die genauen Bedingungen zur Hydrolyse und zur Aufarbeitung sind in Abschnitt 5.5.3 nachzulesen. Hierbei ist es beim Arbeiten mit Zellextrakten besonders wichtig, dass nach der Inkubationszeit alle Proteine und übrigen Bestandteile der Zellen zunächst gefällt werden, um diese von den entstandenen Metaboliten zu trennen. Dies gewährleistet zum einen eine bessere Analyse der einzelnen Metabolite im Chromatogramm, zum anderen wird dadurch das empfindliche HPLC-System geschont. Für das Fällen wurde das Aliquot zunächst mit der doppelten Menge an Methanol versetzt und für zehn Minuten auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine zehnmündige Zentrifugation bei 4 °C, worauf der erhaltene Überstand noch einmal über einen Spritzenfilter filtriert wurde, bevor eine Injektion erfolgte. Wie bei den vorangegangenen Hydrolysen der FdU-Verbindungen wurde die übliche HPLC-Methode (Methode A) bei einer Wellenlänge von 270 nm verwendet.

Da aufgrund der aufwendigen Aufzucht insgesamt nur wenig Zellextrakte zur Verfügung stand, wurden nicht alle FdU-Verbindungen 01 bis 06 **32a-f** inkubiert. Hierzu wurden lediglich die durch Vorversuche (Abschnitt 4.4) und Proliferationsessays (Abschnitt 4.6) ermittelten, besonders interessanten Verbindungen FdU-01 **32a** (R = C₈) und FdU-04 **32d** (R = C₁₁) verwendet.

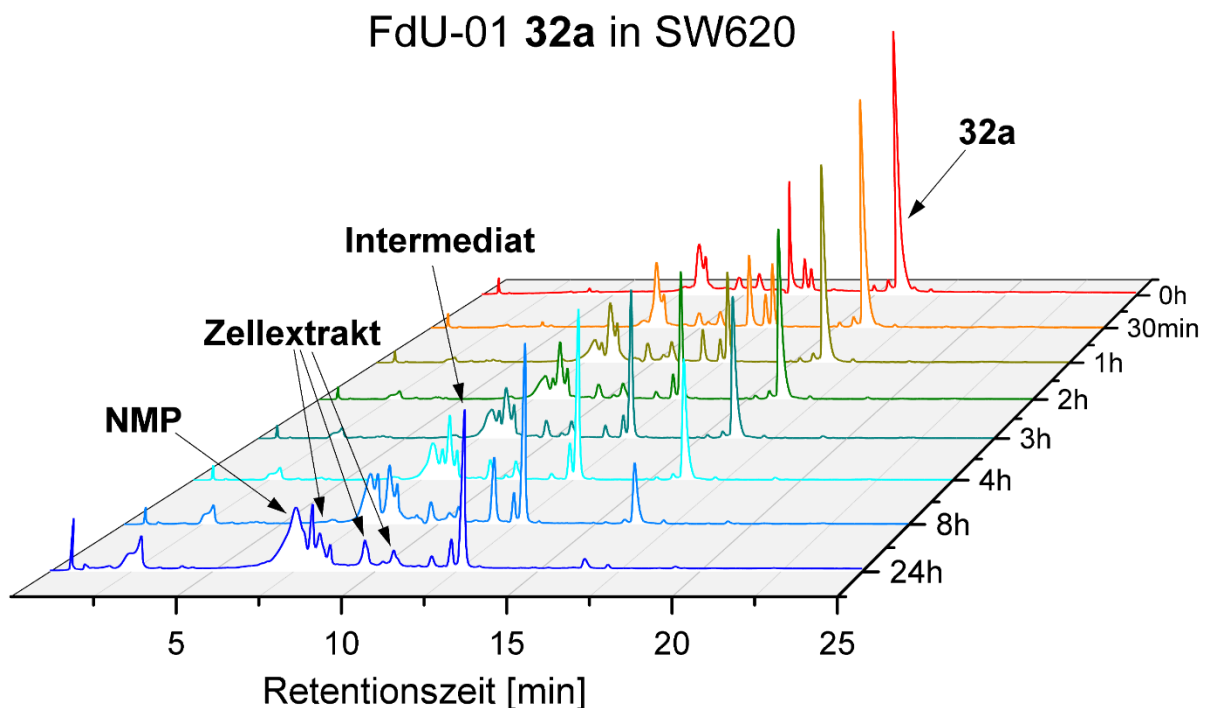


Abb. 79: Hydrolyseverlauf von FdU-01 **32a** in SW620-Zellextrakten.

In Abb. 79 ist der Hydrolyseverlauf von FdU-01 **32a** in SW620 Zellextrakt dargestellt. Die Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ der Verbindung liegt hier bei 4.4 Stunden, wodurch eindeutig eine enzymatische Hydrolyse der ersten Maskierungseinheit stattfand. Ebenfalls ist zu erkennen, dass zunächst wie erwartet das Intermediat gebildet wird. Schließlich ist nach 24 Stunden

eine vermehrte Menge von FdU-MP **68** detektierbar, während das Di- und Triphosphat nicht erkennbar sind. Diese Beobachtung konnte auch für die HT29-Zelllinie festgestellt werden. Jedoch ist hier insgesamt eine langsamere Metabolisierung des Prodrugs zu beobachten. Die Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ beträgt für FdU-01 **32a** hier 6.5 Stunden. Der Hydrolyseverlauf von FdU-01 **32a** in HT29-Zellextrakt ist in Abb. 80 dargestellt.

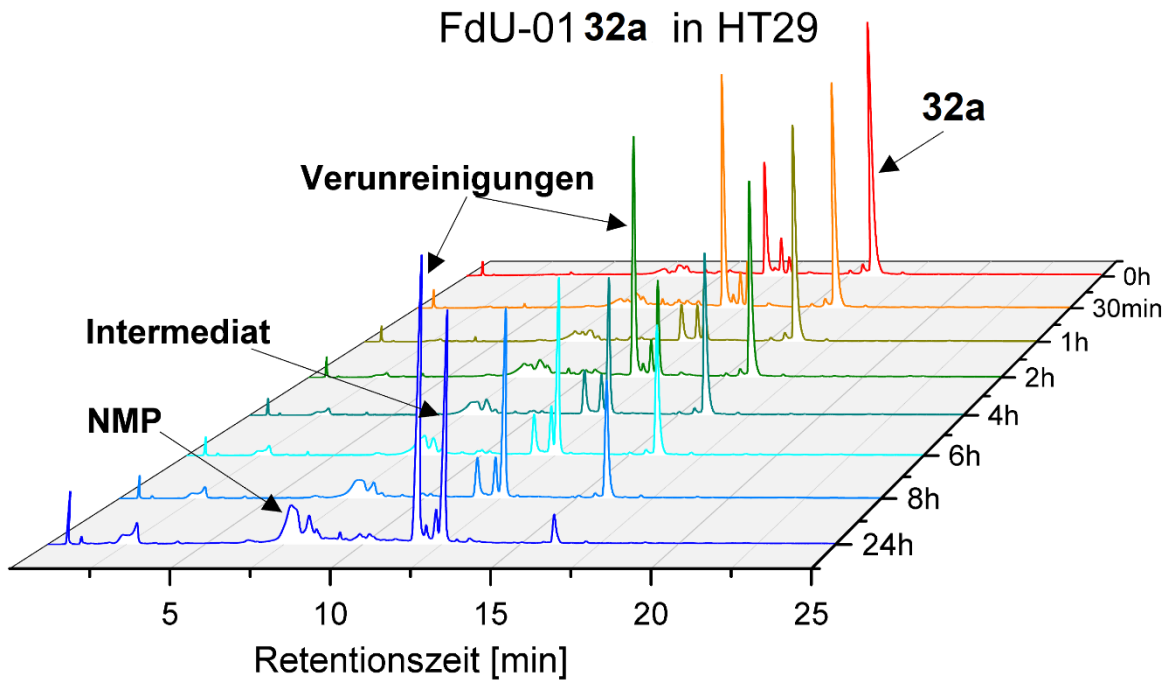


Abb. 80: Hydrolyseverlauf von FdU-01 **32a** in HT29-Zellextrakt.

Die Mengen der Prodrugs und der gebildeten Metabolite gegen die Zeit sind in Abb. 81 aufgetragen. Anhand dieser Grafiken ist die typische Hydrolyse des Prodrugs zu erkennen, sowie die vermehrte Bildung des Intermediats und des FdU-MPs im Vergleich zum Di- und Triphosphat. Ebenfalls wird hier noch einmal die langsamere Hydrolyse des Prodrugs und des Intermediats in HT29-Zellen im Vergleich zur SW620-Zelllinie verdeutlicht. Interessant ist auch der Verlauf der Bildung des Intermediats in SW620-Zellextrakt, der zunächst stark ansteigt, aber dann zwischen acht und 24 Stunden nur noch eine sehr geringe Metabolisierung aufweist. Dies ist vermutlich auf die nachlassende Aktivität der Enzyme innerhalb der Inkubationslösung zurückzuführen.

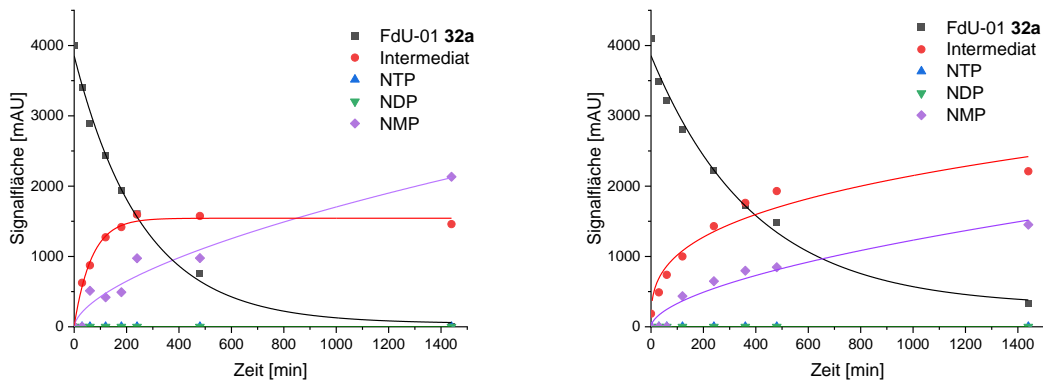


Abb. 81: Diagramme der Hydrolyse von FdU-01 **32a** in SW620- (links) und HT29- (rechts) Zellextrakten.

Dass zu keinem Zeitpunkt der Hydrolyse das Nucleosidtriphosphat detekierbar war, könnte auf eine direkte Freisetzung des FdU-MPs ausgehend vom Intermediat hinweisen. Wahrscheinlicher ist aber, dass das während der Inkubation gebildete Triphosphat sehr schnell zum Di- und anschließend Monophosphat hydrolysiert wird. Dephosphorylierungen durch Phosphatasen sind im intrazellulären Raum sehr häufig und stehen dauerhaft in Konkurrenz zu den Phosphorylierungen durch Kinasen. Um herauszufinden, auf welchem Weg das detektierte Monophosphat entstanden ist, wurde FdU-TP **71** direkt im Zellextrakt inkubiert. Die Synthese von FdU-TP **71** ist in 4.9 beschrieben. Für die Hydrolyse von NTP **71** wurde das gleiche Protokoll wie für die Prodrugs angewendet. Der Hydrolyseverlauf ist in Abb. 82 dargestellt.

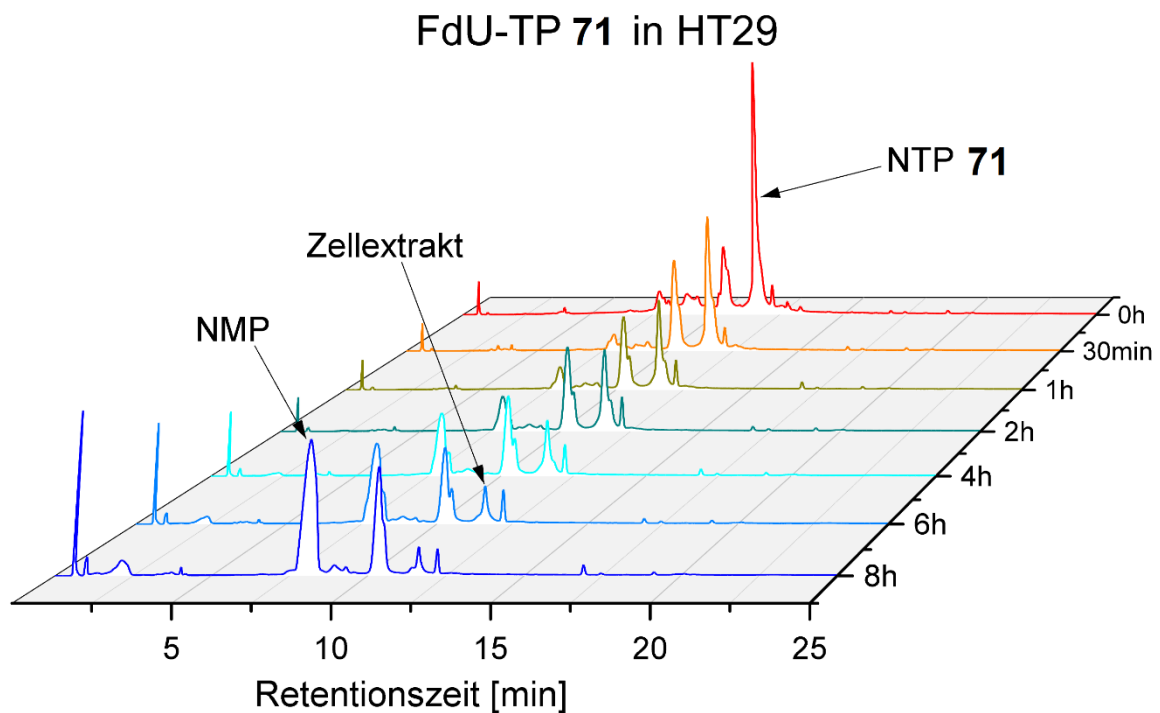


Abb. 82: Hydrolyseverlauf von FdU-TP **71** in HT29-Zellextrakten.

Anhand dieser Hydrolyse ist die geringe Stabilität des FdU-TP **71** im verwendeten Zellextrakten deutlich zu erkennen. In der HT29-Zelllinie beträgt die Halbwertszeit gerade einmal eine Stunde, während diese im SW620-Zellextrakten 1.5 Stunden beträgt. Das Nucleosiddiphosphat konnte nicht nachgewiesen werden. Zum einen liegt dies vermutlich wieder an der geringen Stabilität in den Zellextrakten, zum anderen gibt es Überlagerungen von Zellbestandteilen, die eine Detektion und eine Bestimmung erschweren. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Metabolisierung des Triphosphats zum Monophosphat über das Diphosphat stattfindet. Zunächst ist eine direkte enzymatische Dephosphorylierung vom Triphosphat zum Monophosphat eher unüblich, zusätzlich ist es unwahrscheinlich, dass unter zellulären Bedingungen eine derartig schnelle chemische Spaltung der Phosphoranhydridbindung zwischen dem α - und β -Phosphat stattfindet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass FdU-MP in den Zellextrakthydrolysen ausgehend vom FdU-TP **71** erhalten wurde. Eine Hydrolyse des FdU-Diphosphats wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt.

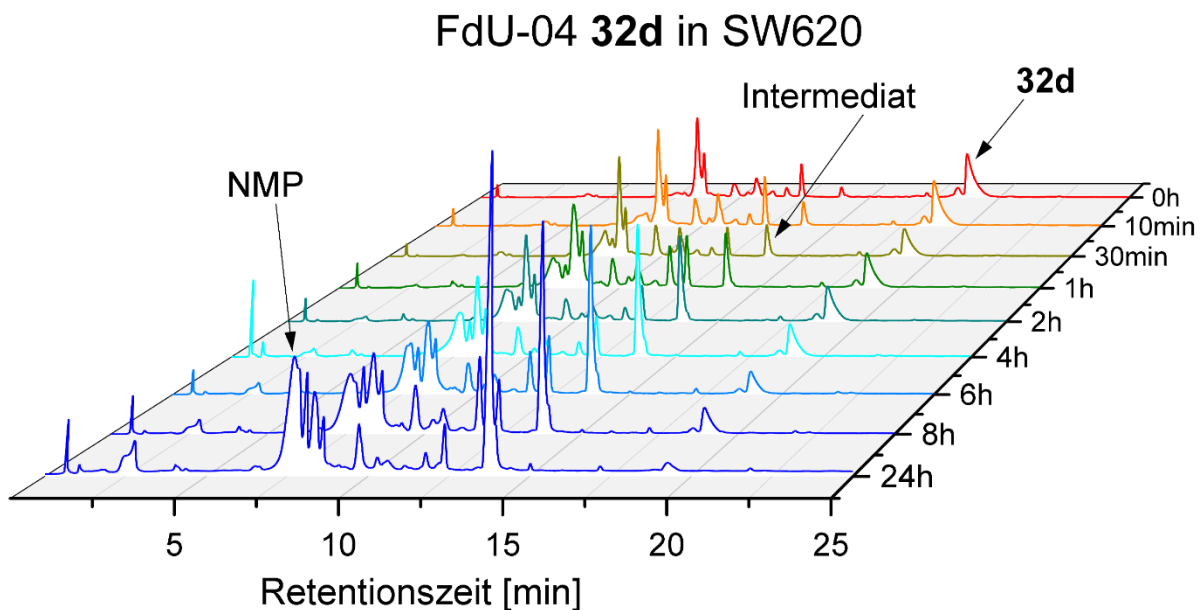


Abb. 83: Hydrolyseverlauf von FdU-04 **32d** in SW620-Zellextrakten.

Die Hydrolysen von FdU-04 **32d** in SW620- und HT29- Zellextrakten wurde analog zu denen von FdU-01 **32a** durchgeführt. Der Verlauf der Hydrolyse über 24 Stunden ist in Abb. 83 dargestellt. Hier ist erneut zu erkennen, dass die hauptsächlichsten Metabolite das Intermediat und das Nucleosidmonophosphat darstellen. Besonders interessant ist jedoch der Verlauf des Prodrugs **32d**. Anhand der Peakintensitäten ist erkennbar, dass zu allen Zeitpunkten der Hydrolyse, sogar bei der Nullprobe, nur eine sehr geringe Konzentration an **32d** detektiert werden konnte. Auch nach wiederholten Hydrolysen und neu angesetzten Stammlösungen konnte dieser Effekt beobachtet werden. Dies bedeutet, dass das Prodrug sich nicht mehr vollständig frei in Lösung befindet und somit undetektiert bleibt. Da aber keine

Löslichkeitsprobleme der Verbindung erkennbar waren, muss dieser Effekt eine andere Ursache haben. Zunächst wurden die Schritte der Aufarbeitung überprüft, da in Arbeiten von GOLLNEST ebenfalls schlechte Signalintensitäten für lipophile Prodrugs beobachtet wurden, die auf die Proteinfällung zurückgeführt wurden. Tatsächlich konnte in eigenen Arbeiten ebenfalls festgestellt werden, dass durch das Fällern mit Methanol und anschließender Zentrifugation deutlich weniger Prodrug als erwartet detektiert wurde. Dieses Problem konnte jedoch durch den Einsatz von Acetonitril als Fällungsmittel deutlich reduziert werden. Auch mit dem angepassten Fällungsprotokoll war dennoch eine deutlich geringere Prodrugkonzentration als erwartet detektierbar. Daher kann angenommen werden, dass Bestandteile der Zellen innerhalb der Zellextrakte die Prodrugs zu einem gewissen Teil binden. Da aber auch mit der Zeit Metabolite in großer Menge gebildet werden, muss ebenso eine Freisetzung der Prodrugs über die Zeit erfolgen. Auf diese Form der Proteinbindung der Prodrugs und deren Analyse wird noch genauer in Abschnitt 4.10 eingegangen. Derselbe Effekt konnte auch für die HT29-Zelllinie beobachtet werden, dessen Verlauf in Abb. 84 dargestellt ist.

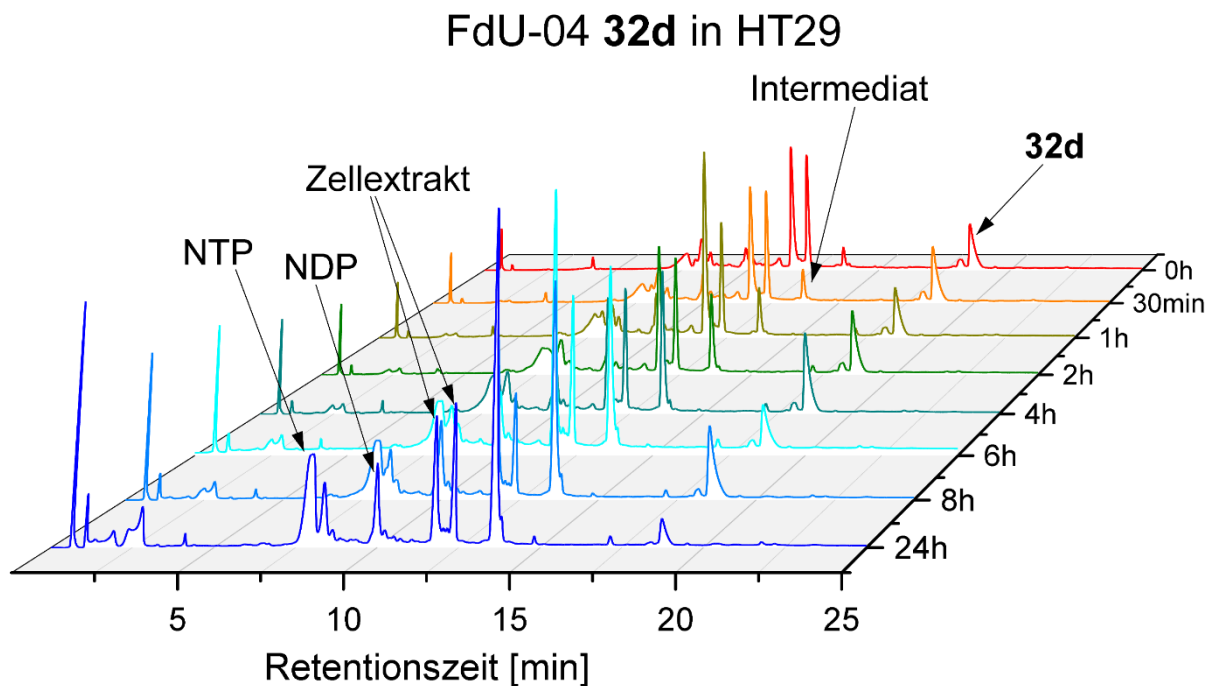


Abb. 84: Hydrolyseverlauf von FdU-04 **32d** in HT29-Zellextrakten.

Analog wie zur SW620 Zelllinie scheint auch hier das Prodrug an Zellbestandteile zu binden, was die Bestimmung der genauen Konzentration verhindert. Aus diesem Grund konnten auch keine verlässlichen Halbwertszeiten für FdU-04 **32d** in Zellextrakten bestimmt werden. Dennoch können anhand der Hydrolysen wertvolle Rückschlüsse auf die Metabolisierung innerhalb der Zellen gezogen werden, da die Metabolite gut detektierbar sind und trotz der möglichen Proteinbindung der Prodrugs offenbar eine, wenn auch im Vergleich zum FdU-01 **32a** Prodrug langsamere, Hydrolyse stattfindet. Ebenso wie für FdU-01 **32a** konnten auch für

FdU-04 **32d** Unterschiede in der Metabolisierung in den jeweiligen Zelllinien beobachtet werden. Dies ist Anhand der Graphen in Abb. 85 verdeutlicht.

Zum einen wird anhand der konzentrationsabhängigen Auftragung die mangelhafte Detektion des Prodrugs **32d** gut erkennbar, auch wenn über 24 Stunden insgesamt ein leichter Abfall sichtbar wird. Neben der hauptsächlichen Entstehung der Intermediate und des Nucleosidmonophosphats konnte bei der HT29-Zelllinie auch das Diphosphat nachgewiesen werden. In geringen Mengen konnte das Diphosphat auch bei der direkten Hydrolyse von NTP **71** beobachtet werden (Abb. 82), jedoch wurde es hier von Zellbestandteilen überlagert, was eine genaue Bestimmung erschwerte. Da aber für die Verbindung FdU-01 **32a** in der HT29-Zelllinie keine Diphosphatbildung beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieses durch chemische Hydrolyse direkt aus dem Prodrug **32d** gebildet wurde. Dies würde mit den Beobachtungen bei der PBS-Hydrolyse in Abschnitt 4.5.1 übereinstimmen, wo für FdU-04 **32d** eine vermehrte Bildung des Diphosphats aufgrund des längeren Acylrestes beobachtet wurde.

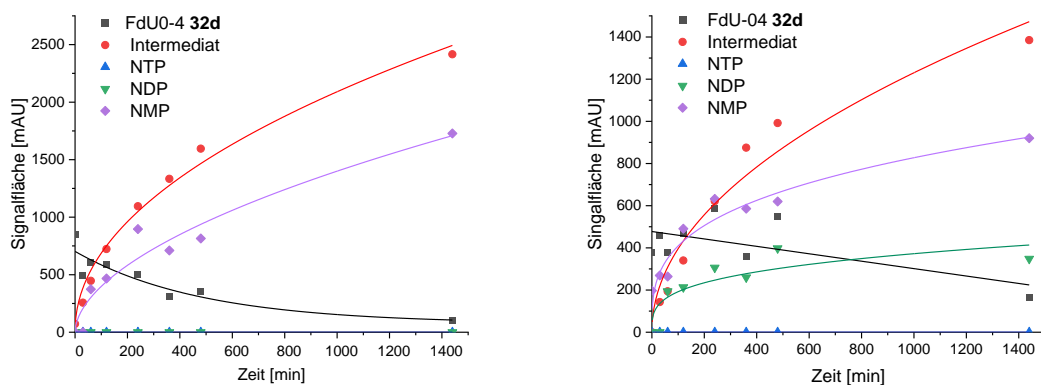


Abb. 85: Diagramme der Hydrolyse von FdU-04 **32d** in SW620- (links) und HT29- (rechts) Zellextrakten.

Insgesamt konnte durch die Hydrolysen der beiden FdU-Prodrugs FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** in verschiedenen Zellextrakten gezeigt werden, dass eine enzymbedingte Metabolisierung zu aktiven Metaboliten erfolgt. Auch wenn kein Triphosphat während der Hydrolysen nachgewiesen werden konnte, kann durch Versuche der direkten Hydrolyse von FdU-TP **71** davon ausgegangen werden, dass das Triphosphat ausgehend vom Intermediat freigesetzt wurde. Somit muss von einer schnellen Metabolisierung zum Monophosphat ausgegangen werden, welches in Zellextrakten einigermaßen stabil zu sein scheint. In der HT29-Zelllinie konnten bei der Hydrolyse von FdU-04 **32d** ebenfalls geringe Mengen FdU-Diphosphat nachgewiesen werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass das aktive FdU-Triphosphat **71** intrazellulär freigesetzt wird, unterstreichen die Hydrolysen die Eignung dieser TriPPP-Verbindungen als antitumoral aktive Substanzen. Das hauptsächlich beobachtete Monophosphat stellt wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben ebenfalls einen aktiven

Metaboliten dar, weshalb eine schnelle Zersetzung vom FdU-Tri- zum Monophosphat nicht nachteilig für diese Substanzen ist. Die mögliche Proteinbindung der Prodrugs und ihre damit verbundene langsame Freisetzung stellt ebenfalls einen sehr interessanten Sachverhalt dar, der in Abschnitt 4.9 und 4.10 genauer besprochen wird.

4.5.3 Fazit der Hydrolysen der FdU-TriPPPPro-Verbindungen

Insgesamt unterstreichen die durchgeführten Hydrolyseexperimente die Eignung der FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** für den Einsatz als antitumoral aktive Prodrugs. In PBS-Puffer (pH 7.3, 37 °C) konnte eine ausreichend hohe chemische Stabilität unter physiologischen Bedingungen erhalten werden, die für alle FdU-Verbindungen **32a-f** im Bereich von 50 bis 55 Stunden für die Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ liegen (Tab. 4). Hierbei konnte auch festgestellt werden, dass bei den TriPPPPro-Verbindungen mit längeren Acylresten der Maskierungseinheiten die chemische Stabilität des Intermediats sinkt sowie eine vermehrte Bildung des Nucleosiddiphosphats ausgehend vom Prodrug stattfindet. Diese Effekte spielen aber aus pharmakokinetischer Sicht vermutlich eine untergeordnete Rolle.

Die enzymatische Hydrolyse wurde zunächst durch exemplarische PLE-Hydrolysen bestätigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass für die kurzen Maskierungseinheiten eine sehr schnelle Spaltung der AB-Masken und eine Freisetzung von FdU-TP erfolgt, während bei längeren Acylresten die Geschwindigkeit der Spaltung durch PLE stark abnimmt.

Durch die Hydrolysen in verschiedenen Krebszellextrakten konnte ebenfalls eine enzymatische Spaltung der BisAB-TriPPPPro-Verbindungen in Krebszellen bestätigt werden. Während für FdU-01 **32a** Halbwertszeiten zwischen vier und sechs Stunden je nach Zelllinie erhalten wurden, konnten diese für FdU-04 **32d** nicht bestimmt werden. Grund hierfür war eine nur sehr geringe Signalintensität des Prodrugs über die Zeit, was vermutlich auf Proteinbindungen und Wechselwirkungen mit Zellbestandteilen zurückzuführen ist. Dennoch scheint eine langsame Freisetzung des Prodrugs stattzufinden, da die gebildeten Metabolite, hauptsächlich das Intermediat und FdU-MP **68**, über die Zeit in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden können. Dies könnte durch einen „*slow-release*“-Mechanismus begründet sein, worauf in Abschnitt 4.10 genauer eingegangen wird. Da sowohl für FdU-01 **32a** als auch FdU-04 **32d** nach 24 Stunden neben dem Intermediat hauptsächlich FdU-MP **68** nachgewiesen werden konnte, muss von einer schnellen Metabolisierung des FdU-Triphosphats **71** innerhalb der Zellen ausgegangen werden. Dies konnte durch direkte Hydrolysen von FdU-TP **71** in SW620- und HT20-Zellextrakt bestätigt werden, wo die Halbwertszeit des Triphosphats **71** gerade mal eine bis anderthalb Stunden betrug. Da aber auch das FdU-Monophosphat **68** einen aktiven Metaboliten darstellt (Abschnitt 4.3.1), ist die hauptsächliche Freisetzung nicht nachteilig. Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer hohen antitumoralen Aktivität der FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32a-d** ausgegangen werden.

4.6 Proliferationsassays der FdU-TriPPPro-Verbindungen

Um die antitumorale Aktivität der FdU-TriPPPro-Verbindungen FdU-01 bis 06 **32a-f** zu bestimmen, sollten Proliferationsnachweise an verschiedenen Krebszelllinien zur Bestimmung der EC_{50} -Werte durchgeführt werden. Diese Assays wurden wie die Zellaufnahmestudien in der Arbeitsgruppe von U. Schumacher am Universitätsklinikum Eppendorf durchgeführt. Hierzu wurden sogenannte XTT-Zell-Proliferations-Assays verwendet. Dabei wird den Zellen ein 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumsalz (XTT) zugefügt, welches von metabolisch aktiven Zellen unter anderem durch mitochondriale Dehydrogenasen zum farbigen Formazan-Produkt reduziert wird. Da nur lebende, funktionierende Zellen das XTT reduzieren können, ist die photometrische Intensität des gebildeten Formazan proportional zu den noch lebenden Zellen.^{181,182}

Für die Assays wurden vier verschiedene Krebszelllinien verwendet. Zum einen die MDA-MB231-Zelllinie, bei der es sich um ein Triple-negatives Mammakarzinom handelt, zum anderen die HCT116-, HT29- und SW620-Zelllinien. Diese Zelllinien sind verschiedene Kolorektal- und Kolonkarzinome, die bereits für die Zellaufnahmestudien und Hydrolysen verwendet wurden, da das 5-FU **1** in der antitumoralen Therapie für derartige Karzinome eingesetzt wird. Als Referenzsubstanz wurde 5-FU **1** verwendet.

Tab. 5: Auflistung der in den XTT-Assays ermittelten EC_{50} -Werte [μ M] für die FdU-TriPPPro-Verbindungen 01 bis 06 **32a-f** in unterschiedlichen Krebszelllinien.

	5-FU	FdU-01	FdU-02	FdU-03	FdU-04	FdU-05	FdU-06
MDA-MB231	32.3	9.2	28.9	17.3	0.3	29.1	30.3
HCT116	8.6	0.7	18.8	3.8	1.3	15.0	11.8
HT29	41.1	2.9	22.0	12.5	5.4	25.3	24.0
SW620	11.8	2.8	3.8	2.1	0.07	6.9	12.9

Die zusammengefassten EC_{50} -Werte, die die mittlere effektive Konzentration beschreiben, sind in Tab. 5 sowie in Abb. 86 für die jeweiligen Zelllinien als Balkendiagramm dargestellt. Insgesamt liegen alle gemessenen EC_{50} -Werte zwischen 0.07 und 40 μ M. Insgesamt kann für alle getesteten Verbindungen eine antitumorale Aktivität festgestellt werden, wobei auch klare Trends erkennbar sind. Für die MDA-MB231- und HT29-Zelllinie sind alle TriPPPro-Substanzen genauso aktiv oder wesentlich aktiver als das 5-FU **1**. Für die HT29-Zellen liegen die EC_{50} -Werte für die TriPPPro-Substanzen vergleichsweise sogar deutlich unterhalb dem 5-FU **1**. Für die HCT116- und SW620-Zelllinie wurden aber auch EC_{50} -Werte für manche TriPPPro-Verbindungen erhalten, die etwas über dem 5-FU liegen.

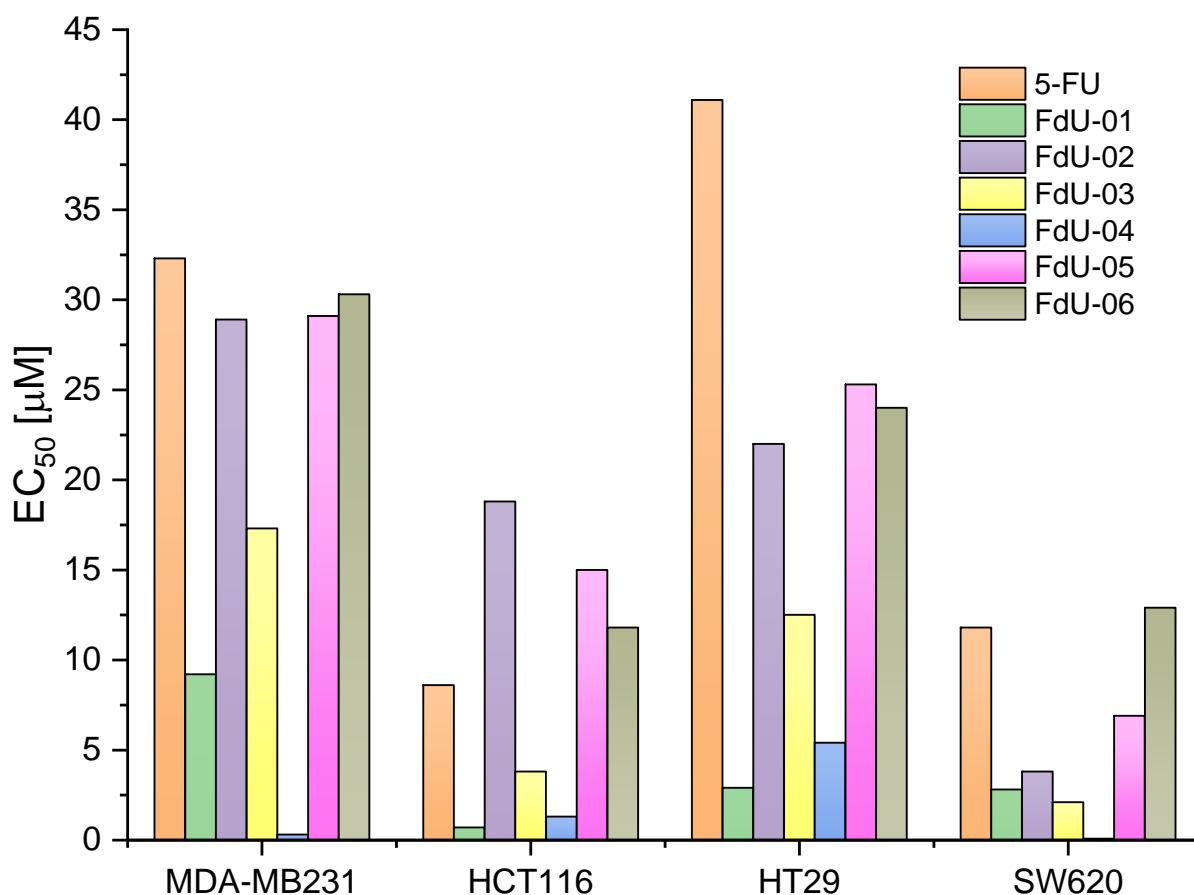


Abb. 86: EC_{50} -Werte der FdU-TriPPPro-Verbindungen 01 bis 06 **32a-f** in den Krebszelllinien MDA-MB23, HCT116, HT29 und SW620.

Für die einzelnen FdU-Verbindungen lässt sich auch ein eindeutiger Trend unabhängig von der Zelllinie erkennen. Während die FdU-Verbindungen FdU-02 **32b**, FdU-05 **32e** und FdU-06 **32f** in der Regel ähnliche proliferationshemmende Eigenschaften wie das 5-FU aufweisen, ist für FdU-03 **32c**, aber besonders für FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** eine deutlich höhere Aktivität ermittelt worden. Das besonders die TriPPPro-Verbindung FdU-04 **32d** eine teilweise 100-fach höhere Aktivität als das 5-FU **1** aufweist, ist besonders interessant. Wie bereits in Abschnitt 4.4 erwähnt wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Lipophilie und der damit zusammenhängenden Zellaufnahme und der Aktivität von TriPPPro-Verbindungen vermutet. Daher wurde durch einen Lipophilievergleich FdU-04 **32d** als potenziell aktivste Substanz ermittelt, da die Lipophilie denen der Leitstrukturen dBCNA-03 **30c** ($R = C_{10}$) und BCNA-02 **31c** ($R = C_{10}$) der Zellaufnahmestudien entsprach. Durch die durchgeführten Proliferationsnachweise konnte diese Annahme eindeutig bestätigt werden. Vor allem für die MDA-MB231-Zelllinie, die ein durch Chemotherapie kaum behandelbares Karzinom darstellt, sowie für die SW620-Zelllinie stellt die TriPPPro-Verbindung FdU-04 **32d** die mit Abstand aktivste Substanz im unteren mikromolaren bis nanomolaren Bereich dar. Zur Verdeutlichung sind die ermittelten EC-Werte in Abb. 87 von FdU-04 **32d** erneut gegen die von 5-FU **1** aufgetragen.

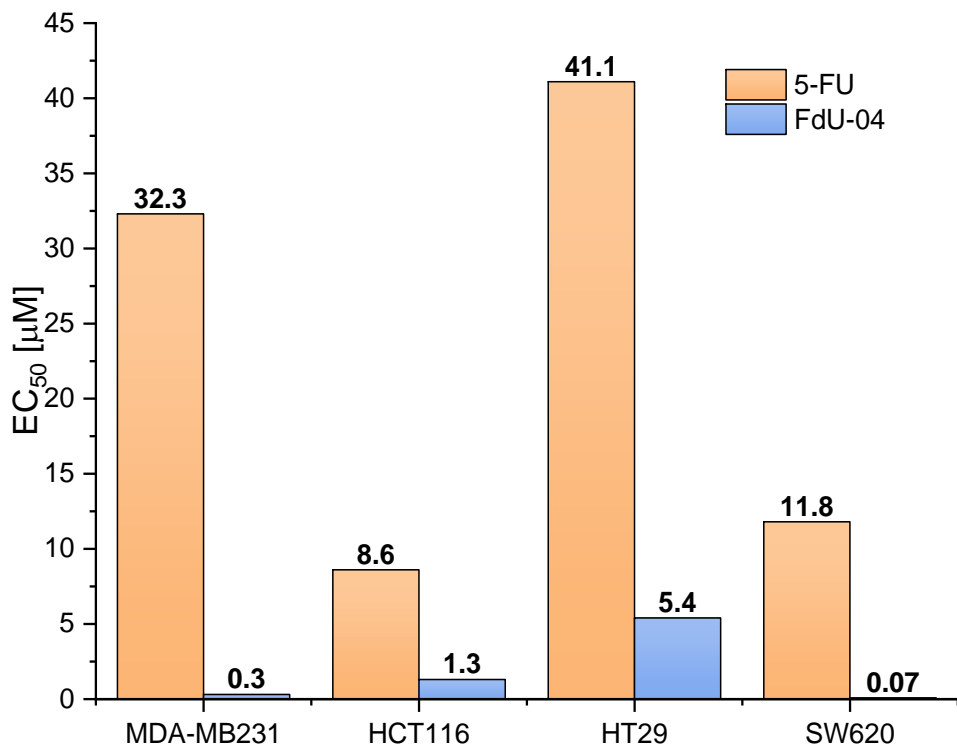


Abb. 87: EC₅₀-Werte von FdU-04 **32d** im Vergleich zu 5-FU **1** in den getesteten Krebszelllinien.

Anhand dieser Grafik wird noch einmal die hohe antitumorale *in vitro*-Aktivität von FdU-04 **32d** verdeutlicht. In der MDA-MB231- sowie der SW620-Zelllinie sind die EC₅₀-Werte verglichen mit dem 5-FU **1** bis zu 100-fach geringer, was für deutlich höhere proliferationshemmende Eigenschaften spricht. Hierbei sticht vor allem der mit 70 nM ermittelte Wert für die SW620-Zelllinie heraus, der insgesamt sogar mehr als 150-fach höher liegt als von der Referenzsubstanz.

Ebenfalls sticht wie erwähnt das FdU-01 **32a** heraus. Die ermittelten Werte sind in Abb. 88 gegen die Referenzsubstanz 5-FU **1** dargestellt. Vor allem in der MDA-MB231 und SW620-Zelllinie wurden im Vergleich zum FdU-04 **32d** deutlich geringere EC₅₀-Werte erhalten. Dennoch kann eine signifikant höhere Aktivität im Vergleich zum 5-FU **1** beobachtet werden. Für die HCT116- und HT29-Zelllinie wurden sogar geringfügig geringere Werte gemessen. Die insgesamt sehr hohe Aktivität von FdU-01 **32a** im Vergleich zu den weniger aktiven FdU-TriPPP-Verbindungen ist jedoch nicht mit dem Modell der Lipophilie und Zellaufnahme erklärbar. Betrachtet man die gemessenen Lipophilien sollte für Verbindung **32a** nur eine sehr geringe Zellaufnahme und somit eine vergleichsweise geringe Aktivität erhalten werden. Dies lässt nur den Schluss zu, dass neben der Lipophilie der Substanzen auch andere Faktoren wesentlichen Einfluss auf die Aktivität nehmen können. Durch die durchgeführten Hydrolysestudien bezüglich der chemischen und enzymatischen Stabilität konnte jedoch keine Erklärung für dieses Verhalten gefunden werden. Sowohl im PBS-Puffer (pH 7.3) als auch in Zellextrakten weisen die Substanzen ähnliche Stabilitäten auf. Auch wenn für das

FdU-01 **32a** im Vergleich zum FdU-04 **32d** keine Proteinbindungen beobachtet wurden, weisen beide Substanzen die ähnlichen Metabolite innerhalb der Zellen auf. Insgesamt konnte für FdU-01 eine etwas schnellere Freisetzung des Intermediats und der Nucleotide beobachtet werden, dies kann aber die deutlich höhere Aktivität im Vergleich zu den anderen FdU-Substanzen nicht erklären, die bedingt durch ihre Lipophilie eine bessere Zellaufnahme aufweisen sollten. Möglicherweise stellt FdU-01 ein geeignetes Substrat für bestimmte Fettsäure-Transportproteine der Krebszellen dar, wodurch eine hohe Zellaufnahme trotz geringer Lipophilie erklärt werden kann. Dies ist aber auch nicht sehr wahrscheinlich, da nicht davon auszugehen ist, dass die Selektivität solcher Transporter gegenüber FdU-01 **32a** zu den anderen FdU-TriPPP-Verbindungen **32a-f** so hoch ist, wie es die EC_{50} -Werte suggerieren.¹⁸³

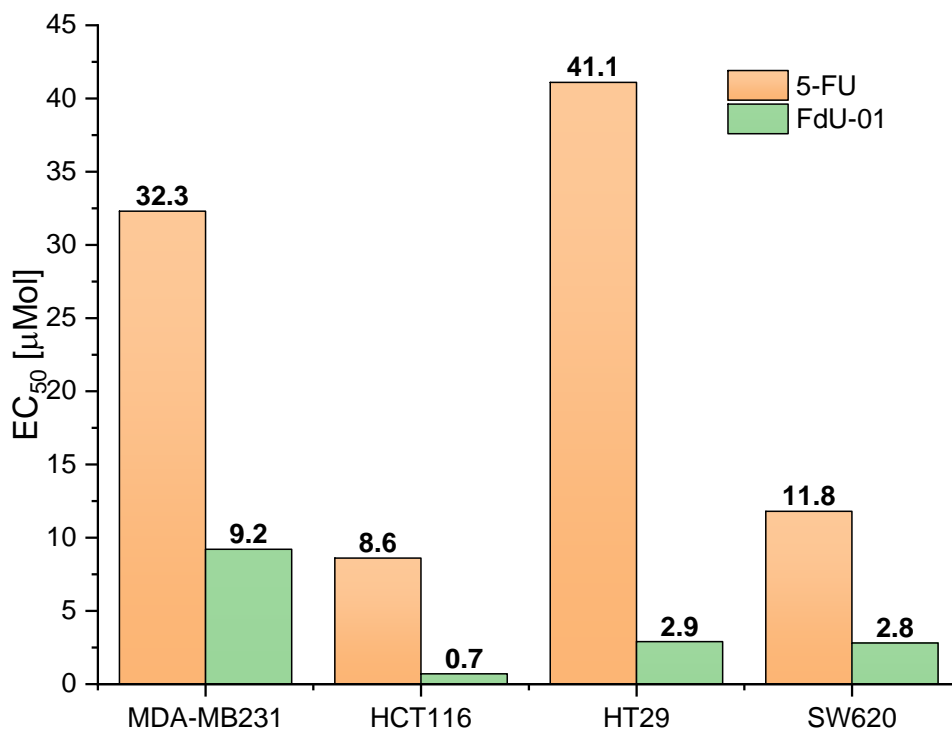


Abb. 88: EC_{50} -Werte von FdU-01 **32a** im Vergleich zu 5-FU **1** in den getesteten Krebszelllinien.

4.6.1 Therapeutische Bandbreite von FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d**.

Aufgrund der ermittelten EC_{50} -Werte konnten FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** als neue Leitstrukturen identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden diese Substanzen für weitere Studien verwendet. In der Arbeitsgruppe von U. Schumacher wurden daher Proliferationsstudien mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um Hinweise über die therapeutische Bandbreite der Substanzen zu erhalten. Wie in Abschnitt 2.4.1 erläutert, beschreibt die therapeutische Breite (*therapeutic index*, TI) das Verhältnis zwischen der toxischen Dosis und der therapeutischen Dosis des Wirkstoffs.⁸⁴ Je geringer die Konzentration des Wirkstoffes ist, bei dem die proliferierenden Eigenschaften der

Krebszellen verhindert werden, desto geringer sind auch die Nebenwirkungen an gesunden Zellen. Besonders für Chemotherapeutika ist der TI-Wert meist nahe 1 und es besteht nur ein geringer Spielraum zwischen therapeutischer und toxischer Dosis.

HT29

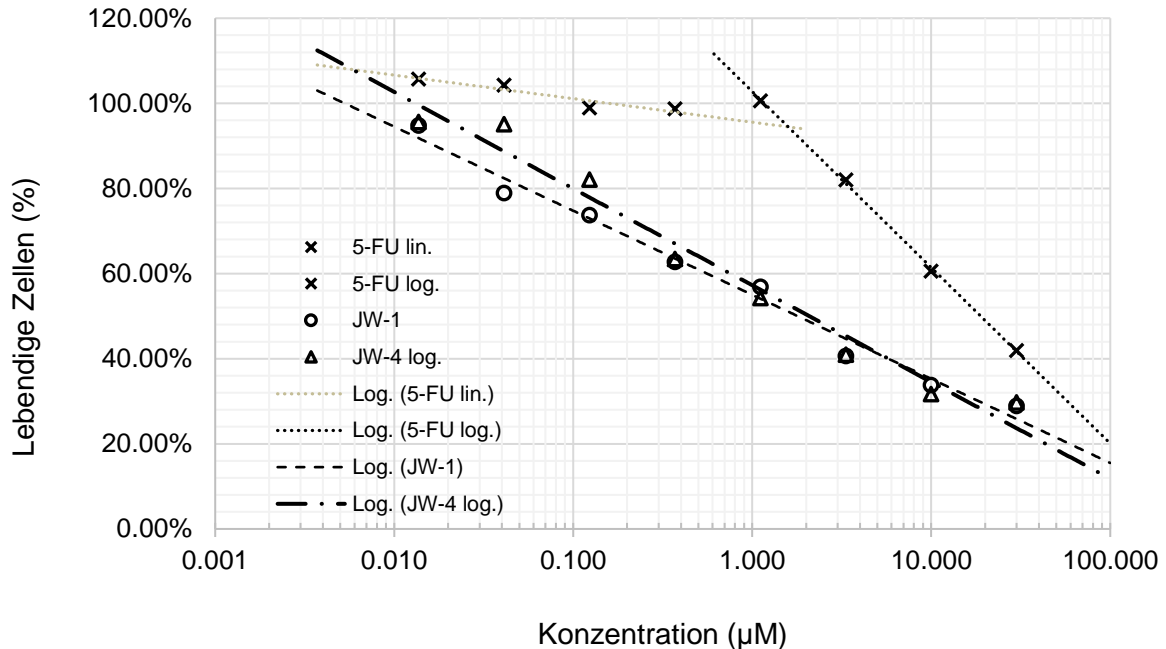


Abb. 89: Auftragung des prozentualen Anteils lebender Zellen gegen die logarithmische Konzentration nach Inkubation der HT29-Krebszellen mit 5-FU **1**, FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d**.

Um einen Vergleich der therapeutischen Breite der FdU-TriPPPro-Verbindungen 01 und 04 mit 5-FU **1** darzustellen, wurden für die Substanzen die proliferationshemmenden Eigenschaften bei acht unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen nach der Inkubationszeit logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Für die HT29-Zelllinie lässt sich anhand dieser Auftragung eindeutig erkennen, dass die TriPPPro-Substanzen FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** bei wesentlich geringeren Konzentrationen bereits proliferationshemmende Eigenschaften besitzen (Abb. 89). Während beim 5-FU **1** erst bei ca. 5 µM ein Effekt erkennbar ist, zeigen die TriPPPro-Verbindungen bereits zwischen 0.04 µM und 0.1 µM einen antitumoralen Effekt. Dieser Effekt ist bereits durch die wesentlich niedrigeren EC_{50} -Werte der Assays aus Abschnitt 4.6 erwartet, jedoch wird mit Hilfe dieser Auftragung die hohe Effektivität bei geringen Konzentrationen gegenüber dem 5-FU **1** verdeutlicht. Derselbe Effekt war auch für die SW620-Zelllinie zu beobachten. Die logarithmische Auftragung ist in Abb. 90 dargestellt.

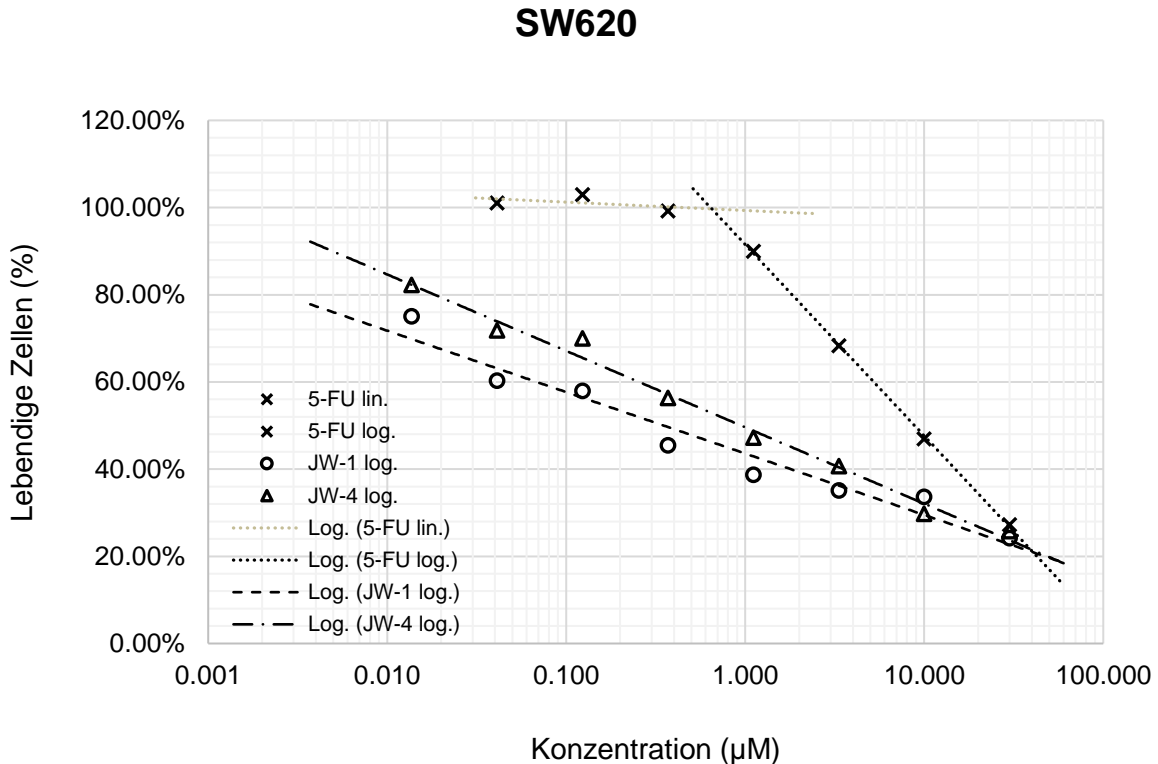


Abb. 90: Auftragung des prozentualen Anteils lebender Zellen gegen die logarithmische Konzentration nach Inkubation der SW620-Krebszellen mit 5-FU **1**, FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d**.

Während für das 5-FU **1** wie bei HT29 erst ab ca. 5 µM proliferationshemmende Eigenschaften aufweist, kann dieser Effekt für FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** bereits bei extrem geringen Konzentrationen von etwas über 0.01 µM beobachtet werden.

Anhand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass für die TriPPPPro-Verbindungen zumindest für *in vitro*-Studien eine wesentlich höhere therapeutische Breite als das 5-FU **1** besitzen, was für den Einsatz als antitumorale Chemotherapeutika von großer Bedeutung ist und ihr Potential weiter unterstreicht.

4.6.2 Fazit der Proliferationsassays der FdU-TriPPPPro-Verbindungen.

Die FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32a-f** wurden in insgesamt vier verschiedenen Krebszelllinien auf ihre proliferationshemmenden Eigenschaften getestet. Hierbei haben sich vor allem FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** als besonders aktive Substanzen erwiesen, deren EC₅₀-Werte in der MDA-MB231- sowie der SW620-Zelllinie teilweise um bis zu 150-fach höher liegen als das derzeit eingesetzte 5-FU **1**. Die jeweiligen Werte sind in Abb. 91 gegenübergestellt.

Während FdU-04 **32d** wie durch die Zellaufnahmestudien und durch den Lipophilievergleich vorhergesagt, die aktivste Substanz darstellt, konnten die ebenso guten proliferationshemmenden Eigenschaften von FdU-01 **32a** nicht mit diesem Modell erklärt werden. Auch die Hydrolysen in Zellextrakten gaben keine Hinweise auf unterschiedliches metabolisches

Verhalten, welches die hohe Aktivität von FdU-01 **32a** trotz geringer Lipophilie und damit eigentlich schlechter Zellaufnahme erklären. Der Grund für die unerwartet guten EC_{50} -Werte konnte abschließend nicht geklärt werden.

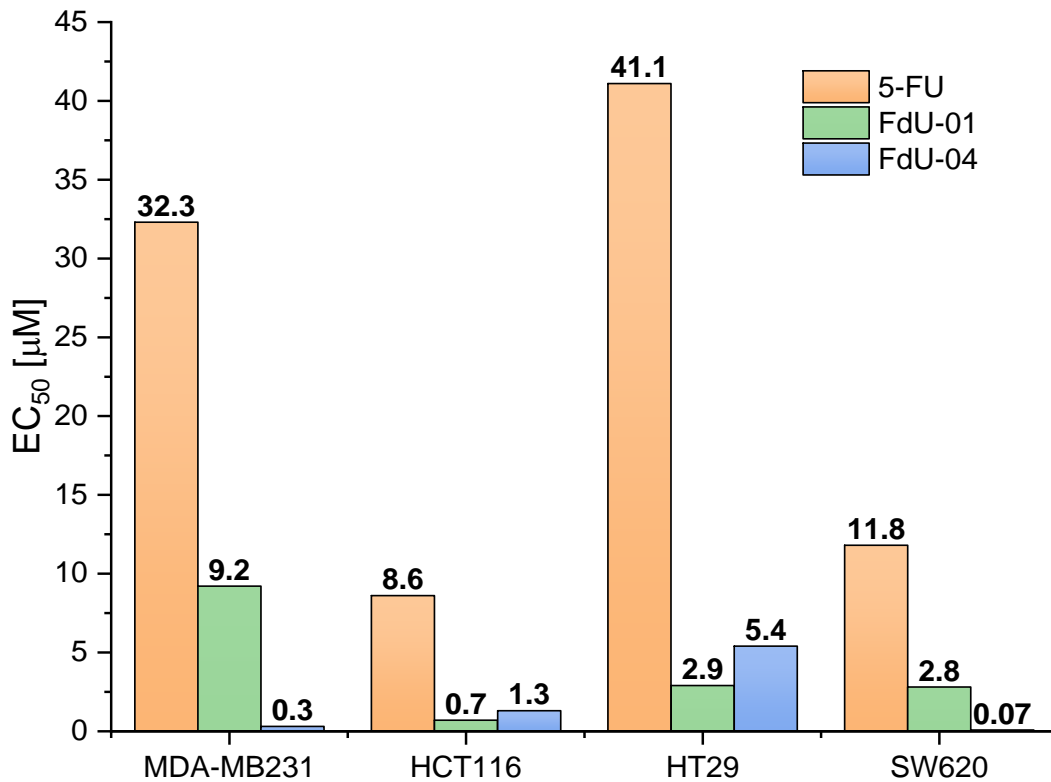


Abb. 91: EC_{50} -Werte von FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** im Vergleich zu 5-FU **1** in den getesteten Krebszelllinien.

Zusätzlich wurde in weiteren Studien durch konzentrationsabhängige Messungen eine hohe therapeutische Bandbreite für das FdU-01 **32a** und das FdU-04 **32d** ermittelt. Die TriPPP-Verbindungen zeigten im Vergleich zum 5-FU **1** bei bedeutend geringeren Konzentrationen bereits proliferationshemmende Eigenschaften, was ihren potenziellen Einsatz als antitumorale Wirkstoff weiter unterstreicht.

Insgesamt stellen FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** durch die Ergebnisse der Proliferationsassays zwei neue Leitstrukturen dar, die für weitere Versuche und *in vivo*-Studien verwendet werden sollten, da in den durchgeführten Proliferationsassays vielversprechende Eigenschaften als antitumorale Wirkstoffe ermittelt wurden.

4.7 Synthese verschiedener antitumoraler TriPPPro-Verbindungen

Nach den vielversprechenden Ergebnissen der Zellaufnahmestudien und den Proliferationsassays der FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a-f** sollten weitere potenziell antitumoral aktive TriPPPro-Verbindungen dargestellt werden. Da für das 5-FU **1** bzw. FdU **2** durch die Einführung des TriPPPro-Konzeptes die proliferationshemmenden Eigenschaften bei *in vitro* Studien signifikant verbessert werden konnten, kann auch auf eine Anwendbarkeit für weitere Nucleosidanaloga ausgegangen werden. Aus diesem Grund sollten für die antitumoral aktiven Nucleoside in Abb. 92 ebenfalls TriPPPro-Prodrugs dargestellt werden.

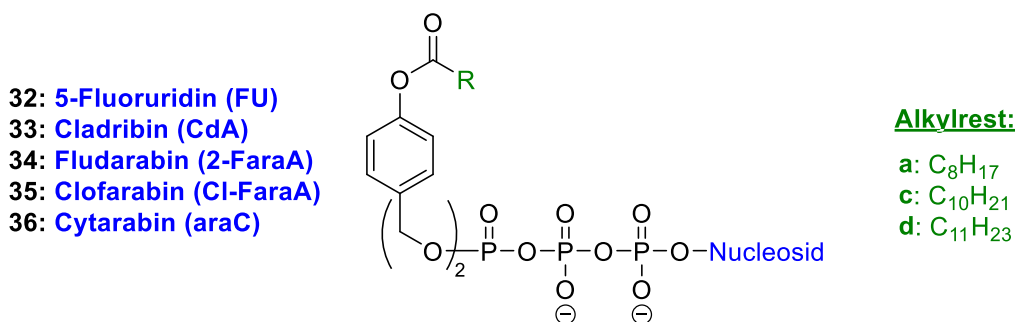


Abb. 92: TriPPPro-Verbindungen **32-36** der Nucleosidanaloga 5-Fluoruridin (FU) **76**, Cytarabin (araC) **22**, Cladribin (CdA) **24**, Fludarabin (2-FaraA) **25** und Clofarabin (Cl-FaraA) **26**.

Für die Nucleosidanaloga **22-26** sowie **75** stellen die Nucleosidtriphosphate die aktiven Metabolite dar. Zusätzlich wurden bei diesen Verbindungen wie beim 5-FU **1** verschiedene Resistenzmechanismen in den Phosphorylierungsschritten sowie unzureichende Zellaufnahme beobachtet, sodass das TriPPPro-Konzept eine vielversprechende Methode zur Verbesserung der proliferationshemmenden Eigenschaften sowie zur Behandlung von Resistenzen Krebszelllinien darstellen kann.

Bei den Alkylresten der AB-Maskierungen sollte im Vergleich zu den FdU-Verbindungen keine komplette Reihe von **a-f** dargestellt werden. Durch die vorangegangenen Studien konnte davon ausgegangen werden, dass für eine größtmögliche Aktivität die Maskierungseinheiten mit C₈ **a**, C₁₀ **c** und C₁₁ **d** verwendet werden sollten. Während die **c**- und **d**-Maskierungen für eine optimale Lipophilie der Verbindungen je nach Nucleosid und somit für eine größtmögliche Zellaufnahme und Aktivität sorgen sollten, sollte die **a**-Maskierung aufgrund der guten Resultate von Verbindung **32a** in den Proliferationsstudien (Abschnitt 4.6) verwendet werden.

Da für die hier dargestellten Nucleosidanaloga die Monophosphate kommerziell nicht oder nur sehr teuer zu erhalten sind, mussten diese zunächst synthetisch zugänglich gemacht werden, da diese für die TriPPPro-Synthese in ausreichenden Mengen vorhanden sein müssen. Auf die Synthesen sowie die Hydrolysestudien dieser TriPPPro-Verbindungen wird in den nächsten Abschnitten eingegangen.

4.7.1 Synthese von 5-Fluoruridin TriPPPro-Verbindungen

Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 erwähnt, kann das antitumoral aktive 5-FU **1** auch zum 5-Fluoruridin-Triphosphat **70** metabolisiert werden, woraufhin es in die intrazelluläre RNA eingebaut wird und auf vielen Ebenen der RNA-Synthese, aber auch Translation und anderer RNA-Prozessierung zu Schäden führt, die ebenfalls den Zelltod zur Folge haben.^{173,174} Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die TriPPPro-Verbindungen von 5-Fluoruridin **76** ebenfalls proliferationshemmende Eigenschaften aufweisen. Daher sollten die FU-Verbindungen FU-01 **33a**, FU-02 **33c** und FU-03 **33d** in Abb. 93 dargestellt werden. Die Synthese sollte wie für die FdU-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute erfolgen.

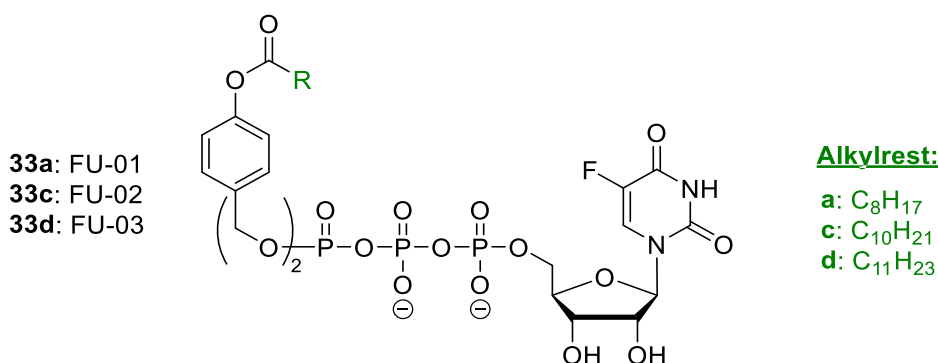


Abb. 93: Darzustellende FU-TriPPPro-Verbindungen **32a**, **32c** und **32d**.

4.7.1.1 Synthese von 5-Fluoruridin-5'-monophosphat

Um die FU-TriPPPro-Verbindungen FU-01 bis 03 über die *H*-Phosphonatroute darstellen zu können, muss zunächst das FU-5'-Monophosphat **77** in ausreichenden Mengen zugänglich gemacht werden. Hierzu sollte wie für das FdU-5'-Monophosphat **68** der Ansatz über die Amiditchemie gewählt werden. Auf den Versuch einer direkten Phosphorylierung des 5-Fluoruridins **76** wurde verzichtet, da davon ausgegangen wurde, dass hierbei ähnliche Schwierigkeiten wie für die Versuche am FdU **2** auftreten würden.

Für die Synthese des Monophosphats **78** kamen zwei verschiedene Syntheserouten in Betracht. Zum einen sollte die Synthese analog zum Monophosphat **68** (Abschnitt 4.3.2) erfolgen. Hierzu sollte das selektiv an 2'- und 3'-Position acetylgeschützte Nucleosid **78** mit dem Fm-Amidit **60** zur Reaktion gebracht werden, um über eine anschließende Entschützung das Monophosphat **77** zu erhalten. Die Synthese des geschützten Nucleosids **78** sollte zunächst wieder über orthogonale Schutzgruppen unter Einführung einer TBDMS-Schutzgruppe an der 5'-Position und anschließender selektiver Entschützung derselben Position mittels Fluoridionendonator ausgehend von 5-Fluoruridin **76** erfolgen.

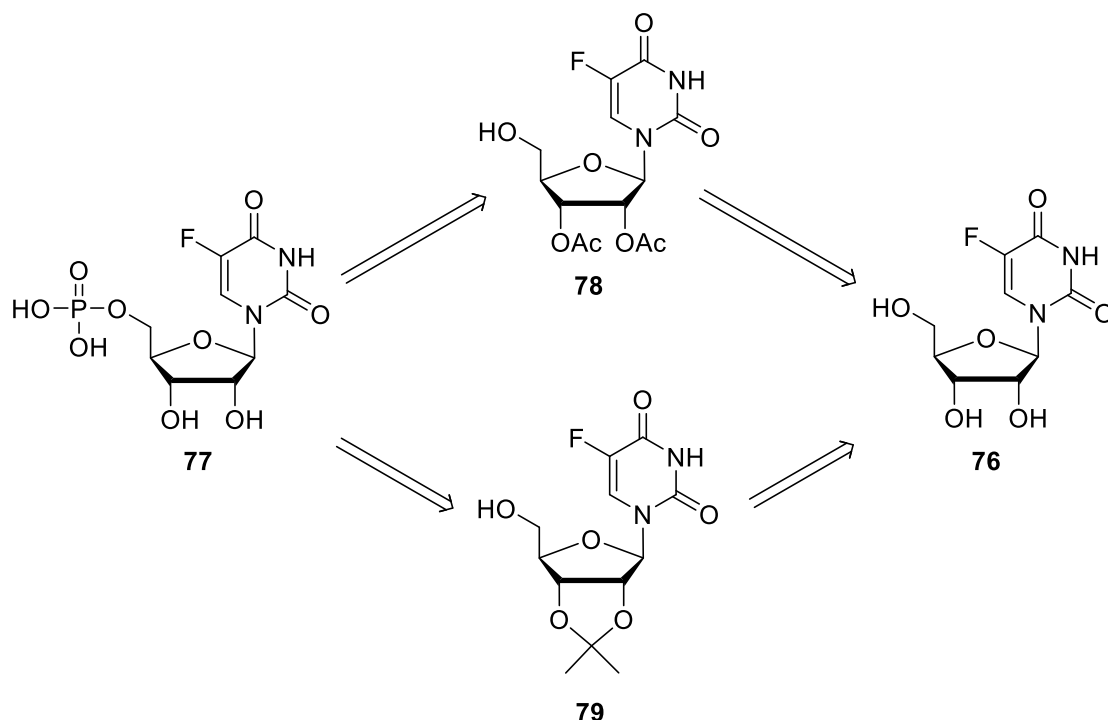


Abb. 94: Retrosyntheseschema der Darstellung von FU-Monophosphat **77**.

Da es sich aber bei 5-Fluoruridin **76** im Vergleich zum FdU **2** um ein Ribose-Nucleosid handelt, kann die selektive Schützung der 2'- und 3'-Hydroxyfunktion über einen und nicht über zwei Schritte erreicht werden. Dadurch würde der synthetische Aufwand insgesamt geringer ausfallen. Bei dieser Syntheseroute sollte das Monophosphat **77** ausgehend von dem isopropyliden-geschützten Nucleosid **79** durch Umsetzung mit einem Phosphoramidit erfolgen. Da die Isopropyliden-Schutzgruppen nicht wie die Acetylgruppen unter basischen, sondern unter sauren Bedingungen gespalten werden, muss hierfür ebenfalls ein Amidit verwendet werden, welches unter diesen Bedingungen spaltbare Schutzgruppen besitzt. Hierfür sollte Bis-O-(*tert*-butyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **80** verwendet werden. Das selektiv geschützte Nucleosid **79** sollte wiederum in einem Reaktionsschritt aus 5-Fluoruridin **76** erhalten werden. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. **95** dargestellt. Für die Synthese des acetylgeschützten Nucleosids **78** wurden die Bedingungen analog zum FdU-Nucleosid **73** gewählt. Jedoch muss bei der Einführung der Acetylgruppen im ersten Schritt darauf geachtet werden, dass eine ausreichende Zahl an Äquivalenten an Essigsäureanhydrid zugegeben werden müssen, um beide Hydroxyfunktionen vollständig zu schützen. Die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe mit Triethylammonium Trihydrofluorid erfolgte problemlos. Sowohl das vollständig geschützte Nucleosid **81** als auch das Nucleosid **78** ließen sich nach einfacher säulenchromatographischer Reinigung in guten Ausbeuten von 82 % und 96 % in hoher Reinheit erhalten. Insgesamt konnte so das selektiv mit Acetylgruppen geschützte 5-Fluoruridin **78** in einer Gesamtausbeute von 78 % über zwei Stufen erhalten werden (Abb. **95**).

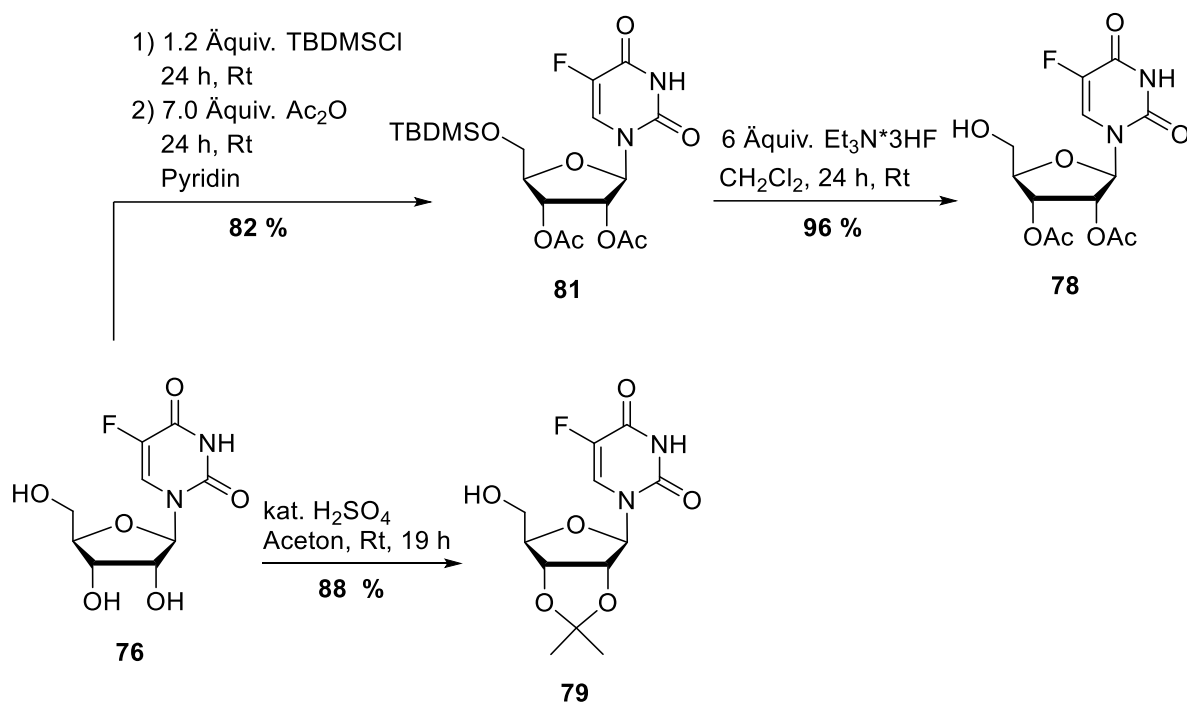


Abb. 95: Synthesen der selektiv geschützten Nucleoside **78** und **79** ausgehend von 2-Fluoruridin **2**.

Das Nucleosid **79** hingegen sollte nur durch eine Isopropyliden-Funktion geschützt werden. Die Isopropylidene (Acetonide) stellen eine der am meisten verwendeten Schutzgruppen für 1,2- und 1,3-Diole dar. Vor allem in der Zuckerchemie wird diese Schutzgruppe besonders häufig verwendet.¹⁸⁴ Der Vorteil in dieser Syntheseroute besteht darin, dass eine selektive Schützung der benachbarten 2'- und 3'-Hydroxyfunktionen erfolgt, ohne eine orthogonale Schutzgruppenstrategie wie für die Acetylgruppen verwenden zu müssen, sodass die 5'-Hydroxyfunktion frei vorliegt. Die Schützung erfolgte hierbei unter Säurekatalyse mit Schwefelsäure und Aceton als Reagenz und Lösungsmittel. Nach Beenden der Reaktion mit wässriger Ammoniaklösung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt in hoher Reinheit und guter Ausbeute von 88 % isoliert werden.

Für die anschließende Phosphorylierung wurden für die unterschiedlichen Nucleoside auch unterschiedliche Amidreagenzien verwendet. Grund hierfür sind die Schutzgruppen, die unter unterschiedlichen Bedingungen gespalten werden. Da es vorteilhaft ist, die Schutzgruppen des Amidits im selben Reaktionsschritt wie die Schutzgruppen der 2'- und 3'-Hydroxyfunktion wieder abzuspalten, müssen diese entsprechend gewählt werden. Für die Phosphorylierung von Nucleosid **78** sollte das wie in Abschnitt 4.3.2 verwendete Fm-Amidit **60** zum Einsatz kommen. Anschließend sollten alle Schutzgruppen unter basischen Bedingungen wieder abgespalten werden. Die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 96 dargestellt. Hierbei wurde analog zur Synthese von FdU-Monophosphat **68** vorgegangen. Insgesamt konnte mit Hilfe dieser Reaktionsbedingungen das Monophosphat **77** in einer guten Ausbeute von 63 % erhalten werden.

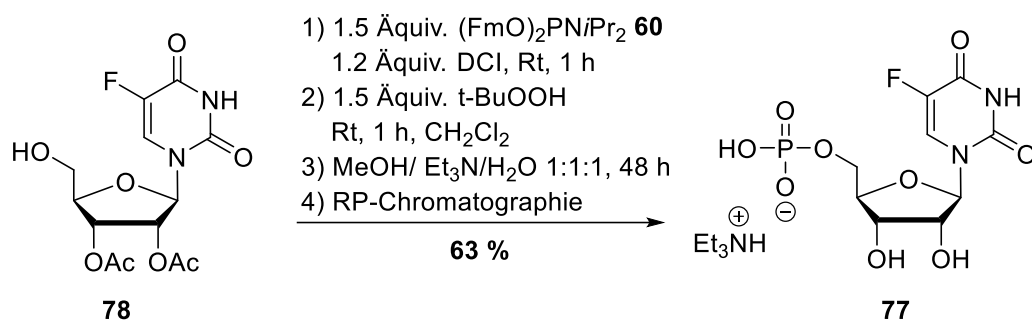


Abb. 96: Synthese von FU-Monophosphat **77** mittels Fm-Amidit **60**.

Für die Phosphorylierung von Nucleosid **79** sollte das ^tBu-Amidit **80** verwendet werden. Dieses ist kommerziell erhältlich, jedoch ist es auch synthetisch ausgehend vom Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **62** zugänglich. Da diese Synthese wie in eigenen vorangegangenen Arbeiten festgestellt aber besonders wegen der schwierigen Reinigung relativ aufwendig ist, wurde hier auf eine eigene Synthese verzichtet. Da die *tert*-Butyl-Funktion wie die Acetonidgruppe unter sauren Bedingungen gespalten werden kann, wurde dies anstelle des Fm-Amidits **60** verwendet. Die Reaktionsbedingungen für die versuchte Synthese sind in Abb. 97 dargestellt.

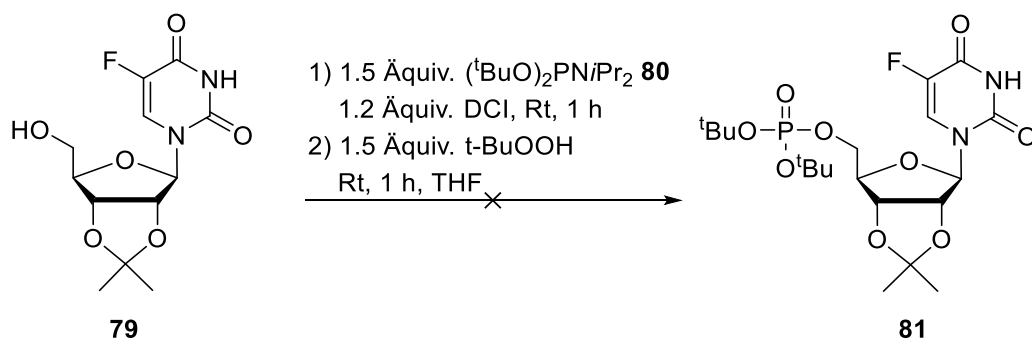


Abb. 97: Versuchte Phosphorylierung von Nucleosid **79** mit dem ^tBu-Amidit **80**.

Über diese Synthesebedingungen konnte das vollständig geschützte Monophosphat **81** nicht erhalten werden. Zum einen wurde während der Reaktion auch nach wiederholter Zugabe des Amidits **80** und Aktivator nur ein unvollständiger Umsatz vom Edukt **79** beobachtet, zum anderen konnte das Produkt nach Oxidation und säulenchromatographischer Reinigung nicht isoliert werden. Möglicherweise wurden die *tert*-Butylgruppen des Phosphats bereits unter den leicht sauren Bedingungen der Chromatographie gespalten, was die Isolierung des Produktes **81** verhinderte. Eine Anpassung der Reinigungsprozedur zu leicht basischen Bedingungen könnte hier hilfreich sein. Des Weiteren könnte komplett auf eine Chromatographie verzichtet und direkt mit dem Rohprodukt die Entschützung durchgeführt werden, um die vorzeitige Spaltung der Schutzgruppen zu unterbinden. Da aber bereits während der Reaktion Schwierigkeiten vor allem beim Umsatz des Eduktes beobachtet wurden, könnte auch bereits hier ein Problem in der Reaktion vorhanden sein. Ein Wechsel des Aktivators zu BTT und Änderung des Lösungsmittels brachte hierbei aber keine

Veränderung. Da die Synthese mit dem Fm-Amidit aber problemlos funktionierte und das Monophosphat **77** mit guten Ausbeuten erhalten werden konnte, wurde auf eine weitere Optimierung dieser Reaktion verzichtet.

Insgesamt konnte das FU-Monophosphat **77** über die Fm-Amiditchemie analog zum FdU-Monophosphat **68** in einer guten Ausbeute von 50 % über drei Stufen ausgehend vom 5-Fluoruridin **76** erhalten. Über die Syntheseroute mit dem ^tBu-Amidit **80** hingegen konnte das gewünschte Monophosphat nicht erhalten werden. Die erfolgreiche Synthese des Monophosphats **77** über die Fm-Amidit Chemie unterstreicht erneut die breite Anwendbarkeit als Phosphorylierungsreagenz mit zuverlässigen Ausbeuten und hoher Reproduzierbarkeit.

4.7.1.2 Synthese der Fluoruridin TriPPPro-Verbindungen

Nach erfolgreicher Synthese des FU-Monophosphats **77** schloss sich die Synthese der FU-TriPPPro-Verbindungen **33** an. Das Retrosyntheseschema ist in Abb. 98 dargestellt.

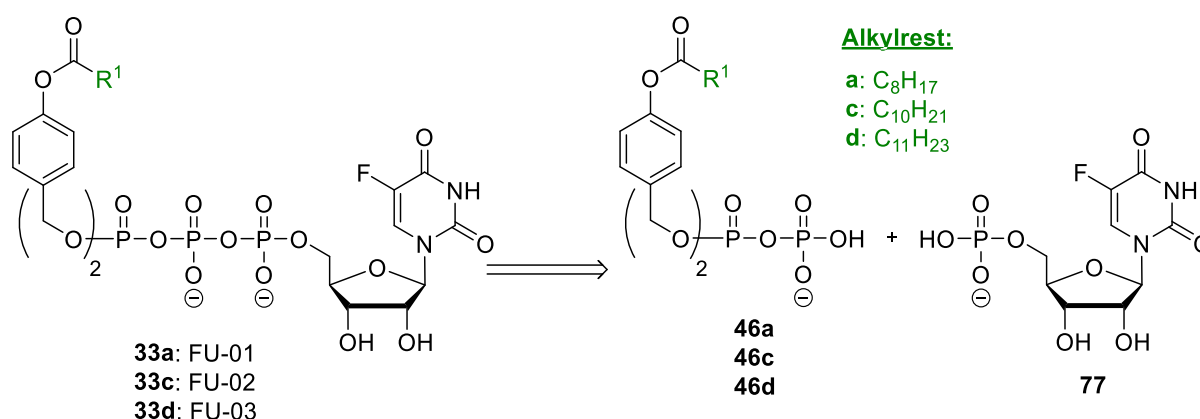


Abb. 98: Retrosyntheseschema der Darstellung von FU-TriPPPro-Verbindungen FU-01 **33a**, FU-02 **33c** und FU-03 **33d**.

Hierbei sollte wieder die *H*-Phosphonatroute verwendet werden, mit der bisher für alle in dieser Arbeit dargestellten TriPPPro-Verbindungen gute Ergebnisse erzielt wurden. Hierbei sollten die entsprechenden Pyrophosphate **46a**, **c** und **d** mit dem FU-Monophosphat **77** zur Reaktion gebracht werden. Dabei erfolgte die Kupplung über die etablierte, stufenweise Aktivierung des Pyrophosphats mit TFAA und 1-Methylimidazol. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 99 dargestellt.

Wie für das FdU-Monophosphat **68** wurde für das FU-Monophosphat **77** nur eine geringe Löslichkeit in Acetonitril mit Triethylammonium-Ionen beobachtet. Aus diesem Grund wurde für die Synthesen wie für die FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a-f** ebenfalls DMF als Lösungsmittel verwendet. Ebenso wurden für die längeren Acylreste der AB-Maskierungen längere Reaktionszeiten beobachtet. Für die Reinigung der Verbindungen wurde das typische Protokoll der automatisierten Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel sowie Ionentausch auf Ammoniumionen über DOWEX und erneuter Chromatographie durchgeführt. Insgesamt konnten alle drei TriPPPro-Verbindungen FU-01 bis 03 in

Ausbeuten zwischen 32 % und 36 % in hoher Reinheit erhalten werden. In Abb. 100 ist beispielhaft das ^1H - sowie ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **33c** mit den für TriPPP-Derivate typischen Signalen abgebildet.

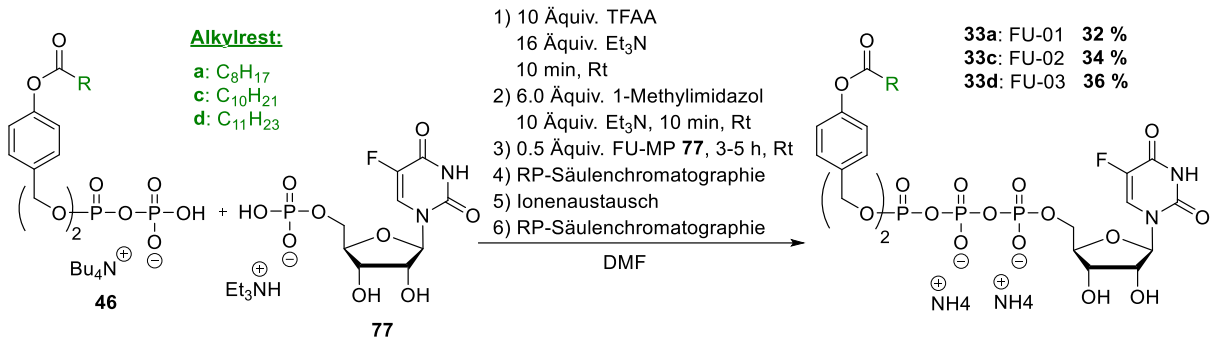


Abb. 99: Synthese von FU-01 **33a**, FU-02 **33c** und FU-03 **33d** über die *H*-Phosphonatrouten.

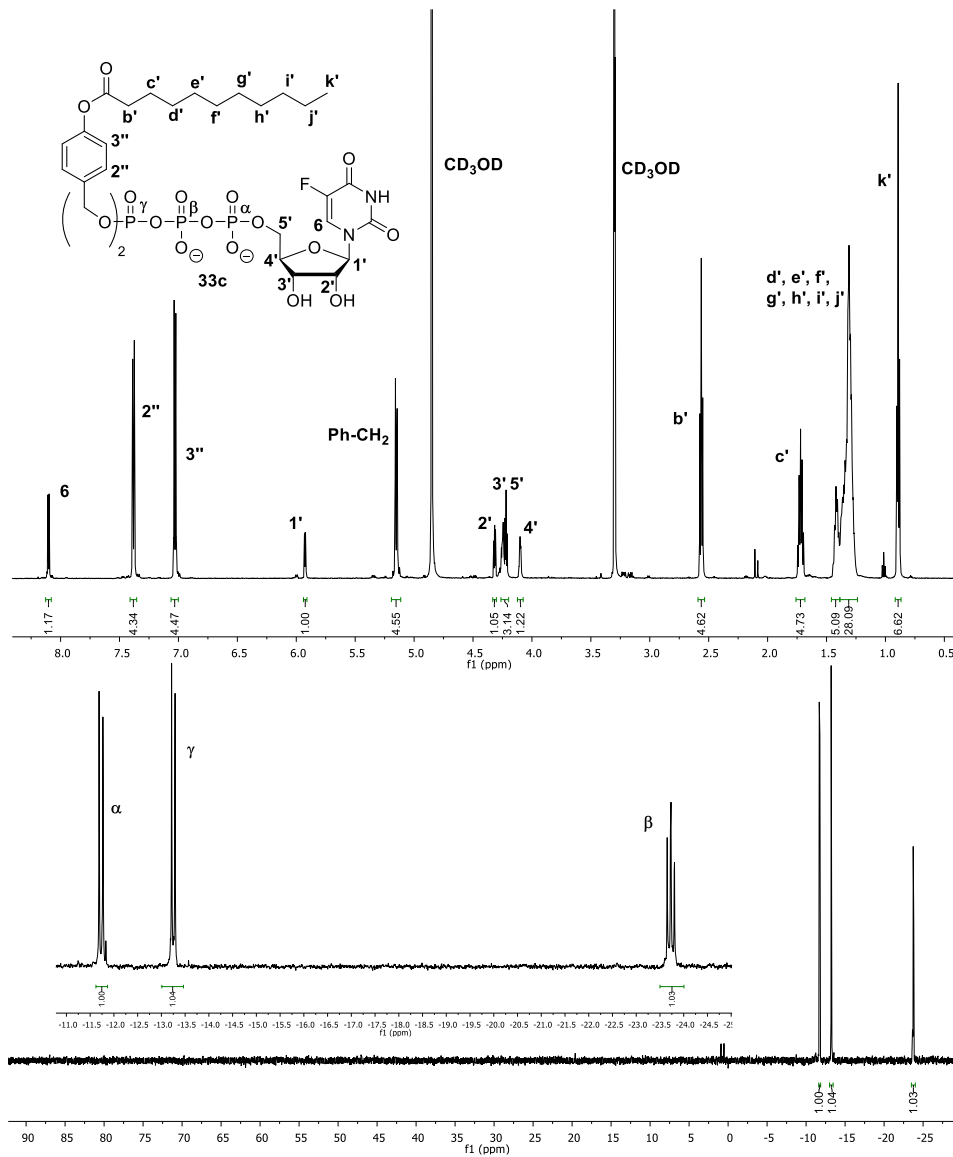


Abb. 100: ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektrum von FU-TriPPP-Verbindung FU-02 **33c**.

4.7.1.3 Antitumorale Aktivität der FU-TriPPPPro-Verbindungen

Wie für die FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** sollten für die FU-TriPPPPro-Verbindungen **33** die proliferationshemmenden Eigenschaften ermittelt werden. Hierfür wurden die Prodrugs **33** nach demselben Protokoll wie die Verbindungen **32** von der Arbeitsgruppe von U. Schumacher am Universitätsklinikum Eppendorf in XTT-Assays untersucht (Abschnitt 4.6). Die Inkubation erfolgte in HT29-Krebszellen. Die Ergebnisse mit der ermittelten EC_{50} -Werten für die jeweiligen Substanzen sind in Abb. 101 dargestellt. Als Referenzverbindung wurde ebenso das 5-FU **1** verwendet.

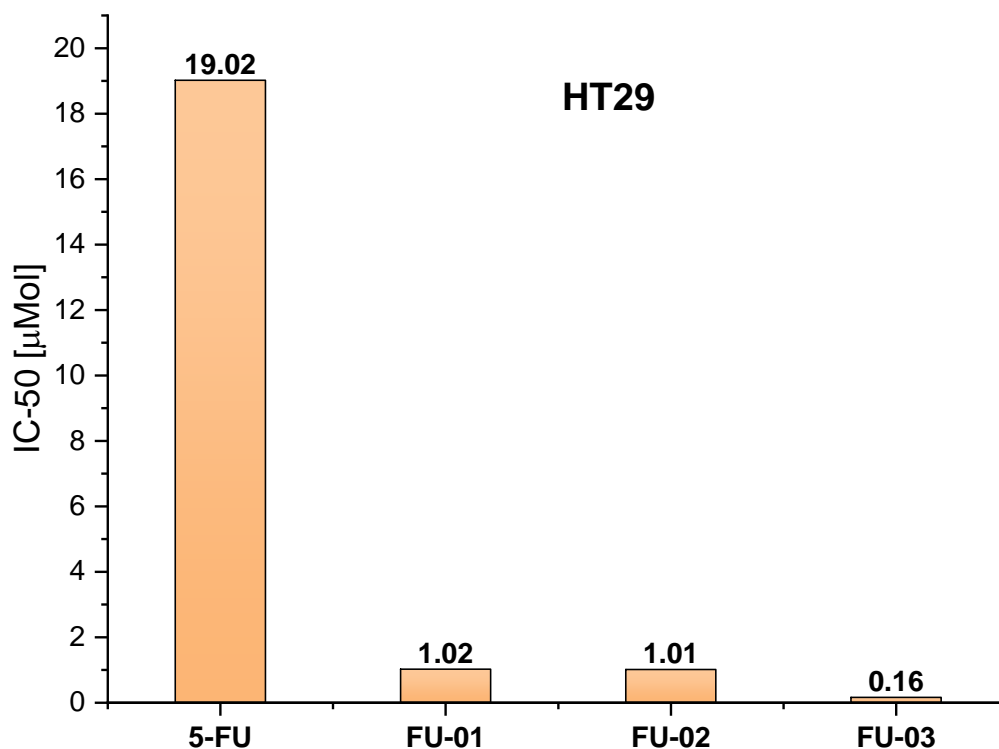


Abb. 101: EC_{50} -Werte der FU-TriPPPPro-Verbindungen **33** in HT29-Krebszellen im Vergleich zu 5-FU **1** als Referenzsubstanz.

Die ermittelten Werte für FU-01 **33a** und FU-02 **33c** liegen bei ungefähr 1 µM. Damit sind diese Prodrugs deutlich aktiver als das 5-FU **1** selbst, welches in diesen Proliferationsassays einen EC_{50} -Wert von 19 µM aufweist. Besonders aktiv ist aber FU-03 **33d**, welches mit einem Wert von 0.16 µM mehr als 100fach aktiver als 5-FU **1** selbst ist. Insgesamt zeigen alle FU-TriPPPPro-Verbindungen **33** ähnliche proliferations-hemmende Eigenschaften wie die aktiven FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32a** und **32d** in der HT29-Zelllinie. Durch diese Ergebnisse kann die Wirksamkeit des TriPPPPro-Konzeptes in Bezug auf antitumorale Aktivität weiter bestätigt werden. Auch interessant ist die Tatsache, dass erneut das FU-03 **33d** die besten proliferationshemmenden Eigenschaften aufweist. In den Lipophilievergleichen mit den BCNA-Leitstrukturen wurde FU-03 **33d** bedingt durch seine lipophilen Eigenschaften als aktivste Substanz prognostiziert (Abschnitt 4.7.7). Die

Anwendbarkeit dieses Modells auf das Design der antitumoralen TriPPPPro-Prodrugs kann durch diese Ergebnisse weiter untermauert werden.

Ebenso wie die FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** zeigen auch die FU-TriPPPPro-Verbindungen **33** im Vergleich zum 5-FU **1** proliferationshemmende Eigenschaften bei deutlich geringeren Konzentrationen. In Abb. 102 ist die logarithmische Konzentration der Prodrugs gegen die Anzahl der lebenden Zellen aufgetragen. Während die FU-Verbindungen bei Konzentrationen von ungefähr 1.5 μM bereits mehr als 50 % aller inkubierten Krebszellen töten, wird für 5-FU **1** eine Konzentration von mindestens 12.5 μM benötigt. Die FU-TriPPPPro-Verbindungen zeigen im Vergleich also potenziell ein deutlich verbessertes therapeutisches Fenster.

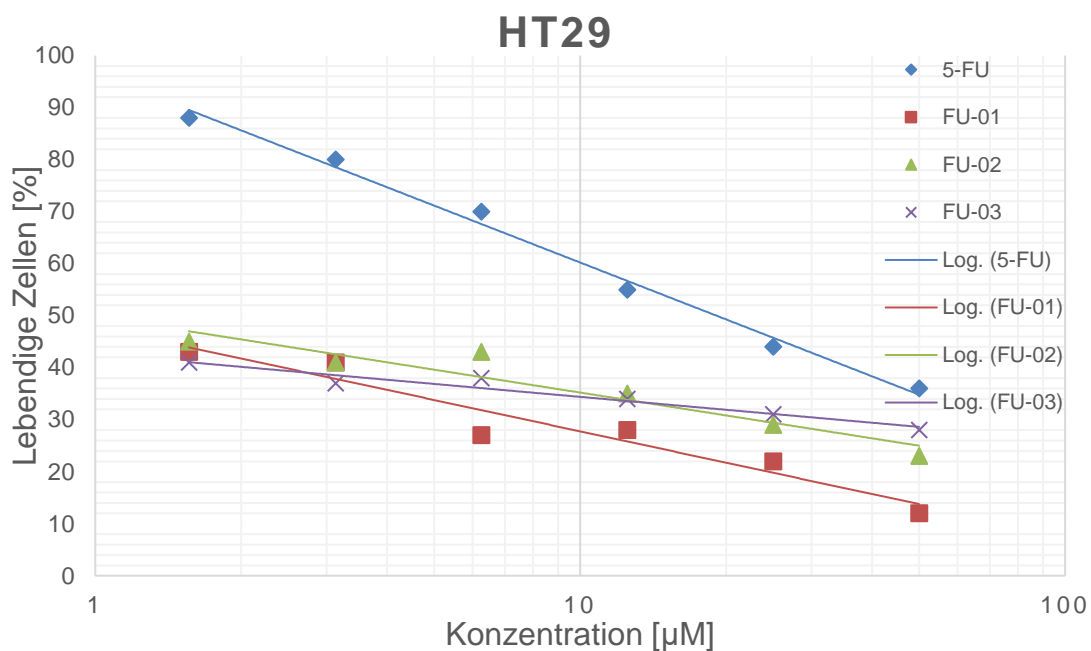


Abb. 102: Proliferationshemmende Eigenschaften von FU-01 bis 03 **33** und 5-FU **1** in Abhängigkeit von der logarithmischen Konzentration in HT29-Zellen.

4.7.2 Synthese von Cladribin TriPPPro-Verbindungen

Wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, stellt 2-Chlor-2'-desoxyadenosin **24** (Cladribin) ein antitumoral aktives Nucleosid dar. Im Vergleich zu den FU- und FdU-Nucleosiden ist das Cladribin ein Purin-Analogon, welches jedoch an der 2-Position der Nucleobase ein Chloratom trägt.¹⁸⁵ Durch diese Modifikation ist Cladribin **24** resistent gegenüber dem Abbau durch die Adenosin-Desaminase (ADA), die die Umwandlung vom Adenosin in Inosin katalysiert.¹⁸⁶ Besonders häufig kommt die ADA in B- und T-Lymphozyten vor. Dies führt vor allem dazu, dass das Cladribin in diesen Zellen akkumuliert wird.¹⁸⁷ Das in den Zellen durch enzymatische Phosphorylierung erhaltene Cladribintriphosphat (CdA-TP) **82** stellt den aktiven Metaboliten dar, der durch den Einbau in die DNA die Synthese und Reparatur stört, was zum Zelltod führt. Aufgrund seines Wirkmechanismus und der Akkumulation in den Lymphozyten wird Cladribin **24** vor allem bei Haarzelleukämie und chronischer, lymphatischer B-Zell Leukämie verwendet. Außerdem zeigt es gute Aktivitäten gegenüber non-Hodgkin Lymphomen.^{185,187}

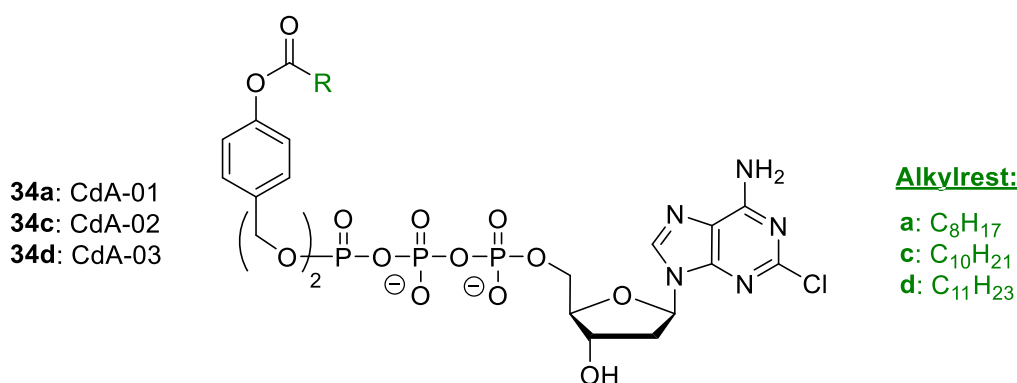


Abb. 103: Darzustellende CdA-TriPPPro-Verbindungen CdA-01 bis 03 **34a**, **34c** und **34d**.

Die Synthese der CdA-TriPPPro-Verbindungen 01 bis 03 (Abb. 103), sollte wieder über die *H*-Phosphonatroute erfolgen. Hierzu musste zunächst das Monophosphat, aber auch das Nucleosid selbst synthetisch zugänglich gemacht werden, da das Cladribin kommerziell in nur sehr geringen Mengen und zu hohen Preisen erhältlich ist.

4.7.2.1 Synthese von Cladribin

Für die Synthese von Cladribin **24** sind verschiedene Ansätze in der Literatur bekannt (Abb. **104**). Der erste Ansatz basierte auf der Glykosylierung von Desoxyribose und dem entsprechenden Purin. ROBINs publizierte eine Synthese, bei der eine 2'-Desoxy-1'-chlorribose mit dem 6-Imidazolidat des 2-Chlorpurins gekuppelt wird, um Cladribin zu erhalten (Route **A**).¹⁸⁸ Nachteilig hierbei ist trotz der β -selektiven Glykosylierung die aufwendige Synthese der Precursors. XU *et al.* publizierten eine Synthese ausgehend von 2-Chloradenosin **83**, bei der eine Gesamtausbeute von 31 % über fünf Stufen erreicht wurde (Route **B**).¹⁸⁹ Nachteilig hierbei ist die geringe Verfügbarkeit des Startmaterials **83**, wodurch

diese Syntheseroute sehr kostspielig ist. Ebenso von ROBINS wurde eine Syntheseroute publiziert, bei der ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin **84** Cladribin **24** mit 64 % über fünf Stufen erhalten wurde.¹⁹⁰ Ebenso publizierte LAKSHMAN *et al.* eine ähnliche Synthese, bei der ebenfalls von 2'-Desoxyguanosin **84** ausgegangen wurde, wobei die Substitution zum Amin der 6-Position über ein Benzotriazol-Derivat erfolgte (Route **C**).¹⁹¹ Die aktuellste publizierte Methode stellt die Synthese von PENG dar, bei der ausgehend von 2'-Desoxyadenosin **85** Cladribin **24** in einer Ausbeute von 45 % in vier Stufen erhalten wird (Route **D**).¹⁹²

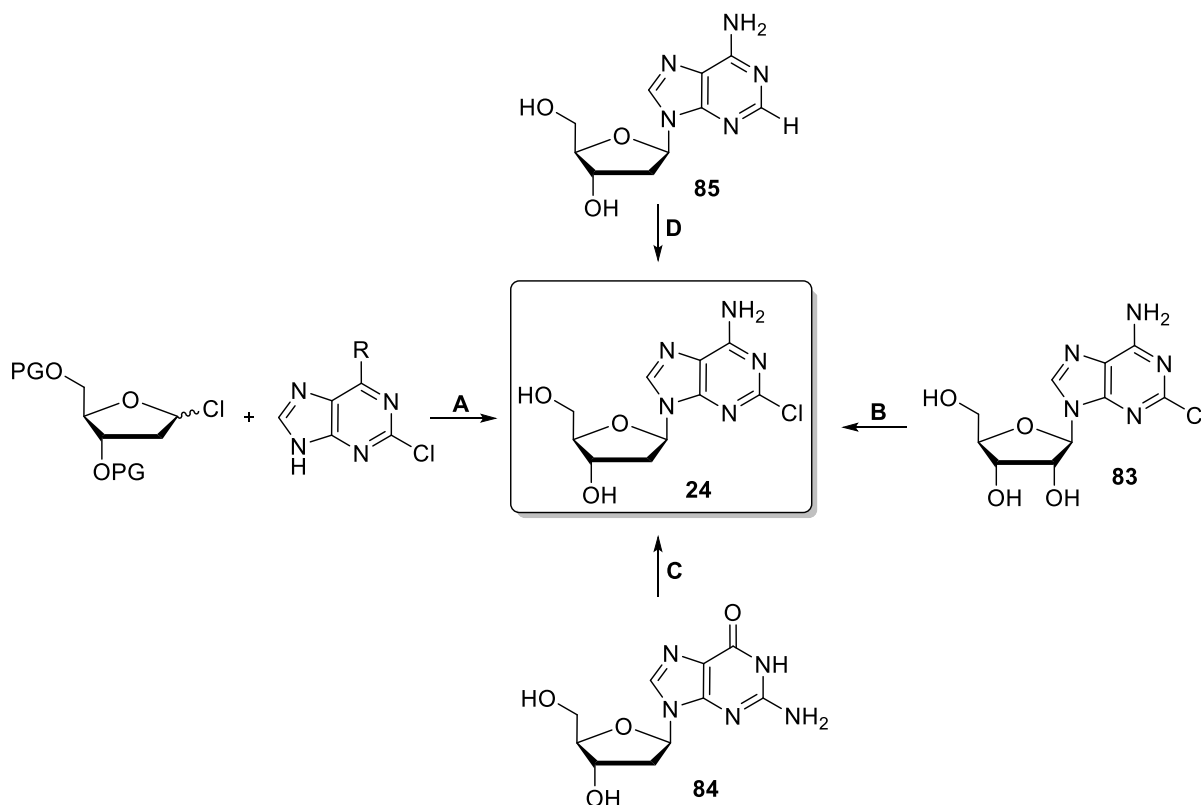


Abb. 104: Mögliche Syntheserouten für die Darstellung von Cladribin **24**.

Aufgrund der hohen beschriebenen Ausbeuten und einfacher Syntheseschritte sollte in dieser Arbeit zunächst die Route von PENG¹⁹² nachvollzogen werden. Der Schlüsselschritt hierbei ist die Nitrierung und anschließende Chlorierung der 2-Position an der Nucleobase. Cladribin **24** soll über die Entschützung von dem vollständig geschützten Nucleosiden erhalten werden. Von PENG wurde ein vollständig benzoylgeschütztes Nucleosid verwendet, jedoch sollten in dieser Arbeit orthogonale Schutzgruppen verwendet und die noch geschützten Nucleoside **86** oder **87** erhalten werden, um eine anschließende Phosphorylierung zu erleichtern. Diese sollten ausgehend von den 5'-TBDMS-geschützten Nucleosiden **88** und **89** dargestellt werden. Zuvor sollte die Chlorierung nach PENG an den 2-Nitro-Verbindungen **90** und **91** durchgeführt werden. Die Nitrogruppe sollte durch eine Nitrierungsreaktion an den vollständig geschützten 2'-Desoxyadenosinen **92** und **93** erhalten werden. Die Schutzgruppen sollten direkt am 2'-Desoxyadenosin **85** eingeführt werden.

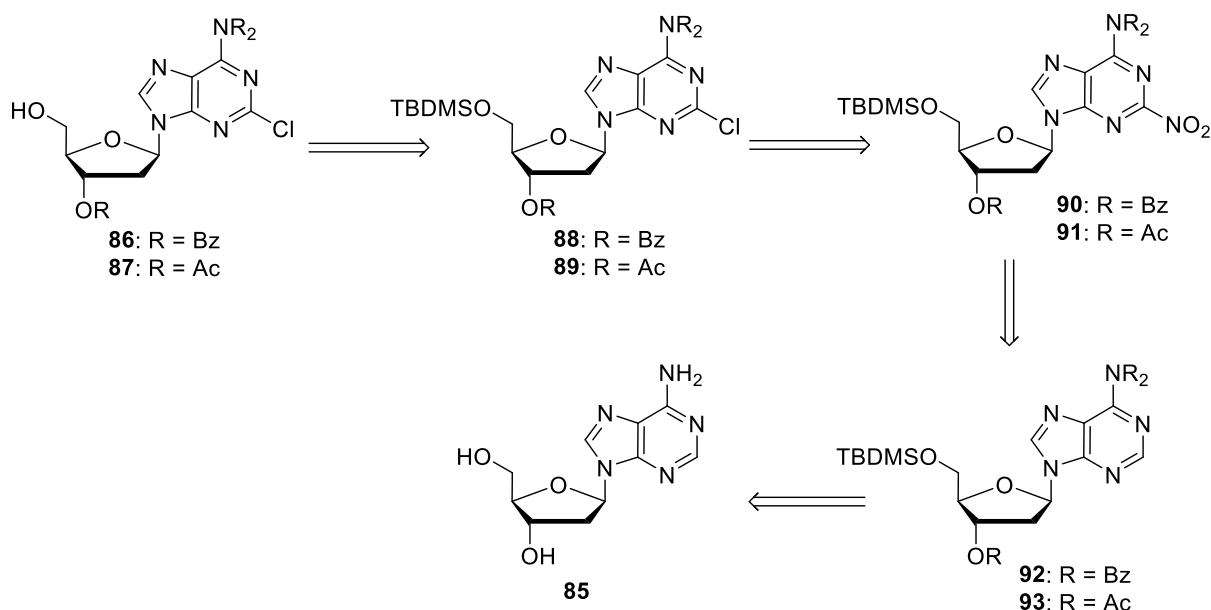


Abb. 105: Retrosyntheseschema für die selektiv geschützten Cladribin-Derivate **86** und **87** basierend auf der Syntheseroute von PENG.¹⁹²

Zunächst sollten die orthogonalen Schutzgruppen am 2'-Desoxyadenosin **85** eingeführt werden. Hierzu wurde ein *one-pot* Ansatz durchgeführt, in dem die Silylschutzgruppe und die Benzoylgruppen in einer Reaktion eingeführt werden sollten. Das Amin sollte für die spätere Nitrierungsreaktion doppelt verestert werden, da laut Literatur dies für den Reaktionsverlauf entscheidend ist.^{193,194} Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 106 dargestellt.

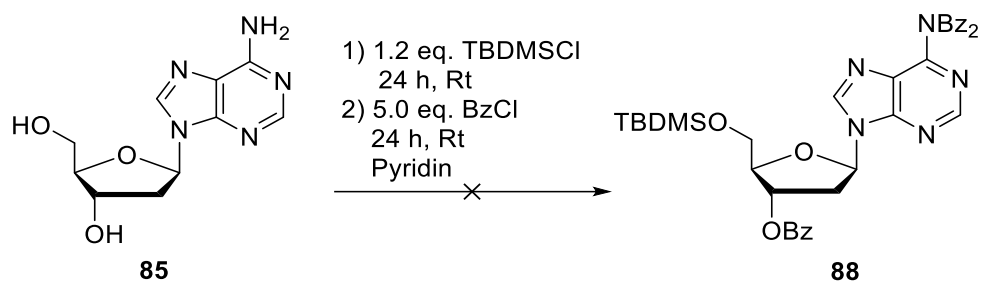


Abb. 106: Versuch der Synthese des vollständig geschützten Nucleosids **88**.

Für die Einführung der Schutzgruppen wurden analoge Synthesebedingungen wie für die BCNA-, FdU- und FU-Nucleoside verwendet. Jedoch konnte hier nach 24 Stunden kein vollständiger Umsatz des Eduktes **85** beobachtet werden. Insgesamt war kaum eine Reaktion zu erkennen, weshalb die Reaktion für längere Zeit gerührt und zudem erwärmt wurde. Obwohl weiterhin kein vollständiger Umsatz beobachtet werden konnte, erfolgte eine Zugabe von Benzoylchlorid. Nach dem Beenden der Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Es konnte hauptsächlich das Edukt und geringe Mengen des vollständig benzoylgeschützten Nucleosids erhalten werden. Daraufhin wurden die Reaktionsbedingungen variiert, um einen vollständigen Umsatz bei der Einführung der Silylgruppe zu erhalten. Zunächst wurde sich

an der Vorschrift von DEBARGE *et al* orientiert. Diese berichteten eine Gesamtausbeute von 72 % durch den Einsatz von DMF als Lösungsmittel unter Zusatz von Imidazol als Base.¹⁹⁵ Unter diesen Reaktionsbedingungen (Abb. 107, Eintrag 1) konnte ebenfalls nur eine geringe Umsetzung zum gewünschten Nucleosid **94** beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde erneut das Lösungsmittel gewechselt sowie eine leichte Erhöhung der TBDMS-Chlorid Menge vorgenommen. Zusätzlich wurde 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) in katalytischen Mengen hinzugegeben (Eintrag 2). Hierbei konnte erneut nur ein unvollständiger Umsatz des Eduktes beobachtet werden. Schließlich wurde die Menge an TBDMS-Chlorid auf insgesamt 2.5 Äquivalente erhöht, obwohl dadurch eine Silylierung der 3'-Hydroxyfunktion erwartet wurde (Eintrag 3 und 4). Dies führte schließlich zum gewünschten Ergebnis, wobei eine vollständige Umsetzung beobachtet wurde. Die doppelte Silylierung als Nebenprodukt konnte überraschenderweise nicht beobachtet werden. Ebenso schien sowohl Imidazol als auch Triethylamin als Base geeignet zu sein. So konnte das gewünschte 5'-geschützte Nucleosid **82** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 99 % erhalten werden.



Eintrag	TBDMSCl [Äquiv.]	Lösungsmittel	Zusatz	Ausbeute [%]
1 ¹⁹⁵	1.0	DMF	Imidazol	9
2	1.2	Pyridin	4-DMAP	22
3	2.5	DMF	Et ₃ N	99
4	2.5	DMF	Imidazol	99

Abb. 107: Reaktionsbedingungen zur Einführung der TBDMS-Schutzgruppe in der 5'-Position am 2'-Desoxyadenosin **85**.

Nach der erfolgreichen Schützung der 5'-Position sollte nun die 3'-Hydroxyfunktion sowie die Aminogruppe am Purin geschützt werden. Hierzu sollten sowohl die Benzoylgruppen wie in der Arbeit von PENG¹⁹² eingeführt sowie die Acetylgruppen erprobt werden. Die Reaktionsbedingungen für beide Ansätze sind in Abb. 108 dargestellt. Für die Einführung der Benzoylgruppen konnte nach säulenchromatographischer Reinigung eine Ausbeute von 61 % erzielt werden. Als Nebenprodukt wurde auch das einfach benzoylierte Nucleosid isoliert, welches jedoch laut DEGHATI für die folgende Nitrierungsreaktion ungeeignet ist. Für die Acetylgruppen wurde lediglich eine Ausbeute von 17 % für das doppelt acetylierte Amin

93 erhalten. Bei dieser Reaktion stellt trotz des großen Überschusses an Essigsäureanhydrid das einfach acetylierte Amid das Hauptprodukt dar. Grund hierfür ist vermutlich die geringe Aktivität des einfach acetyliertenamins. Eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde in dieser Arbeit jedoch nicht erprobt. Insgesamt konnten die doppelt geschützten Nucleoside **92** und **93** in moderaten Ausbeuten erhalten werden.

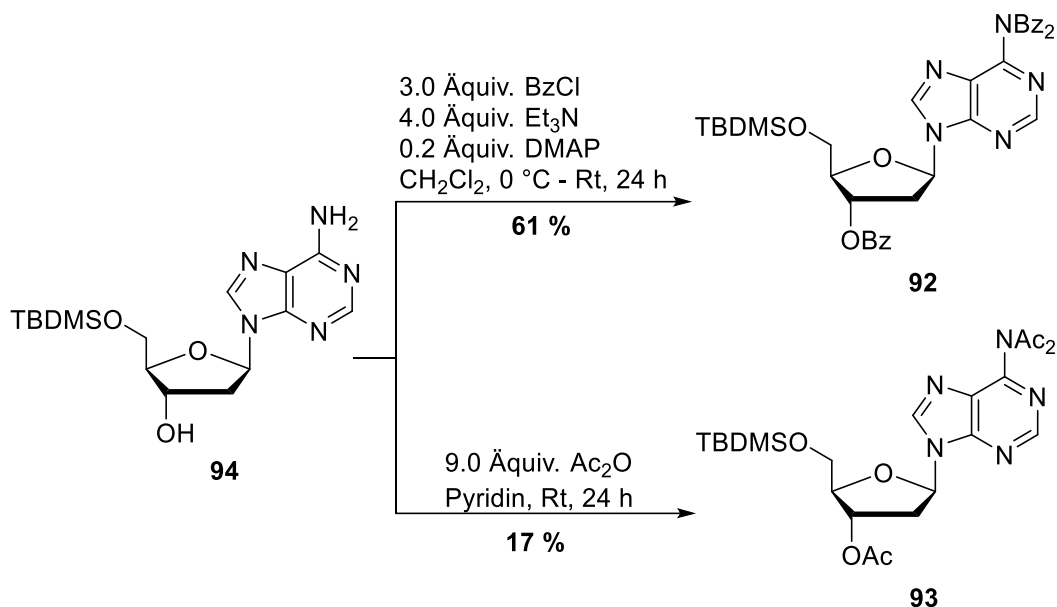
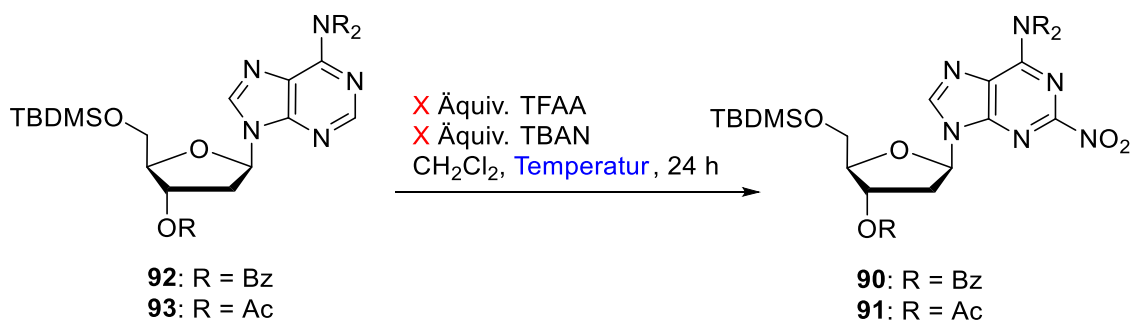


Abb. 108: Synthese der vollständig geschützten Nucleoside **92** und **93**.

Anschließend sollte mit den vollständig geschützten Nucleosiden **92** und **93** die Nitrierung zu den Nucleosiden **90** und **91** erfolgen. Hierbei sollten die Reaktionsbedingungen analog zu der Synthese von PENG¹⁹² durchgeführt werden, die wiederum auf den Publikationen von DEGHATI¹⁹⁴ beruhen. Bei dieser Reaktion wird zunächst das Nitrierungsreagenz mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und Tetra-*n*-butylammoniumnitrat (TBAN) *in situ* hergestellt und dieses anschließend mit dem Nucleosid **92** umgesetzt. Die verschiedenen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 109 dargestellt. Für die gewählten Reaktionsbedingungen konnte leider kein Produkt isoliert werden. Obwohl sich streng an die Vorschriften der Literatur gehalten wurde (Eintrag 1), konnte nach drei Stunden bei 0 °C keinerlei Umsetzung des Eduktes beobachtet werden. Ebenso konnte eine Verlängerung der Reaktionsdauer auf 24 Stunden und Erhöhung auf Raumtemperatur keine Reaktion bewirken. Die Erhöhung der Anzahl an Äquivalenten von den Nitrierungsreagenzien war ebenfalls ergebnislos (Eintrag 2). Diese Ergebnisse konnten für das Nucleosid **93** reproduziert werden, weshalb nicht von einer negativen Auswirkung der Schutzgruppen ausgegangen werden kann, zumal PENG ebenfalls Benzoylschutzgruppen verwendete. Schließlich wurde noch das Nitrierungsreagenz modifiziert, indem Essigsäureanhydrid anstelle von TFAA verwendet wurde, wodurch sich eine erhöhte Reaktivität versprochen wurde. Auch dieser Versuch brachte jedoch keinen Erfolg. In keinem Reaktionsansatz

konnte eine Umsetzung des Eduktes **92** oder **93** zum Nitrierungsprodukt **90** und **91** beobachtet werden. Lediglich das Edukt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung reisoliert werden.



Eintrag	Edukt	Nitrierungsreagenzien [Äquiv.]	Temp. [°C]	Ausbeute [%]
1	92	1.5	0 - Rt	-
2	92	3.0	0 - Rt	-
3	92	3.0	Rt	-
4	93	1.5	0 - Rt	-
5	92	1.5 (Ac_2O)	0 - Rt	-

Abb. 109: Reaktionsbedingungen zur Nitrierung von **92** und **93**.

Das für diese Reaktion keinerlei Umsatz erhalten wurde, schien etwas verwunderlich, da in der Literatur diese Art von Reaktion an Purin mehrfach beschrieben ist. Jedoch ist bis auf die Vorschrift von PENG¹⁹² keine Literatursynthese mit 2'-Desoxyadenosin bekannt. Dies könnte die mögliche Ursache für einen mangelnden Umsatz bedeuteten, auch wenn dies aus mechanistischen Gründen nicht ersichtlich ist. Zusammenfassend konnte die beschriebene Synthese zum Cladribin **24** von Peng in dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

Ein weiterer Ansatz stellt die Synthese von LAKSHMAN *et al.* dar, bei der vom 2'-Desoxyguanosin **84** ausgegangen wird (Abb. 104, C). Das Retrosyntheschema ist in Abb. 110 dargestellt. Cladribin **24** soll ausgehend vom vollständig TBMDs-geschützten Nucleosid **95** erhalten werden, welches die Benzotriazolgruppe an der O⁶-Position trägt. Durch die Umsetzung dieses Triazols mit Ammoniak und anschließender Spaltung der Schutzgruppen kann so Cladribin **24** dargestellt werden. Das Nucleosid **95** sollte zuvor durch eine Chlorierung ausgehend vom TBDMS- und O⁶-benzotriazolgeschützten 2'-Desoxyguanosin **96** erhalten werden. Die Einführung der O⁶-Benzotriazolfunktion sollte mittels dem in der Peptidsynthese häufig eingesetztem BOP-Reagenz **98** am vollständig TBDMS-geschützten Guanosin **97** erfolgen. Das geschützte Nucleosid **97** sollte ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin **84** erhalten werden.

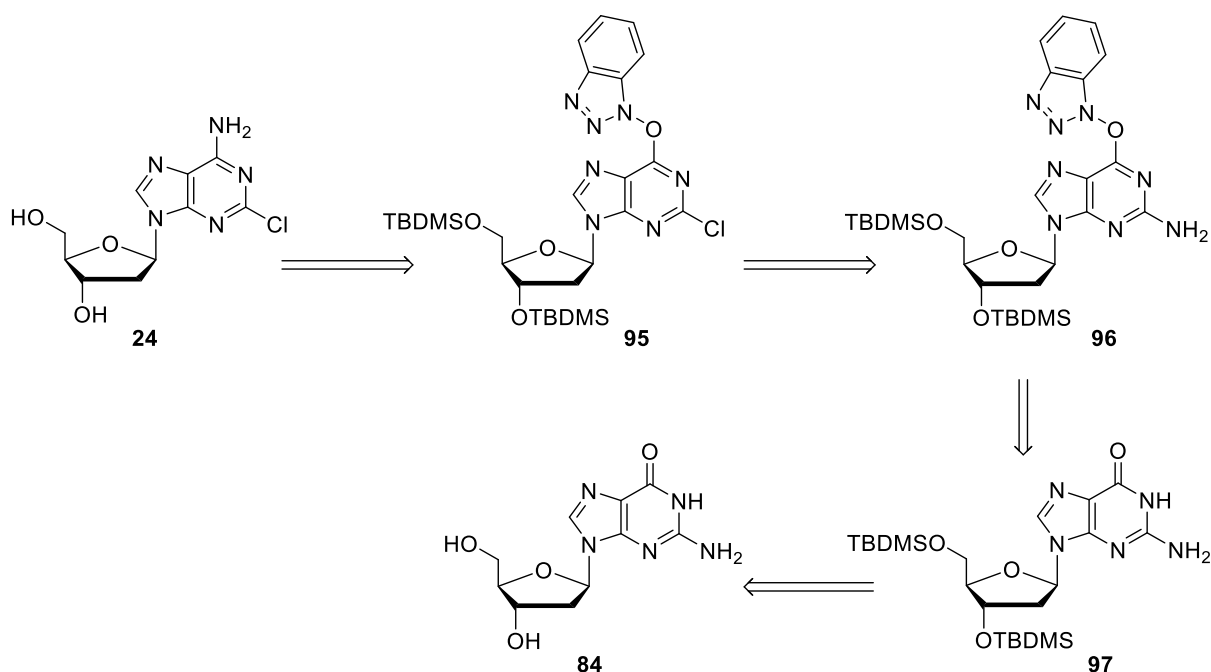


Abb. 110: Retrosyntheseschema von Cladribin **24** ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin **72** basierend auf der Synthese von LAKSHMAN *et al.*¹⁹¹

Zunächst sollte das TBDMS-geschützte Nucleosid **97** dargestellt werden, da die freien Hydroxygruppen die nachfolgenden Reaktionen beeinträchtigen würden. Hierzu wurden Reaktionsbedingungen analog zu Taniguchi *et al.*¹⁹⁶ angewendet. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 111 dargestellt. 2'-Desoxyguanosin **84** wurde in DMF suspendiert und anschließend mit TBDMS-Chlorid und Imidazol versetzt. Nach Rühren über Nacht konnte hierbei ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Die Reinigung des Produktes erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol. Hierbei ist es sinnvoll, bei größeren Ansätzen die Mengen des Rohproduktes für die Kristallisation in kleinere Ansätze zu teilen, da für eine vollständige Kristallisation große Mengen an Methanol benötigt werden.

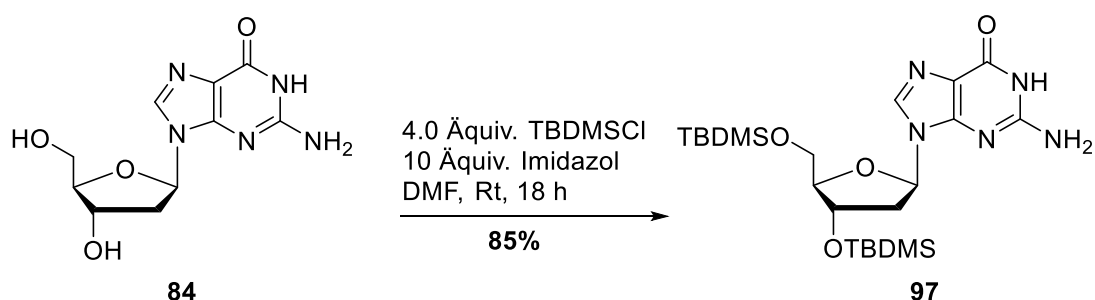
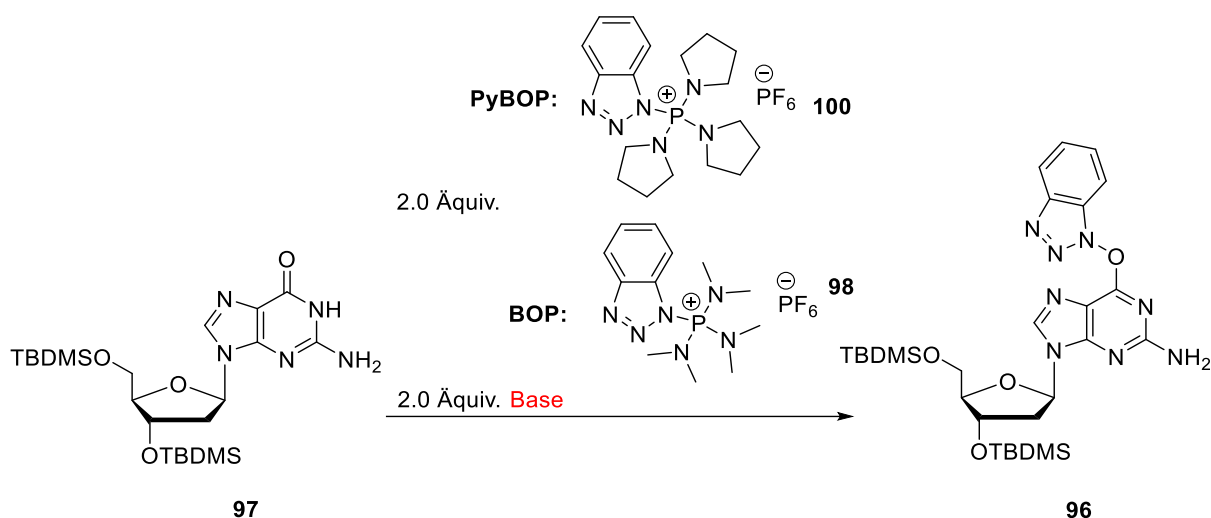


Abb. 111: Synthese von Nucleosid **97**.

Anschließend erfolgte die Einführung der O^6 -Benzotriazolfunktion. Hierfür wurden zunächst die Reaktionsbedingungen von LAKSHMAN *et al.* aus 2008 angewendet, bei denen das BOP-Reagenz **98** eingesetzt wurde. Da dies aber äquimolar Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) **99** freisetzt, sollte zunächst das weniger schädliche PyBOP-Reagenz **100** erprobt

werden, welches heutzutage in der Peptidchemie das BOP-Reagenz beinahe vollständig ersetzt hat. Vorteilhaft hierbei ist, dass nicht das krebserregende HMPT **99** freigesetzt wird.



Eintrag	Reagenz	Lösungsmittel	Base	Zeit [h]	Ausbeute [%]
1	PyBOP	DMF	DIPEA	72	18
2	BOP	DMF	DIPEA	18	35
3	PyBOP	MeCN	DIPEA	18	40
4	PyBOP	MeCN	DBU	1	42
5	BOP	MeCN	DBU	1	68

Abb. 112: Reaktionsbedingungen der Synthese von Nucleosid **96**.

Mit dem PyBOP-Reagenz **100** konnten nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden (Eintrag 1). Grund hierfür war vor allem der schlechte Umsatz des Eduktes **97**, welches nach 72 Stunden und erneuter Zugabe von PyBOP **100** immer noch nicht vollständig umgesetzt werden konnte. Auch der Wechsel auf das in der Literatur beschriebene BOP-Reagenz **98** konnte die Ausbeute auf nur 35 % steigern, obwohl diese in der Literatur¹⁹¹ als wesentlich höher beschrieben wurde. In einer weiteren Publikation von 2009 beschrieb LAKSHMAN eine verbesserte Synthese für Guanodin-Derivate indem Acetonitril als Lösungsmittel und DBU als Base verwendet wird.¹⁹⁷ Mit Hilfe dieser Reaktionsbedingungen konnte die Ausbeute auf insgesamt 68 % gesteigert werden (Eintrag 5). Dies liegt zwar immer noch unter der von LAKSHMAN beschriebenen Ausbeute von 85 %, ist aber dennoch ausreichend für die nächsten Synthesen. Ein erneuter Einsatz von PyBOP als Reagenz unter diesen Reaktionsbedingungen ging wieder mit starken Ausbeuteverlusten einher (Eintrag 4). Anschließend erfolgten die Chlorierung und die Substitution an der 6-Position. Hierzu wurden die Reaktionsbedingungen wieder analog zur Synthese von LAKSHMAN *et al.* gewählt.¹⁹¹ Die Reaktionssequenz sowie die anschließende Spaltung der TBDMS-Schutzgruppen ist in Abb. **113** dargestellt.

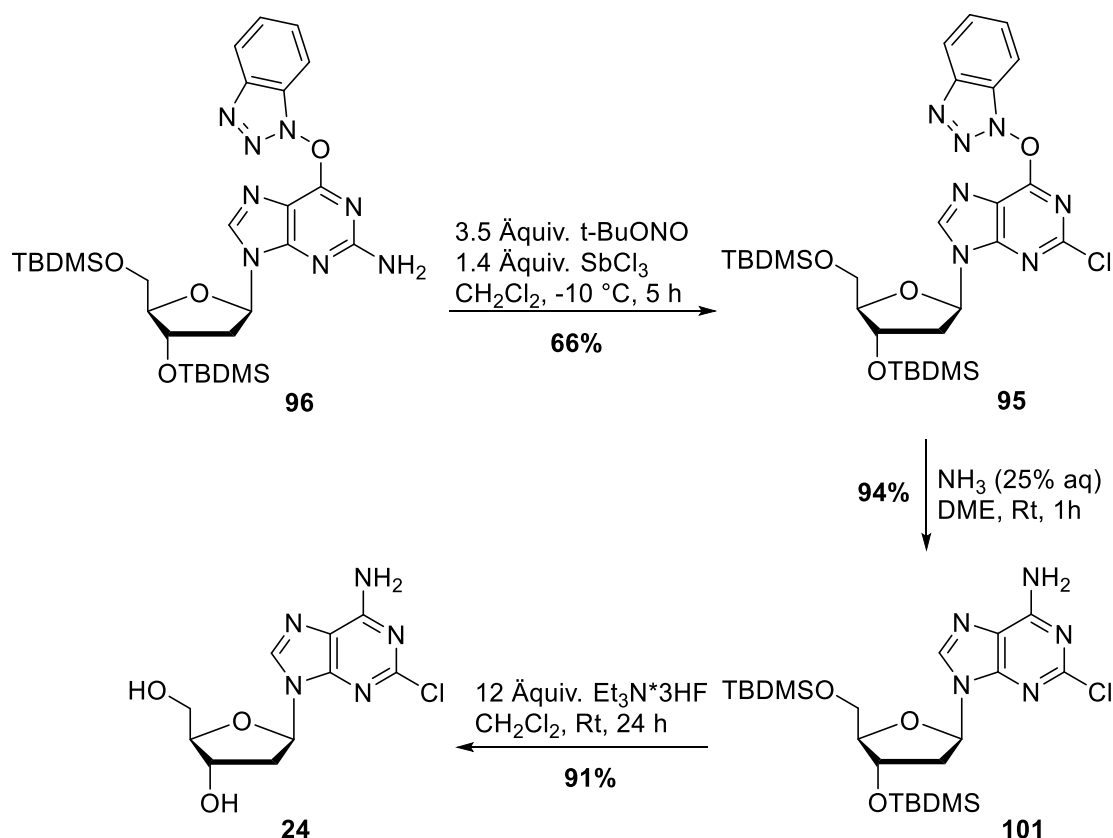


Abb. 113: Synthese von Cladribin **24** ausgehend von Nucleosid **96**.

Die Chlorierung des O⁶-substituierten Nucleosids **96** an der 2-Position erfolgte mit Antimon(III)-chlorid. Hierbei konnte ein vollständiger Umsatz nach fünf Stunden beobachtet werden. Bei dieser Reaktion ist es wichtig, dass die Reaktionstemperatur bei mindestens -10 °C gehalten wird. Bei höheren Temperaturen konnte die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden, was die Ausbeute deutlich reduzierte. Insgesamt konnte das gewünschte Produkt **95** mit einer Ausbeute von 66 % erhalten werden, was der Literatur entspricht.¹⁹¹ Im nächsten Schritt wurde die Substitution des Benzotriazols mittels wässriger Ammoniaklösung durchgeführt. Hierzu wurde das Edukt in 1,2-Dimethoxyethan (DME) gelöst und zusammen mit der Ammoniaklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das gewünschte, vollständig geschützte Cladribin **101** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung so in einer guten Ausbeute von 94 % erhalten werden. Die anschließende Entschützung erfolgte analog zu in diesen Arbeiten bisher durchgeführten Desilylierungen mittels Triethylammonium-trihydrofluorid als Fluoridionendonator. Hierbei konnte eine Ausbeute von 91 % erreicht werden.

Insgesamt konnte Cladribin **24** über eine angepasste Syntheseroute nach LAKSHMAN *et al.*¹⁹¹ in einer Gesamtausbeute von 32 % über fünf Stufen erhalten werden. Die Syntheseroute von PENG¹⁹² konnte in dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden. Grund hierfür war die Nitrierungsreaktion als Schlüsselschritt, die trotz zahlreicher Modifikationen keinen Umsatz zum gewünschten Produkt lieferte.

4.7.2.2 Synthese von Cladribin-5'-monophosphat

Nach der erfolgreichen Synthese von Cladribin **24** erfolgte die Synthese des Cladribin-Monophosphats **102**. Da wie in Abschnitt 4.7.2.1 beschrieben für die Synthese des Cladribins **24** eine orthogonale Schutzgruppenstrategie nicht praktikabel ist, sollte zunächst die direkte Phosphorylierung ohne Schutzgruppen erprobt werden. Die direkte Phosphorylierung sollte mittels der bereits ausführlich in Abschnitt 4.3.2 besprochenen YOSHIKAWA-Methode¹⁷⁸ durchgeführt werden. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 114 dargestellt.

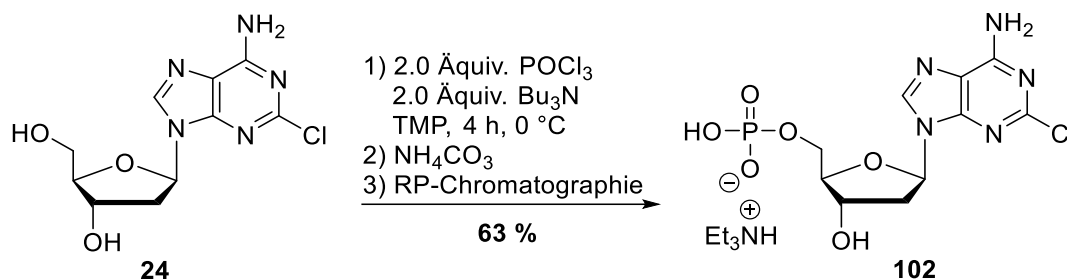


Abb. 114: Synthese von Cladribin-5'-monophosphat **102** ausgehend von Cladribin **24** über die YOSHIKAWA-Reaktion.

Das Nucleosid wurde nächst in Trimethylphosphat gelöst und bei 0 °C mit Phosphorylchlorid und Tributylamin versetzt. Nach vier Stunden bei 0 °C war ein nahezu vollständiger Umsatz zum gewünschten Monophosphat **102** mittels RP-HPLC erkennbar. Zusätzlich konnten nur geringe Mengen des 3',5'-diphosphorylierten Nebenproduktes nachgewiesen werden. Bei Erhöhung der Anzahl an Äquivalenten von Phosphorylchlorid und Base war bereits nach einer Stunde eine bedeutende Menge an diphosphoryliertem Nebenprodukt vorhanden. Eine dadurch erhoffte Verkürzung der Reaktionszeit konnte hierdurch also nicht erreicht werden. Möglicherweise könnte das Weglassen der Base zu einer erhöhten Selektivität führen, was aber in der Regel mit einer längeren Reaktionszeit einhergeht. Dieser Ansatz wurde aber aufgrund der bereits guten Resultate mit den angewendeten Reaktionsbedingungen nicht weiter untersucht.

Zum Beenden der Reaktion wurde die Reaktionslösung zunächst mit einer Ammoniumhydrogencarbonatlösung gequenchet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Chloroform gewaschen, um das Trimethylphosphat zu entfernen. Anschließend erfolgte eine automatisierte RP-Chromatographie an RP-18 Kieselgel mit einem Triethylammonium-bicarbonat-Puffer. Mit Hilfe dieses Puffers wird zum einen eine gute Trennleistung erzielt, zum anderen indirekt ein Ionenaustausch auf Triethylammoniumionen für das Phosphat durchgeführt. Insgesamt konnte so das gewünschte Cladribin-5'-monophosphat (CdA-MP) **102** in einer guten Ausbeute von 63 % erhalten werden.

4.7.2.3 Synthese der Cladribin TriPPPro-Verbindungen

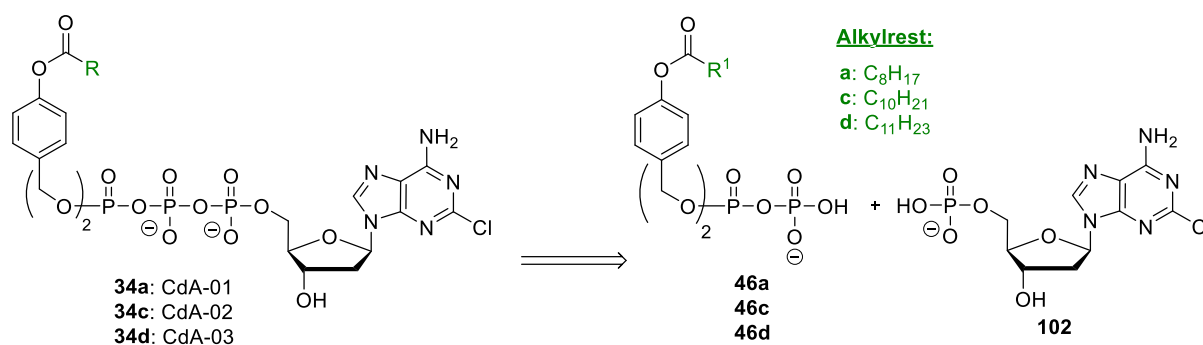


Abb. 115: Retrosyntheseschema der Darstellung von CdA-TriPPPro-Verbindungen CdA-01 **34a**, CdA-02 **34c** und CdA-03 **34d**.

Das Retrosyntheseschema für die CdA-TriPPPro-Verbindungen 01 bis 03 ist in Abb. 115 dargestellt. Die Prodrugs sollten wieder über die *H*-Phosphonatroute erhalten werden, bei der das CdA-Monophosphat **102** mit den Pyrophosphaten **46c**, **46e** und **46f** über eine stufenweise Aktivierung miteinander gekuppelt wird.

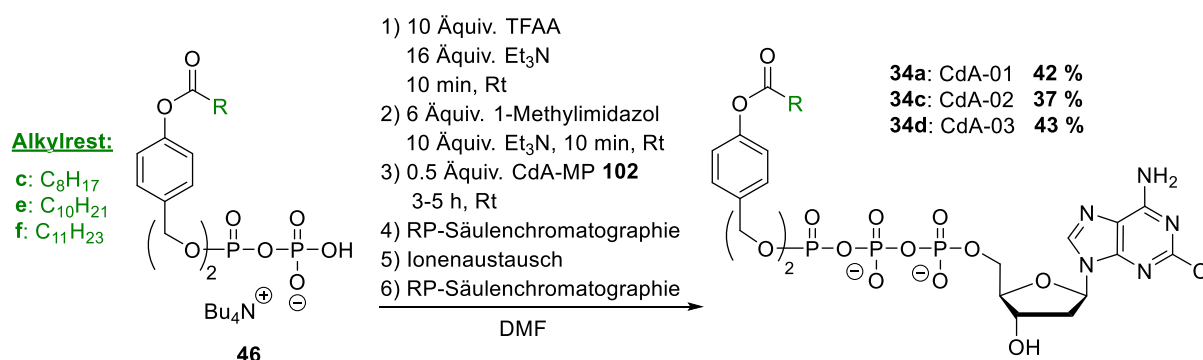


Abb. 116: Synthese von CdA-TriPPPro-Verbindungen 01 bis 03 **34a**, **c** und **d** über die *H*-Phosphonatroute.

Die Reaktionsbedingungen für alle darzustellenden TriPPPro-Verbindungen CdA-01 bis 03 sind in Abb. 116 dargestellt. Wie für die FdU- und FU-TriPPPro-Verbindungen wurde für das CdA-Monophosphat **102** nur eine geringe Löslichkeit in Acetonitril beobachtet, weshalb die Synthese erneut in DMF durchgeführt wurde. Ebenso wiesen die längeren Acylreste der Maskierungseinheiten eine vergleichsweise längere Reaktionszeit auf. Insgesamt konnten aber mit dem üblichen Protokoll der Synthese und der Reinigung über automatisierte RP-Chromatographie und Ionenaustausch über DOWEX-NH₄⁺ alle drei gewünschten TriPPPro-Verbindungen CdA-01 bis 03 in guten Ausbeuten zwischen 37 % und 43 % erhalten werden. In Abb. 117 ist beispielhaft das ¹H- sowie ³¹P-Spektrum von CdA-02 **34c** mit den für TriPPPro-Verbindungen typischen Signalen dargestellt.

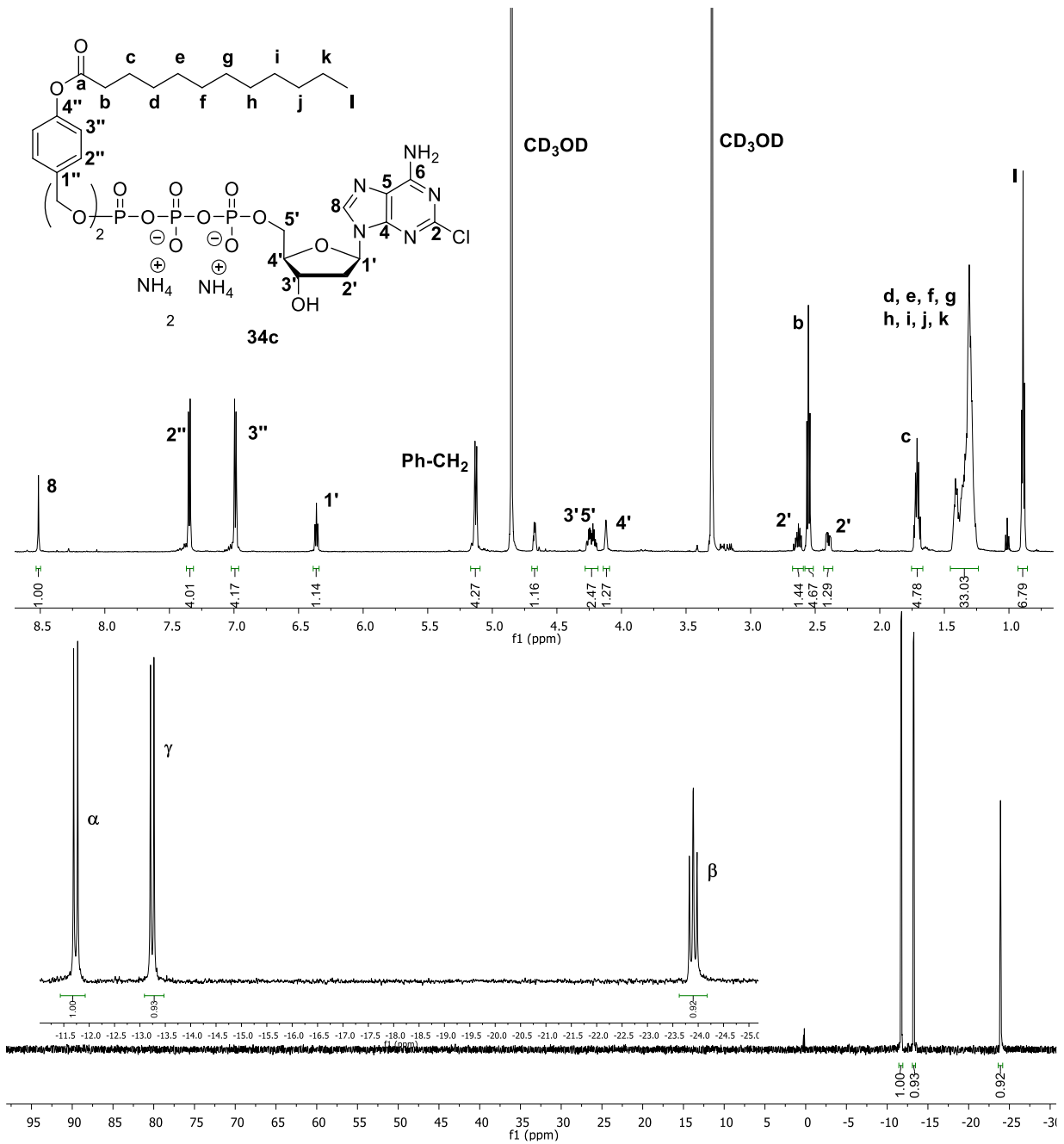


Abb. 117: ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektrum von CdA-TriPPPPro-Verbindung CdA-02 34c.

4.7.3 Synthese von Fludarabin TriPPPro-Verbindungen

Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben stellt das Fludarabin **25** ein antitumoral aktives Nucleosid dar. Als Purin-Analogon weist das Fludarabin **25** an der 2-Position ein Fluoratom auf. Dies verhindert einen schnellen Abbau durch die Adenosin-Desaminase (ADA), welche intrazellulär Adenosin in Inosin überführt. Zusätzlich enthält es eine Arabinosylfuranose anstelle einer Ribofuranose. Es wird besonders häufig gegen chronische lymphatische Leukämie, akute myeloische Leukämie (AML) und verschiedene Lymphome eingesetzt.⁹² Dabei stellt die Verabreichungsform meist das Fludarabin-5'-Monophosphat (2FaraA-MP) **103** dar. Dadurch wird eine hohe Wasserlöslichkeit sowie ein gewisser „lock-in“-Effekt der Substanz im Plasma erzeugt, was die Selektivität gegenüber Blutzellen erhöht. Im Plasma selbst wird das Prodrug aber wieder dephosphoryliert, sodass es als Fludarabin in die Zellen aufgenommen wird. In den Zellen inhibiert zum einen das Fludarabin-5'-diphosphat (2FaraA-DP) **104** die Ribonucleotid Reduktase (RNR), zum anderen wird das Fludarabin-5'-triphosphat (2FaraA-TP) **105** als aktiver Metabolit bei der DNA-Synthese eingebaut und hemmt die DNA-Polymerase. Durch diese Eigenschaften wirkt das Fludarabin als stark proliferationshemmende Verbindung.^{92,115}

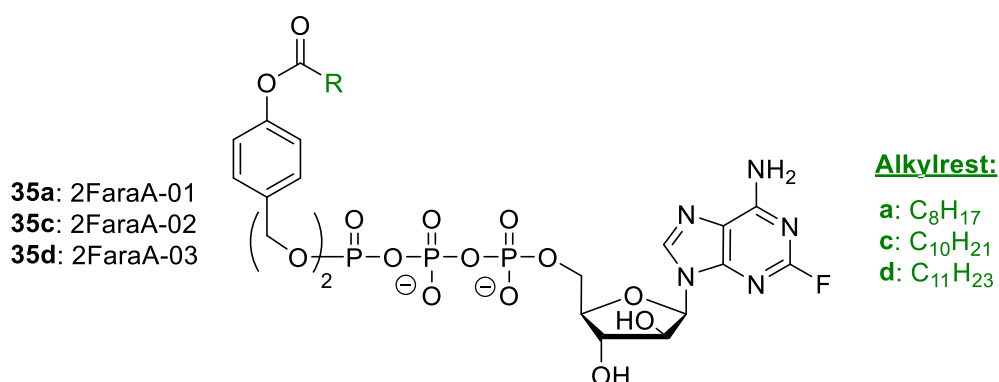


Abb. 118: 2FaraA-TriPPPro-Verbindungen 2FaraA-01 bis 03 **35a**, **35c** und **35d**.

Die Synthese der 2FaraA-TriPPPro-Verbindungen 01 bis 03 **35a**, **35c** und **35d** (**Abb. 118**) sollte wieder über die *H*-Phosphonatroute erfolgen. Das Fludarabin-Monophosphat **103** ist zwar kommerziell erhältlich, aber nur zu extrem hohen Preisen. Daher sollte das Monophosphat und das Nucleosid zunächst dargestellt werden.

4.7.3.1 Synthese von Fludarabin

Für die Synthese von Fludarabin sind neben dem enzymatischen Weg ausgehend vom 2-Fluoradenosin **106** (**Abb. 119**, Route **A**) nur wenige Syntheserouten publiziert.¹⁹⁸ Ein nicht enzymatischer Ansatz von GUNDERSEN *et al.* beruht auf der Fluorierung von Adenosin **17** an der 2-Position mit anschließender Inversion der 2'-Hydroxyfunktion (Route **B**).¹⁹⁹ Die Fluorierung selbst beruht auf der vorherigen Nitrierung der 2-Position. Da in dieser Arbeit aber keine guten Ergebnisse für diese Art von Reaktion erzielt wurden (**Abschnitt 4.7.2**),

erschien dieser Ansatz ebenso unpraktikabel. Ein dritter Ansatz von SHEN *et al.* basiert auf der Glykosylierung von 2-Fluoradenin **107** und einer selektiv 2'-geschützten Ribose, die ausgehend von Verbindung **108** erhalten wird (Route **C**).²⁰⁰

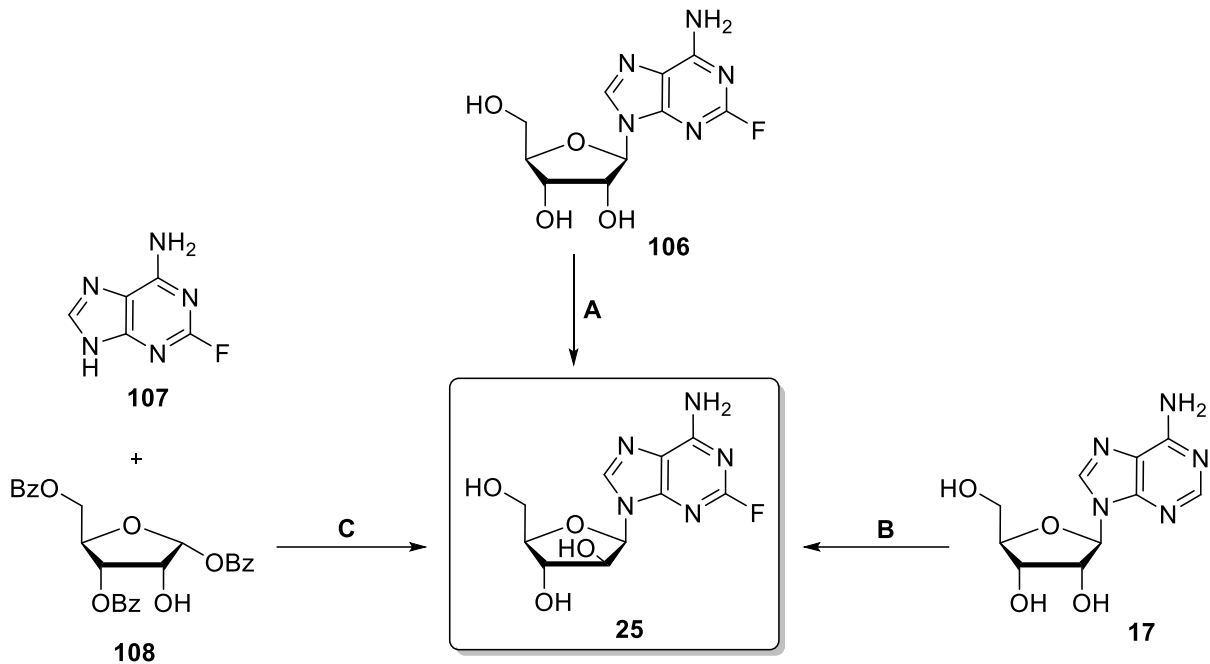


Abb. 119: Mögliche Syntheserouten für die Darstellung von Fludarabin **25**.

In dieser Arbeit sollte zunächst der Ansatz von SHEN *et al.* erprobt werden. Die enzymatischen Synthesen (Route **A**) haben in der Regel den Nachteil, dass diese nur in sehr geringen Ansätzen durchzuführen sind. Das Retrosyntheseschema für die Darstellung von Fludarabin nach SHEN *et al.* ist in Abb. 120 dargestellt.

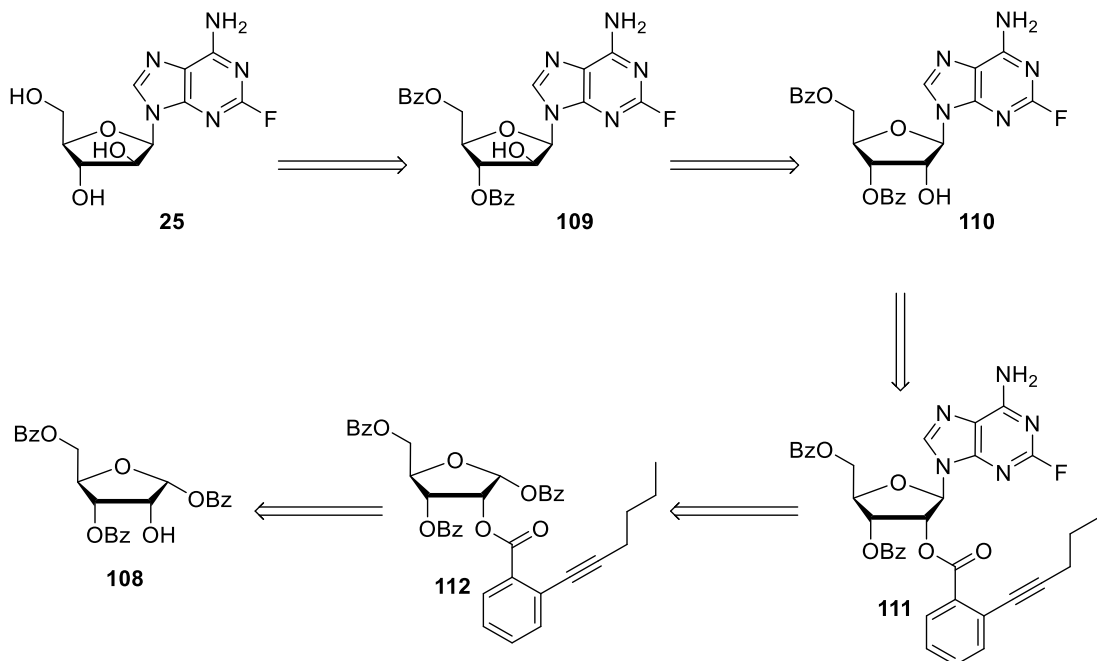


Abb. 120: Retrosyntheseschema von Fludarabin **25** basierend auf der Syntheseroute von SHEN *et al.*²⁰⁰

Fludarabin **25** soll ausgehend von der benzoylgeschützten Verbindung **109** erhalten werden, welches zuvor durch eine Inversion der 2'-Hydroxyfunktion ausgehend vom 3',5'-geschützten 2-Fluoradenosin **110** erhalten wird. Das selektiv geschützte Nucleosid **110** sollte zunächst in einer von DING *et al.*²⁰¹ entwickelten orthogonalen Entschützungsreaktion mit einem Gold-Katalysator ausgehend vom Nucleosid **111** erhalten werden, welches an der 2'-Position ein ortho-alkinyl Benzoat trägt. Dieses Nucleosid **111** sollte durch eine Glykosylierung von 2-Fluoradenin **107** mit der geschützten Ribose **112** erhalten werden, die zuvor ausgehend vom kommerziell erhältlichen 1',3',5'-benzoylgeschützten Zucker **108** dargestellt werden sollte.

Die Reaktionsbedingungen der Synthese von Verbindung **112** sind in Abb. 121 dargestellt und sind analog zu den beschriebenen Bedingungen von SHEN *et al.* Zunächst wurde eine Veresterung der 1',3',5'-benzoylgeschützten Ribose **108** mit 2-Iodobenzoylchlorid **113** in Pyridin durchgeführt. Bei dieser Reaktion wurde für Verbindung **114** insgesamt eine Ausbeute von 77 % erhalten, was etwas unterhalb der Literatursausbeute liegt.²⁰⁰ Im nächsten Schritt wurde eine Sonogashira-Reaktion an der eingeführten Schutzgruppe durchgeführt, um Verbindung **112** zu erhalten. Für diese Reaktion konnte nach zwölf Stunden ein vollständiger Umsatz beobachtet werden und nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt **112** in einer Ausbeute von 89 % erhalten. Diese 2-hexinyl-Benzoylschutzgruppe, die von DING *et al.*²⁰¹ entwickelt wurde, ermöglicht zum einen, dass der Zucker für eine Vorbrücken-Glykosylierung verwendet werden kann, zum anderen wird eine Gold-katalysierte, orthogonale Entschützung dieser Schutzgruppe gegenüber den Benzoylgruppen ermöglicht.

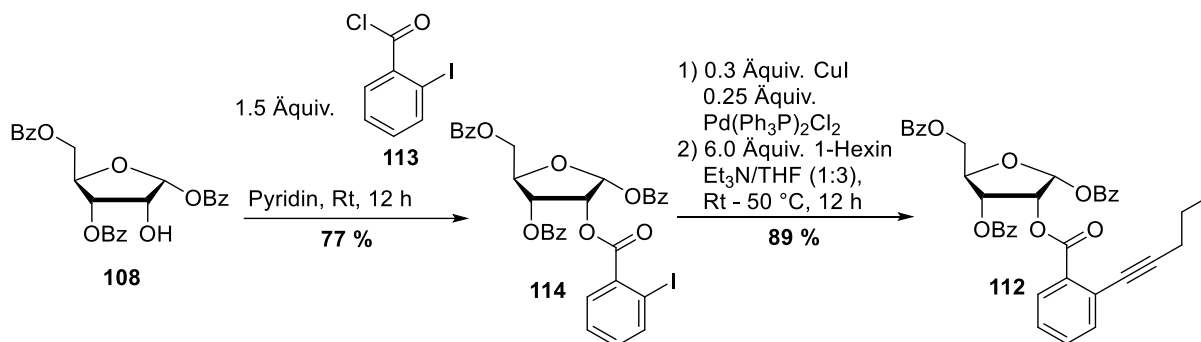


Abb. 121: Synthese von Verbindung **112** ausgehend von der selektiv geschützten Ribose **108**.

Im nächsten Schritt wurde dann die Vorbrücken-Glykosylierung von 2-Fluoradenin **107** mit der Ribose **112** durchgeführt. Diese Glykosylierung stellt eine Erweiterung der Reaktion nach Hilbert-Johnson dar, bei der eine silylierte Nucleobase mit einem Zucker umgesetzt wird, um eine *N*-glykosidische Bindung aufzubauen. Vorteil dieser Reaktion ist, dass durch einen Nachbargruppeneffekt an der 2'-Position selektiv das β -Anomer erhalten werden kann. Für diesen Effekt ist es jedoch erforderlich, Schutzgruppen an der 2'-Position einzuführen, die

eine Carbonylfunktion aufweist, beispielweise Acetyl- oder Benzoylgruppen.²⁰² Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 122 dargestellt.

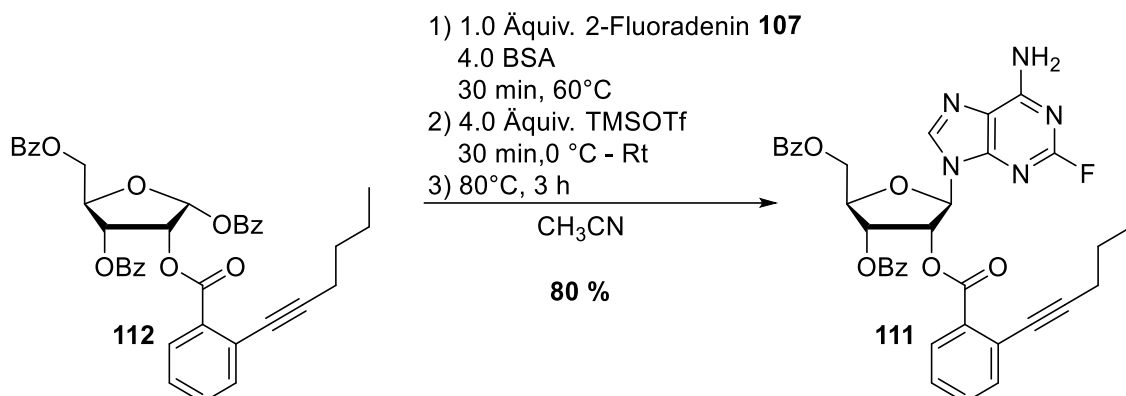


Abb. 122: Vorbrüngen-Glykosylierung zu Verbindung **111**.

Diese Reaktionsbedingungen wurden wieder analog zur Synthese nach SHEN *et al.* durchgeführt.²⁰⁰ Hierzu wurde zunächst das 2-Fluoradenin **107** mit Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) aktiviert und der Zucker **112** mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der silylierten Base **107** zur Reaktionslösung, wobei die Reaktionslösung folgend für drei Stunden bei 80 °C gerührt wurde. Hierbei konnte ein vollständiger Umsatz der Nucleobase **107** beobachtet werden. Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnte das gewünschte Nucleosid **111** als reines β -Anomer mit einer Ausbeute von 80 % isoliert werden. Die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms wurde mittels eines NOESY-NMR-Spektrums sowie der Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum nachgewiesen. Dies entspricht der von SHEN *et al.* angegebenen Ausbeute.²⁰⁰

Anschließend sollte die selektive 2'-Entschützung der ortho-alkinyl Benzoatschutzgruppe mittels eines Gold(I)-Katalysators nach DING *et al.* erfolgen. Die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 123 dargestellt.

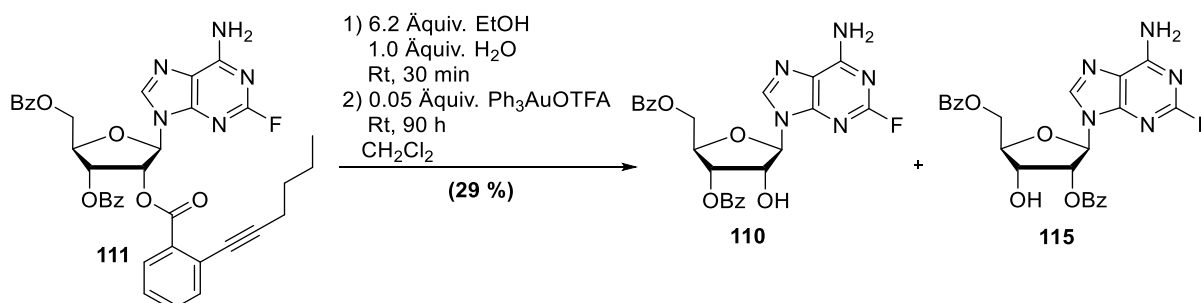


Abb. 123: Synthese des selektiv geschütztem Nucleosids **110**.

Durch die Zugabe des Katalysators und Wasser zur Reaktion, wird aus dem Benzoat ein Cumarin-Derivat gebildet, welches nach mehreren Schritten das Molekül verlässt und schließlich das 2'-entschützte Nucleosid **110** freigesetzt wird.²⁰¹ Jedoch konnte nicht wie von SHEN *et al.* beschrieben ein vollständiger Umsatz des Eduktes nach fünf Stunden beobachtet

werden. Auch nach erneuter Zugabe des Katalysators und Rühren für insgesamt 90 Stunden bei Raumtemperatur konnte in der Reaktionslösung noch das Edukt **111** nachgewiesen werden. Dennoch wurde die Reaktion aufgearbeitet und nach säulenchromatographischer Reinigung das Produkt **110** isoliert. Leider zeigte die NMR-spektrometrische Analyse, dass ebenso das 3'-entschützte Nucleosid **115** erhalten wurde. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Benzoylschutzgruppen in Lösung in der Lage sind zwischen der 2'- und 3'-Position zu migrieren. Dieser Effekt ist aber laut DING *et al.* und SHEN *et al.* für diese Moleküle nicht beobachtet worden.^{200,201} Dennoch konnte dieser Effekt auch nach wiederholten Versuchen sowohl über NMR als auch direkt mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden, da die beiden Nucleoside **110** und **115** ein chromatographisch kaum trennbares Gemisch ergeben. Zur Veranschaulichung ist in Abb. **124** ein ¹H-NMR-Spektrum des Stoffgemisches abgebildet.

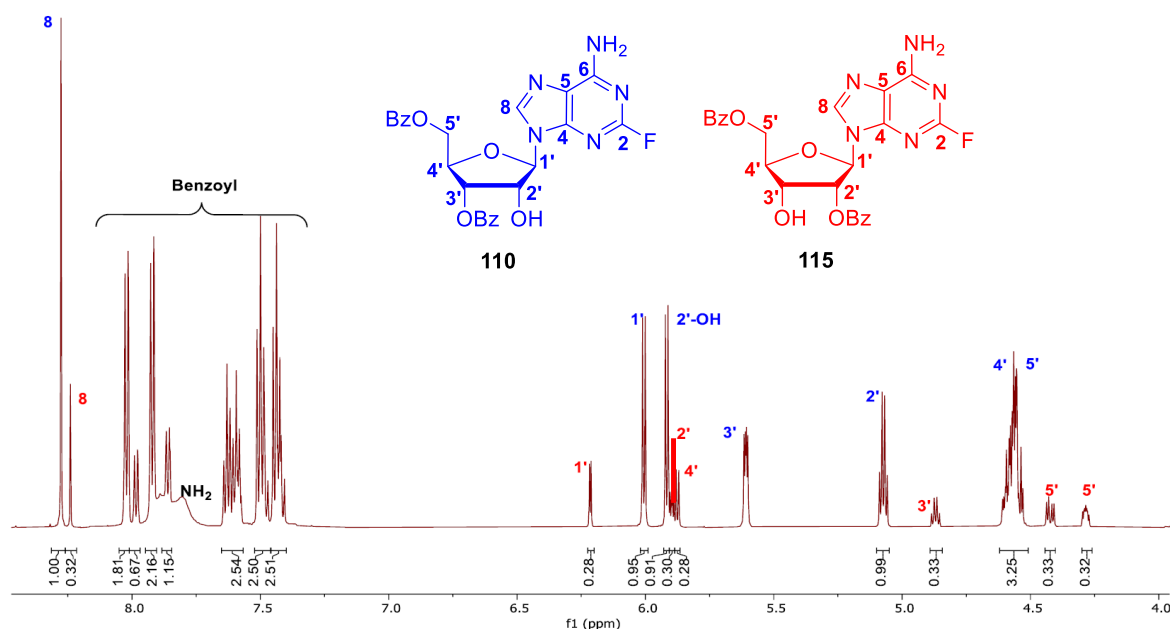


Abb. 124: ¹H-NMR-Spektrum des Stoffgemisches von Nucleosid **110** und **115**.²⁰³

Auch nach zahlreichen Versuchen konnte nur ein Gemisch der beiden Nucleoside **110** und **115** erhalten werden. Das Weiterarbeiten mit dem Stoffgemisch erwies sich ebenfalls als nicht sinnvoll, da die Produkte der darauffolgenden Reaktionen ebenfalls nicht voneinander getrennt werden konnten. Aus diesem Grund wurde der Ansatz nach SHEN *et al.* für die Synthese von Fludarabin **25** nicht weiterverfolgt.

Als zweiter Ansatz sollte eine Synthese ausgehend von 2-Fluoradenosin **106** erprobt werden. Das genaue Retrosyntheschema ist in Abb. 125 dargestellt. Hierbei sollte das Fludarabin **25** durch eine Entschützung ausgehend vom 3',5'-silylgeschützten Fludarabin **116** erhalten werden. Bei der Schutzgruppe handelt es sich um eine 1,1,3,3-Tetraisopropyl-disiloxan-Schutzgruppe (TIPDS), durch die Nucleoside selektiv an der 5'- und 3'-Position in einem Reaktionsschritt geschützt werden. Zusätzlich verhindert diese Art der Schutzgruppe

eine Migration zwischen der 2'- und 3'-Position. Das Nucleosid **116** sollte wiederum durch eine Inversion der 2'-Hydroxyfunktion ausgehend vom TIPDS-geschützten 2-Fluoradenosin **117** erhalten werden. Die Einführung der Schutzgruppe sollte durch die Reaktion von TIPDS-Chlorid mit 2-Fluoradenosin **106** erhalten werden.

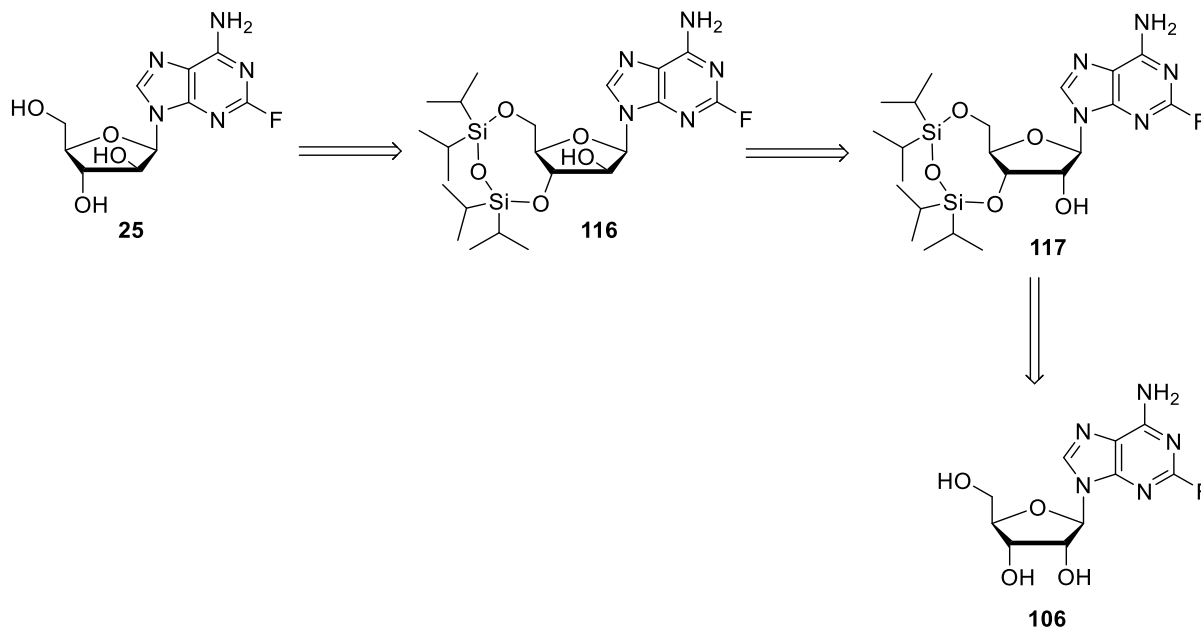


Abb. 125: Retrosyntheseschema für Fludarabin **25** ausgehend von 2-Fluoradenosin **106** mittels chemischer Inversion der 2'-Hydroxyfunktion.

Die Reaktionssequenz kommt insgesamt mit vier Stufen aus. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 126 dargestellt. Zunächst wurde das kommerziell erhältliche 2-Fluoradenosin **106** mit TIPDS-Chlorid in Pyridin umgesetzt, um das 3',5'-geschützte Nucleosid **117** zu erhalten. Hierbei wurden die Synthesebedingungen mit leichten Modifikationen analog zu MONTGOMERY *et al.*²⁰⁴ durchgeführt. Nach einfacher säulenchromatographischer Reinigung wurde das gewünschte Nucleosid in einer Ausbeute von 88 % erhalten, was deutlich über der publizierten Ausbeute von MONTGOMERY *et al.* von 30 % liegt. Grund hierfür könnte sein, dass bei der wässrigen Aufarbeitung der Reaktionslösung beobachtet wurde, dass große Mengen des Produktes in die wässrige Phase übergingen. Durch intensives Waschen der wässrigen Phasen mit Dichlormethan konnte dieses jedoch vollständig extrahiert werden, was die Ausbeute erheblich steigerte. Dies wurde nach der Vorschrift von MONTGOMERY *et al.* nur unzureichend durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Einführung einer Trifluormethansulfonsäuregruppe (Tf), die eine gute Abgangsgruppe für nucleophile Substitutionen darstellt. Die Bedingungen für diese Reaktion wurden analog zu den Synthesen von SHEN *et al.*²⁰⁰ gewählt. Hierzu wurde das Nucleosid mit Pyridin und Trifluormethansulfonsäureanhydrid bei 0 °C versetzt. Nach Rühren für zwei Stunden bei Raumtemperatur konnte bereits ein vollständiger Umsatz beobachtet

werden. Durch eine säulenchromatographische Reinigung konnte das gewünschte Produkt **118** in einer Ausbeute von 76 % in hoher Reinheit isoliert werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass eine Säulenchromatographie nicht zwingend notwendig ist, um das Produkt in ausreichender Reinheit zu erhalten. Durch Versuche hat sich gezeigt, dass bereits nach dem Waschen der Reaktionslösung mit Wasser und Natriumhydrogencarbonatlösung eine ausreichende Reinheit vorlag, sodass die nächste Reaktion problemlos durchgeführt werden konnte. Durch dieses Vorgehen konnte die Gesamtausbeute weiter gesteigert werden.

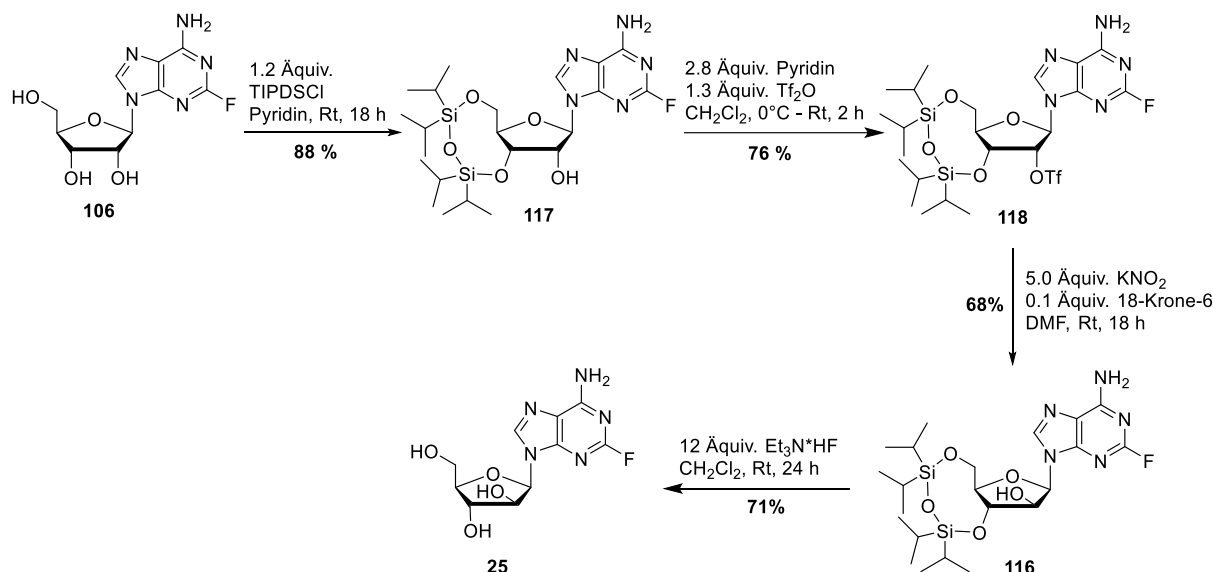


Abb. 126: Syntheseroute zur Darstellung von Fludarabin **25** ausgehend von 2-Fluoradenosin **106**.

Anschließend erfolgte die Inversion der 2'-Hydroxyfunktion. Da durch die Tf-Gruppe eine gute Abgangsgruppe vorhanden war, konnte eine nucleophile Substitution durchgeführt werden. Die Reaktionsbedingungen wurden an die Vorschriften von MONTGOMERY²⁰⁴ und SHEN *et al.*²⁰⁰ angelehnt. Hierbei wurde das Nucleosid **118** mit Kaliumnitrit und 18-Krone-6-Ether in DMF versetzt. Durch anschließende wässrige Aufarbeitung und säulenchromatographische Reinigung konnte das gewünschte invertierte Produkt **116** in einer Ausbeute von 68 % erhalten werden. Die Inversion des Stereozentrums konnte mittels ¹H-NMR-Spektrum sowie NOESY-NMR-Spektrum bestätigt werden. Im letzten Schritt wurde die Silylschutzgruppe an der 3'- und 5'-Position abgespalten. Hierzu wurde wieder Triethylammonium-trihydrofluorid als Fluoridendonator verwendet. Bei dieser Reaktion konnte im Vergleich zu anderen Desilylierungen eine vergleichsweise geringe Ausbeute von 71 % erhalten werden. Grund hierfür ist die hohe Polarität und geringe Löslichkeit von Fludarabin **25**, was die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel deutlich erschwerte. Hierbei hat sich eine zusätzliche automatisierte säulenchromatographische Reinigung an RP18-Kieselgel bewährt. Dennoch konnte vermutlich bedingt durch die zusätzlichen Reinigungsschritte der Ausbeuteverlust erklärt werden.

Insgesamt konnte durch die Kombination verschiedener literaturbekannter Ansätze und Modifikationen der Synthesebedingungen Fludarabin **25** in einer guten Ausbeute von 32 % in nur vier Stufen erhalten werden. Dies stellt eine Route dar, der sowohl in den Ausbeuten als auch in der Anzahl der nötigen Synthesestufen den nicht enzymatischen, literaturbekannten Synthesen deutlich überlegen ist.

4.7.3.2 Synthese von Fludarabin-5'-monophosphat

Die Synthese des Fludarabin-5'-monophosphats (2FaraA-MP) **103** sollte mittels direkter Phosphorylierung über die Yoshikawa-Reaktion erfolgen. Eine Phosphorylierung mittels Amidchemie erschien nicht sinnvoll, da in der Synthese des Fludarabins **25** eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zur selektiven Schützung der 2'- und 3'-Hydroxyfunktion sich nicht als praktikabel darstellte. Für die Synthese von 2FaraA-MP **103** wurden dieselben Reaktionsbedingungen wie für das CdA-MP **90** gewählt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 127 dargestellt.

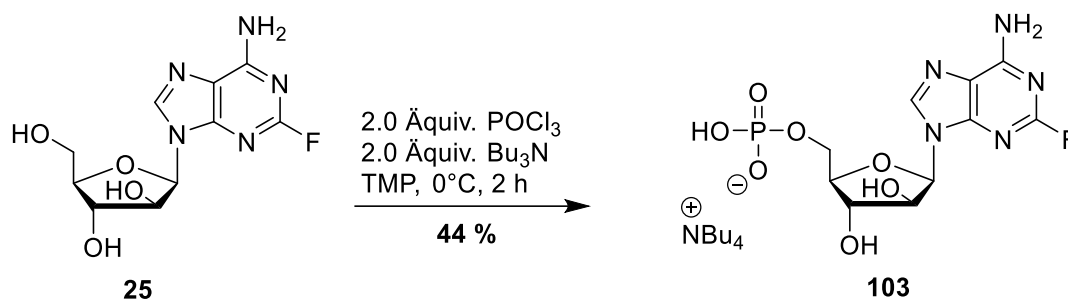


Abb. 127: Synthese von 2FaraA-MP **103** mittels Yoshikawa-Reaktion.

Das Nucleosid **25** wurde zunächst in Trimethylphosphat gelöst und nach Abkühlen auf 0 °C mit Phosphorylchlorid und Tributylamin versetzt. Nach zwei Stunden bei 0 °C war bereits ein vollständiger Umsatz des Eduktes mittels RP-HPLC erkennbar. Außerdem konnten nur sehr geringe Mengen an diphosphoryliertem Nebenprodukt nachgewiesen werden. Zum Beenden der Reaktion wurde die Reaktionslösung auf eine Ammoniumhydrogencarbonatlösung gegeben und die wässrige Phase zum Entfernen des TMPs mit Chloroform gewaschen. Bei der automatisierten RP18-Säulenchromatographie mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer zeigte sich, dass das Triethylammonium-Salz des Monophosphats **103** nur eine sehr geringe Löslichkeit sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungen aufweist. Dadurch wurden starke Verluste in der Gesamtausbeute bei der Reaktion erhalten. Nach dem Ionentausch auf Tetra-*n*-butylammoniumionen wies das Monophosphat **103** eine wesentlich bessere Löslichkeit sowohl im wässrigen Medium als auch in organischen Lösungsmitteln auf. Für spätere Reaktionen hat es sich als hilfreich erwiesen, nach dem Waschen der wässrigen Lösung den Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer zunächst zu entfernen, um dann vor der chromatographischen Reinigung den Rückstand wieder in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-

Puffer aufzunehmen. Dadurch wurde ein direkter Austausch der Gegenion gewährleistet, was die anschließende Reinigung deutlich erleichterte. Die Chromatographie mit einem Puffer ist hierdurch nicht mehr nötig. Es ist ebenfalls möglich, die Reaktionslösung direkt mit dem Tetra-n-butylammoniumacetat-Puffer zu quenchen. Ein Übergang des Monophosphats in die organische Phase wurde unter diesen Bedingungen nicht beobachtet.

Insgesamt konnte das Fludarabin-5'-Monophosphat **103** in einer Ausbeute von 44 % über eine direkte Phosphorylierung mittels der Yoshikawa-Reaktion erhalten werden. Durch den direkten Tausch der Gegenionen konnte die anfangs geringe Ausbeute sowie die einfachere Handhabung bedingt durch verbesserte Löslichkeitseigenschaften deutlich gesteigert werden. Die mehrfache Phosphorylierung konnte unter diesen Reaktionsbedingungen für das Nucleosid **25** ebenfalls nicht beobachtet werden.

4.7.3.3 Synthese der Fludarabin TriPPPPro-Verbindungen

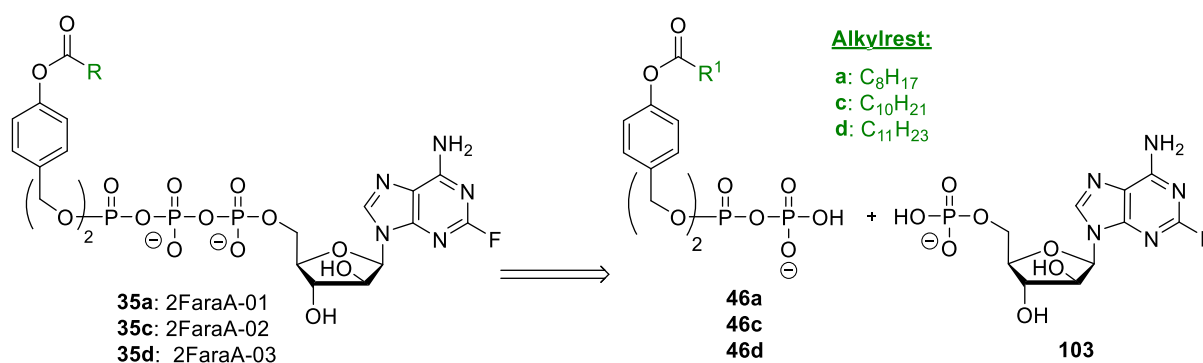


Abb. 128: Retrosyntheschema der Darstellung von 2FaraA-TriPPPPro-Verbindungen 2FaraA-01 bis 03 **35a, c und d**.

Die 2FaraA-TriPPPPro-Verbindungen 01 bis 03 **35a, c und d** sollten über die *H*-Phosphonatroute ausgehend vom Fludarabinmonophosphat **91** und den Pyrophosphaten **46a, c und d** dargestellt werden. Die Kupplung sollte wieder über die stufenweise Aktivierung des Pyrophosphats und anschließende Zugabe des Monophosphats **103** als Nucleophil erfolgen. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 129 dargestellt.

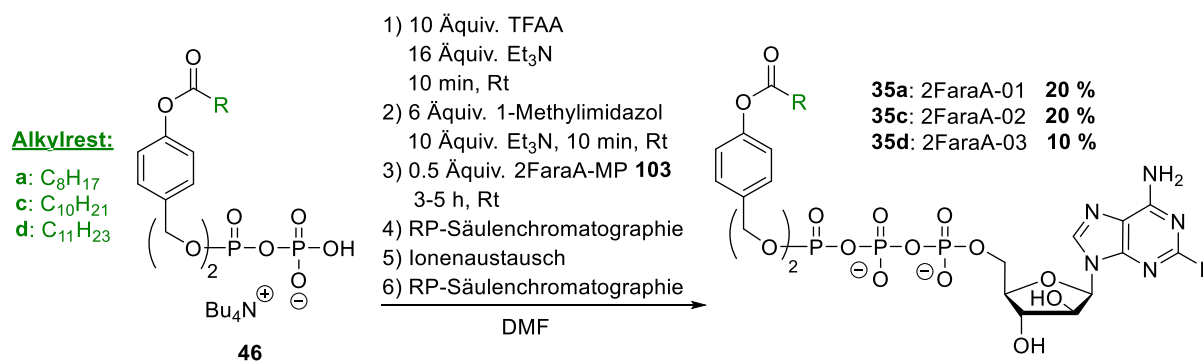


Abb. 129: Synthese der 2FaraA-TriPPPPro-Verbindungen 2FaraA-01 bis 03 **35a, c und d**.

Die Reaktionen wurden aufgrund der geringen Löslichkeit des 2FaraA-5'-Monophosphats **103** in DMF durchgeführt. Insgesamt konnten alle gewünschten TriPPPPro-Verbindungen über diese Syntheseroute erhalten werden. Jedoch sind die vergleichsweise geringen Ausbeuten für die 2FaraA-Verbindungen **35** auffällig. Da für alle Verbindungen ein vollständiger Umsatz während der Reaktion mittels RP-HPLC Reaktionsverfolgung beobachtet wurde, muss die geringe Ausbeute auf die Reinigungsprozeduren zurückzuführen sein. Bei allen drei Verbindungen konnte auch nach mehrfacher Säulenchromatographie und Ionentausch über DOWEX-Ionentauscherharz auf Ammoniumionen die während der Reaktion gebildeten Imidazoliumsalze nur schwer abgetrennt werden. Interessant hierbei ist, dass dieser Effekt unabhängig von den Acylresten der Maskierungseinheiten beobachtet wurde. Dieser Effekt war bei Verbindung **35d** sogar so stark, dass am Ende Mischfraktionen verworfen wurden, was die geringe Ausbeute von 10 % erklärt. Insgesamt konnte nach dem Ionentausch auf Ammoniumionen durch eine automatisierte Chromatographie an RP8-Kieselgel anstelle von RP18-Kieselgel eine verbesserte Trennleistung erzielt werden, da sich das Elutionsverhalten sowohl des Produkts als auch der Imidazoliumsalze günstig veränderte. Dieser Effekt war vor allem für die Verbindung **35c** und **d** zu beobachten. Auf diese Weise konnten die 2FaraA-TriPPPPro-Verbindungen **35a**, **c** und **d** in ausreichenden Mengen und in hoher Reinheit erhalten werden. Eventuell könnten durch die Synthese über die Amiditroute die Ausbeuten für diese Verbindungen gesteigert werden. Der Vorteil der Amiditchemie ist, dass die Reaktion ohne das Methylimidazol auskommt, welches bei der *H*-Phosphonatroute die in diesem Fall nur schwer abzutrennenden Imidazoliumsalze bildet. Da aber alle TriPPPPro-Verbindungen am Ende durch eine optimierte Reinigungsprozedur in ausreichenden Mengen in hoher Reinheit vorlagen, wurde die alternative Syntheseroute in dieser Arbeit nicht erprobt.

4.7.4 Synthese von Clofarabin TriPPPro-Verbindungen

Clofarabin **26** ist ein Purin-Analogon, welches an der 2-Position ein Chloratom trägt. Zusätzlich stellt es wie das Fludarabin **25** ein Arabinosyl-Derivat dar, welches jedoch ein Fluoratom an der 2'-Position anstelle einer Hydroxygruppe trägt.⁹³ Im Prinzip ist das Clofarabin **26** eine Weiterentwicklung von Fludarabin **25**. Wie beim Fludarabin verhindert das Chloratom an der 2-Position einen Abbau des Analogons durch die Adenosin-Desaminase (ADA) zum Inosin. Dadurch wird die intrazelluläre metabolische Stabilität deutlich erhöht.⁹³ Zusätzlich erhöht das 2'-(S)-Fluoratom im Vergleich zur Hydroxyfunktion deutlich die Stabilität der glykosidischen Bindung unter sauren Bedingungen sowie die Stabilität gegenüber Phosphatasen.^{204,205} Clofarabin **26** wird über Transportproteine in die Zellen aufgenommen, wo es anschließend zum Clofarabin-5'-triphosphat (ClFaraA-TP) **119** phosphoryliert wird. Dies stellt den aktiven Metaboliten dar, der sowohl die Ribonucleotid Reduktase (RNR) inhibiert, als auch in die DNA eingebaut wird. Durch die Inhibierung der RNR wird zusätzlich das Level der intrazellulären natürlichen dNTPs reduziert, was zu einem vermehrten Einbau von ClFaraA-TP **119** in die DNA führt. Das eingebaute Clofarabin in der DNA führt zum Stillstand der Polymerase an der Replikationsgabel, was schließlich zur Apoptose führt.^{16,93}

Hauptsächlich wird Clofarabin **26** gegen akute lymphoblastische Leukämie (ALL) in Kindern sowie bei akuter myeloischer Leukämie (AML) eingesetzt.²⁰⁶ Derzeit laufen auch weitere Studien zur Erprobung des Clofarabins für andere Tumorerkrankungen.¹⁶

Die Synthese der Clofarabin-TriPPPro-Verbindungen **36a**, **c** und **d** sollte über die *H*-Phosphonatroute erfolgen. Da das Clofarabin **26** selbst kommerziell erhältlich ist, musste lediglich das Clofarabin-5'-monophosphat (ClFaraA-MP) **120** synthetisch zugänglich gemacht werden.

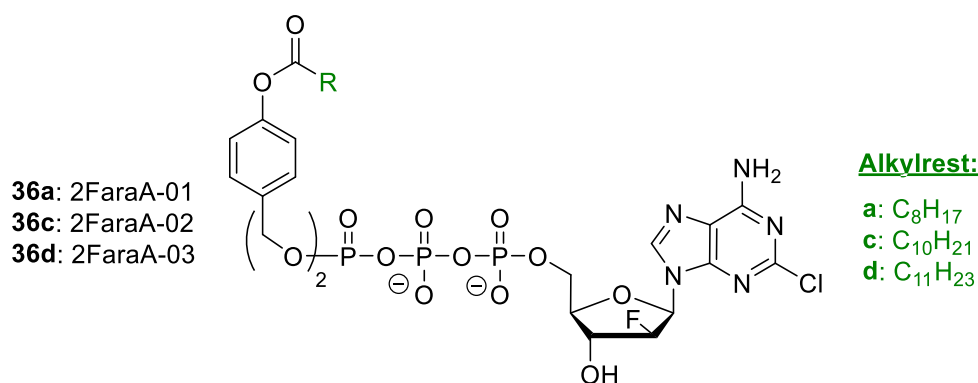


Abb. 130: Clofarabin-TriPPPro-Verbindungen ClFaraA-01 bis 03 **36a**, **c** und **d**.

4.7.4.1 Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat

Für die Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat (ClFaraA-MP) **120** sollten verschiedene Ansätze erprobt werden. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 131 dargestellt.

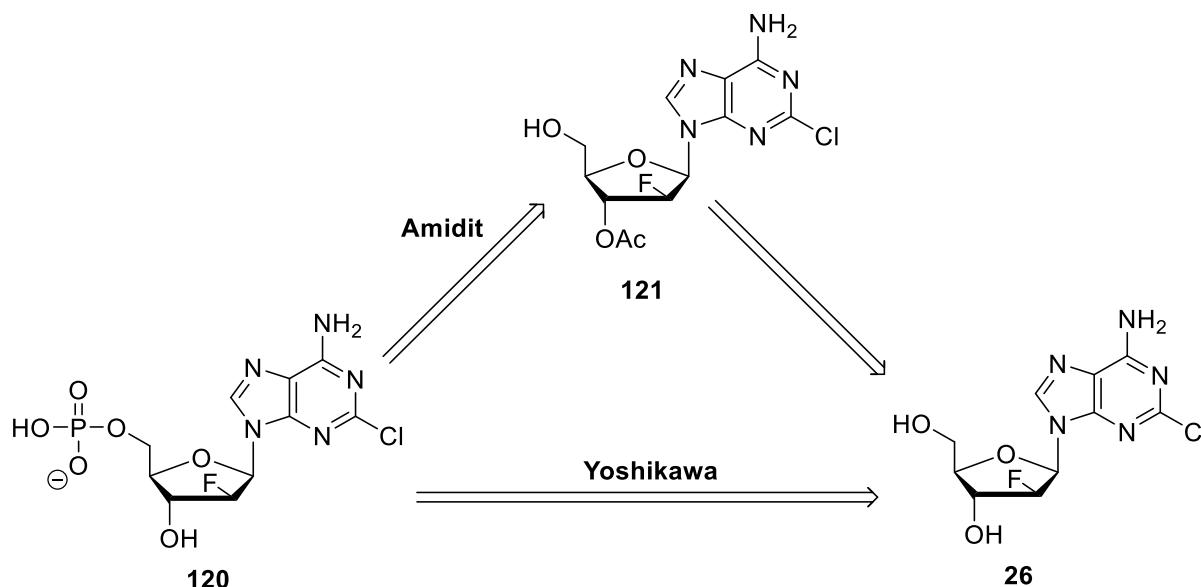


Abb. 131: Retrosyntheschema zur Darstellung von ClFaraA-MP **120**

Zum einen sollte eine Phosphorylierung mit dem Fm-Amidit **60** an dem selektiv geschützten Clofarabin **121** durchgeführt werden, da in dieser Arbeit bereits sehr gute Ergebnisse über diese Syntheseroute erzielt wurden. Zusätzlich sollte auch die direkte Phosphorylierung von Clofarabin **26** über die Yoshikawa-Methode erprobt werden, da diese durch weniger Reaktionsschritte vorteilhaft ist. In der Literatur sind neben der enzymatischen Phosphorylierung keine Synthesen des ClFara-MPs **120** bekannt.

In Abb. 132 sind die Reaktionsbedingungen zur Synthese des selektiv geschützten Clofarabins **121** dargestellt.

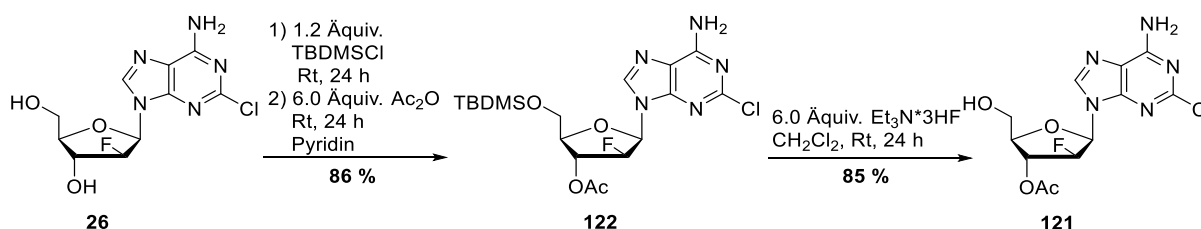


Abb. 132: Synthese des selektiv 3'-acetylgeschützten Nucleosids **121**.

Hierzu wurde zunächst analog zu den bisher durchgeführten Synthesen das vollständig orthogonal geschützte Clofarabin **122** mit einer TBDMS-Schutzgruppe an der 5'-Position und der Acetylschutzgruppe an der 3'-Position dargestellt. Hierzu wurde das Nucleosid **26** mit TBDMS-Chlorid und anschließend mit Essigsäureanhydrid versetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **122** in einer guten Ausbeute und hoher Reinheit isoliert werden. Die Acetylierung des Amins konnte nicht beobachtet werden.

Im nächsten Schritt wurde die Desilylierung der 5'-Position unter den üblichen Bedingungen mit Triethylamin-Trihydrofluorid als Fluoridionendonator durchgeführt. Hierbei konnte nach säulenchromatographischer Reinigung eine Ausbeute von 85 % erzielt werden. Insgesamt wurde so das selektiv 3'-geschützte Clofarabin **121** in einfachen Schritten über zwei Stufen in einer guten Ausbeute von 73 % erhalten.

Im nächsten Schritt wurde die Phosphorylierung von Nucleosid **121** mittels Fm-Amidit **60** durchgeführt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 133 dargestellt.

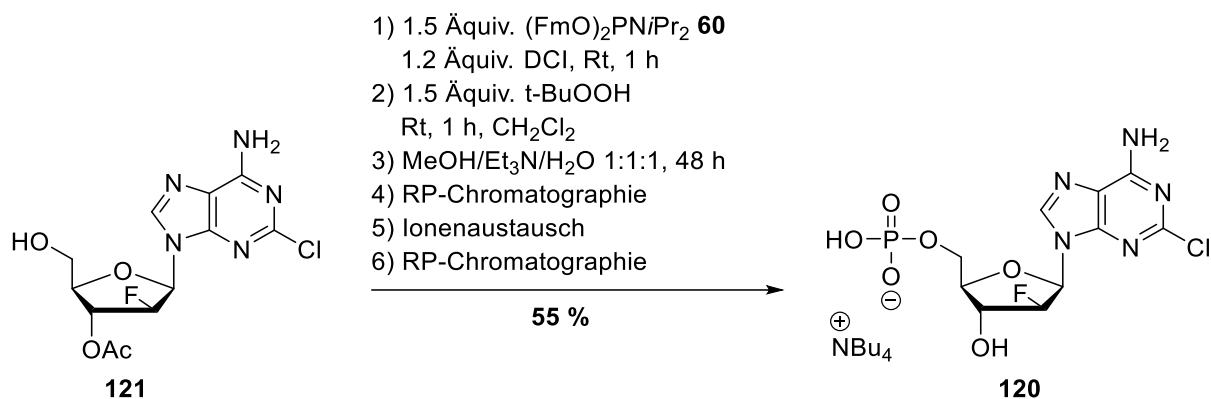


Abb. 133: Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat **120** durch Anwendung Amiditchemie.

Die DCI-vermittelte Amiditkupplung sowie die Oxidation und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte analog zum in dieser Arbeit bisher durchgeführten Protokoll. Die Reinigung des ClFaraA-MPs **120** stellte sich aber zunächst als schwierig heraus. Zum einen konnte das überschüssige DCI als Salz erst nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung entfernt werden, was für diese Art von Reaktion bisher nicht beobachtet wurde. Des Weiteren erschwerte die schlechte Löslichkeit des Triethylammonium-Salzes des Monophosphats **120** die Chromatographie erheblich. Aus diesem Grund musste ein Ionentausch auf Tetra-*n*-butylammoniumionen durchgeführt werden. Hierzu wurde das Monophosphat **120** zunächst über DOWEX-H⁺ Ionentauscherharz in die protonierte Form überführt und anschließend mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid titriert (pH 8). Durch die anschließende säulenchromatographische Reinigung an RP18-Kieselgel konnte schließlich das Produkt **120** in hoher Reinheit erhalten werden. Durch die deutlich lipophileren Gegenionen konnte auch die Gesamtlöslichkeit des Produktes sowohl in organischen als auch in organisch/wässrigen-Medien verbessert werden. Um den zusätzlichen Ionentausch zu umgehen, wurde auch eine direkte Entschützung mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung anstelle von Triethylamin erprobt. Hierbei konnte das Produkt aber nur in einer wesentlich geringeren Ausbeute von 16 % isoliert werden. Möglicherweise ist unter diesen stark basischen Bedingungen das Nucleotid nicht ausreichend stabil, eine genaue Untersuchung der Nebenprodukte wurde jedoch nicht vorgenommen. Auch eine

Verringerung der Konzentration des Hydroxids führte nicht zu besseren Ergebnissen. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

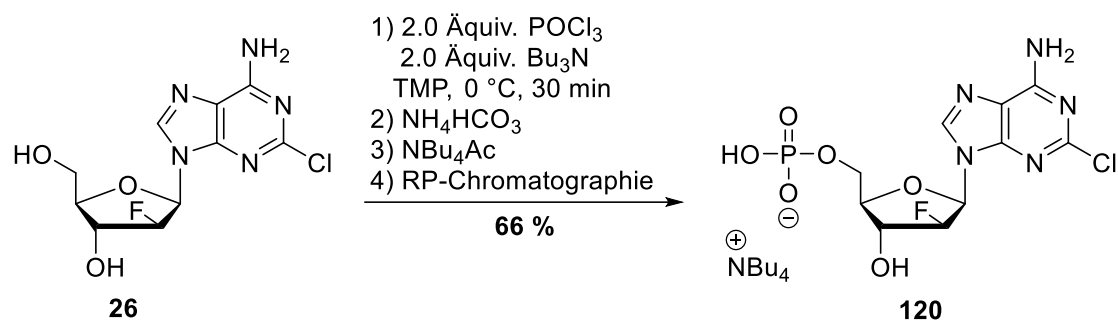


Abb. 134: Synthese von Clofarabin-MP **120** durch die Yoshikawa-Reaktion.

Als nächstes wurde die direkte Phosphorylierung von Clofarabin **26** über die Methode nach Yoshikawa durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden analog zu den bisher durchgeführten Yoshikawa-Reaktionen durchgeführt. Hierzu wurde das Nucleosid zunächst in Trimethylphosphat (TMP) gelöst und anschließend mit Phosphorylchlorid und Tributylamin bei 0 °C versetzt. Nach 30 Minuten konnte bereits ein nahezu vollständiger Umsatz beobachtet werden. Bei längerem Rühren ist auch deutlich die Bildung des diphosphorylierten Produktes erkennbar, weshalb die Reaktion trotz des nicht ganz vollständigen Umsatzes nach 30 Minuten abgebrochen wurde. Wie für Fludarabin-5'-monophosphat **103** hat es sich bewährt, das Rohprodukt nach dem Waschen mit Chloroform zunächst in die Tetra-*n*-butylammoniumform zu überführen. Hierzu wurde das Rohprodukt vor der Chromatographie an RP18-Kieselgel zunächst in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer aufgenommen und anschließend die Lösung mittels Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid auf einen leicht basischen pH-Wert von 8.0 eingestellt. Dadurch konnte das gewünschte Monophosphat **120** nach nur einer automatisierten säulenchromatographischen Reinigung an RP18-Kieselgel in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 66 % erhalten werden.

Insgesamt konnte Clofarabin-5'-monophosphat **120** über zwei verschiedene Syntheserouten in guten Ausbeuten und hoher Reinheit erhalten werden. Beim direkten Vergleich der Phosphorylierungsmethoden ist für das Clofarabin **26** die direkte Phosphorylierung mittels Yoshikawa-Reaktion zu bevorzugen, da hier in einem Reaktionsschritt und wenig synthetischem Aufwand das Monophosphat **120** in hoher Reinheit und guter Ausbeute von 66 % erhalten wurde. Für die Amiditmethode über das Fm-Amidit **60** konnten ebenfalls gute Ausbeuten und eine hohe Reinheit erzielt werden, jedoch werden hier insgesamt drei Reaktionsschritte benötigt, weshalb sich die Gesamtausbeute ausgehend von Clofarabin auf 41 % verringerte. Des Weiteren ist die Reinigung des Monophosphats **120** im letzten Schritt mit mehr Aufwand verbunden, da der Ionentausch auf Tetra-*n*-butylammoniumionen nicht direkt durchgeführt werden kann. Somit mussten mehrere säulenchromatographische

Reinigungsschritte durchgeführt werden, um Clofarabin-5'-monophosphat **120** in ausreichender Reinheit zu erhalten.

4.7.4.2 Synthese der Clofarabin TriPPPPro-Verbindungen

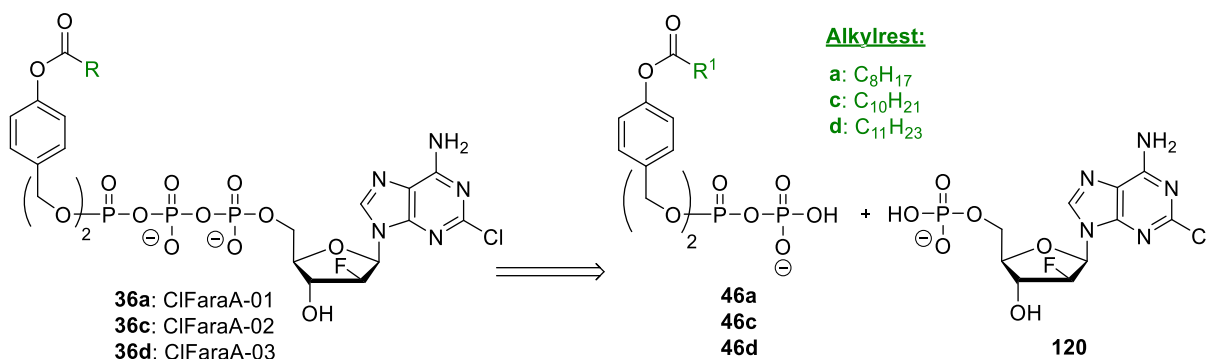


Abb. 135: Retrosyntheschema der Darstellung von Clofarabin-TriPPPPro-Verbindungen ClFaraA-01 bis 03 **36a**, **c** und **d**.

Die Synthese der Clofarabin-TriPPPPro-Verbindungen **36a**, **36c** und **36d** sollte über die *H*-Phosphonatroute erfolgen. Die Kupplung des Clofarabin-Monophosphats **120** mit den entsprechenden Pyrophosphaten **46a**, **46c** und **46d** sollte analog zu den bisher durchgeführten TriPPPPro-Synthesen über stufenweise Aktivierung des Pyrophosphats erfolgen. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 136 dargestellt.

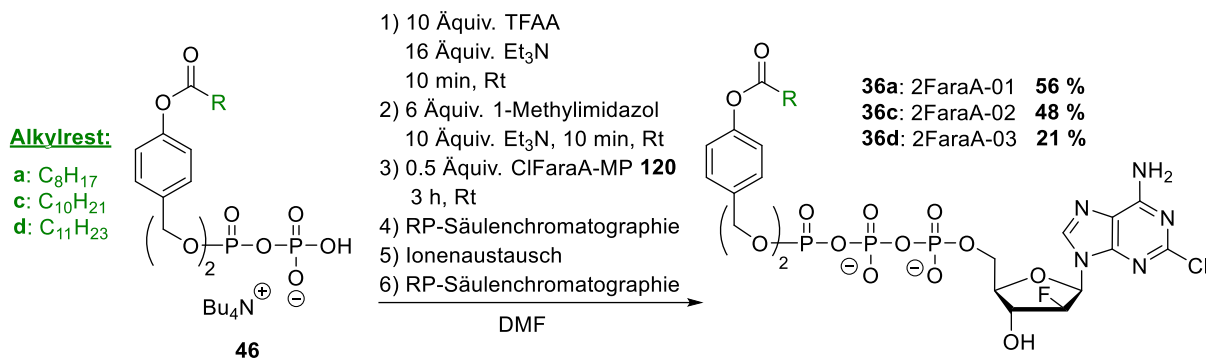


Abb. 136: Synthese der Clofarabin-TriPPPPro-Verbindungen ClFaraA-01 bis 03 **36a**, **c** und **d**.

Obwohl Clofarabin-5'-monophosphat **120** auf Tetra-*n*-butylammoniumionen in Acetonitril löslich ist, wurde die Reaktion aufgrund der besseren Löslichkeit der Pyrophosphatsalze in DMF durchgeführt. Für alle TriPPPPro-Verbindungen konnte bereits nach drei Stunden mittels einer RP-HPLC Reaktionsverfolgung ein vollständiger Umsatz des Clofarabin-5'-monophosphats **107** beobachtet werden. Für die Verbindungen **36a** und **36c** konnten nach dem gängigen Reinigungsprotokoll durch automatisierte RP18-Chromatographie, Ionenaustausch auf Ammoniumionen und erneute RP18-Chromatographie die gewünschten TriPPPPro-Verbindungen in guten Ausbeuten von 56 % und 48 % in hoher Reinheit isoliert werden. Für das Clofarabin-Prodrug **36d** konnte jedoch nur eine Ausbeute von 21 % erreicht

werden. Grund hierfür ist die aufwendige Reinigungsprozedur, da die in der Reaktion gebildeten Imidazoliumsalze trotz des Ionentauschs auf Ammoniumionen wie in Abschnitt 4.7.3.3 mit dem Produkt coeluierten. Dadurch waren mehrere säulenchromatographische Reinigungsschritte sowie ein Wechsel auf RP8-Kieselgel als stationäre Phase notwendig, um schließlich eine ausreichende Trennung zu erhalten. So konnte auch das Clofarabin-TriPPPPro-Produkt **36d** in hoher Reinheit, wenn auch mit Ausbeuteverlusten isoliert werden. In Abb. 136 ist das ^1H - sowie ^{31}P -NMR-Spektrum von Clofarabin-TriPPPPro ClFaraA-02 **36c** dargestellt. Im ^{31}P -Spektrum sind die für TriPPPPro-Verbindungen typischen Signale zu erkennen. Im ^1H -NMR-Spektrum sind vor allem die stark aufgespaltenen Signale der 1'- bis 4'-Protonen erkennbar, was durch das 2'-Fluoratom bedingt ist.

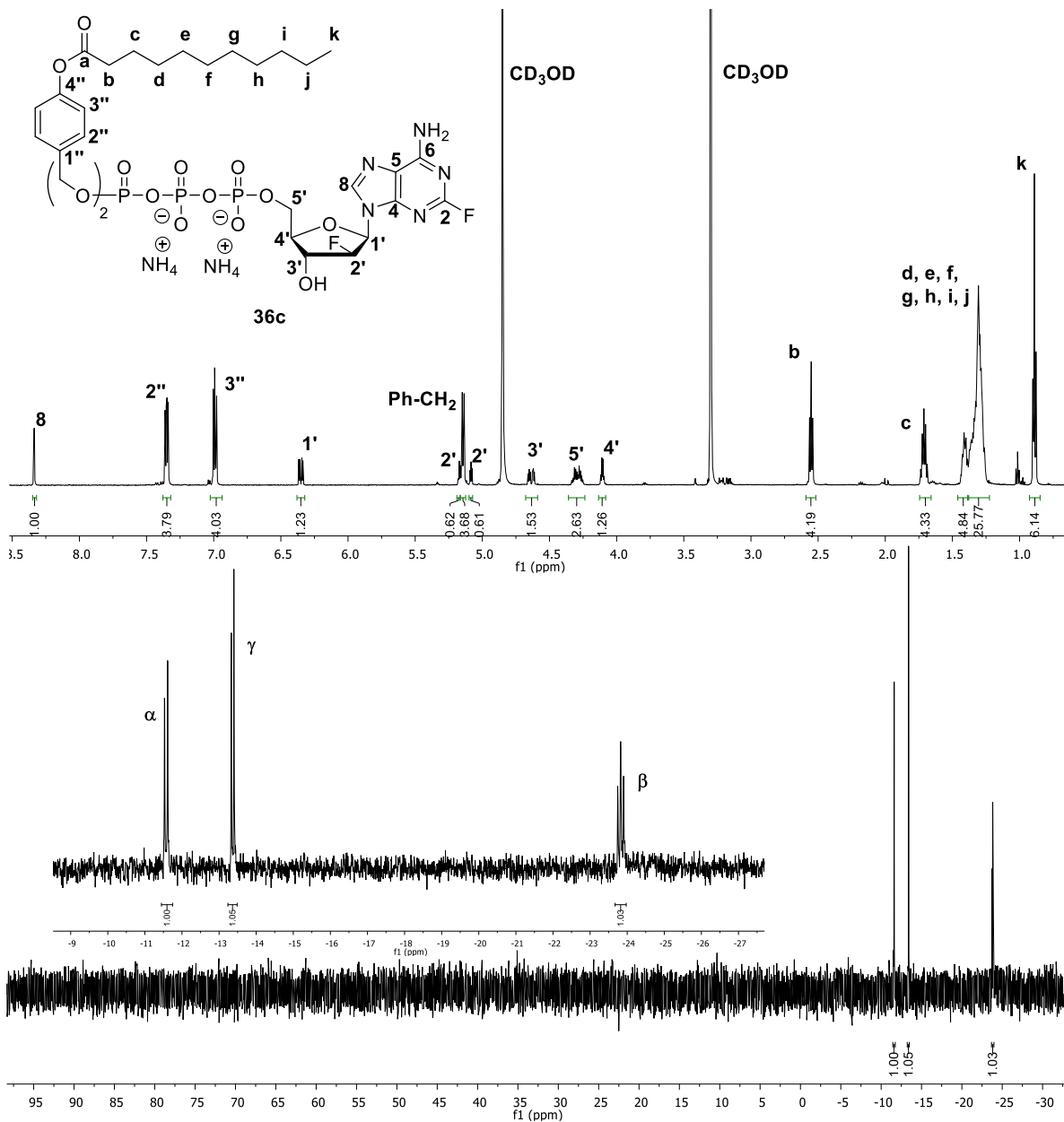


Abb. 137: ^1H - sowie ^{31}P -Spektrum von ClFaraA-TriPPPPro-Verbindung ClFaraA-02 **36c**.

4.7.5 Synthese von Cytarabin TriPPPro-Verbindungen

Als weiteres Pyrimidinanalogon sollten in dieser Arbeit TriPPPro-Verbindungen von Cytarabin **22** dargestellt werden. Cytarabin stellt ein Arabinosyl-Derivat des natürlichen Nucleosids Cytosin **11** dar.¹⁶ Zunächst wird es über Transportproteine aufgenommen²⁰⁷ und wird anschließend stufenweise phosphoryliert, wobei das 5'-Triphosphat (araC-TP) **123** den aktiven Metaboliten darstellt.²⁰⁸ Das Triphosphat **123** wirkt zum einen als schwacher Inhibitor der DNA-Polymerase α , zum anderen wird es anstelle von Cytosin-5'-triphosphat (CTP) **124** in die DNA eingebaut. Dies führt zu einem verzögerten Kettenabbruch, was zur Apoptose der Zelle führt.²⁰⁸ Gegen das Cytarabin sind inzwischen eine Vielzahl an Resistenzmechanismen bekannt. Neben der verringerten Aufnahme durch Nucleosidtransportproteine kann das Cytarabin-5'-monophosphat (araC-MP) **125** durch die Cytidin Desaminase zu den inaktiven Uridinanaloga abgebaut werden. Zusätzlich wirkt das Cytarabin-5'-triphosphat **123** als sogenannter „feedback-inhibitor“ der 2'-Desoxycytidin Kinase, was die Bildung von Cytarabin-Monophosphat **125** verringert.⁸⁸ Eine Cytarabin-TriPPPro-Verbindung wäre in der Lage, all diese Resistenzmechanismen durch die direkte Freisetzung des araC-TPs **123** zu umgehen.^{16,209} Cytarabin wird hauptsächlich gegen akute myeloische Leukämie (AML) und akute lymphatische Leukämie (ALL) eingesetzt, sowie in Kombinationstherapie für verschiedene Lymphome.⁸⁹

Die darzustellenden Cytarabin-TriPPPro-Verbindungen araC-01 bis 03 **37a**, **37c** und **37d** sollten über die *H*-Phosphonatroute zugänglich gemacht werden. Da das Cytarabin **22** kommerziell erhältlich ist, sollte direkt das Cytarabin-5'-Monophosphat **125** dargestellt werden.

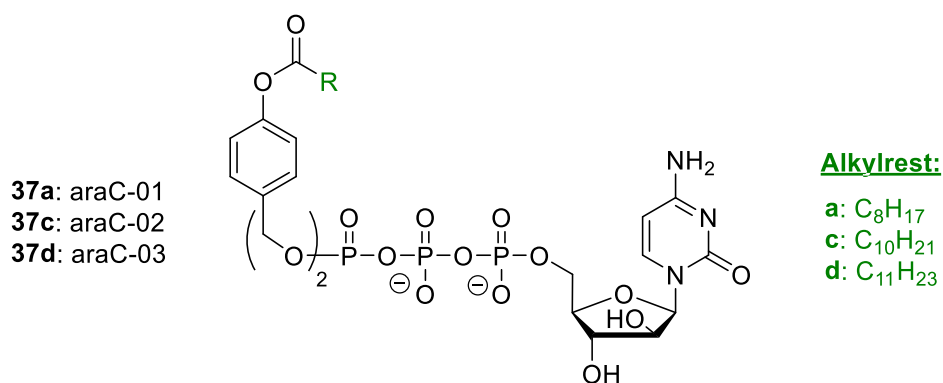


Abb. 138: Darzustellende Cytarabin-TriPPPro-Verbindungen araC-01 bis 03 **37a**, **c** und **d**.

4.7.5.1 Synthese von Cytarabin-5'-monophosphat

Die Synthese von Cytarabin-5'-monophosphat **125** sollte über verschiedene Routen durchgeführt werden. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 139 dargestellt.

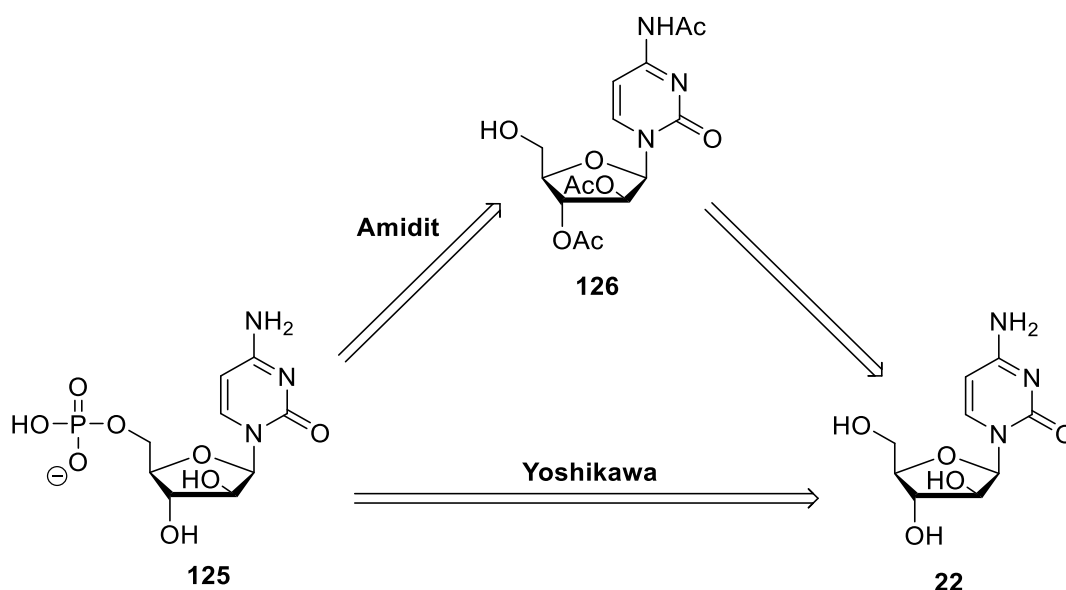


Abb. 139: Retrosyntheschema der Darstellung von Cytarabin-Monophosphat **125** ausgehend von Cytarabin **22**.

Zunächst sollte wieder die Phosphorylierung mittels Fm-Amidit **60** durchgeführt werden. Zusätzlich sollte auch für dieses Nucleosid die direkte Phosphorylierung mittels der Yoshikawa-Reaktion erprobt werden. Für die Phosphorylierung mittels FM-Amidit **60** mussten zunächst selektiv die 2'- und 3'-Hydroxyfunktion acetylgeschützt werden. Dies erfolgte erneut über die in dieser Arbeit bereits durchgeführte orthogonale Schutzgruppenstrategie, bei der zunächst die TBDMS-Schutzgruppe an der 5'-Position eingeführt wird, gefolgt von den Acetylgruppen an der 2'- und 3'-Position. Nach der selektiven Abspaltung der Silylgruppe wird schließlich das 2',3'-geschützte Cytarabin **125** erhalten. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 140 dargestellt.

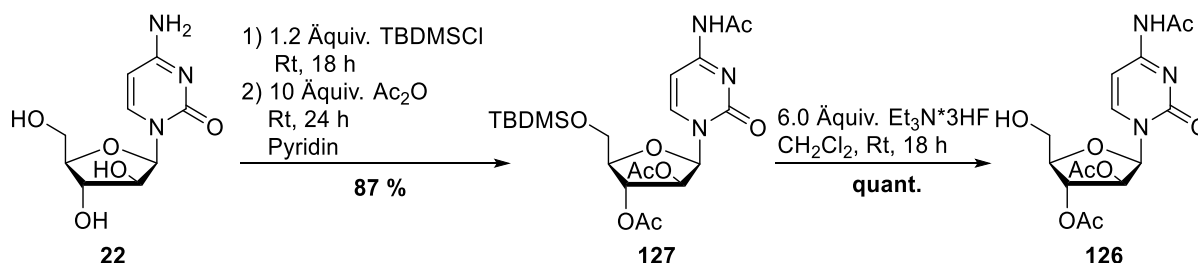


Abb. 140: Synthese des selektiv geschützten Cytarabins **126**.

Das Cytarabin wurde zunächst in Pyridin mit TBDMS-Chlorid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Essigsäureanhydrid und erneutes Rühren über Nacht. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das vollständig geschützte Nucleosid **127** so in einer guten Ausbeute von 87 % und hoher

Reinheit erhalten werden. Anschließend wurde die Desilylierung mit Triethylammonium-trihydrofluorid als Fluoridionendonator durchgeführt. Hierbei konnte das Produkt **126** ebenfalls nach chromatographischer Reinigung in hoher Reinheit und quantitativer Ausbeute erhalten werden. Im Vergleich zu den Purin-Analoga konnte beim Cytarabin **22** bei der Acetylierung ebenfalls eine einfache Acetylierung der Aminofunktion der Nucleobase zum Amid beobachtet werden. Insgesamt konnte so das selektiv acetylierte Cytarabin **126** in einer guten Ausbeute von 87 % in zwei Stufen erhalten werden.

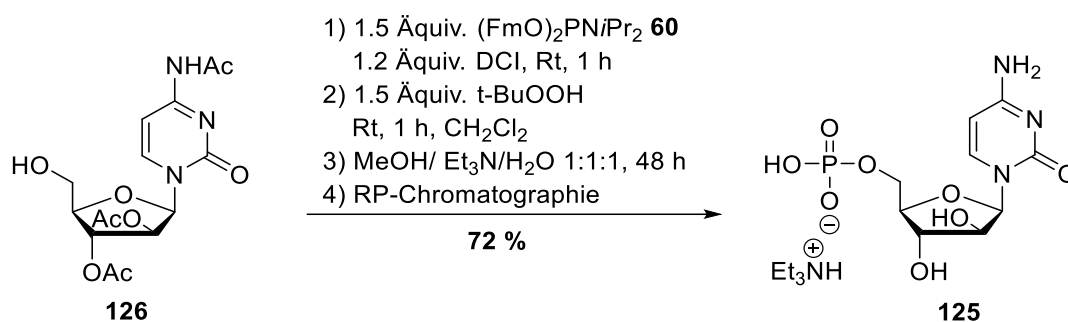


Abb. 141: Synthese von Cladribin-5'-Monophosphat **125** über das Fm-Amidit **60**.

Anschließend erfolgte die Phosphorylierung mit dem Fm-Amidit **60** nach dem etablierten Protokoll. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 141 dargestellt. Mit Hilfe dieser Synthesebedingungen konnte das Monophosphat **125** in einer guten Ausbeute von 72 % erhalten werden. Da das Cytarabin-5'-monophosphat **125** aber eine nur sehr geringe Löslichkeit sowohl im wässrigen Medium als auch in organischen Lösungsmitteln aufweist, wurde versucht, ein Ionenaustausch auf Tetra-*n*-butylammoniumionen durchzuführen. Zunächst wurde wieder wie in Abschnitt 4.7.4.1 versucht, direkt eine Entschützung mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid durchzuführen. Hierbei wurde aber ebenso eine Zersetzung des Produktes beobachtet, was zu einer sehr geringen Ausbeute führte. Anschließend wurde versucht, das Monophosphat **125** über DOWEX-Ionenaustauscherharz zunächst in die protonierte Form zu überführen, um es anschließend mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid zu titrieren. Hierbei wirkte sich aber die geringe Löslichkeit des Triethylammonium-Salzes des Produktes **125** nachteilig aus. Zunächst konnte das Monophosphat **125** nur unvollständig in Wasser in Lösung gebracht werden, was für den Ionentausch über DOWEX notwendig ist. Zum anderen zeigte es auch in der protonierten Form nur eine sehr geringe Löslichkeit, was das Ergebnis der folgenden Titration negativ beeinflusste. Auf diese Weise konnte das Cytarabin-5'-mopnophosphat **125** nur in sehr geringen Mengen und mit hohem Aufwand auf Tetra-*n*-butylammoniumionen erhalten werden.

Da es sich für die späteren TriPPPPro-Synthesen (Abschnitt 4.7.5.2) als notwendig herausstellte, dass Monophosphat **125** auf Tetra-*n*-butylammoniumionen in der Synthese zu verwenden, mussten weitere Ansätze zur Darstellung des Tetra-*n*-butylammonium-Salzes des Cytarabin-5'-Monophosphats **125** erprobt werden. Hierzu sollte wie in Abschnitt 4.7.4.1

für das Clofarabin-5'-monophosphat **120** die direkte Phosphorylierung und anschließendem direkter Tausch auf Tetra-*n*-butylammoniumionen durchgeführt werden. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 142 dargestellt.

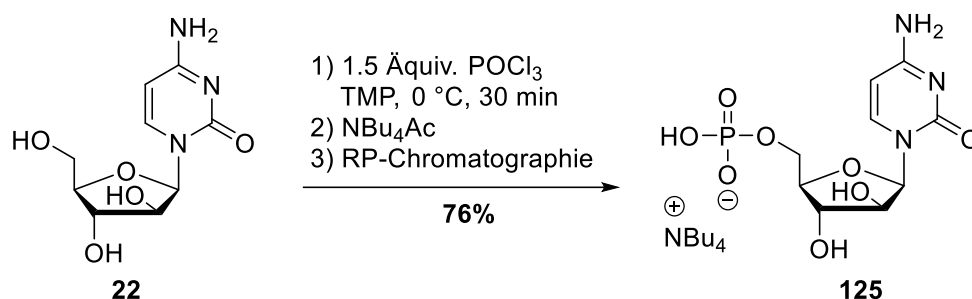


Abb. 142: Synthese von Cytarabin-5'-Monphosphat **125** über die Yoshikawa-Methode.

Für die Reaktionsbedingungen mussten zunächst einige Optimierungen durchgeführt werden. In den ersten Ansätzen wurden zunächst die Reaktionsbedingungen von bisher durchgeführten Yoshikawa-Reaktionen mit 2.0 Äquivalenten Phosphorylchlorid und Tributylamin als Base erprobt. Zum einen weist Cytarabin **22** eine schlechte Löslichkeit in Trimethylphosphat auf. Zum anderen wurde unter diesen Reaktionsbedingungen eine schlechte Umsetzung des Eduktes und gleichzeitig eine zusätzliche Phosphorylierung an der 3'-Position mittels RP-HPLC beobachtet. Aus diesem Grund wurde die Anzahl an Äquivalenten und die Menge an Lösungsmittel erhöht, was jedoch nicht den gewünschten Effekt brachte. Schließlich wurde dann auf die Zugabe einer Base verzichtet, wodurch wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben eine höhere Selektivität gegenüber der 5'-Phosphorylierung erwartet wurde. Mit der angepassten Zahl an Äquivalenten von Phosphorylchlorid konnte unter diesen Bedingungen bereits nach 30 Minuten ein vollständiger Umsatz des Eduktes sowie keine unerwünschten Nebenprodukte beobachtet werden. Auch die schlechte Löslichkeit des Cytarabins **22** in Trimethylphosphat scheint sich unter diesen Bedingungen nicht negativ auf die Reaktion auszuwirken. Durch das direkte Quenchen der Reaktion mit Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer konnte das Monophosphat **125** zudem direkt in sein Tetra-*n*-butylammonium-Salz überführt werden, wodurch die Löslichkeit und somit auch die Handhabbarkeit des Produktes deutlich verbessert werden konnte. So konnte das Nucleotid **125** bereits nach einer automatisierten Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 76 % erhalten werden.

Mit Hilfe dieser optimierten Reaktionsbedingungen konnte das Cytarabin-5'-Monophosphat **125** in einer sehr guten Ausbeute von 76 % in nur einem Reaktionsschritt durch direkte Phosphorylierung mittels der Yoshikawa-Methode erhalten werden. Für dieses Nucleosid hat sich die Yoshikawa-Methode also im Vergleich zur Phosphorylierung mit dem Fm-Amidit **60** nach einigen Optimierungen als deutlich überlegen erwiesen. Hierbei konnte eine Ausbeute von 63 % über drei Stufen erreicht werden. Zusätzlich ist das Monophosphat **125** nach

dieser Methode nur in größeren Mengen als Triethylammonium-Salz zugänglich, was ebenfalls sehr unvorteilhaft ist, da das Monophosphat **125** in dieser Form eine sehr schlechte Löslichkeit und somit auch Handhabbarkeit aufweist.

4.7.5.2 Synthese der Cytarabin TriPPPro-Verbindungen

Die Synthese der Cytarabin-TriPPPro-Verbindungen araC-01 bis 03 **37a**, **c** und **d** sollte über die *H*-Phosphonatroute durch Kupplung der Pyrophosphate **46a**, **c** und **d** mit dem Monophosphat **125** erfolgen. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 143 dargestellt.

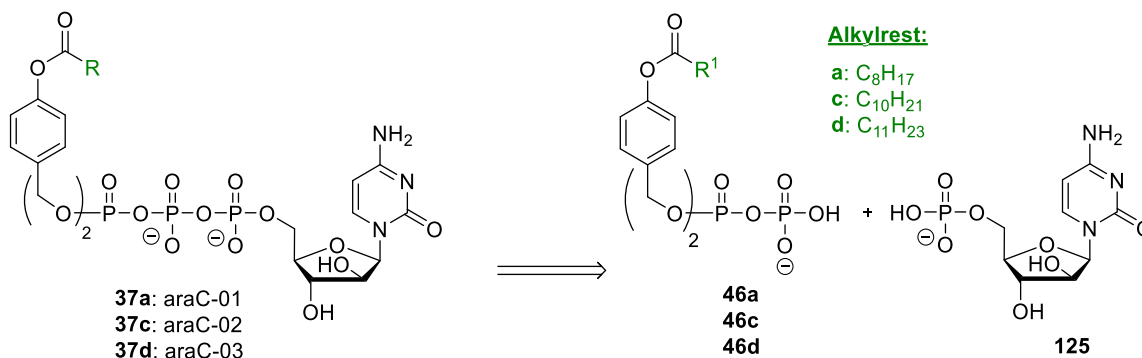


Abb. 143: Retrosyntheschema der darzustellenden Cytarabin-TriPPPro-Verbindungen araC-01 bis 03, **37a**, **c** und **d**.

Zunächst sollte die Reaktion nach dem gängigem Protokoll für die TriPPPro-Synthese mittels stufenweiser Aktivierung des Pyrophosphats erfolgen. Hierbei stellte sich heraus, dass das Triethylammonium-Salz des Cytarabin-5'-monophosphats **125** in keinem für die TriPPPro-Synthese geeignetem Lösungsmittel ausreichende Löslichkeit zeigte. Trotz des Einsatzes von Acetonitril, *N,N*-Dimethylformamid und Tetrahydrofuran sowie Mischungen dieser Lösungsmittel konnte das Edukt nicht ausreichend in Lösung bringen. Für alle Ansätze wurde auch nach mehreren Stunden der Reaktion sowie Erwärmen kein Umsatz des Edukts mittels RP-HPL-Chromatographie ermittelt. Aus diesem Grund sollte für das Triethylammonium-Salz des Monophosphats **125** ein weiterer Ansatz erprobt werden. Die genauen Bedingungen sind in Abb. 144 dargestellt.

Anstelle des maskierten Pyrophosphats **46a** sollte das Cytarabin-5'-Monophosphat **125** stufenweise mittels Trifluoressigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol aktiviert werden. Dies wurde analog zur TriPPPro-Synthese durchgeführt, jedoch ist diese Art der Aktivierung näher an den Triphosphatsynthesen von MOHAMADY *et al.*,¹⁶⁷ bei denen ebenfalls das Monophosphat in die aktivierte Spezies überführt wird. Durch Zugabe von TFAA und Triethylamin zu einer Suspension des Monophosphats **125** entsteht das *in situ* vollständig geschützte Nucleosid **128**, welches eine sehr gute Löslichkeit in Acetonitril besitzt. Anschließend wurde 1-Methylimidazol zugegeben, um das vollständig geschützte und

aktivierte Monophosphat **129** zu erhalten. Dies wurde dann mit dem Pyrophosphat **46a** versetzt, welches in dieser Reaktion als Nucleophil dient.

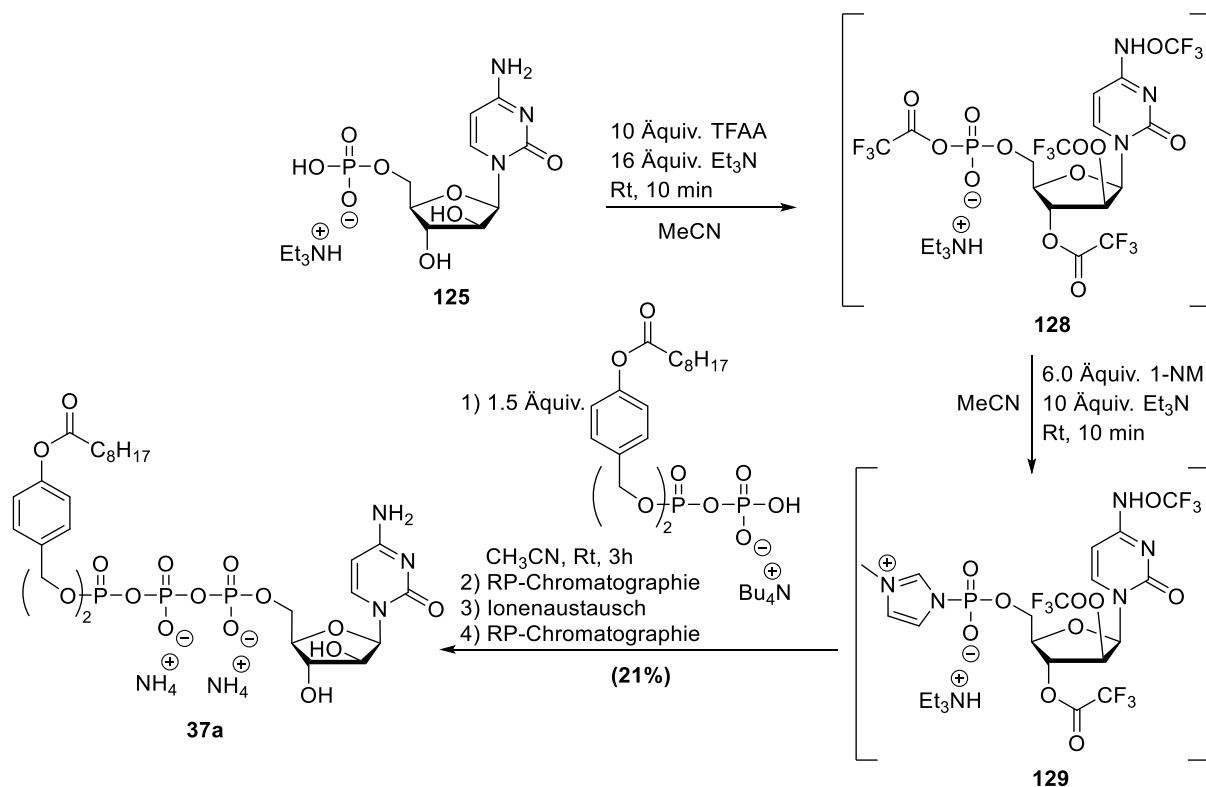


Abb. 144: Versuchte Synthese von **37a** über die stufenweise Aktivierung des Monophosphats nach MOHAMADY *et al.*¹⁶⁷

Nach den Arbeiten von GOLLNEST¹⁴³ stellen die BisAB-maskierten Pyrophosphate zwar keine geeigneten Nucleophile für diese Reaktion dar, jedoch konnte bei dieser Reaktion bereits nach einer Stunde ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. In den anschließenden Versuchen mit den Pyrophosphaten **46c** und **46d** konnte ebenso ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Jedoch wurde hier eine vergleichsweise längere Reaktionszeit benötigt. Durch die anschließende wässrige Aufarbeitung der Reaktion werden die TFA-Gruppen wieder abgespalten. Dennoch konnten die TriPPPPro-Verbindungen **37** nicht in ausreichender Reinheit über diese Syntheseroute erhalten werden. Zum einen traten bei der säulenchromatographischen Reinigung an RP18-Kieselgel Probleme auf, da sich das Produkt scheinbar unter diesen Bedingungen wieder zu zersetzen schien. Zusätzlich wurde das Nebenprodukt **130** erhalten (Abb. 145), welches sich nicht chromatographisch vom Produkt **37a** trennen ließ. Offensichtlich ist die wässrige Aufarbeitung der Reaktion nicht ausreichend, um das durch die Zugabe von TFAA gebildete Säureamid **130** wieder vollständig abzuspalten. Alle Versuche an der TriPPPPro-Verbindung **37a** selektiv das Amid zu spalten, ohne dabei die AB-Maskierungen ebenso abzuspalten, schlugen fehl.

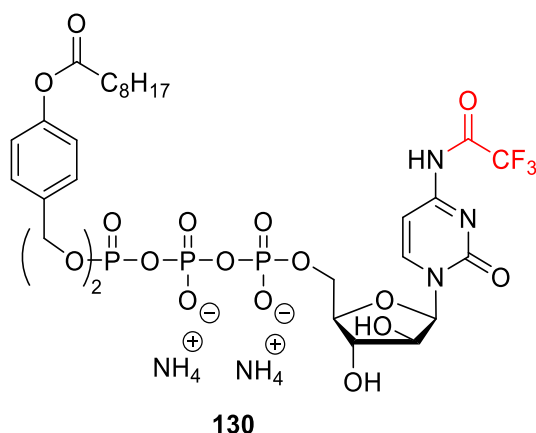


Abb. 145: Das bei der Aktivierung des Monophosphats **125** erhaltene Nebenprodukt der TriPPPPro-Synthese von Verbindung **37a**.

Als nächstes sollte die Synthese der araC-TriPPPPro-Verbindungen erprobt werden, in dem das Cytarabin 5'-Monophosphat **125** in seiner Tetra-*n*-butylammoniumform eingesetzt werden sollte. Durch diese Gegenionen konnte das Monophosphat **125** in DMF gelöst werden, was eine Reaktion als Nucleophil mit dem aktivierten Pyrophosphat **46a** ermöglichte. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 146 dargestellt.

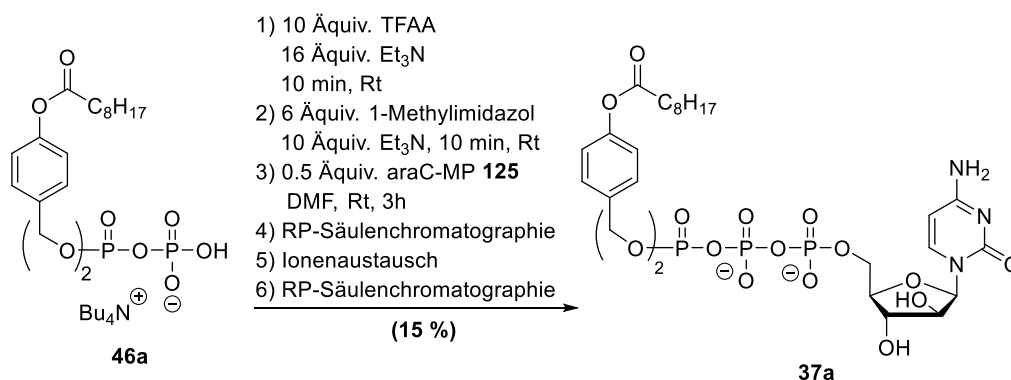


Abb. 146: Synthese von **23a** mit dem Tetra-*n*-butylammonium-Salz des Cytarabin-5'-Monophosphats **125**.

Für diese Reaktion konnte bereits nach einer Stunde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet werden (RP-HPLC). Dies war auch für die Reaktionen mit den Pyrophosphaten **46c** und **46d** zu erkennen, jedoch wurde hier eine längere Reaktionsdauer festgestellt. Dennoch konnten auch über diese Reaktionen die TriPPPPro-Verbindungen **37a**, **c** und **d** nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden. Auch hier zeigte sich bei der säulenchromatographischen Reinigung der Produkte eine Zersetzung während der Reinigungsschritte, die die Isolation des sauberen Produktes unmöglich machte. Vermutlich handelt es sich bei den gebildeten Nebenprodukten um das Intermediat oder das Cytarabin-Triphosphat **114**, da NMR-spektroskopisch verschiedene Signale im ³¹P-NMR-Spektrum gefunden wurden, die unterschiedlichen Triphosphat-Verbindungen zuzuordnen sind. Da diese Spektren von scheinbar sauberen Fraktionen der chromatographischen Reinigung

aufgenommen wurden ist anzunehmen, dass diese Zersetzung ebenso im NMR-Lösungsmittel stattfindet. Ein Wechsel des Lösungsmittels von MeOH- d^4 auf DMSO- d^6 und D_2O zeigten keine Veränderungen.

Aufgrund dieser Resultate kann nur vermutet werden, dass die synthetisierten TriPPPPro-Verbindungen araC-01 bis 03 **37a**, **37c** und **37d** in wässrigen Lösungen keine ausreichende Stabilität besitzen, um sie als reine Verbindungen isolieren zu können. Aus diesem Grund wurde nach zahlreichen Versuchen kein weiterer Syntheseversuch für diese Verbindungen unternommen. Die Ursache für diese Instabilität konnte zunächst nicht geklärt werden. Jedoch wäre es möglich, dass das Amin der Nucleobase intramolekulare Reaktionen eingeht. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von GOLLNEST¹⁴³ für bestimmte Purin-Analoga festgestellt.

4.7.5.3 Synthese von *N*-acetylgeschützten araC-TriPPPPro-Verbindungen

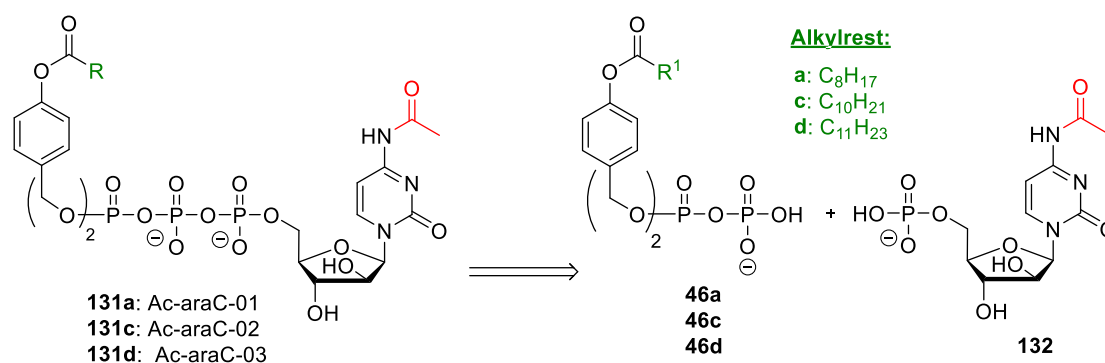


Abb. 147: Retrosyntheschema der *N*-acetylierten araC-TriPPPPro-Verbindungen Ac-araC-01 bis 03 **131a**, **131c** und **131d**.

Wie in vorherigen Abschnitt 4.5.7.2 beschrieben, konnten die TriPPPPro-Verbindungen araC-01 bis 03 aufgrund ihrer geringen Stabilität nicht rein erhalten werden. Da vermutet wurde, dass die Aminofunktion der Nucleobase für diese geringe Stabilität verantwortlich ist, sollten die *N*-acetylierten TriPPPPro-Verbindungen von Cytarabin **22** Ac-araC-01 bis 03 dargestellt werden. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 147 dargestellt. Die TriPPPPro-Verbindungen **131a**, **c** und **d** sollten über die Kupplung der aktivierten Pyrophosphate von **46a**, **c** und **d** mit dem *N*-acetylgeschützten Cytarabin-5'-monophosphat **132** erhalten werden. Hierfür musste zunächst das Monophosphat **132** zugänglich gemacht werden. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 148 dargestellt.

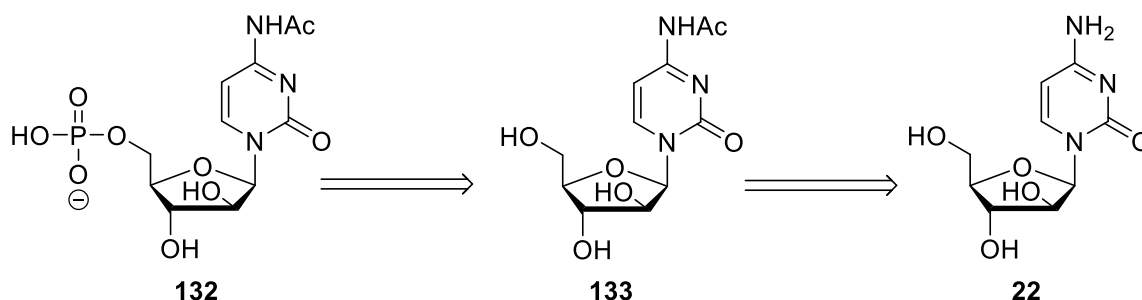


Abb. 148: Retrosyntheseschema des *N*-acetylgeschützten Cytarabin-5'-Monophosphats **132** ausgehend von Cytarabin **22**.

Das *N*-acetylgeschützte Monophosphat **132** sollte über eine Yoshikawa-Phosphorylierung ausgehend vom *N*-acetylgeschützten Nucleosid **133** erhalten werden. Dies sollte zuvor durch selektive Schützung ausgehend von Cytarabin **22** dargestellt werden.

Zunächst erfolgte die Synthese des *N*-acetylierten Cytarabins **133**. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 149 dargestellt. Hierzu wurde das Cytarabin **22** mit Essigsäureanhydrid in *N,N*-Dimethylformamid umgesetzt. Nach 18 Stunden konnte ein vollständiger Umsatz des Nucleosids **22** beobachtet werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte das gewünschte Produkt **133** in einer Ausbeute von 89 % in hoher Reinheit erhalten werden.

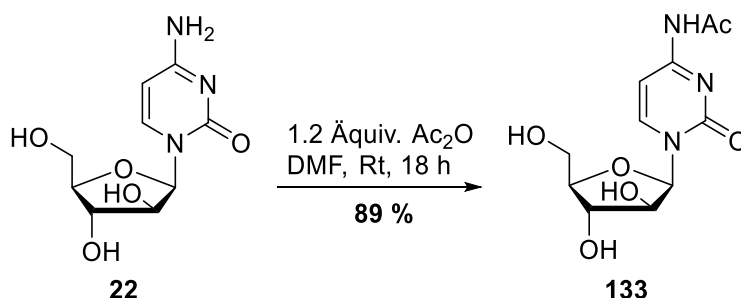


Abb. 149: Synthese des *N*-acetylierten Cytarabins **133**.

Im nächsten Schritt wurde die Phosphorylierung durch die Yoshikawa-Reaktion durchgeführt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 150 dargestellt. Das geschützte Nucleosid wurde zunächst in Trimethylphosphat suspendiert und anschließend mit insgesamt drei Äquivalenten Phosphorylchlorid versetzt. Im Vergleich zur Phosphorylierung von Cytarabin **22** musste interessanterweise insgesamt die doppelte Menge an Phosphorylchlorid hinzugegeben werden, um einen vollständigen Umsatz beobachten zu können. Zusätzlich erhöhte sich auch die Reaktionszeit auf insgesamt eine Stunde. Dies ist ungewöhnlich, da ein Einfluss der Aminofunktion auf die Phosphorylierung nicht erwartet wurde.

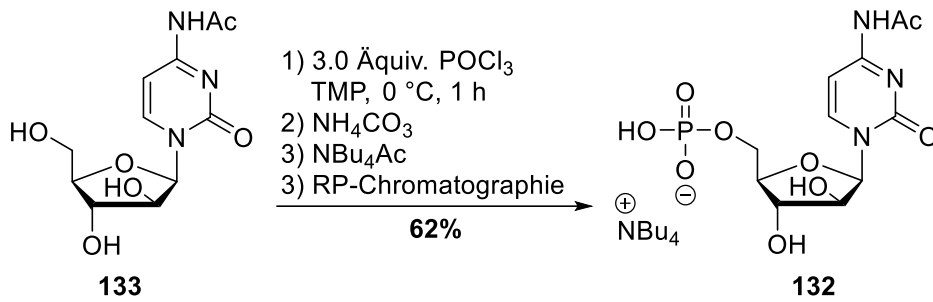


Abb. 150: Synthese des *N*-acetylierten Cytarabin-5'-monophosphats **132** über die Yoshikawa-Methode.

Zusätzlich wurden Schwierigkeiten beim Quenchen der Reaktion und der Reinigung beobachtet. Zunächst muss für das Quenchen der Reaktion eine gesättigte Ammoniumhydrogencarbonatlösung anstelle des Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffers verwendet werden. In ersten Reaktionen hat sich gezeigt, dass der Acetatpuffer keine ausreichende Pufferkapazität besitzt, um die Lösung leicht basisch zu halten. Durch die leicht sauren Bedingungen konnte sehr schnell eine teilweise Spaltung des Amids beobachtet werden, was zu einem chromatographisch nicht trennbaren Gemisch der Monophosphate **132** und **125** führte. Das mittels RP18-HPLC erhaltene Chromatogramm direkt nach dem Quenchen der Reaktionslösung mit Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer ist in Abb. 151 dargestellt. Die beiden Monophosphate konnten bedingt durch ihr ähnliches Elutionsverhalten auch nach mehrfacher automatisierten Säulenchromatographie nicht ausreichend voneinander getrennt werden, weshalb dieser Ansatz verworfen wurde.

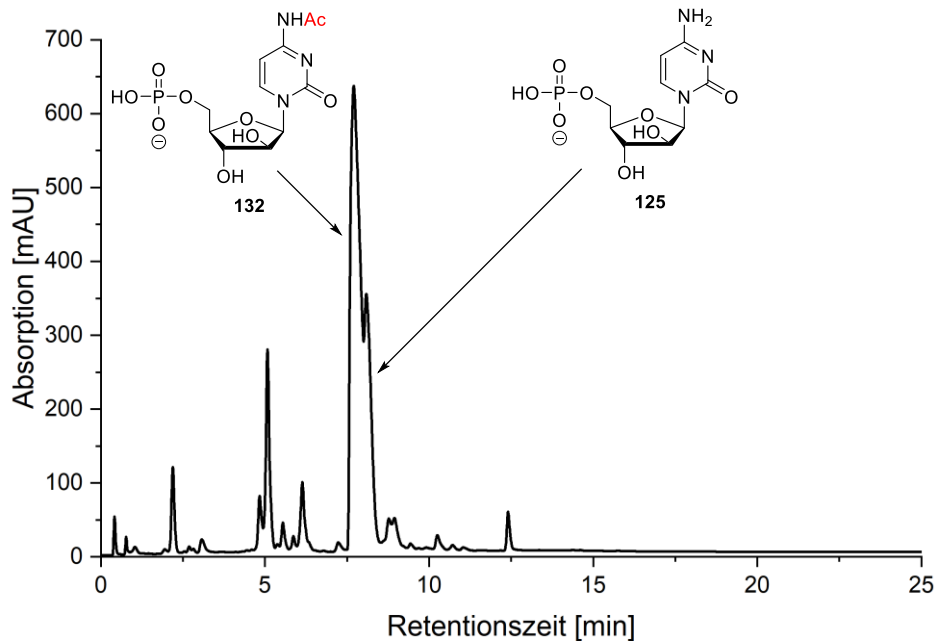


Abb. 151: RP-HPLC-Chromatogramm des Stoffgemisches aus *N*-acetyliertem Monophosphat **132** und dem ungeschützten Monophosphat **125** nach Quenchen der Reaktion mit Tetra-*n*-butylammonium-acetat-Puffer.

Das Problem der sauren Amidspaltung konnte durch den Einsatz von gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung behoben werden. Diese besitzt offensichtlich eine ausreichende Pufferkapazität, um die Reaktionslösung beim Quenchen im leicht basischen Bereich von $\text{pH} = 8$ zu halten. Dadurch konnte eine Spaltung des Amids vollständig verhindert werden. Anschließend wurde die wässrige Phase zunächst wieder entfernt, um vor der säulenchromatographischen Reinigung den Rückstand wieder in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer zum Austausch der Ionen aufzunehmen. Bei der anschließenden automatisierten Säulenchromatographie konnte ein unvollständiger Ionenaustausch beobachtet werden, sodass Fraktionen des gewünschten Produktes **132** auf Tetra-*n*-butylammoniumionen und Ammoniumionen isoliert werden konnten. Dies ist jedoch nicht sonderlich nachteilig, da die Fraktionen mit Ammoniumionen wieder erneut in NBu₄OAc-Puffer aufgenommen und einer weiteren Chromatographie unterzogen werden können. Durch diese Prozedur konnte das gewünschte *N*-acetylierte Cytarabin-5'-monophosphat **132** in einer guten Ausbeute von 62 % und hoher Reinheit erhalten werden. Ebenfalls interessant ist die beobachtete Verschiebung der Absorption der jeweiligen Nucleotide. Die Absorptionsspektren von Monophosphat **125** und **132** sind in Abb. 152 dargestellt.

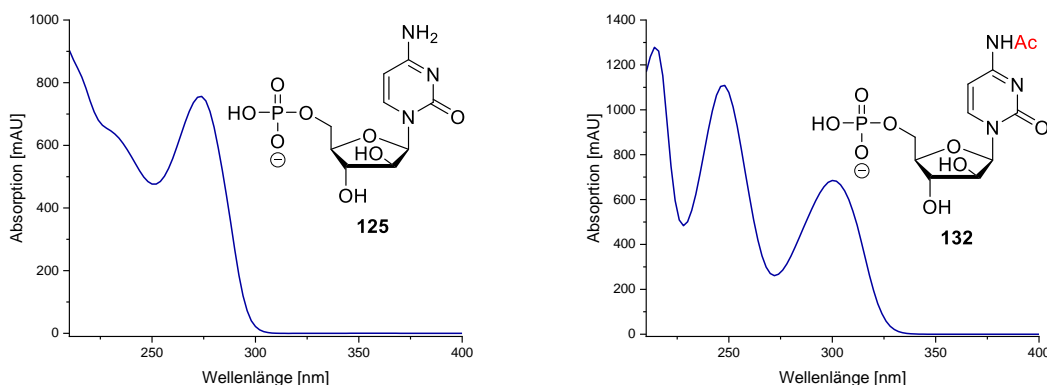


Abb. 152: Absorptionsspektren von Cytarabin-5'-monophosphat **125** (links) und *N*-acetyl-Cytarabin-5'-monophosphat **132** (rechts).

Während das Cytarabin-5'-Monophosphat **125** ein für Nucleotide typisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei ungefähr 275 nm aufweist, besitzt das *N*-acetylierte Monophosphat **132** zwei Absorptionsmaxima bei jeweils circa 250 nm und 300 nm. Da die UV-Vis-Absorption von Nucleotiden durch die Nucleobasen bestimmt wird, ist diese Beobachtung gut zu begründen. Die Acetylierung der Aminofunktion der Cytidin-Base scheint also einen großen Einfluss auf das Elektronensystem auszuüben, welches zur starken Verschiebung und der Absorptionsmaxima und einer zweiten Bande führt. Durch diese Eigenschaften konnten die beiden Nucleotide **125** und **132** trotz ihrer äußerst

ähnlichen Elutionsverhalten bei der Chromatographie mit UV/Vis-spektroskopischen Methoden gut voneinander unterschieden und identifiziert werden.

Nach der erfolgreichen Synthese des *N*-Acetyl-cytarabin-5'-monophosphats **132** erfolgte die Synthese der TriPPP-Verbindungen Ac-araC-01 bis 03 **131a**, **c** und **d** über die *H*-Phosphonatroute. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 153 dargestellt.

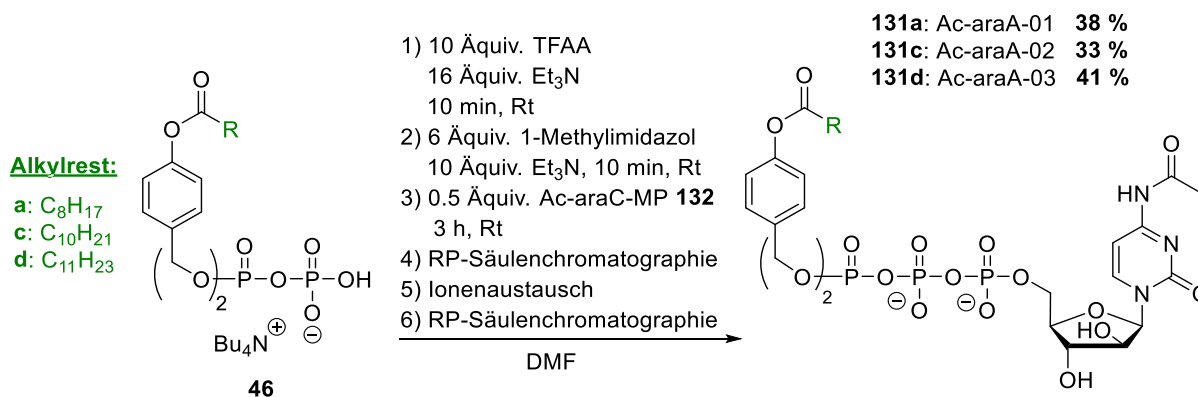


Abb. 153: Synthese der *N*-acetyl-Cytarabin-TriPPP-Verbindungen Ac-araC-01 bis 03 **131a**, **131c** und **131d**.

Für alle durchgeführten Reaktionen konnte bereits nach drei Stunden ein vollständiger Reaktionsumsatz des Monophosphats **132** beobachtet werden (RP-HPLC). Zusätzlich konnten auch keine Probleme mit der Löslichkeit des Monophosphats **132** in *N,N*-Dimethylformamid beobachtet werden. Alle drei TriPPP-Verbindungen **131a**, **c** und **d** konnten nach der üblichen Reinigungsprozedur in guten Ausbeuten zwischen 33 % und 41 % in hoher Reinheit erhalten werden. Die für die araC-TriPPP-Verbindungen festgestellte Instabilität konnte für diese Verbindungen nicht beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass tatsächlich die freie Aminofunktion an der Nucleobase einen negativen Einfluss auf die Stabilität der TriPPP-Verbindungen **37a**, **c** und **d** hat. Wodurch genau diese Instabilität hervorgerufen wird konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

In Abb. 154 ist beispielhaft das ¹H- sowie ³¹P-NMR-Spektrum von *N*-Acetyl-cytarabin-TriPPP-Verbindung **131a** dargestellt. Hier erkennt man eindeutig die für TriPPP-Verbindungen typischen Signale sowie die Acetyl-Funktion bei 2.1 ppm im ¹H-NMR-Spektrum.

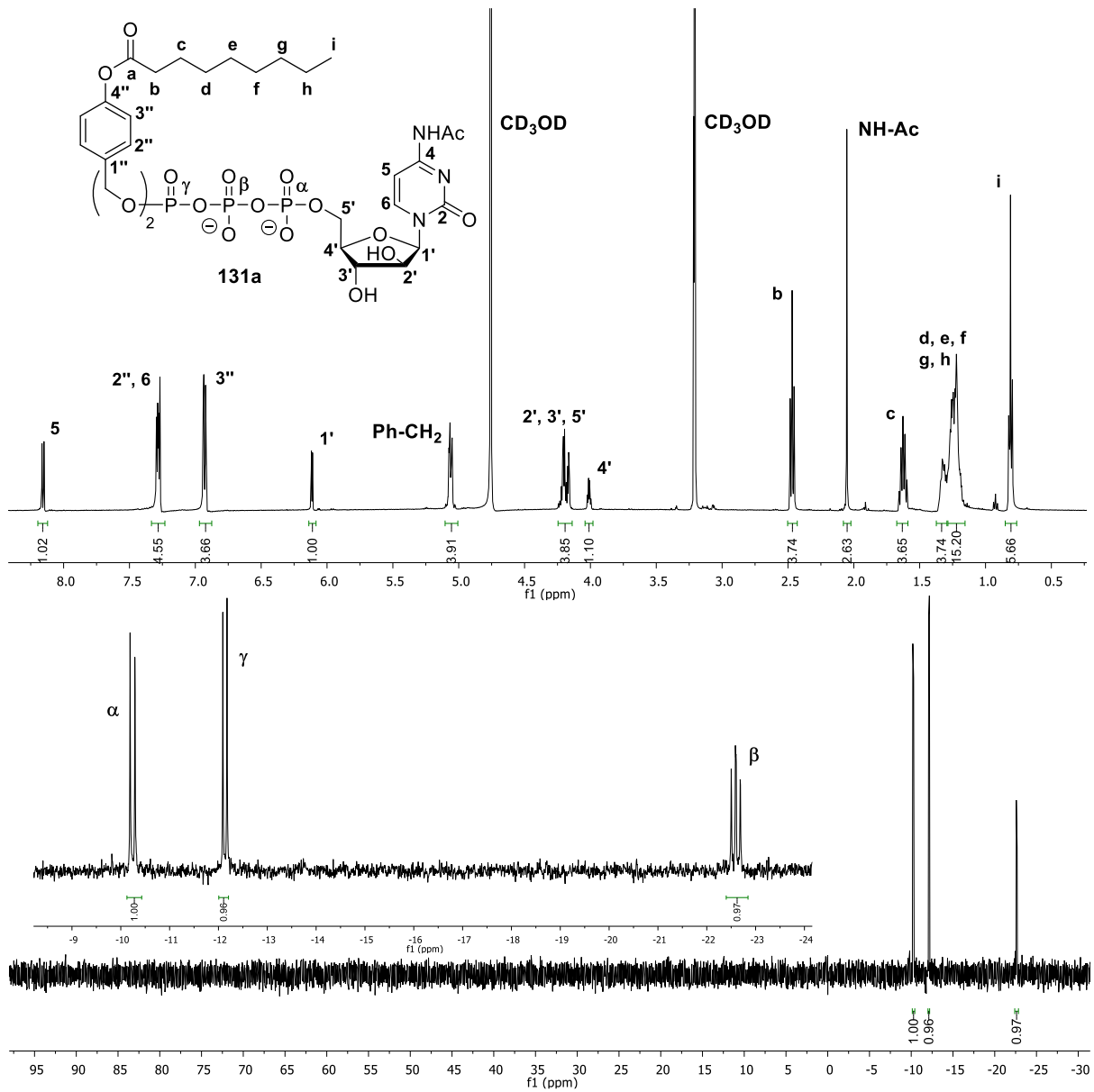


Abb. 154: ¹H- sowie ³¹P-Spektrum von Ac-araC-TriPPPro-Verbindung Ac-araC-01 131a.

4.7.7 Lipophilievergleich der antitumoralen TriPPPPro-Verbindungen

Wie auch für die FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** sollte für die TriPPPPro-Verbindungen der anderen Nucleosidanaloga die Lipophilie und somit ihre potenzielle Zellaufnahme und Aktivität mit den BCNA-Leitstrukturen **30c** und **31c** verglichen werden. Hierzu sollte wieder die Gesamtlipophilie der Substanzen mittels der Retentionszeit über RP18-HPL-Chromatographie ermittelt werden. Dafür wurden die entsprechenden TriPPPPro-Verbindungen mit der BCNA-Leitstruktur **31c** coeluiert. Die erhaltenen Retentionszeiten sind in Tab. 6 dargestellt.

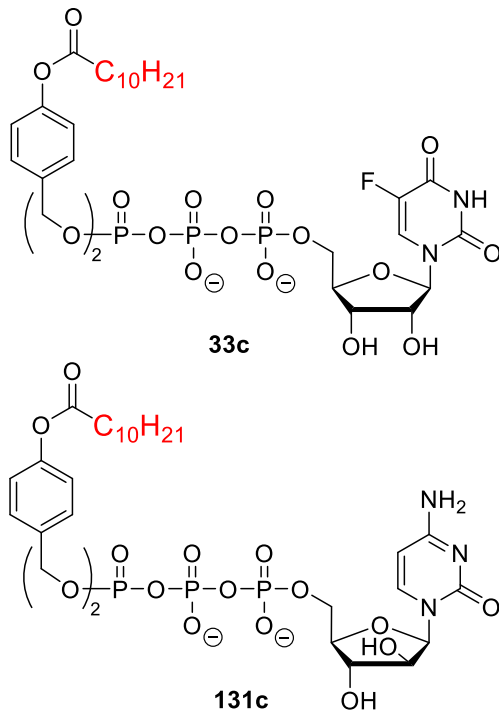
Tab. 6: Retentionszeiten R_T der TriPPPPro-Verbindungen im Vergleich zur Leitstruktur BCNA-02 **31c**.

	BCNA	FU	CdA	2FaraA	ClFaraA	Ac-araC
01 (a)		16.379	16.660	16.618	16.379	16.260
02 (c)	18.500	18.019	18.294	18.169	18.474	17.911
03 (d)		18.840	19.058	18.968	19.296	18.700

Wie erwartet liegen je nach Analogon das C₁₀- oder das C₁₁-Derivat bezüglich ihrer Retentionszeit am nächsten an Leitstruktur BCNA-02 **31c**. Hierbei handelt es sich um das FU-03 **33d**, Ac-araC-03 **131d**, CdA-02 **34c**, 2FaraA-02 **35c** und ClFaraA-02 **36c**. Für diese Substanzen wird bedingt durch ihre Lipophilie auch die beste Zellaufnahme in Krebszellen und somit auch die höchste *in vitro*-Aktivität erwartet. Ebenso wie bei den bisherigen TriPPPPro-Verbindungen war bei diesen Substanzen erneut zu beobachten, dass die Gesamtlipophilie im geringen Maße auch von dem Nucleosid selbst beeinflusst wird, jedoch wird der Haupteinfluss durch die Maskierung der Verbindungen definiert. Während für die Purin-Analoga **34-36** die Maskierungseinheit C₁₀ (**b**) die besten lipophilen Eigenschaften aufweist, ist dies für die Pyrimidin-Analoga **33** und **131** die C₁₁-Maske (**d**). Vor allem die Purin-TriPPPPro-Verbindungen **34c**, **35c** und **36c** weisen insgesamt sehr ähnliche Eigenschaften bezüglich ihrer Lipophilie auf, obwohl sich vor allem das CdA-Derivat **34c** durch die Desoxy-Riboseeinheit nicht unerheblich von den anderen TriPPPPro-Verbindungen unterscheidet. Ebenso konnte hier wieder ein Unterschied der Retentionszeit von ungefähr 0.7 Minuten pro Methyleinheit je Maskierungseinheit wie bei den FdU- und BCNA-TriPPPPro-Verbindungen ermittelt werden. Diese Erkenntnisse können für das Design weiterer potenzieller antitumoraler TriPPPPro-Verbindungen sehr hilfreich sein.

Insgesamt konnten durch die Bestimmung der Lipophilien der dargestellten TriPPPPro-Verbindungen die Derivate ermittelt werden, die potenziell die besten antitumoralen Eigenschaften bedingt durch die beste Zellaufnahme zeigen sollten. Diese Derivate sind in Abb. 155 dargestellt. Während es sich bei den Purin-TriPPPPro-Verbindungen **34-36** um die Prodrugs mit der C₁₀-Maskierungseinheit (**c**) handelt, ist für die Pyrimidin-TriPPPPro-Verbindungen **33** und **131** die C₁₁-Maskierungseinheit (**d**) am besten geeignet.

Pyrimidin-TriPPPro-Verbindungen



Purin-TriPPPro-Verbindungen

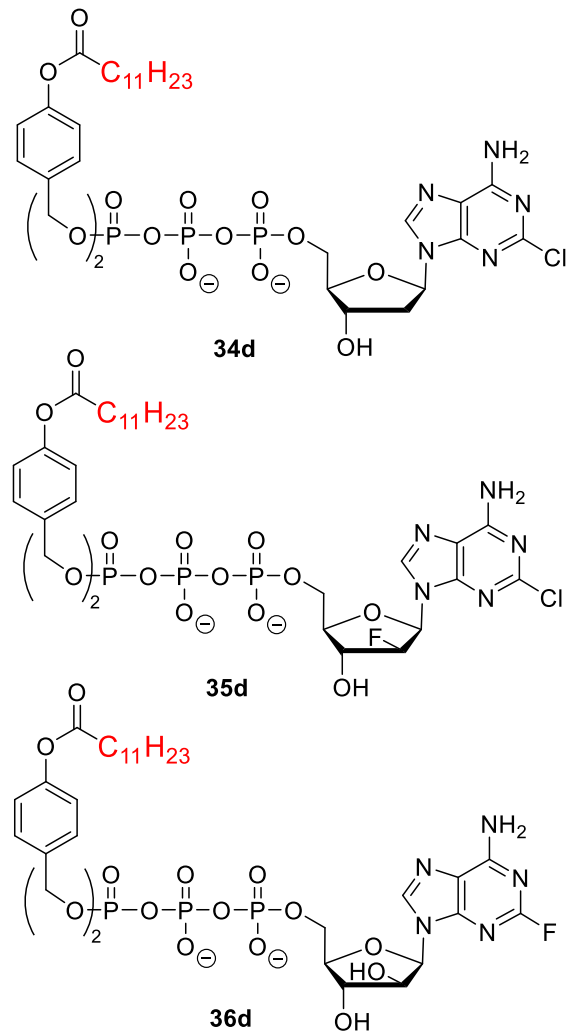


Abb. 155: Durch Lipophilievergleich mit der Leitstruktur **31c** bestimmte, potenziell aktive TriPPPro-Verbindungen **33c**, **131c**, **34d**, **35d** und **36d**.

4.7.8 Fazit der Synthesen antitumoraler TriPPPro-Verbindungen

Insgesamt konnten von allen gewünschten antitumoral aktiven Nucleosidanaloga nach der erfolgreichen Monophosphatsynthese über die Amiditchemie oder die Yoshikawa-Reaktion bis auf das Cytarabin **22** die TriPPPro-Verbindungen mit den BisAB-Maskierungen **a**, **c** und **d** über die *H*-Phosphonatroute dargestellt werden. Hierbei wurden je nach Nucleosidanalogen zwischen 10 % und 56 % im Kupplungsschritt erzielt. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind vor allem auf die unterschiedlichen Löslichkeiten der jeweiligen Monophosphate und auf die Reinigung der Produkte zurückzuführen. Vor allem die Monophosphate der Purinanaloge wiesen im Vergleich zu den Pyrimidinanaloga eine geringere Löslichkeit in DMF auf, was insgesamt mit einer schlechteren Umsetzung und längeren Reaktionszeit einherging. Durch die Verwendung von Tetra-*n*-butylammoniumionen

für das Monophosphatsalz konnte die Löslichkeit deutlich verbessert werden. Vor allem bei den Fludarabin-TriPPPPro-Verbindungen **35** bereitete die säulenchromatographische Reinigung an RP18-Kieselgel Schwierigkeiten, da hier die bei der Reaktion gebildeten Imidazoliumsalze coeluierten. Durch einen Wechsel auf RP8-Kieselgel konnte schließlich eine ausreichende Trennung erhalten werden, was sich aber insgesamt dennoch negativ auf die Ausbeute auswirkte. Dennoch konnten durch die angepassten Reaktions- und Reinigungsbedingungen für die jeweiligen Nucleosidanaloga die gewünschten TriPPPPro-Verbindungen in mittleren bis guten Ausbeuten und hoher Reinheit erhalten werden (Abb. 156).

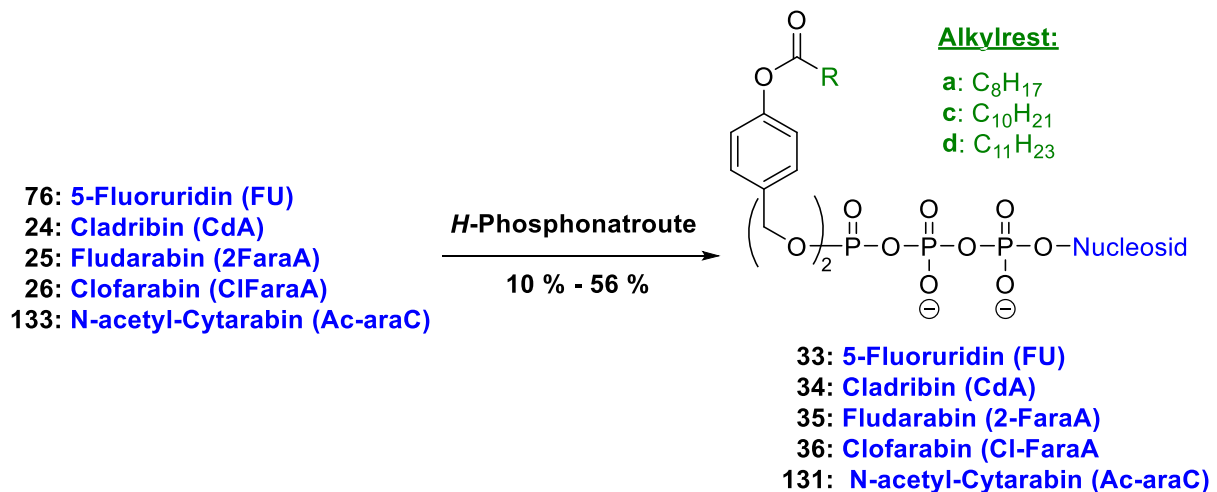


Abb. 156: Darstellung der antitumoralen TriPPPPro-Verbindungen ausgehend von den Nucleosidanaloga 5-Fluoruridin (FU) **76**, Cladribin (CdA) **24**, Fludarabin (2FaraA) **25**, Clofarabin (ClFaraA) **26** und *N*-acetyl-Cytarabin (Ac-araC) **133**.

Für Cytarabin **22** konnten keine TriPPPPro-Verbindungen dargestellt werden. Von diesen Verbindungen konnte trotz erfolgreicher Kupplung abschließend kein sauberes Prodrug isoliert werden. Diese Instabilität konnte erst überwunden werden, nachdem an der Aminofunktion der Nucleobase eine Acetylierung durchgeführt wurde. Durch diese Modifikation konnte das Prodrug entscheidend stabilisiert werden, sodass die TriPPPPro-Verbindungen **131** erfolgreich in guten Ausbeuten und hoher Reinheit isoliert werden konnten. Ob diese Verbindungen trotz der Modifikation noch eine antitumorale Aktivität zeigen, muss durch weitere Studien ermittelt werden.

4.8 Synthese von Nucleosid-5'-di- und triphosphaten

Für die Hydrolysestudien der TriPPPro-Verbindungen war es wichtig, dass neben den Prodrugs auch die Nucleosid-5'-di- und triphosphate dargestellt werden. Bei der Analyse der Chromatogramme müssen diese als Referenzsubstanzen coeluiert werden, um über die Retentionszeit und Absorptionsspektren Aussagen über die bei den Hydrolysen entstandenen Metabolite zu treffen. Hierfür sollten für die dBCNA- und BCNA-Nucleoside, sowie für das FdU **2**, FU **76**, CdA **24**, FaraA **25** und ClFaraA **26** die jeweiligen 5'-Di- und Triphosphate dargestellt werden.

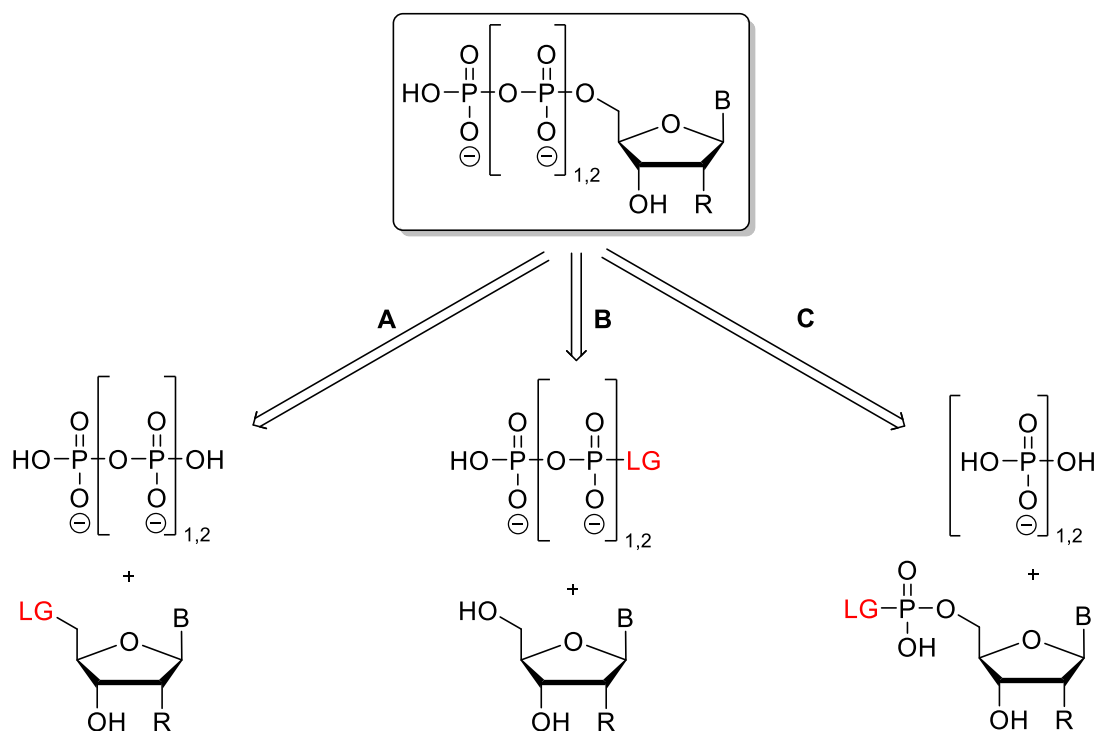
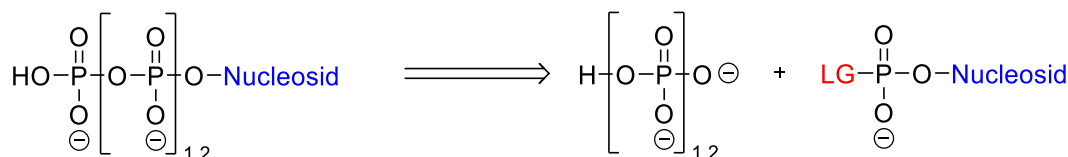


Abb. 157: Synthesemethoden zur Darstellung von Nucleosid-5'-di- und triphosphaten.

Für die Synthese von Nucleosid-5'-di- und triphosphaten sind inzwischen zahlreiche Methoden publiziert worden.²¹⁰ Die verschiedenen Ansätze sind in Abb. 157 zusammengefasst. Zum einen können die Di- und Triphosphatsalze als Nucleophile verwendet werden, indem sie mit einem 5'-aktivem Nucleosid als Elektrophil zur Reaktion gebracht werden (**A**). Hierzu können zum einen iodierte Nucleoside zum Einsatz kommen,²¹¹ besonders bewährt haben sich jedoch die 5'-Tosyl-Nucleoside.²¹² Ebenso können die Nucleoside selbst als Nucleophil verwendet werden, während die Phosphatsalze durch verschiedene Abgangsgruppen als Elektrophil eingesetzt werden (**B**). Diese aktivierten Phosphatester können beispielsweise Phosphoramidate darstellen, bei denen Pyridin oder Imidazol sowie Morpholin als Abgangsgruppe dienen.²¹⁰ Zu den elektrophilen Phosphorspezies zählen auch die Phosphoramidite, die ebenfalls für die Synthese von 5'-Di- und Triphosphaten verwendet werden können. Ebenso können Phosphorhalogenide als Elektrophile verwendet werden, meist die Chloridate. Diese Art der Synthesen werden

jedoch eher selten für die Darstellung von Nucleosid-Polyphosphaten, sondern eher zur Synthese von Nucleosid-5'-monophosphaten verwendet.²¹⁰ Ebenso möglich ist die Kupplung eines aktivierten Nucleosid-5'-monophosphats als Elektrophil mit einem Mono- oder Diphosphatsalz als Nucleophil (**C**). Hierbei haben sich ähnliche Abgangsgruppen bewährt, beispielsweise die Verwendung von Imidazoliden und Morpholiden (MOHAMADY *et al.*¹⁶⁷), aber auch Monophosphatdichloride (LUDWIG UND ECKSTEIN²¹³).



<u>Diphosphate</u>	<u>Triphosphate</u>	
134: dBCNA-DP	141: dBCNA-TP	40: dBCNA-MP
135: BCNA-DP	142: BCNA-TP	41: BCNA-MP
136: FdU-DP	71: FdU-TP	68: FdU-MP
137: FU-DP	70: FU-TP	77: FU-MP
138: CdA-DP	83: CdA-TP	102: CdA
139: 2FaraA-DP	105: 2FaraA-TP	103: 2-FaraA
140: ClFaraA-DP	119: ClFaraA-TP	107: Cl-FaraA

Abb. 158: Retrosyntheschema der darzustellenden 5'-Di- und Triphosphate über die Methode nach MOHAMADY *et al.*¹⁶⁷

In dieser Arbeit sollte die Syntheseroute **C** erprobt werden, da die Monophosphate für die Darstellung der TriPPPPro-Verbindungen über die *H*-Phosphonatroute bereits in ausreichenden Mengen vorlagen. Zusätzlich stellt die Kupplung über diese Route eine Variante der von Mohamady *et al.* eingeführten Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten dar, weshalb dieser Ansatz ebenso für die 5'-Di- und Triphosphate in dieser Arbeit erprobt werden sollte. Das Retrosyntheschema für alle darzustellenden Di- und Triphosphate ist in Abb. 158 dargestellt. Zur Kupplung sollte das Nucleosid-5'-Monophosphat stufenweise zum Imidazolidat aktiviert werden, um es anschließend mit dem entsprechenden Mono- oder Diphosphatsalz umzusetzen. Die Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen für alle in dieser Arbeit synthetisierten Diphosphate ist in Abb. 159 dargestellt.

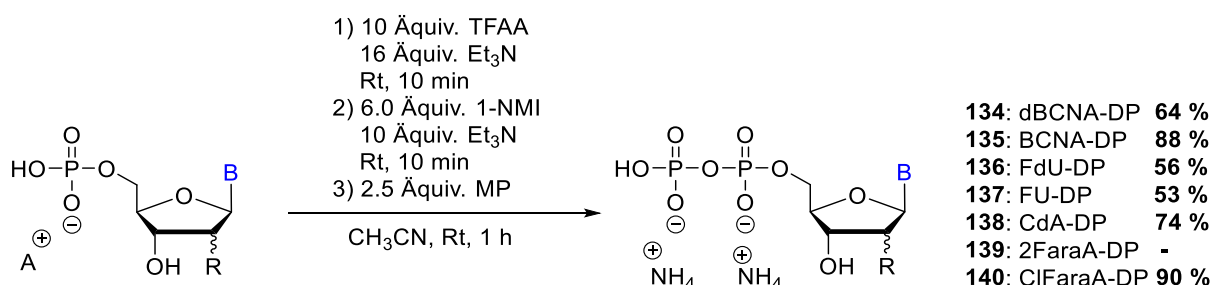


Abb. 159: Reaktionsbedingungen der Synthese der Diphosphate **134-140**.

Analog zu den TriPPPPro-Synthesen wurde die stufenweise Aktivierung mit Trifluoressigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol durchgeführt. In diesem Fall wurden aber

die Monophosphate in ihre elektrophile Form überführt. Besonders vorteilhaft an dieser Syntheseroute ist, dass die in Acetonitril meist unlöslichen Nucleosid-5'-monophosphate durch die Zugabe von TFAA in ihre komplett TFA-geschützte Form überführt werden, die sehr gut löslich in organischen Lösungsmitteln sind (siehe Abschnitt 4.7.5.2, Abb. 144). Durch die anschließende Zugabe von 1-Methylimidazol wird dann das Imidazolium-Phosphoramidat gebildet, welches ein gutes Elektrophil darstellt. Anschließend wurde das aktivierte Imidazoliumphosphat zu einer Lösung des Tetra-*n*-butylammoniumphosphatsalzes getropft. Hierbei ist es zum einen wichtig, einen Überschuss von mindestens 2.5 Äquivalenten des Phosphatsalzes zu verwenden, um eine doppelte Veresterung zu verhindern. Zusätzlich sollte die Zugabe der aktivierten Spezies sehr langsam erfolgen. In dieser Arbeit hat es sich bewährt, mittels einer Spritzenpumpe eine sehr langsame Zugabe mit 0.2 mL/min zu verwenden. Auf diesem Wege konnte die Bildung von Nebenprodukten nicht beobachtet werden. Nach der erfolgten Zugabe wurde die Reaktionslösung noch bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei teilweise schon kurz nach Beenden der Zugabe ein vollständiger Umsatz des Monophosphats mittels RP-HPLC-Läufen beobachtet wurde.

Entscheidend bei der Reaktion sind auch die einzelnen Reinigungsschritte nach der Reaktion. Nachdem alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt wurden, wurde der Rückstand zunächst in Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Chloroform gewaschen, um das überschüssige Imidazol zu entfernen. Dadurch konnte das Schmierien der Imidazoliumsalze und deren damit verbundene aufwendige Trennung, die bei den TriPPP_{ro}-Synthesen beobachtet wurde, umgangen werden. Anschließend erfolgte zunächst eine automatisierte säulenchromatographische Reinigung an RP18-Kieselgel des Tetra-*n*-butylammonium-Salzes des Nucleotids, wodurch die meisten überschüssigen Salze entfernt werden konnten. Anschließend erfolgte ein Ionentausch über DOWEX-NH₄⁺-Harz und eine erneute säulenchromatographische Reinigung. Durch diese Prozedur wurde das Diphosphat zunächst in seine polare, gut wasserlösliche Form überführt, wodurch dann bei der Chromatographie alle verbliebenen unpolaren Verunreinigungen abgetrennt werden konnten. Auf diese Weise wurden alle Diphosphate in guter Ausbeute zwischen 53 % und 88 % und hoher Reinheit erhalten (Abb. 159). Lediglich für das 2FaraA-DP **139** konnte über diese Methode kein sauberes Produkt isoliert werden. Obwohl für die Reaktion selbst ein vollständiger Umsatz des Monophosphats **120** beobachtet wurde, konnte bereits bei allen durchgeführten Reaktionen durch RP-HPLC-Analytik eine Vielzahl an unterschiedlichen Produkten ermittelt werden. Die anschließende Reinigung der Reaktionsprodukte brachte wie erwartet keinen Erfolg. Auch eine Änderung der Reaktionsbedingungen durch eine Erhöhung der Anzahl an Äquivalenten an Monophosphatsalz, Verlangsamung der Zutropfgeschwindigkeit und Erniedrigung der Reaktionstemperatur brachten keine entscheidenden

Effekte. Weitere Versuche zur Darstellung des 2FaraA-DPs **139** wurden im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht erprobt.

Die Synthese der Triphosphate erfolgte unter analogen Reaktionsbedingungen, jedoch wurde anstelle des Tetra-*n*-butylammoniumphosphats das Diphosphatsalz als Nucleophil verwendet. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Abb. 160 dargestellt. Auch die anschließende Reinigung der Triphosphate erfolgte auf analoge Weise wie die der Diphosphate, wodurch alle gewünschten Triphosphate bis auf das 2FaraA-TP **105** in guten Ausbeuten zwischen 56 % und 92 % und hoher Reinheit erhalten wurden. Für das Triphosphat **105** wurden dieselben Probleme wie für das 2FaraA-DP **139** beobachtet. Während der Reaktion konnten bereits mittels RP-HPLC eine Vielzahl an Nebenprodukten beobachtet werden, wodurch die Isolierung des gewünschten Triphosphats **105** nicht mehr möglich war. Da für alle anderen eingesetzten Monophosphate gute bis sehr gute Ergebnisse über diese Methode erzielt werden konnten, scheint das Fludarabin aus unbekanntem Gründen nicht geeignet zu sein, um eine selektive Aktivierung mittels des Imidazolidats zu erzielen.

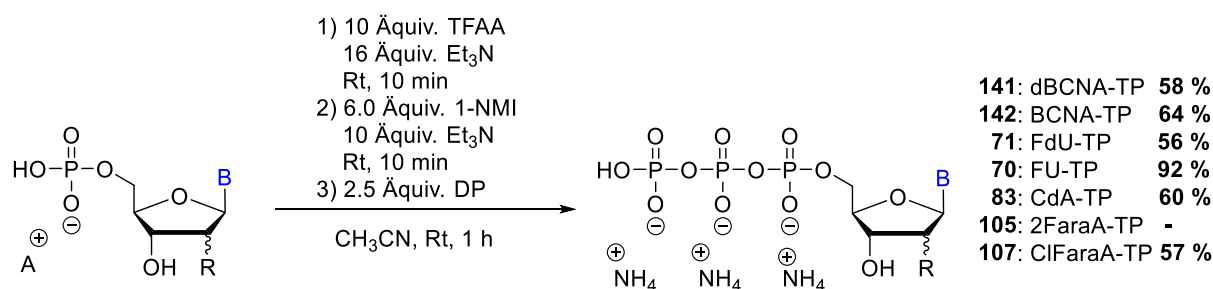


Abb. 160: Synthese der Nucleosidanaloga-Triphosphate.

Insgesamt konnte im Zuge dieser Arbeit über die von MOHAMADY *et al.* etablierte Methode zur Synthese von Triphosphaten eine Reihe von Nucleosid-5'-triphosphaten dargestellt werden, für die es bisher keine bekannten Literaturbeispiele gibt. Durch die angepassten Reinigungsprozeduren konnten für diese Verbindungen gute bis sehr gute Ausbeuten sowie eine hohe Reinheit erzielt werden. Ebenso konnten über diese Methode zahlreiche Nucleosid-5'-Diphosphate dargestellt werden. Bezeichnend für diese Reaktionssequenz ist vor allem die vergleichsweise einfache Synthese sowie einfache Reinigung des Produktes, welche bei anderen Synthesemethoden für Di- und Triphosphate oft sehr aufwendig ist. Beispielsweise konnte durch die selektive Phosphorylierung und das Ausbleiben der Bildung von unterschiedlichen Polyphosphaten auf eine aufwendige Reinigung mittels SEPHADEX-Chromatographie und Ionengradienten verzichtet werden, welches bei der Synthesemethode nach LUDWIG und ECKSTEIN üblich ist. Interessant ist auch das Potential dieser Synthese, die Di- und Triphosphate in großen Ansätzen darstellen zu können. Das FdU-5'-Diphosphat **136**

konnte in Ansatzgrößen von mehreren Hundert Milligramm erhalten werden, was sich nicht nachteilig auf die Ausbeute auswirkte.

4.9 Hydrolyseverhalten verschiedener antitumoraler TriPPPPro-Verbindungen

Wie für die BCNA-TriPPPPro-Verbindungen **30**, **31** und die FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** sollte für die TriPPPPro-Verbindungen **33-36** und **131** das Hydrolyseverhalten untersucht werden. Hierbei sollte sowohl das chemische Hydrolyseverhalten wie auch das enzymatische Hydrolyseverhalten in Zellextrakten untersucht werden. Hydrolysen mit PLE wurden jedoch nicht durchgeführt, da diese vergleichsweise nur wenig Aufschluss über das enzymatische Verhalten in lebenden Zellen geben. Durch die exemplarischen PLE-Hydrolysen mit den BCNA- und FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** und zahlreicher literaturbekannter Beispiele wurde generell von einer enzymatischen Spaltbarkeit der hier dargestellten Verbindungen durch die Schweineleberesterase ausgegangen.

4.9.1 Chemische Hydrolyse der TriPPPPro-Verbindungen in PBS-Puffer

Hierzu wurden die Hydrolysen zur Bestimmung der chemischen Stabilität analog zum Protokoll für die FdU-TriPPPPro-Verbindungen **32** zunächst in PBS-Puffer (pH = 7.3, 37 °C) inkubiert und zu entsprechenden Zeitpunkten Aliquote entnommen und mittels RP-HPLC analysiert. Je nach TriPPPPro-Verbindung wurde hierfür die Wellenlänge der Absorption variiert. Die ermittelten Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der einzelnen TriPPPPro-Verbindungen sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der TriPPPPro-Verbindungen **33**, **34**, **35**, **36** und **131** in PBS-Puffer (pH = 7.3, 37 °C).

	$t_{1/2}(1)$ in PBS [h]					
	FdU	FU	CdA	2FaraA	CIFaraA	Ac-araC
01 (a)	55	45	32	38	40	41
02 (c)	50	50	26	36	34	56
03 (d)	52	45	25	36	36	58

Bei den ermittelten Halbwertszeiten der Spaltung der ersten AB-Maskierungseinheit sind je nach Nucleotid Unterschiede zu erkennen. Bei den FU-TriPPPPro-Verbindungen liegen die Halbwertszeiten etwas unter den von den FdU-TriPPPPro-Verbindungen (Abschnitt 4.5.1, Tab. 4). Dadurch lässt sich darauf schließen, dass die 2'-Hydroxyfunktion insgesamt einen negativen Einfluss auf die chemische Stabilität der FU-Verbindungen im Vergleich zu den FdU-Verbindungen besitzt. Für die drei Purin-Analoga CdA, 2FaraA und CIFaraA weisen die TriPPPPro-Verbindungen ebenso eine vergleichsweise geringe Stabilität auf. Hier liegen die Halbwertszeiten zwischen 30 und 40 Stunden. Für die Ac-araC-TriPPPPro-Verbindungen, die

Pyrimidin-Derivate darstellen, konnten wiederum hohe Halbwertszeiten zwischen 40 und fast 60 Stunden ermittelt werden. Dies spricht eindeutig für einen Einfluss der Nucleobase auf die chemische Stabilität. Dennoch liegen alle in dieser Arbeit bestimmten Halbwertszeiten für die PBS-Hydrolysen zwischen 25 und 58 Stunden, was insgesamt für eine ausreichende chemische Stabilität der Substanzen spricht, da die Halbwertszeiten bei *in vitro*- oder *in vivo*-Systemen deutlich unterhalb dieser Zeiträume liegen.

Bezüglich der unterschiedlichen Acylreste der Maskierungseinheiten konnten für alle hier untersuchten TriPPPPro-Verbindungen dieselben Effekte festgestellt werden wie für die BCNA- und FdU-TriPPPPro-Verbindungen. Die Verläufe des Prodrugs und der Metaboliten über die Zeit für die untersuchten TriPPPPro-Verbindungen sind in Abb. 161 und Abb. 162 dargestellt.

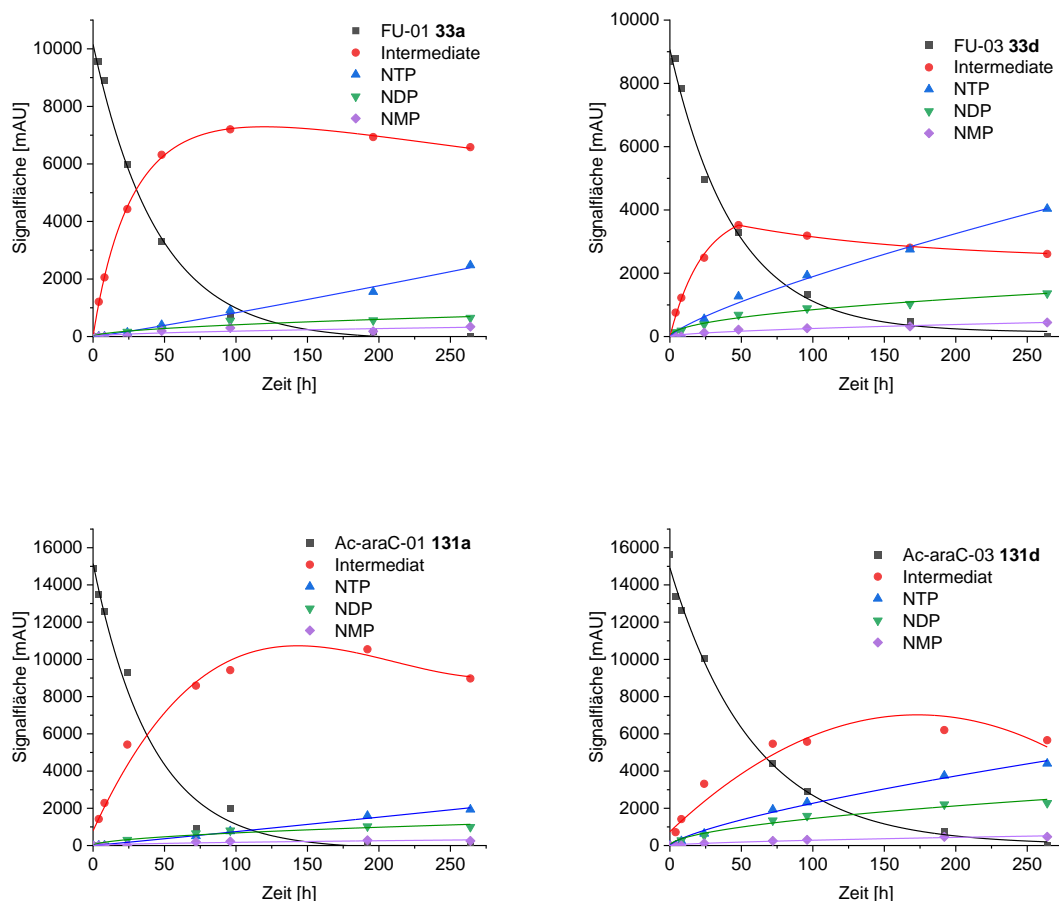


Abb. 161: Diagramme der chemischen Hydrolyse von FU-01 **33a** (oben links), FU-03 **33d** (oben rechts), Ac-araC-01 **131a** (unten links) und Ac-araC-03 **131d** (unten rechts) in PBS-Puffer (pH = 7.3, 37 °C).

Während die Spaltung der ersten AB-Maskierung relativ unabhängig von der Länge des Acylrestes ist, scheint die Spaltung der zweiten Maskierung bei längeren Acylresten wesentlich schneller abzulaufen. Diese Beobachtung wurde bereits bei den BCNA- und FdU-TriPPPPro-Verbindungen gemacht.

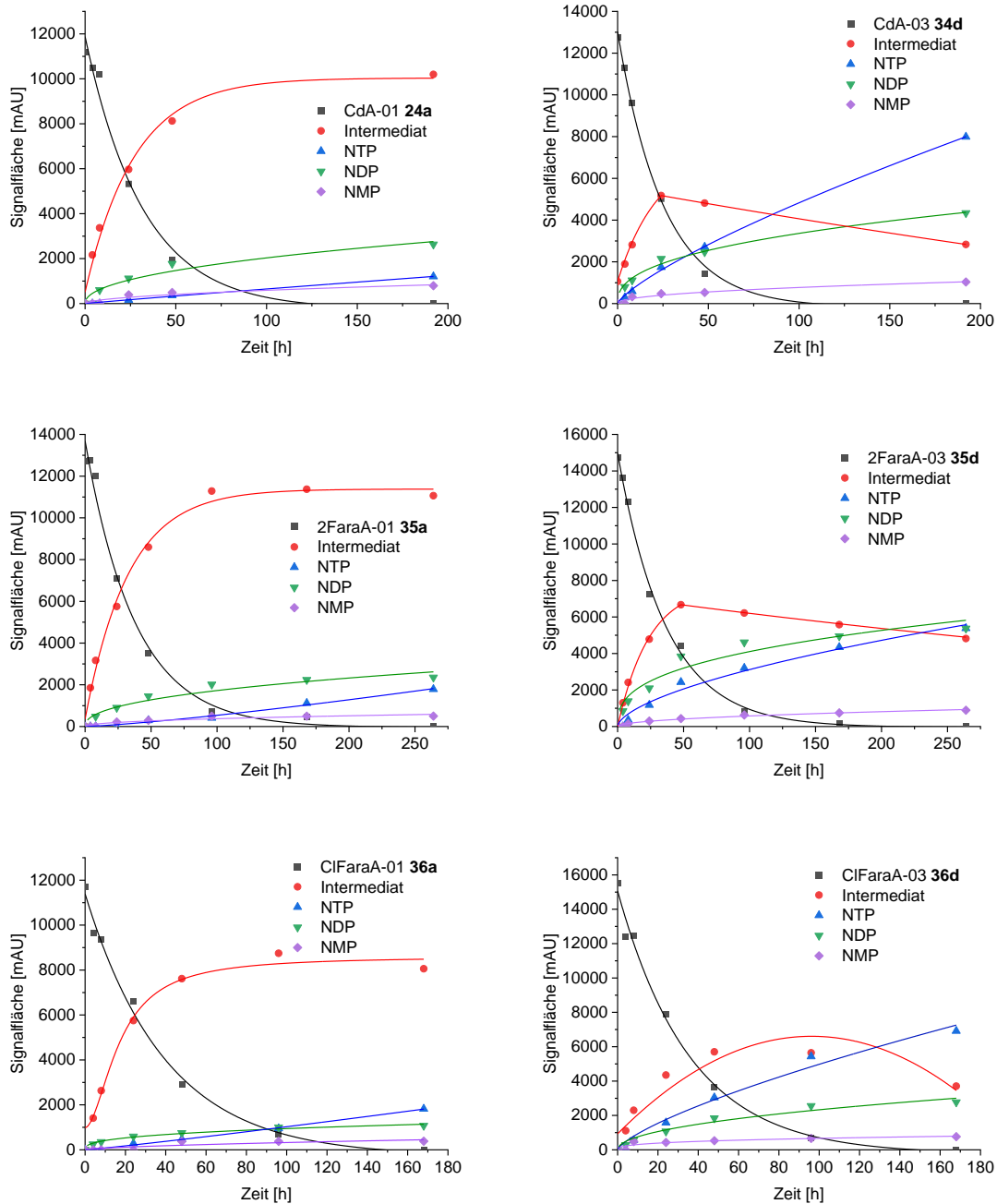


Abb. 162: Diagramme der chemischen Hydrolyse von CdA-01 **34a** (oben links), CdA-03 **34d** (oben rechts), 2FaraA-01 **35a** (Mitte links), 2FaraA-03 **35d** (Mitte rechts), ClFaraA-01 **36a** (unten links), ClFaraA-03 **36d** (unten rechts) in PBS-Puffer (pH = 7.3, 37 °C).

Zusätzlich wurde auch hier bei den TriPPPPro-Verbindungen 03 mit den langen Acylresten (C₁₁, **d**) eine vermehrte Bildung der entsprechenden Nucleosid-Diphosphate beobachtet. Auf die Ursache für diesen Effekt wurde bereits ausführlich in Abschnitt 4.5.1 eingegangen. Zusätzlich scheint dieser Effekt auch unabhängig vom Nucleosid zu sein, da dieser Effekt sowohl für die Pyrimidin-Analoga (Abb. 161) als auch für die Purin-Analoga (Abb. 162) beobachtet wurde. Ebenso interessant ist die Beobachtung, dass für die *N*-Acetyl-cytarabin-TriPPPPro-Verbindungen **131a**, **c** und **d** keine Spaltung des Acetyl-Amids an der Nucleobase

beobachtet wurde. Die Funktion scheint unter den imitierten physiologischen Bedingungen also chemisch stabil zu sein.

Insgesamt konnte für alle getesteten TriPPPro-Verbindungen eine ausreichende chemische Stabilität unter den gewählten Bedingungen der Hydrolyse erhalten werden. Die Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ schwanken hierbei je nach Prodrug zwischen 25 und 58 Stunden.

4.9.2 Hydrolyse der TriPPPro-Verbindungen in Zellextrakten

Neben der chemischen Hydrolyse der Prodrugs ist ebenso ihr metabolisches Verhalten in den Zellen von großer Bedeutung. Daher sollten die TriPPPro-Verbindungen der Nucleosidanaloga aus Abschnitt 4.7 ebenso wie die FdU-TriPPPro-Verbindungen **32a** und **32d** in unterschiedlichen Zellextrakten inkubiert werden. Die Bedingungen der Inkubation und der anschließenden Proteinfällung sowie die Bedingungen der chromatographischen Analyse wurden analog zu denen in Abschnitt 4.5.2 gewählt.

Zunächst wurden alle 01-Verbindungen mit dem Acylrest von C₈ **a** in SW620- und HT29-Zellextrakten inkubiert. Die erhaltenen Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der Spaltung der ersten AB-Maskierungseinheiten sind in Tab. 8 zusammengefasst. Zum besseren Vergleich sind die Resultate der Hydrolyse von FdU-01 **32a** ebenfalls in der Tabelle angegeben.

Tab. 8: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der unterschiedlichen TriPPPro-Verbindungen 01 in SW620- und HT29-Zellextrakten.

Verbindung	$t_{1/2}(1)$ [h]					
	FdU-01	FU-01	CdA-01	2FaraA	ClFaraA	Ac-araC
SW620	4.4	6.4	-	-	1.0	14.7
HT29	6.5	8.3	8.8	7.5	14.4	9.8

Zunächst ist anhand dieser Ergebnisse zu erkennen, dass die Hydrolysehalbwertszeit in den Zellextrakten deutlich unterhalb der in PBS-Puffer liegt. Es ist also davon auszugehen, dass innerhalb der Zellen neben der chemischen Hydrolyse auch eine enzymatische Hydrolyse stattfindet. Zusätzlich können sowohl zwischen den einzelnen Zelllinien als auch zwischen den einzelnen Nucleosidanaloga starke Unterschiede beobachtet werden. Für das CdA-01 **34a** und das 2FaraA-01 **35a** konnten in der SW620-Zelllinie keine Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ bestimmt werden, da nach 24 Stunden noch wesentliche Mengen an Prodrug vorhanden waren. Zusätzlich wurden für die detektierten Mengen an Prodrug teilweise widersprüchliche Ergebnisse erhalten, jedoch konnten die Messung aufgrund der unzureichenden Menge an Zellextrakten nicht wiederholt werden. Dennoch kann auch bei diesen Verbindungen von einer enzymatischen Spaltung der Maskierungseinheiten ausgegangen werden, da nach 24 Stunden für beide Substanzen neben dem Prodrug hauptsächlich die Intermediate sowie die NTPs und NDPs nachgewiesen wurden.

Interessant sind auch die unterschiedlichen Metabolisierungsprodukte, die für die einzelnen Prodrugs beobachtet werden konnten. Während für das FdU-01 **32a** nach 24 Stunden kein Triphosphat aber große Mengen an Monophosphat für beide Zelllinien beobachtet wurden, konnte für das FU-01 **33a** das FU-TP **70** aber kein Monophosphat detektiert werden. Der Hydrolyseverlauf von FU-01 **33a** in der HT29-Zelllinie ist in Abb. 163 dargestellt.

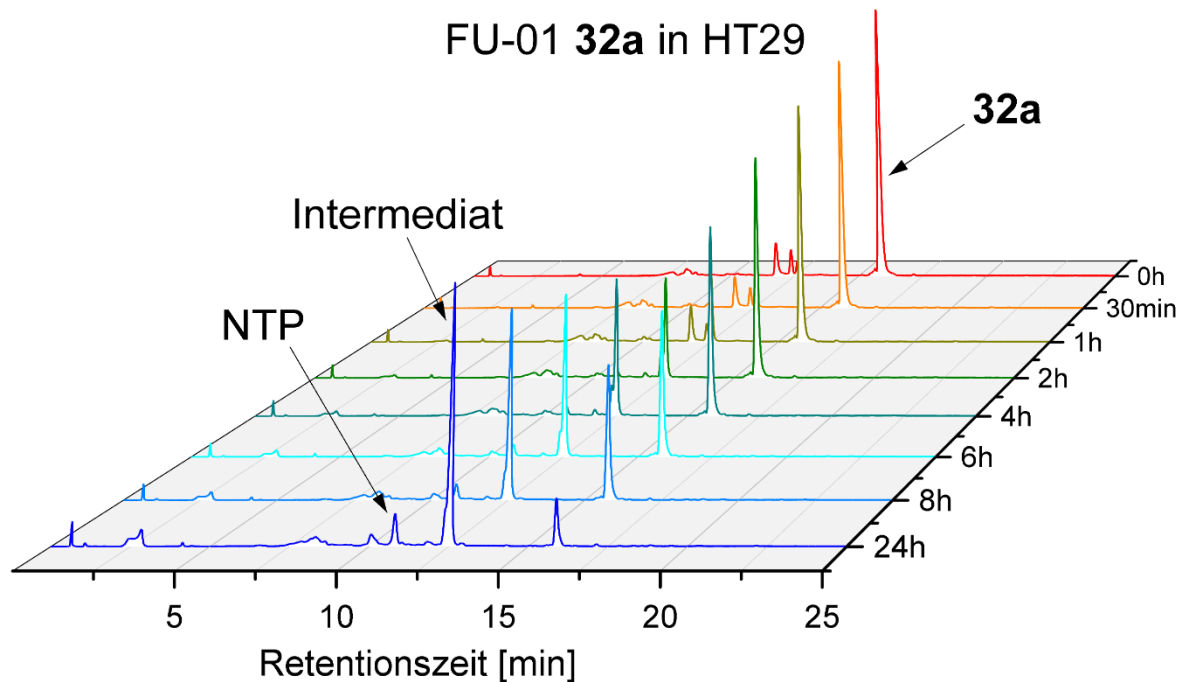


Abb. 163: Hydrolyseverlauf von FU-01 **33a** in HT29 Zellextrakt.

Anhand dieser Grafik ist deutlich zu erkennen, dass bei der Inkubation von FU-01 **33a** in HT29-Zellen das Hauptprodukt der Metabolisierung das Intermediat darstellt, während auch geringe Mengen des Triphosphats gebildet werden. Es ist also davon auszugehen, dass der aktive Metabolit wie gewünscht direkt aus dem Prodrug durch eine enzymatische Spaltung freigesetzt wird.

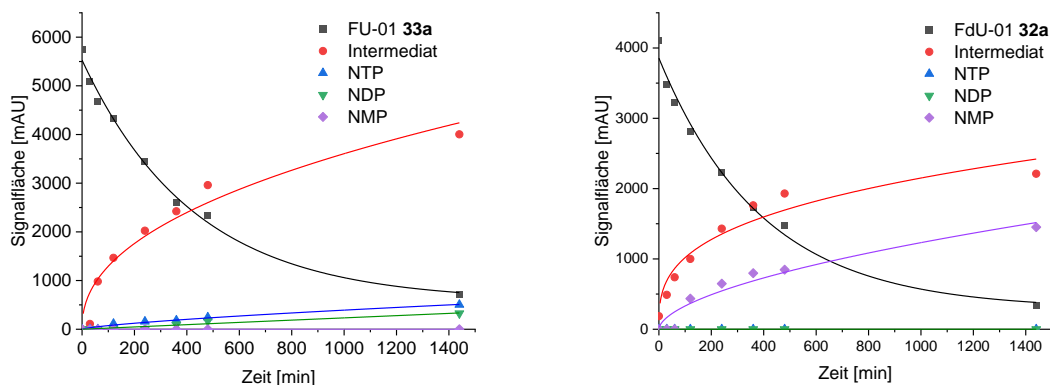


Abb. 164: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von FU-02 **33a** (links) und FdU-01 **32a** (rechts) in HT29-Zellextrakten.

Die Verteilung der verschiedenen Metaboliten von FdU-01 **32a** und FU-01 **33a** sind nochmal in Abb. 165 gegenübergestellt. Anhand dieser Grafik ist eindeutig zu erkennen, dass bei dem FdU-01 **32a** neben dem Intermediat das Nucleosidmonophosphat der hauptsächliche Metabolit ist und kein NDP oder NTP detektiert werden konnte. Dazu konnte in Abschnitt 4.5.2 gezeigt werden, dass das FdU-MP durch enzymatische Hydrolyse aus dem NTP freigesetzt wurde. Für das FU-01 **33a** hingegen ist als hauptsächlicher Metabolit eindeutig das Intermediat erkennbar, während nur geringe Mengen an NTP und NDP nachgewiesen wurden. Dies bedeutet zum einen, dass das FU-Intermediat vergleichsweise stabiler ist, zum anderen, dass das FU-TP **70** im Vergleich zum FdU-TP **71** ebenfalls über eine erhöhte Stabilität in den Zellextrakten verfügt. Die für die Dephosphorylierung verantwortlichen Enzyme scheinen also eine deutlich höhere Selektivität gegenüber dem 2'-Desoxyribose-Derivat aufzuweisen. Dieser Fakt könnte für die Anwendung der Prodrugs als antitumorale Reagenzien von Bedeutung sein. Dass das FdU-TP **71** eine vergleichsweise sehr niedrige Stabilität in Zellextrakten aufweist, scheint sich auch auf diese Verbindung zu beschränken. Für kein anderes in diesen Hydrolysestudien untersuchtes Prodrug konnte das Nucleosid-Monophosphat in relevanten Mengen nachgewiesen werden. Hier scheinen unabhängig von Prodrug und Zelllinie die Intermediate, aber auch die NTPs oder NDPs die vorherrschenden Metabolite darzustellen.

Zwischen den unterschiedlichen Zelllinien konnte kein bedeutender Unterschied in der Art der gebildeten Metabolite festgestellt werden. Jedoch unterschied sich die Geschwindigkeit der Metabolisierung teilweise stark. Während für die FdU- und FU-TriPPP-Verbindungen Unterschiede in den Halbwertszeiten von ungefähr zwei Stunden zu verzeichnen waren, belaufen sich diese Unterschiede bei dem CIFaraA-01 **36a** auf über 13 Stunden und beim Ac-araC-01 **131a** auf fast fünf Stunden. Die unterschiedlichen Hydrolyseverläufe für das CIFaraA-01 **36a** sind in Abb. 165 dargestellt.

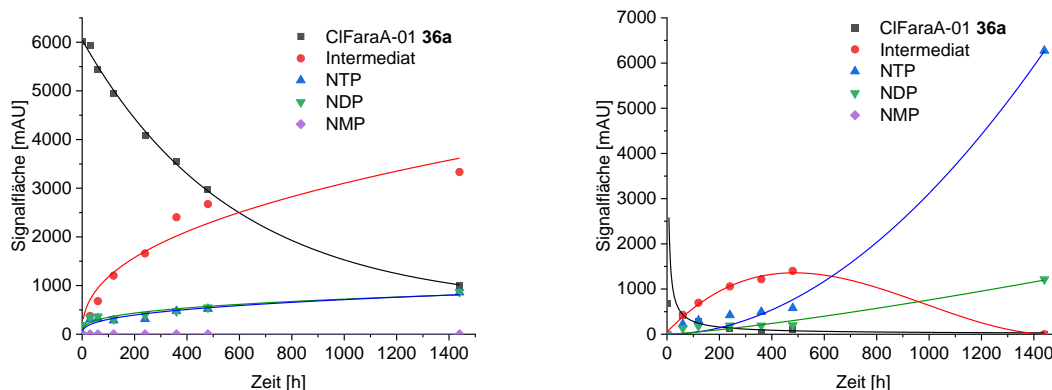


Abb. 165: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von CIFaraA-01 **36a** in HT29-Zellextrakten (links) und SW620-Zellextrakten (rechts).

Zum einen erkennt man die vergleichsweise sehr geringe Halbwertszeit des Prodrugs in SW620-Zellextrakten. Gleichzeitig weist das Intermediat der Verbindung eine ebenso geringere Halbwertszeit auf, sodass in SW620-Zellextrakten nach 24 Stunden das NTP den hauptsächlichen Metaboliten darstellt. Ein solch starker Unterschied konnte nur bei ClFaraA-01 **36a** nachgewiesen werden.

Die Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ von Ac-araC-01 **131a** unterscheiden sich in den verschiedenen Zellextrakten um ungefähr fünf Stunden. Der genaue hydrolytische Verlauf ist in Abb. 166 dargestellt. Interessant ist hierbei, dass in diesem Fall die schnellere Metabolisierung im HT29-Zellextrakt stattfindet, da für alle anderen getesteten Substanzen genau das Gegenteil beobachtet wurde. Insgesamt stellt aber in beiden Fällen das Intermediat sowie das Nucleosidtriphosphat die hauptsächlichen Metabolite dar. Eine Abspaltung der Acetylgruppe wurde in den Zellextrakten nicht beobachtet.

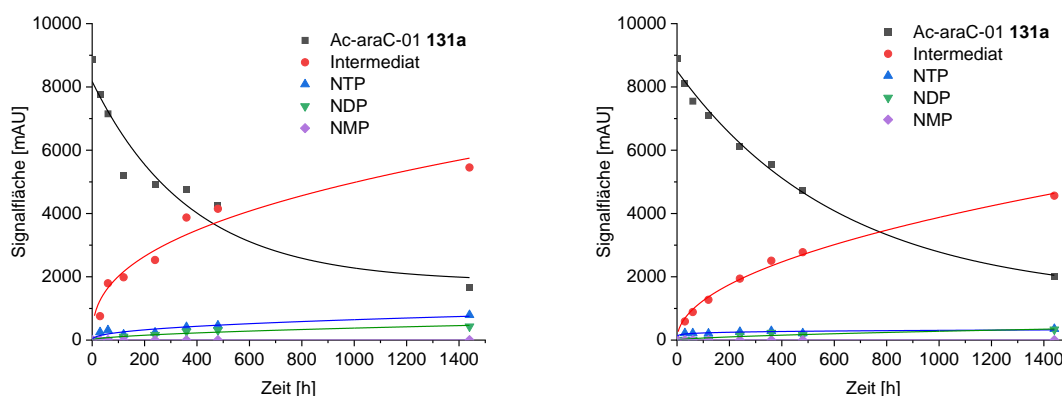


Abb. 166: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von Ac-araC-01 **131a** in HT29- (links) und SW620- (rechts) Zellextrakt.

Insgesamt konnte für alle getesteten TriPPP-Verbindungen 01 mit der C₈-Maskierungseinheit eine enzymatische Hydrolyse in den Zellextrakten bestätigt werden. Die Geschwindigkeit der Metabolisierung unterscheidet sich je nach Zelllinie und nach Prodrug teilweise stark. Dennoch konnte für die meisten Verbindungen das Intermediat sowie das Triphosphat als hauptsächlicher Metabolit nachgewiesen werden. Im Vergleich zum FdU-TP **71** scheinen die anderen aktiven Metabolite eine wesentlich höhere Halbwertszeit in den untersuchten Zellextrakten zu besitzen. Für das 2-FaraA-01 **35a** sowie das CdA-01 **24a** konnte neben dem Triphosphat auch bedeutende Mengen an Diphosphat nachgewiesen werden. Die Verläufe der Hydrolyse in HT29 sind in Abb. 167 dargestellt. Da insgesamt eine größere Menge an NDP im Vergleich zum NTP, aber kein NMP nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das NDP eine vergleichsweise hohe metabolische Stabilität aufweist.

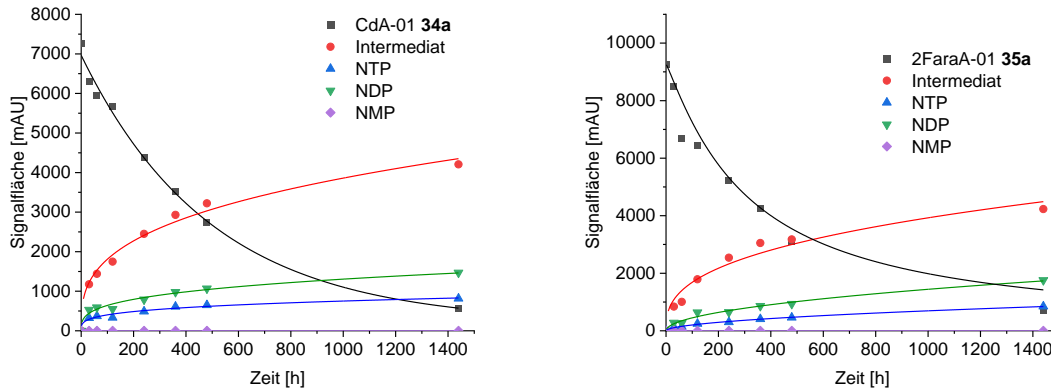


Abb. 167: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von CdA-01 **34a** (links) und 2FaraA-01 **35a** (rechts) in HT29-Zellextrakten.

Als nächstes wurden alle TriPPP-Verbindungen **03** mit der C₁₁-Maskierung **d** in Zellextrakten inkubiert. Hierbei konnten dieselben Effekte wie für die FdU-TriPPP-Verbindung **32d** beobachtet werden (Abschnitt 4.5.2). Unspezifisch gegenüber Nucleosidanalogen oder Zelllinie wurden zu jedem Zeitpunkt der Hydrolyse nur sehr geringe Mengen des Prodrugs detektiert, weshalb diese vermutlich durch Proteine gebunden sind. Dennoch bildeten sich über die Zeit verschiedene Metaboliten, die auf eine langsame Freisetzung der Prodrugs schließen lassen. Zur Veranschaulichung ist der Hydrolyseverlauf von FU-03 **33d** in HT29-Zellextrakten in Abb. 168 dargestellt.

FU-03 **33d** in HT29

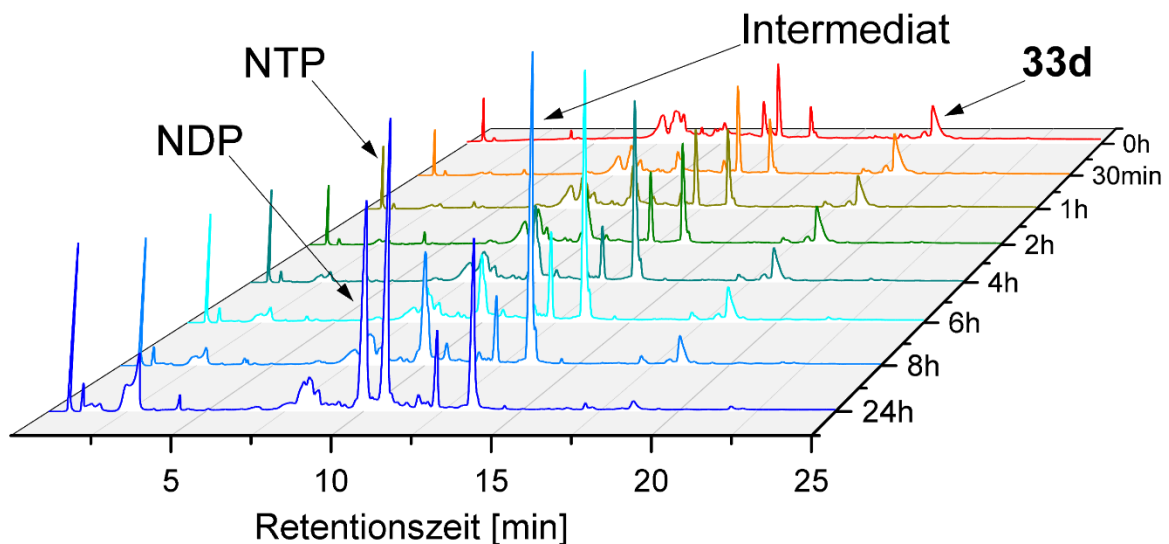


Abb. 168: Hydrolyseverlauf von FU-03 **33d** in HT29-Zellextrakten.

Ebenso wie für FU-01 **33a** unterscheidet sich das FU-03 **33d** bei der Metabolisierung im Vergleich zu den FdU-TriPPP-Verbindungen **32a** und **32d**. Zum Vergleich sind die Hydrolyseverläufe von FdU-04 **32d** und FU-03 **33d** in Abb. 169 dargestellt.

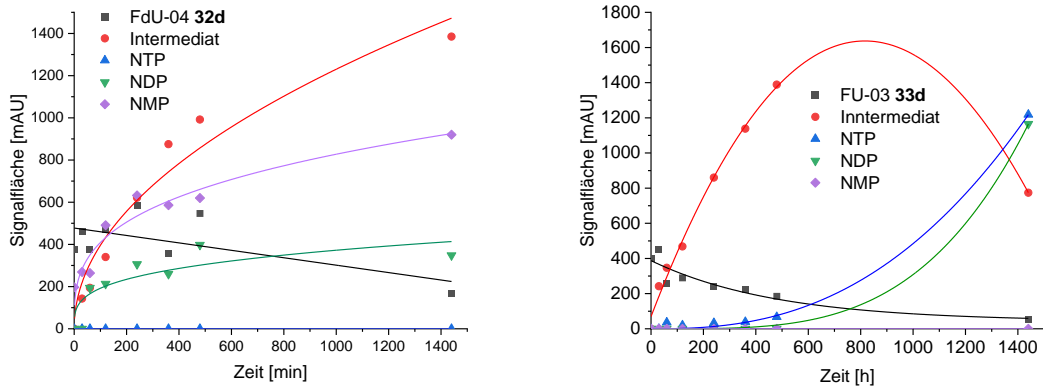


Abb. 169: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von FdU-04 **32d** (links) und FU-03 **33d** (rechts) in HT29-Zellextrakten.

Zunächst kann man für beide Verbindungen die zu allen Zeitpunkten der Hydrolyse geringe Menge an Prodrug erkennen. Zusätzlich ist ein deutlicher Unterschied in der Stabilität des Intermediats erkennbar. Während bei FdU-04 **32d** nach 24 Stunden nicht einmal der Scheitelpunkt der Konzentration für das Intermediat erreicht ist, hat die Konzentration für das Intermediat bei FU-03 **33d** bereits wieder abgenommen. Ebenso wird für das FU-03 **33d** wie erwartet hauptsächlich FU-TP **70** detektiert, da dies wie bereits festgestellt eine deutlich höhere Stabilität in Zellextrakten verglichen mit dem FdU-TP **71** aufweist. Zusätzlich wird nach 24 Stunden auch eine große Menge an FU-DP **137** gebildet. Vermutlich wird dieses neben der enzymatischen Hydrolyse aus FU-TP **70** auch vermehrt durch eine chemische Hydrolyse aus dem Prodrug **33d** gebildet, wie es in den PBS-Hydrolysen für alle TriPPP-Verbindungen mit längeren Acylresten zu beobachten war. Dieser Effekt war auch für andere TriPPP-Verbindungen zu beobachten.

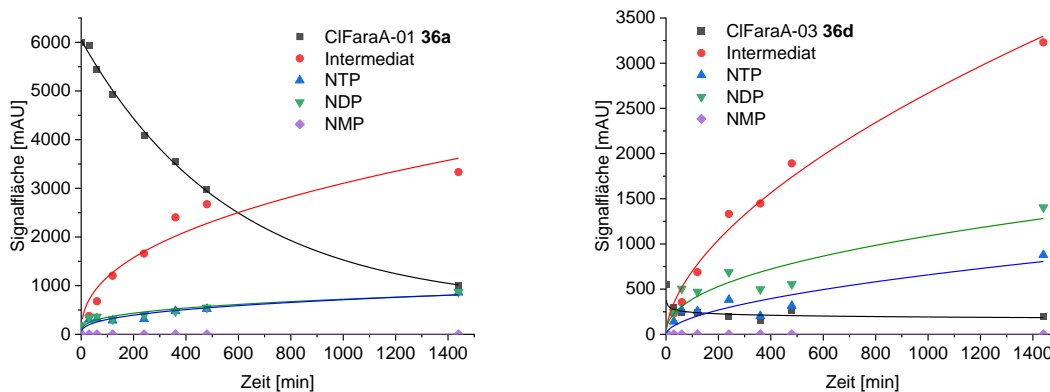


Abb. 170: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von ClFaraA-01 **36a** (links) und ClFaraA-03 **36d** (rechts) in HT29-Zellextrakten.

In Abb. 170 ist der Verlauf der Metabolite für die Hydrolyse von ClFaraA-01 **36a** und ClFaraA-03 **36d** gegenübergestellt. Hier erkennt man wieder eindeutig die geringe Detektierbarkeit des Prodrugs **36d**, sowie die vermehrte Bildung von ClFaraA-DP **146**. Die

vermehrte Bildung der Diphosphate war ebenso für das Ac-araC-03 **131d** in beiden Zelllinien erkennbar. Das Flussdiagramm für die Hydrolyse in HT29 ist in Abb. 171 dargestellt.

Ac-araC-03 **131d** in HT29

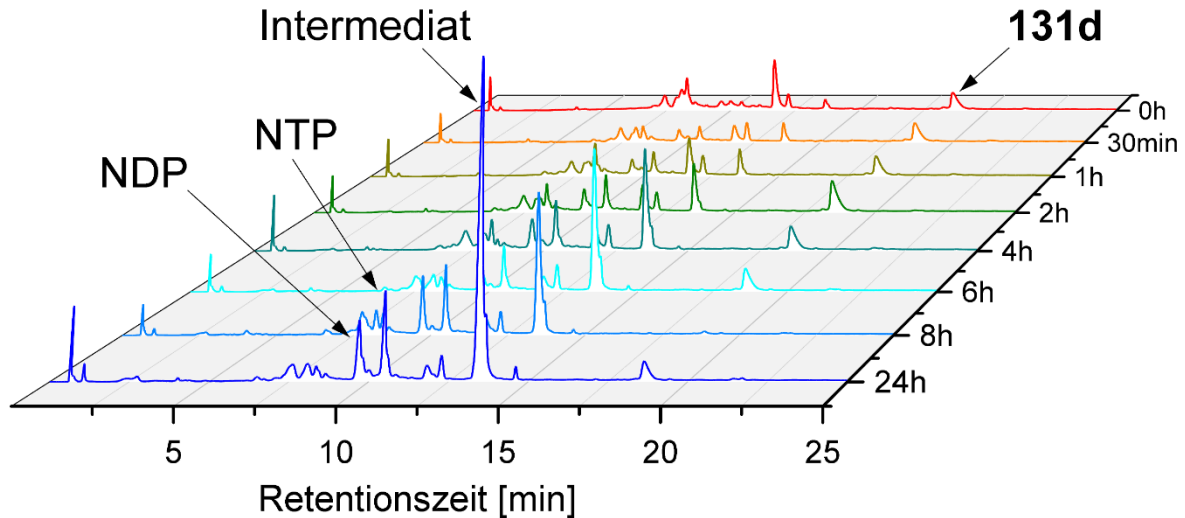


Abb. 171: Hydrolyseverlauf von Ac-araC-03 **131d** in HT29-Zellextrakten.

Während bei der Hydrolyse von Ac-araC-01 **131a** hauptsächlich das Ac-araC-TP und das Ac-araC-DP nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (Abb. 166), ist bei der Hydrolyse von Ac-araC-03 **131d** eindeutig das NDP detektierbar. Hieraus kann geschlossen werden, dass das vermehrt gebildete NDP durch chemische Hydrolyse ausgehend vom Prodrug **131d** entstanden sein muss.

In Abb. 172 sind auch die Hydrolyseverläufe über die Zeit für das CdA-03 **34d** und 2FaraA-03 **35d** in HT29 sowie SW620-Zellextrakten dargestellt. Zum einen ist anhand dieser Verläufe wieder eindeutig die geringe Menge an detektierbaren Prodrugs über die Zeit erkennbar. Ebenso ist hier die unterschiedliche Metabolisierung je nach Zellextrakt klar zu erkennen. Während das CdA-03 **34d** in HT29-Zellextrakten das Intermediat und das Diphosphat als wesentliche Metaboliten freisetzt, sind diese in SW620-Zellextrakten hauptsächlich die Di- und Triphosphate. In SW620 Zellextrakten scheint das CdA-TP **83** eine wesentlich geringere Stabilität als in HT29-Zellen aufzuweisen. Dadurch kann wieder angenommen werden, dass die Menge an gebildeten CdA-DP **138** im Wesentlichen durch die chemische Hydrolyse aus dem Prodrug **34d** entstanden ist, während das CdA-TP **83** aus dem Intermediat freigesetzt wurde. Dies konnte auch für das 2FaraA-03 **35d** beobachtet werden (Abb. 172). Jedoch weist das Intermediat dieses Prodrugs eine geringere Stabilität in HT29-Zellextrakten auf. Da es sich bei beiden Inkubationen um dieselbe Substanz handelt, scheinen die für die Spaltung des ersten Acylrestes verantwortlichen Enzyme je nach Zelllinie unterschiedliche Substratspezifitäten zu besitzen. Für dieses Prodrug konnten auch

im Vergleich ähnliche Mengen an freigesetzten 2FaraA-DP **139** und 2FaraA-TP **105** unabhängig von der Zelllinie beobachtet werden.

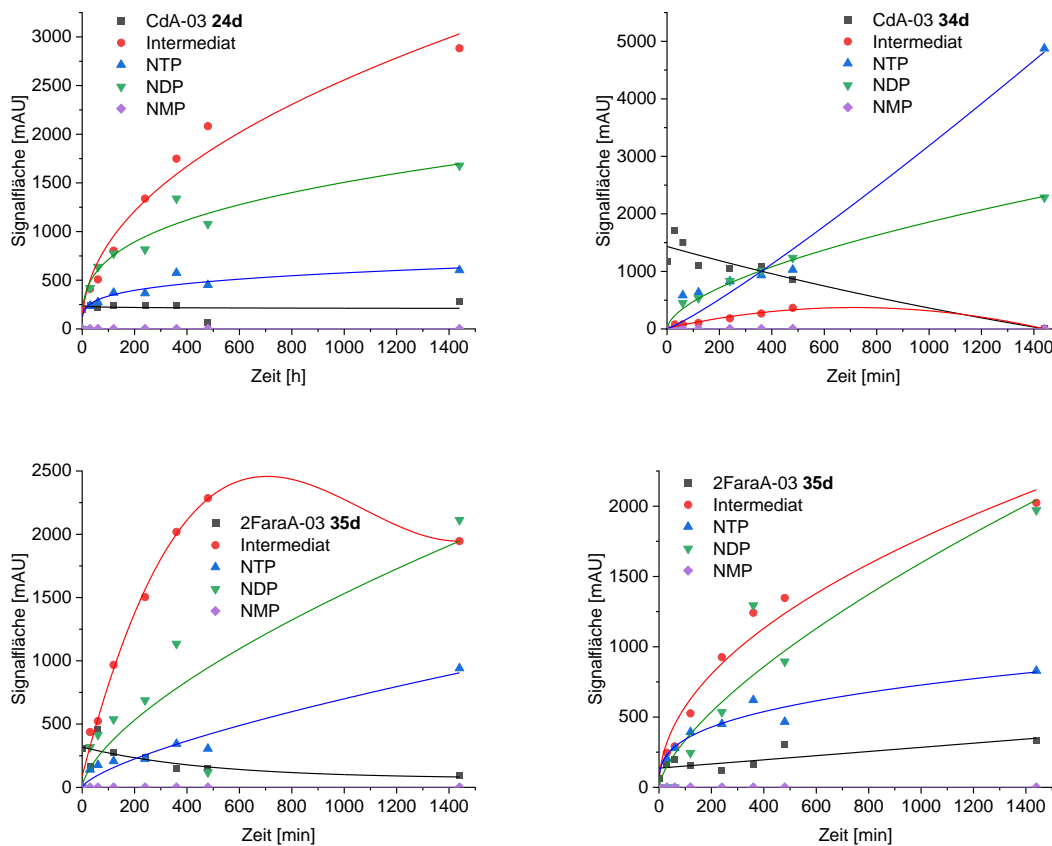


Abb. 172: Diagramme der enzymatischen Hydrolyse von CdA-03 **34d** in HT29- (oben links) und SW620- (oben rechts) Zellextrakten sowie 2FaraA-03 **35d** in HT29- (unten links) und SW620- (unten rechts) Zellextrakten.

Insgesamt konnte für alle im Zuge dieser Arbeit dargestellten antitumoralen TriPPP-Verbindungen eine enzymatische Spaltung der BisAB-Maskierungseinheiten im HT29- sowie SW620-Zellextrakten nachgewiesen werden. Jedoch fallen die Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der ersten Maske je nach Zelllinie und Prodrug stark unterschiedlich aus. Während für das AcaraC-01 **131a** eine Halbwertszeit von fast 15 Stunden bestimmt wurde, weist das ClFaraA-01 **36a** eine Halbwertszeit von gerade einmal einer Stunde in SW620-Zellextrakten auf. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Spaltung ist also stark von Nucleosid sowie Zelllinie abhängig. Eine ähnliche Abhängigkeit konnte auch für die Geschwindigkeit der Spaltung des zweiten Acylrestes beobachtet werden. Diese unterschiedlichen Halbwertszeiten konnten ebenso für die Substanzen mit längeren Acylresten (d) beobachtet werden. Bei diesen Substanzen wurde zusätzlich wie für das FdU-04 **32d** (Abschnitt 4.5.2) eine unabhängig vom Zeitpunkt geringere Detektierbarkeit für das Prodrug beobachtet, die vermutlich auf Proteinwechselwirkungen zurückzuführen sind. Dennoch wurden über die Zeit große Mengen an gebildeten Metaboliten beobachtet, was für eine Freisetzung des Prodrugs über

Zeit spricht. Auch konnte die vermehrte Bildung vom Nucleosiddiphosphat für alle TriPPPro-Verbindungen mit langem Acylrest beobachtet werden, was vermutlich durch die vergleichsweise schnellere chemische Hydrolyse der Prodrugs hervorgerufen wird. Insgesamt kann für alle getesteten Verbindungen eine enzymatisch bedingte Freisetzung des Nucleosidtriphosphats ausgehend vom Prodrug bestätigt werden.

4.10 Hydrolyseverhalten der TriPPPro-Verbindungen in Blutplasma

Für die Applikation von Prodrugs bei in vivo-Systemen ist die Halbwertszeit der Substanzen im Blutplasma von entscheidender Bedeutung. Weisen die Verbindungen eine nur geringe Stabilität im Blutplasma auf, muss entsprechend die zu verabreichende Dosis erhöht werden, damit ausreichend Prodrug beziehungsweise aktiver Metabolit bei den betroffenen Zellen zur Verfügung steht. Aus diesem Grund sollte für die FdU-TriPPPro-Verbindungen 01 und 04 **32a** und **32d** die Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ sowie das allgemeine metabolische Verhalten in Blutplasma bestimmt werden. Neben der chemischen Hydrolyse, die vermutlich durch die hohe Konzentration von zweiwertigen Ionen in Blutplasma beschleunigt wird, können auch enzymatische Prozesse zum Abbau der TriPPPro-Verbindung eine Rolle spielen.

Für diese Studien wurde von der Arbeitsgruppe von U. Schumacher am Universitätsklinikum Eppendorf Blutplasma in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt. Bei dem isolierten humanen Blutplasma handelt es sich um aufbereitetes Blut. Hierfür wird direkt nach der Abnahme das Blut mit einem Antikoagulans versetzt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Nach anschließender Zentrifugation enthält das Pellet die roten sowie weißen Blutkörper, während der Überstand das Blutplasma darstellt. Dieses enthält noch alle im Blut gelösten Proteine sowie Salze und andere geringfügige Bestandteile, beispielsweise Hormone.

Für die Bestimmung der Stabilität der TriPPPro-Verbindungen in Blutplasma wurde das Protokoll analog zu den Hydrolysen in den Zellextrakten angewendet (Abschnitt 4.5.2 und 4.9.2). Das Prodrug wurde zunächst im Blutplasma gelöst und anschließend bei 37 °C inkubiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquote abgenommen und zur Proteinfällung zunächst Methanol oder Acetonitril zugefügt. Nach der Lagerung auf Eis erfolgte die Zentrifugation, wobei der erhaltene Überstand nach Filtration über Spritzenfilter mittels RP-HPLC untersucht wurde.

Die Hydrolyseverläufe von FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** in humanem Blutplasma sind in Abb. 173 und Abb. 174 dargestellt. Für das FdU-01 **32a** konnte eine Halbwertszeit $t_{1/2}(1)$ von zwei Stunden bestimmt werden. Nach 24 Stunden konnte ebenso kein Intermediat mehr detektiert werden. Hierfür konnte eine Halbwertszeit $t_{1/2}(2)$ von ungefähr 15 bis 16 Stunden ermittelt werden. Die freien Nucleotide konnten in nur sehr geringen Mengen während der Hydrolyse nachgewiesen werden. Stattdessen konnte nach 24 Stunden hauptsächlich das

Nucleosid FdU 2 detektiert werden. Dies spricht für eine sehr schnelle Dephosphorylierung der Nucleotide im Blutplasma bis hin zum Nucleosid, welches dann relativ stabil vorzuliegen scheint. Die Nucleobase 5-FU 1 konnte nicht detektiert werden. Der Hydrolyseverlauf der einzelnen Metabolite ist zusätzlich in Abb. 175 dargestellt.

FdU-01 32a in Blutplasma

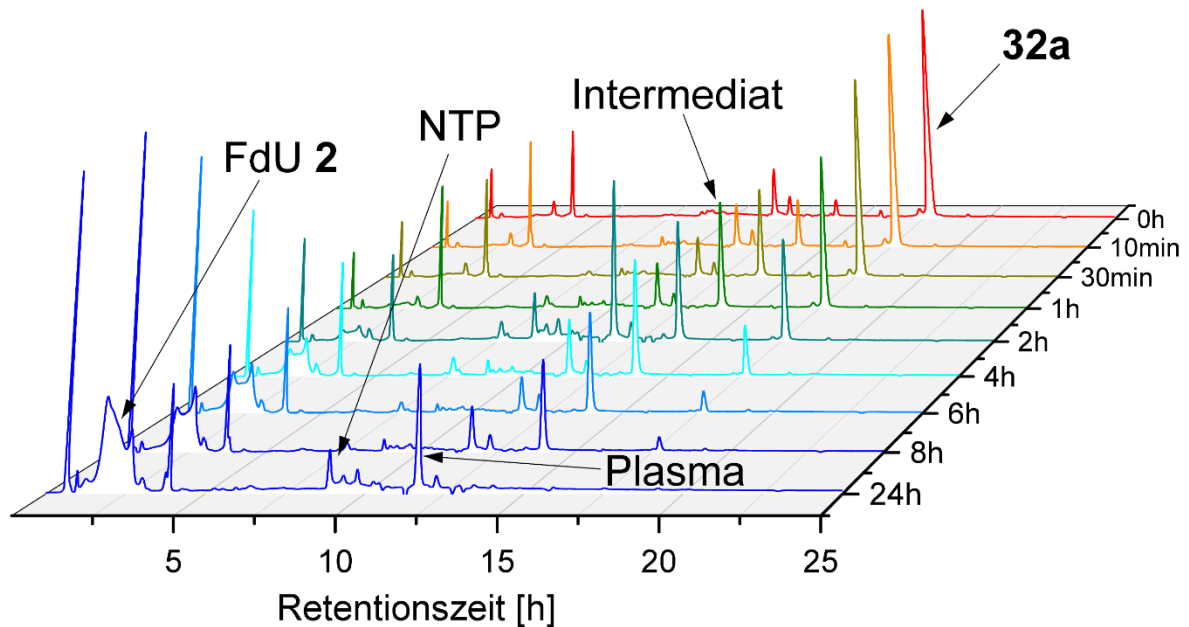


Abb. 173: Hydrolyseverlauf von FdU-01 32a in humanem Blutplasma.

Für das FdU-04 32d wurde dasselbe Verhalten wie in Zellextrakte der verschiedenen untersuchten Zelllinien festgestellt. Während das Prodrug selbst zu jeder Zeit der Inkubation in nur sehr geringen Mengen detektiert werden konnte, wurden dennoch über die Zeit verschiedene Metabolite gebildet (Abb. 174). Interessanterweise ist nach 24 Stunden immer noch das Prodrug im Blutplasma wiederzufinden. Über die Zeit wird zunächst das Intermediat gebildet, welches ebenfalls noch nach 24 Stunden detektierbar ist. Während die einzelnen Nucleotide wieder nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnten, sind nach 24 Stunden wieder große Mengen des Nucleosids FdU 2 erkennbar. Die Metabolisierungsrate erfolgt hierbei vermutlich analog wie beim FdU-01 32a durch sehr schnelle Dephosphorylierung des Triphosphats 71, welches zunächst aus dem Intermediat freigesetzt wird. Da in unterschiedlichen Versuchen die Fällung der Proteine mit Methanol ebenfalls zur anteiligen Fällung der TriPPPro-Verbindung führte, wurden die Hydrolysen mit Acetonitril als Fällungsmittel wiederholt, um somit eine Fällung der Prodrugs zu verhindern. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die detektierbare Menge von FdU-04 32d im Blutplasma, weshalb eine teilweise Bindung an Proteine sehr wahrscheinlich ist.

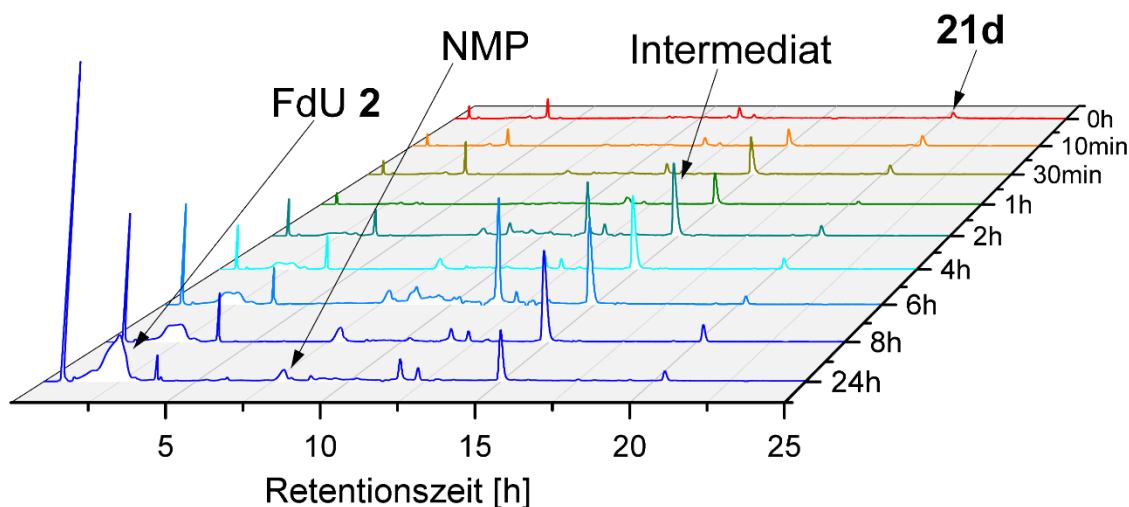
FdU-04 **21d** in Blutplasma


Abb. 174: Hydrolyseverlauf von FdU-04 **32d** in humanem Blutplasma.

Die Hydrolyseverläufe von FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** der einzelnen Metaboliten sind zur Veranschaulichung in Abb. 175 dargestellt. Anhand dieser Abbildungen ist zunächst wieder die vermutlich durch Proteinbindung verursachte geringe Detektierbarkeit von FdU-04 **32d** erkennbar. Ebenso ist die Bildung der Intermediate über die Zeit sowie die Bildung vom Nucleosid FdU **2** als wesentlicher Metabolit nach 24 Stunden gut zu erkennen. Interessanterweise scheint das Intermediat von FdU-04 **32d** insgesamt eine höhere Stabilität im Blutplasma im Vergleich zum Intermediat von FdU-01 **32a** aufzuweisen. Dieser Umstand ist jedoch nur von geringerer Bedeutung, da das Intermediat vermutlich selbst nicht mehr in der Lage ist, durch Diffusion in die Zellen zu gelangen. Da der Hauptmetabolit aber das Nucleosid FdU **2** und nicht die Nucleotide darstellt, kann auch nach 24 Stunden noch von einer Bioverfügbarkeit als Wirkstoff ausgegangen werden. FdU **2** selbst ist im Vergleich zu dem Intermediat und den Nucleotiden in der Lage, durch Transportproteine in die Zellen zu gelangen und somit als Wirkstoff aktiv zu sein. So ist trotz starker Metabolisierung des TriPPP-Prodrugs dennoch eine gewisse Aktivität gewährleistet.

Durch die Hydrolysestudien von FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** in Blutplasma konnte eine ausreichende Stabilität der Prodrugs ermittelt werden. Besonders FdU-04 **32d** zeigte wie in Zellextrakten besondere Eigenschaften. Möglicherweise könnte es durch einen „slow-release“-Mechanismus agieren, sodass über die Zeit langsam das Prodrug im Blut freigesetzt wird. Dadurch könnte eine wesentlich längere Zeit eine bestimmte Konzentration des Prodrugs im Blut aufrechterhalten werden. Dies wäre für die *in vivo*-Applikation von Vorteil, da dadurch die Dosierung reduziert werden könnte, was insgesamt die Nebenwirkungen verringert. Daher sollte dieser Effekt noch genauer untersucht werden.

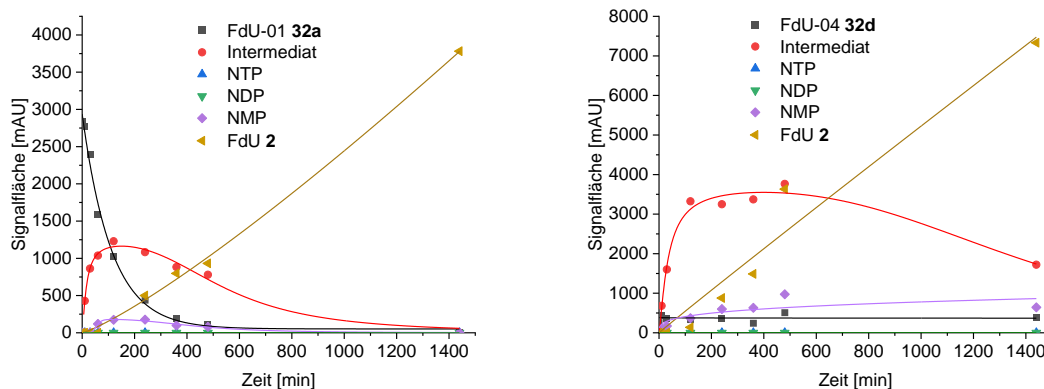


Abb. 175: Diagramme der Hydrolyse von FdU-01 **32a** (links) und FdU-04 **32d** in humanem Blutplasma.

Um das Verhalten von FdU-04 **32d** in Blutplasma erklären zu können, wird eine unspezifische Proteinbindung des Prodrugs bedingt durch seine langen Acylreste vermutet. Die humanen Albumine machen den Hauptanteil der Proteine im menschlichen Blutplasma mit einem Anteil von ca. 60 % aus. Im Schnitt liegt die Konzentration von Serum Albuminen beim Menschen bei 43 mg/mL.²¹⁴ Neben der Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks und einer gewissen Pufferkapazität dienen Albumine hauptsächlich zum Transport von wasserunlöslichen Substanzen innerhalb des Blutes.²¹⁵ Hierzu zählen neben Hormonen und Cholesterin hauptsächlich Fettsäuren. Hierbei dient das Albumin als sogenannter „Carrier“ für die natürlichen Stoffe, aber auch zahlreiche Wechselwirkungen mit Arzneistoffen wurden bereits festgestellt. Die Wirkstoffe binden meist nicht kovalent an die Albumine, wobei dies meist durch hydrophobe Wechselwirkungen geschieht. Dadurch erhöht sich die Löslichkeit der Wirkstoffe erheblich und hat Auswirkungen auf die pharmakokinetischen Eigenschaften.^{216,217} Somit spielt das Albumin eine zentrale Rolle beim vaskulären Transport von hydrophoben Stoffen im menschlichen Körper.²¹⁵

Um eine mögliche Bindung der TriPPP-Verbindungen an das humane Albumin zu ermitteln, wurde FdU-04 **32d** mit dem Protein versetzt. Hierzu wurde das Prodrug in einer verdünnten Lösung des Albumins in PBS-Puffer gelöst und für eine Stunde unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH = 7.3) inkubiert. Sowohl nach der direkten Zugabe des Prodrugs zum Albumin als auch nach einer Stunde wurden Aliquots der Lösung abgenommen. Das Protein wurde anschließend mit Acetonitril gefällt und nach der Lagerung auf Eis für 10 Minuten wurde eine Zentrifugation durchgeführt. Abschließend wurde der Überstand untersucht (RP-HPLC). Dieser Vorgang wurde sowohl mit der Probe durchgeführt, die Albumin und das Prodrug enthält, sowie einer Kontrolllösung, die ausschließlich das Prodrug in PBS-Puffer enthält. So kann eine Fällung des Prodrugs durch die Reinigungsmethode ausgeschlossen werden. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 176 dargestellt.

JW-FdU-04 **32d** mit Albumin

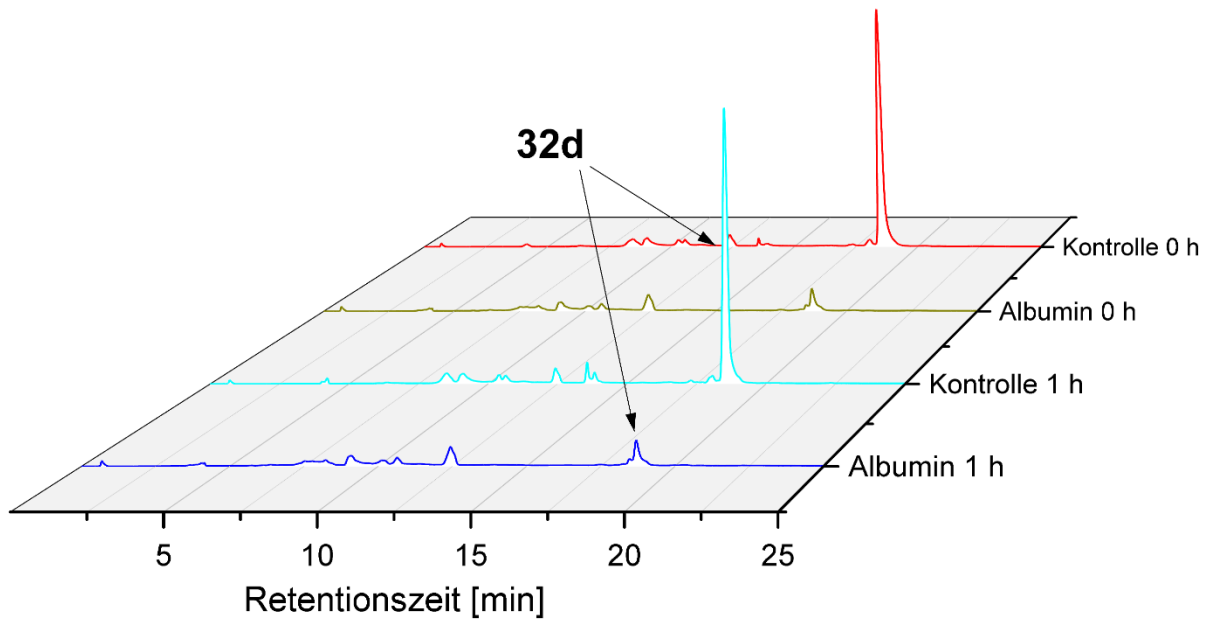


Abb. 176: Chromatogramme der Inkubation von FdU-04 **32d** mit humanem Albumin.

Anhand dieser Chromatogramme kann eindeutig von einer Wechselwirkung des Prodrugs mit dem humanen Albumin ausgegangen werden. Während für die Kontrolle die zu erwartenden Mengen an TriPPPPro-Verbindung **32d** detektiert werden konnten, zeigte die Lösung mit dem Protein denselben Effekt, der auch für die Inkubationen mit Plasma und den Zellextrakten beobachtet wurde. Hierbei spielte die Inkubationsdauer keine Rolle. Sobald das Albumin in der Lösung ist, können nach anschließender Fällung des Proteins nur noch sehr geringe Mengen des Prodrugs **32d** ermittelt werden. Hieraus kann indirekt auf eine Wechselwirkung von FdU-04 **32d** mit dem Albumin geschlossen werden. Versuche mit anderen TriPPPPro-Verbindungen in Zellextrakten aber auch eine Inkubation von FU-03 **33d** in Plasma und mit Albumin bestätigten diese Ergebnisse. Daraus kann ebenfalls geschlossen werden, dass dieser Effekt vermutlich durch die Maskierungseinheiten und nicht durch das Nucleosid selbst verursacht wird.

Insgesamt konnte durch die Hydrolysen in Blutplasma der antitumoral aktiven FdU-TriPPPPro-Verbindungen FdU-01 **32a** und FdU-04 **32d** eine ausreichende Stabilität dieser Verbindungen ermittelt werden. Es konnte zwar nach 24 Stunden keine TriPPPPro-Verbindung mehr nachgewiesen werden, jedoch war das Metabolisierungsprodukt FdU **2**, welches derzeit als antitumoral aktives Prodrug eingesetzt wird. Besonders interessant ist die ermittelte Wechselwirkung von FdU-04 **32d** mit humanen Albumin im Blutplasma, sodass das Prodrug langsam über Zeit freigesetzt wird und auch so noch nach 24 Stunden das Prodrug selbst im Blutplasma nachweisbar ist. Dadurch könnten sich vorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften für TriPPPPro-Verbindungen mit bestimmten

Maskierungseinheiten ergeben, da eine langsame Freisetzung des Wirkstoffs im Blut für die chemotherapeutische Behandlung meistens wünschenswert ist.

5 Experimenteller Teil

5.1 Edukte und Reagenzien

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

Lösungsmittel

- Acetonitril: CH_3CN [41.05 g/mol]; Sdp.: 82 °C; $\rho = 0.78 \text{ g/cm}^3$
1) HiPerSolv CHROMANORM® gradient grade for HPLC (VWR 83639.320-2.5L)
2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt
3) absolut über Molsieb, max. 0.005 % H_2O (Acros 326811000)
- Chloroform: CHCl_3 [119.38 g/mol]; Sdp.: 61 °C; $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$
1) AnalaR NORMAPUR grade stabilisiert mit 0.6% Ethanol (VWR 22711.324)
2) Euroisotop (D007H 100 mL)
- Dichlormethan: CH_2Cl_2 [84.93 g/mol]; Sdp.: 40 °C; $\rho = 1.3 \text{ g/cm}^3$
1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert
2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt
- DMF: $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$ [73.10 g/mol]; Sdp.: 153 °C; $\rho = 0.95 \text{ g/cm}^3$
1) absolut; über Molsieb, max. 0.005 % H_2O (Acros 10534341)
- DMSO: $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ [78.13 g/mol]; Sdp.: 189 °C; $\rho = 1.1 \text{ g/cm}^3$
1) absolut über Molsieb, max. 0.005% H_2O (Acros 00002089)
2) Deutero (00905-10mL-s)
- Ethylacetat: EtOAc [84.93 g/mol]; Sdp.: 77 °C; $\rho = 0.89 \text{ g/cm}^3$
1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert
- Methanol: CH_3OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C; $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$
1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert
2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt
3) absolut über Molsieb, max. 0.005 % H_2O (Acros 00004595)
4) Euroisotop (D024FE)
- Petrolether: Sdp.: 50 – 70°C
1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert

THF:	C_4H_8O [72.11 g/mol]; Sdp.: 66 °C; $\rho = 0.89 \text{ g/cm}^3$ 1) HiPerSolv CHROMANORM® gradient grade, for HPLC (VWR28559.320-2.5L) 2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt
Triethylamin:	$C_6H_{15}N$ [101.19 g/mol]; Sdp.: 89 °C; $\rho = 0.72 \text{ g/cm}^3$ 1) mind. 99.5 %, zur Synthese (Roth X875.3-1.0L) 2) absolut mit Septum der Firma Aldrich (Al 471283)
Pyridin:	C_5H_5N [79.10 g/mol]; Sdp.: 115 °C, $\rho = 0.98 \text{ g/cm}^3$ 1) absolut aus der Lösungsmittel Trocknungsanlage MB SPS 800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt 2) absolut über Molsieb, max. 0.005 % H_2O (Acros 364420010)

5.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

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

Säulenchromatographie

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

Ionenaustauschchromatographie

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

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

Für die automatisierte Chromatographie wurde sowohl für die Normal- als auch die Umkehrphasenchromatographie der automatisierte puriFlash®430 der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für Normalphasentrennungen wurden self-packed Kartuschen eingesetzt, die mit Macherey-Nagel Kieselgel 60 M (siehe *Säulenchromatographie*) befüllt wurden. Für die RP-18-Chromatographie wurden Säulen von Macherey-Nagel (Chromabond® Flash RS 40 C18 ec oder 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 VL
Autosampler: 1260 Vialsampler
Detektor: 1260, Dioden Array Detector (DAD)
1260 FLD Spectra, Fluoreszenz Detektor (FLD)

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

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

HPLC-Methoden:

Methode A: Von 0 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 34 min: isokratisch (95 % Laufpuffer, 5 % Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C₁₈ ec, UV-Detektion bei Wellenlängen von 250 nm, 260 nm, 265 nm, 270 nm und 330 nm.

HPLC-Laufpuffer:

TBAA-Laufpuffer (2 mM): 3000 mL Reinstwasser wurden mit 10.1 mL einer 1.5 M Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in Wasser (ca. 10 %) versetzt und mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.3 eingestellt.

5.3 Spektroskopie und Spektrometrie

Infrarotspektroskopie

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

Kernresonanzspektroskopie

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

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

¹³C-NMR: Bruker Fourier 300 (75 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz), Bruker AV500 (125 MHz) Bruker AV3600 (150 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*₆ (δ = 39.52 ppm),

MeOH- d_4 (δ = 49.00 ppm), CDCl₃ (δ = 77.16 ppm) Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -10 bis 200 ppm.

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

¹⁹F-NMR: Bruker AV3600 (565 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard von Trifluoressigsäure. Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -300 bis 250 ppm.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie unter der Leitung von Dr. Maria Riedner aufgenommen. Die ESI-Massenspektren wurden mit einem Thermoquest 6224-TOF-LC/MSN Spektrometer der Marke Agilent Technologies und einem Bruker maXis ESI-Q-TOF gekoppelt an eine Dionex Ultimate 3000 UPLC im Direkteinlass gemessen. Die MALDI-Messungen wurden am MALDI TOF-TOF Bruker UltrafleXtreme Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

5.4 Weitere Geräte

Gefriertrocknungsanlage

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

Wasseraufbereitungsanlage

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

Zentrifuge

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

Thermomixer

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

5.5 Bioanalytische Methoden und Hydrolysestudien

5.5.1 Zellaufnahmestudien an Krebszellen

Die Inkubationen der Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Schumacher am Universitätsklinikum Eppendorf am Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Krebszelllinien (H69AR-1, HCT116, HOS-SKNH, MEWO, Molm13, MV3, OVCAR3, PaCa5061, PC3, Skov3, SW620, UTSCC2) in T175-Zellkulturflaschen ohne fötales Kälberserum für eine Stunde mit den BCNA-TriPPP-Verbindungen (10 μ M) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und für weitere Analysen eingefroren, die Zellpellets mit PBS-Puffer gewaschen, trypsiniert und schließlich zentrifugiert. Die dadurch erhaltenen Zellpellets wurden erneut mit PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurden die so erhaltenen Pellets eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Der Aufschluss sowie die Analyse der Zellen wurden in eigenen Arbeiten durchgeführt. Während der Überstand direkt nach der Filtration über einen Spritzenfilter (Chromafil RC-20/15 MS, 0.2 μ m der Firma Macherey-Nagel) mit einem Injektionsvolumen von 100 μ L mittels RP-HPL-Chromatographie (Methode A, FLD: Anregungswellenlänge: 330 nm, Emissionswellenlänge: 410 nm) analysiert wurde, wurden die Zellpellets in 170 μ L eines Wasser/Methanol-Gemisches (2:1 v/v) suspendiert und für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile für zehn Minuten bei 0 °C gefällt, worauf sich eine Zentrifugation (10 min, 16000 rpm, 4 °C) anschloss. Der so erhaltene Überstand wurde über einen Spritzenfilter filtriert und mit einem Injektionsvolumen von 100 μ L mittels RP-HPL-Chromatographie (Methode A) analysiert.

5.5.2 Hydrolysestudien in PBS-Puffer

Für die Studien zur Bestimmung der chemischen Stabilität der BisAB-TriPPP-Verbindungen wurden die Prodrugs in PBS-Puffer (Dulbecco's *Phosphat Buffered Saline* der Firma Gibco) bei 37 °C inkubiert. Hierzu wurde zunächst eine 25 mM Stammlösung der Prodrugs in DMSO hergestellt. Anschließend wurde die Inkubationslösung mit einem finalen Volumen von 610 μ L (0.92 mM) hergestellt, indem 22.4 μ L der Stammlösung mit 305 μ L PBS-Puffer, 192.2 μ L Wasser und 90.6 μ L DMSO versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard im Thermomixer. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquote von 35 μ L entnommen und mit einem Injektionsvolumen von 30 μ L mittels RP-HPL-Chromatographie analysiert (Methode A).

5.5.3 Hydrolysestudien in Zellextrakten

Die Zellpellets zur Herstellung der Zellextrakte wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Schumacher am Universitätsklinikum Eppendorf am Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie bereitgestellt.

Die Zellpellets wurden zunächst aufgeschlossen, indem sie in PBS-Puffer (15×10^6 Zellen/mL) suspendiert und anschließend im Ultraschallbad (6x30 s) behandelt wurden. Die so erhaltene Suspension wurde zentrifugiert (14000 rpm, 0 °C, 10 min), wobei der Überstand das Zellextrakt darstellte.

Für die Inkubation der Prodrugs wurde ein Reaktionsvolumen von 600 µL mit einer Prodrugkonzentration von 0.857 mM erstellt. Hierzu wurden 428.6 µL des Zellextrakts, 150 µL Wasser und 20.6 µL der Prodrug-Stammlösung (25 mM in DMSO) zusammengegeben und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert.

Zur Analyse wurden zu entsprechenden Zeitpunkten Aliquote von 60 µL abgenommen und mit 120 µL gekühltem Methanol oder Acetonitril versetzt. Anschließend erfolgte eine zehnmütige Lagerung bei 0 °C, um die Fällung der unlöslichen Zellbestandteile zu vervollständigen. Die Suspension wurde Zentrifugiert (16000 rpm, 4 °C, 10 min) und der erhaltene Überstand über einen Spritzenfilter (Chromafil RC-20/15 MS, 0.2 µm der Firma Macherey-Nagel) filtriert. Die so erhaltene Lösung wurde mit einem Injektionsvolumen von 60 µL mittels RP-HPL-Chromatographie (Methode A) analysiert.

5.6 Synthesen

5.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1 Synthese von Säurechloriden

Unter Stickstoff als Inertgas wurde die entsprechende Carbonsäure in abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt, woraufhin eine tropfenweise Zugabe von 1.2 Äquiv. Oxalylchlorid und zwei Tropfen DMF erfolgte. Anschließend wurde die Reaktionslösung für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

AAV 2 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-alkanoaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurde 1.2 Äquiv. 4-Hydroxybenzylalkohol **43** zusammen mit 1.0 Äquiv. Triethylamin und 0.1 Äquiv. 4-(Dimethylamino)pyridin in abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 1.2 Äquiv. des entsprechenden Säurechlorids **44** gelöst in abs. THF. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die

organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Daraufhin erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1).

AAV 3 Synthese von symmetrischen Bis(4-alkanoyloxybenzyl)phosphonaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.2 Äquiv. des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)-alkanoats **42** in abs. Pyridin gelöst und mit 1.0 Äquiv. Diphenylphosphonat **41** versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für drei Stunden bei 40 °C gerührt, bevor alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt wurden. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan coevaporiert, worauf sich eine Kristallisation des Rückstands aus Methanol anschloss.

AAV 4 Synthese von 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-O-acetyl-nucleosiden

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des Nucleosids mit 1.2 Äquiv. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in abs. Pyridin gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung erfolgte die tropfenweise Zugabe von Essigsäureanhydrid (3.0 Äquiv. pro Acetyl- und Aminofunktion) und anschließendes Rühren über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Beenden der Reaktion wurden alle flüchtigen unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser und einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck schloss sich die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel an.

AAV 5 Entschützung von Silylethern

Das zu entschützende Nucleosid wurde in Dichlormethan gelöst und anschließend tropfenweise mit Triethylamin Trihydrofluorid (6.0 Äquiv. pro Silylether) versetzt. Nach vollständigem Umsatz wurde Kieselgel zur Reaktionslösung gegeben, um das überschüssige Trihydrofluorid zu quenchen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt als *dry load* säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

AAV 6 Synthese von Nucleosid-5'-Monophosphaten

Variante A: Kupplung mit Fm-geschütztem Phosphoramidit und anschließender Entschützung

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden Nucleosids und 1.5 Äquiv. Bis-O-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **60** in abs. Dichlormethan, Acetonitril oder THF gelöst. Anschließend wurde in Abständen von fünf Minuten in Schritten von jeweils 0.2 Äquiv. insgesamt 1.2 Äquiv. 4,5-Dicyanoimidazol

(0.25 mol/L in Acetonitril) tropfenweise zugegeben. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die Oxidation mit 1.5 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) worauf die Reaktionslösung für 30 min bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach dem Entfernen aller flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck schloss sich eine automatisierte säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel an ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v). Das so erhaltene, vollständig geschützte Monophosphat wurde zur Entschützung in einem Gemisch aus Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1 v/v/v) aufgenommen und für 24 - 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurden Methanol und Triethylamin unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.

Variante B: Phosphorylierung nach Yoshikawa

Unter Stickstoff als Inertgas wurde das entsprechende ungeschützte Nucleosid in abs. Trimethylphosphat gelöst/suspendiert, auf 0 °C gekühlt und je nach Nucleosid zusätzlich Tributylamin hinzugegeben. Anschließend wurde Phosphorylchlorid zugetropft und bis zum vollständigen Umsatz bei 0 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels RP-HPL-Chromatographie. Die Reaktionslösung wurde auf eine Ammoniumhydrogencarbonatlösung oder Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer gegeben und die wässrige Phase dreimal mit Chloroform gewaschen. Überschüssiges Wasser wurde dann unter vermindertem Druck entfernt. Die anschließende chromatographische Reinigung erfolgte je nach Nucleosid und gewünschten Gegenionen entweder mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer oder mit Wasser und vorheriger Aufnahme des Rückstandes in einer Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung oder Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer (pH = 6.0 mmol/L).

AAV 7 Synthese von Nucleosid-5'-Di- und Triphosphaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurde das entsprechende Monophosphat in abs. Acetonitril suspendiert und tropfenweise 16 Äquiv. Triethylamin und 10 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben. Nach zehnmütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand wieder in abs. Acetonitril aufgenommen und die Lösung mit 10 Äquiv. Triethylamin und 6 Äquiv. 1-Methylimidazol versetzt. Nach zehnmütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung tropfenweise mittels Spritzenpumpe (0.2 mL/min) zu einer Lösung von monobasischem Tetra-*n*-butylammoniumphosphat oder Tris(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat gegeben und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und dreimal mit Chloroform gewaschen. Nach automatisierter säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel erfolgte einer Überführung in die

Ammoniumform über ein DOWEX-NH₄⁺-Ionentauscherharz, worauf sich eine weitere automatisierte Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel anschloss.

AAV 8 Synthese von TriPPPro-NTP-Prodrugs

Variante A: H-Phosphonat-Route

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden H-Phosphonats zusammen mit 2.0 Äquiv. *N*-Chlorsuccinimid (NCS) in abs. Acetonitril gelöst/suspendiert und für eine Stunde bei 60 °C gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von monobasischem Tetra-*n*-butylammoniumphosphat (0.4 mol/L in Acetonitril), worauf die Reaktion für eine weitere Stunde bei 60 °C gerührt wurde. Darauf wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase einmal mit Ammoniumacetatlösung (1 mol/L) und einmal mit Wasser gewaschen. Hierbei wurde die Phasentrennung mittels Zentrifugation beschleunigt (8000 rpm, 4 °C, 4 min). Abschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Produkt ohne weitere Reinigung eingesetzt (Die Lagerung erfolgte unter Stickstoff als Inertgas und bei -20 °C).

1.0 Äquiv. des Pyrophosphats wurden in 5 mL abs. Acetonitril gelöst und eine Lösung aus 16 Äquiv. Triethylamin und 10 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid, welche zuvor für zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde, zugegeben. Nach zehnmütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 5 mL abs. DMF aufgenommen und mit 10 Äquiv. Triethylamin und 6.0 Äquiv. 1-Methylimidazol versetzt. Nach Rühren für zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden 0.5 - 0.7 Äquiv. des Nucleosid-5'-Monophosphats, gelöst in 5 mL abs. DMF oder direkt als Feststoff, zugegeben und bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels RP-HPL-Chromatographie. Nach Beenden der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18- oder RP8-Kieselgel gereinigt. Anschließend erfolgte eine Überführung in die Ammoniumform über ein DOWEX-NH₄⁺-Ionentauscherharz, worauf sich mindestens eine weitere automatisierte Säulenchromatographie an RP18- oder RP8-Kieselgel anschloss.

Variante B: Phosphoramidit-Route

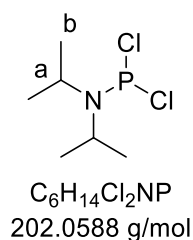
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des Nucleosid-Diphosphats und 3.0 Äquiv. des entsprechenden Bis(4-alkanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidits einmal mit abs. Acetonitril coevaporiert und für drei Stunden im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in abs. Acetonitril aufgenommen und auf 0 °C gekühlt, bevor eine tropfenweise Zugabe von 4,5-Dicyanoimidazol (1.2 Äquiv., 0.25 mol/L in Acetonitril) erfolgte. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die Oxidation mit 3.5 Äquiv. *tert*-

Butylhydroperoxid (5.5 mol/L in *n*-Decan) und weiteres dreißigminütiges Rühren bei Raumtemperatur. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und eine automatisierte säulenchromatographische Reinigung an RP18-Kieselgel durchgeführt. Nach der Überführung in die Ammoniumform über ein DOWEX-NH₄⁺-Ionentauscherharz schloss sich eine erneute automatisierte Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel an.

5.6.2 Synthese von Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **60**

Synthese von Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **62**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.00 mL (57.0 mmol, 1.0 Äquiv.) frisch destilliertes Phosphortrichlorid **63** in 40 mL abs. Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Lösung aus 17 mL (0.12 mol, 2.1 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylamin **64** in 20 mL abs. Diethylether tropfenweise zur gekühlten Lösung gegeben. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die erhaltene Suspension unter Inertgas filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Das so erhaltene Produkt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.



Ausbeute: 7.91 g (39.1 mmol, 65 %) eines gelben Öls.

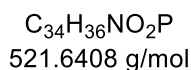
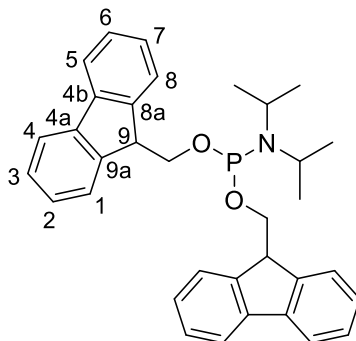
- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 3.38 (hept, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 2H, **a-H**), 1.48 (d, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 12H, **b-H**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 169.55.

Synthese von Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **60**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Luftfeuchtigkeit auszuschließen. 4.00 g (19.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **62** wurden in 40 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 5.76 mL (4.21 g, 2.1 Äquiv.) abs. Triethylamin und eine tropfenweise Zugabe von 7.77 g (39.6 mmol, 2.0 Äquiv) 9-Fluorenylmethanol **65**, gelöst in 40 mL abs. THF. Nach Rühren für 21 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung filtriert. Das Filtrat wurde in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Darauf wurde die wässrige Phase einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an Kieselgel (PE/EtOAc 96:4 v/v, 1 % Et₃N Vol., Flussrate 40 mL/min) gereinigt.



Ausbeute: 8.36 g (16.0 mmol, 81 %) eines gelblichen Harzes.

- **DC:** R_f-Wert (PE/EtOAc 96:4: v/v, 1 % Et₃N Vol.): 0.90.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 7.68 - 7.63 (m, 4H, **1-H**, **8-H**), 7.59 - 7.52 (m, 4H, **4-H**, **5-H**), 7.32 - 7.25 (m, 4H, **2-H**, **7-H**), 7.23 - 7.15 (m, 4H, **3-H**, **6-H**), 4.09 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, **9-H**), 3.92 (dt, ³J_{H,H} = 9.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, **-CH₂-a**), 3.72 (dt, ³J_{H,H} = 10 Hz, ⁴J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, **-CH₂-b**), 3.62 - 3.52 (m, 2H, **iPr-CH**), 1.07 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 12H, **iPr-CH₃**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl₃): 145.3, 145.1 (**C8-a**, **C-9a**), 141.8, 141.7 (**C-4a**, **C-4b**), 127.8, 127.8 (**C-2**, **C-7**), 127.2, 127.2 (**C-3**, **C-6**), 125.9, 125.6 (**C-4**, **C-5**), 120.2, 120.2 (**C-1**, **C-8**), 66.3 (d, ²J_{C,P} = 17.4 Hz, **-CH₂**), 49.6 (d, ³J_{C,P} = 7.4 Hz, **C-9**), 43.5 (d, ²J_{C,P} = 12.5 Hz, **iPr-CH**), 25.1 (d, ³J_{C,P} = 7.4 Hz, **iPr-CH₃**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 146.17.

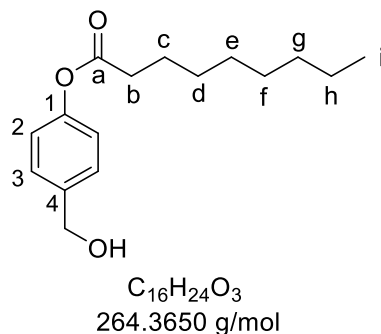
- **IR:** [cm⁻¹]: 3063, 3038, 2963, 2927, 2862, 1476, 1447, 1394, 1362, 1318, 1235, 1198, 1182, 1153, 1125, 1102, 1065, 1006, 971, 936, 882, 859, 794, 779, 755, 732, 641, 620, 588, 548, 516, 425.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 522.2556, gef.: 522.2574 [M+H]⁺.

5.6.3 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)alkanoaten **42**

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat **42a**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. 2.06 g (16.6 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 2.30 mL (1.68 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 168 mg (1.38 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 40 mL abs. THF gelöst und mit 2.60 mL (13.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Nonanoylchlorid **44a** gelöst in 10 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 3.10 g (11.7 mmol, 85 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.29 (PE/EtOAc 4:1).

- **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 7.36 - 7.31 (m, 2H, **3-H**), 7.07 - 7.02 (m, 2H, **2-H**), 5.20 (t, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz, 1H, **OH**), 4.48 (d, $^3J_{H,H} = 5.5$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 1.63 (p, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 2H, **c-H**), 1.41 - 1.20 (m, 10H, **d-H, e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.86 (t, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, 3H, **i-H**).

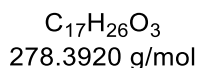
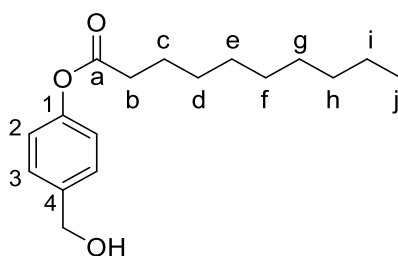
- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.9 (**C-a**), 149.1 (**C-1**), 140.0 (**C-4**), 127.4 (**C-3**), 121.3 (**C-2**), 62.3 (**Ph-CH₂**), 33.4 (**C-b**), 31.2, 28.6, 28.5, 28.4, 22.0 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h**), 24.3 (**C-c**), 13.9 (**C-i**).

- **IR:** [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** (EI⁺, m/z): ber.: 265.1725, gef.: 265.1728 [M+H]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat **42b**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. 3.98 g (32.1 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 3.70 mL (26.7 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 327 mg (2.67 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 30 mL abs. THF gelöst und mit 5.20 mL (26.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Decanoylchlorid **44b** gelöst in 20 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 5.76 g (20.7 mmol, 77 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.31 (PE/EtOAc 4:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 7.38 - 7.29 (m, 2H, **3-H**), 7.08 - 7.01 (m, 2H, **2-H**), 5.20 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, 1H, **OH**), 4.48 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 1.63 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2H, **c-H**), 1.40 - 1.20 (m, 12H, **d-H, e-H, f-H, g-H, h-H, i-H**), 0.86 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3H, **j-H**).

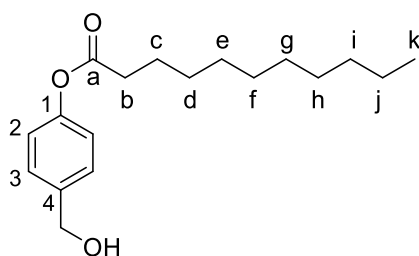
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.9 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.0 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.4 (**Ph-CH₂**), 33.5 (**C-b**), 31.3, 28.9, 28.7, 28.6, 28.4, 22.1 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i**), 24.4 (**C-c**), 14.0 (**C-j**).

- **IR:** [cm^{-1}]: 3331, 2955, 2916, 2848, 1748, 1605, 1508, 1466, 1413, 1383, 1326, 1288, 1250, 1212, 1165, 1144, 1120, 1074, 1035, 1013, 950, 924, 888, 847, 818, 759, 741, 720, 690, 580, 514, 474, 436, 405.

- **HRMS** (EI⁺, m/z): ber.: 278.1882, gef.: 278.2210 [M]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylundecanoat **42c**

Das Säurechlorid wurde nach **AVV 1** dargestellt. Hierzu wurden 5.35 g (28.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Undecansäure **45c** in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 2.96 mL (34.5 mmol, 1.2 Äquiv.) Oxalylchlorid und zwei Tropfen DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Veresterung nach **AAV 2**. 4.22 g (34.5 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 3.98 mL (28.7 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 348 mg (2.87 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 40 mL abs. THF gelöst und mit dem zuvor dargestellten Undecanoylchlorid **44c** gelöst in 20 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



$C_{18}H_{28}O_3$
292.4190 g/mol

Ausbeute: 7.07 g (24.2 mmol, 84 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.33 (PE/EtOAc 4:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.37 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 2H, **3-H**), 7.07 (dt, $^4J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 2H, **2-H**), 4.48 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **c-H**), 1.45-1.37 (m, 2H, **d-H**) 1.37 - 1.20 (m, 12H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 3H, **k-H**).

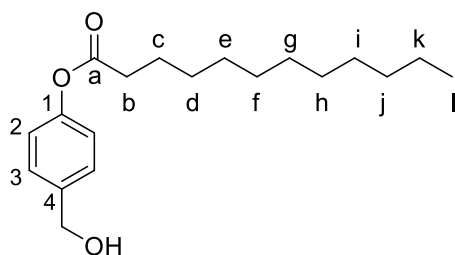
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.5 (**C-a**), 150.3 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.8 (**C-2**), 65.0 (**Ph-CH₂**), 34.6 (**C-b**), 32.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 29.4 (**C-d**), 25.1(**C-c**), 14.3 (**C-k**).

- **IR:** [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** (ESI⁺, m/z): ber.: 292.2038, gef.: 292.2703 [M]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat **42d**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. 4.07 g (32.8 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 3.79 mL (27.3 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 334 mg (2.73 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 40 mL abs. THF gelöst und mit 6.50 mL (27.3 mmol, 1.0 Äquiv.) Dodecanoylchlorid **44d** gelöst in 20 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



$C_{19}H_{30}O_3$
306.4460 g/mol

Ausbeute: 6.93 g (22.6 mmol, 83 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.33 (PE/EtOAc 4:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.37 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 2H, **3-H**), 7.07 (dt, $^4J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 2H, **2-H**), 4.68 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **c-H**), 1.47 - 1.35 (m, 2H, **d-H**) 1.35 - 1.19 (m, 14H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 3H, **l-H**).

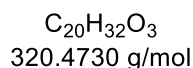
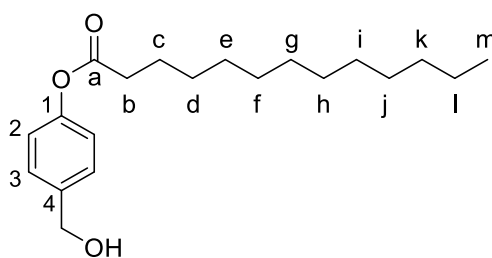
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.5 (**C-a**), 150.3 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.8 (**C-2**), 65.0 (**Ph-CH₂**), 34.6 (**C-b**), 32.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 23.8 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 29.4 (**C-d**), 25.1(**C-c**), 14.3 (**C-l**).

- **IR:** [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** (ESI⁺, m/z): ber.: 292.2038, gef.: 292.2703 [M]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyltridecanoat **42e**

Das Säurechlorid **44e** wurde nach **AVV 1** dargestellt. Hierzu wurden 10.0 g (46.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Tridecansäure **45e** in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 4.81 mL (56.1 mmol, 1.2 Äquiv.) Oxalylchlorid und zwei Tropfen DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Veresterung nach **AAV 2**. 6.96 g (56.1 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 7.78 mL (56.1 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 571 mg (4.68 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 40 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit dem zuvor dargestellten Tridecanoylchlorid **44e** gelöst in 40 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 11.3 g (35.3 mmol, 75 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.38 (PE/EtOAc 4:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.37 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 2H, **3-H**), 7.07 (dt, $^4J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 2H, **2-H**), 4.68 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, **c-H**), 1.46-1.37 (m, 2H, **d-H**) 1.37-1.20 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H, l-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 3H, **m-H**).

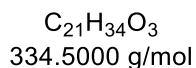
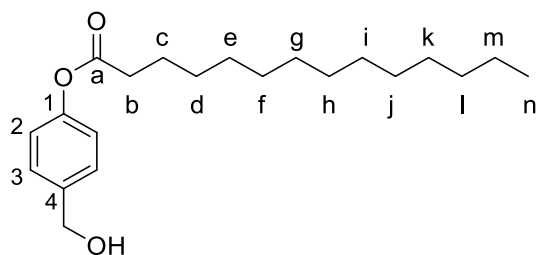
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.5 (**C-a**), 150.3 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.8 (**C-2**), 65.0 (**Ph-CH₂**), 34.6 (**C-b**), 32.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 (**C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**), 29.3 (**C-d**), 25.1 (**C-c**), 14.3 (**C-m**).

- **IR**: [cm^{-1}]: 3322, 2954, 2914, 1848, 1748, 1604, 1509, 1463, 1411, 1384, 1341, 1315, 1287, 1259, 1229, 1216, 1165, 1149, 1125, 1087, 1036, 1013, 949, 924, 888, 847, 817, 794, 762, 726, 719, 762, 726, 719, 681, 580, 513, 453, 429, 405, 391.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 320, 2351, gef.: 320.2841 [M+H]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradecanoat **42f**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. 3.99 g (32.2 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 3.72 mL (26.9 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 327 mg (2.69 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 30 mL abs. THF gelöst und mit 7.28 mL (26.9 mmol, 1.0 Äquiv.) Tetradecanoylchlorid **44f** gelöst in 10 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 5.75 g (17.2 mmol, 64 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert = 0.44 (PE/EtOAc 4:1).

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.37 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0 \text{ Hz}$, 2H, **3-H**), 7.07 (dt, $^4J_{\text{H,H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1 \text{ Hz}$, 2H, **2-H**), 4.68 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, **c-H**), 1.47 - 1.36 (m, 2H, **d-H**) 1.36 - 1.18 (m, 18H, **e-H**, **f-H**, **g-H**, **h-H**, **i-H**, **j-H**, **k-H**, **l-H**, **m-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, **n-H**).

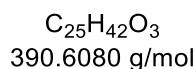
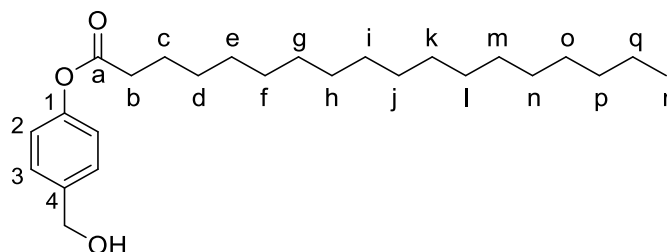
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.5 (**C-a**), 150.3 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.8 (**C-2**), 65.0 (**Ph-CH₂**), 34.6 (**C-b**), 32.1, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.1 (**C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**), 29.3 (**C-d**), 25.1 (**C-c**), 14.3 (**C-n**).

- **IR**: [cm^{-1}]: 3322, 2954, 2914, 1848, 1748, 1604, 1509, 1463, 1411, 1384, 1341, 1315, 1287, 1259, 1229, 1216, 1165, 1149, 1125, 1087, 1036, 1013, 949, 924, 888, 847, 817, 794, 762, 726, 719, 762, 726, 719, 681, 580, 513, 453, 429, 405, 391.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 320, 2351, gef.: 320.2841 [M+H]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyloctadecanoat

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. 2.21 g (17.8 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **43**, 2.05 mL (14.8 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin und 182 mg (1.48 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 30 mL abs. THF gelöst und mit 5.00 mL (14.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Octadecanoylchlorid gelöst in 10 mL abs. THF versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 5:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 4.75 g (12.2 mmol, 82 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.35 (PE/EtOAc 5:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 7.37 - 7.29 (m, 2H, **3-H**), 7.06 - 7.01 (m, 2H, **2-H**), 5.20 (s, 1H, **OH**), 4.48 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, **b-H**), 1.62 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, **c-H**), 1.47 - 1.36 (m, 2H, **d-H**) 1.39 - 1.11 (m, 26H, **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**), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, **r-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 171.9 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.0 (**C-4**), 127.4 (**C-3**), 121.3 (**C-2**), 62.3 (**Ph-CH₂**), 33.5 (**C-b**), 31.5, 20.9, 29.0, 29.0, 29.0, 28.8, 28.7, 28.6, 28.4, 22.0 (**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**), 24.3 (**C-c**), 13.9 (**C-r**).

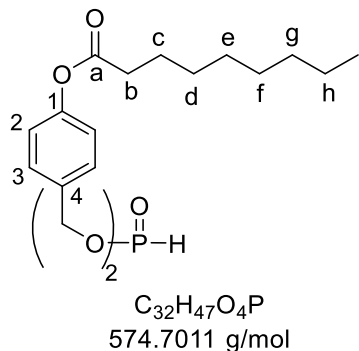
- **IR:** [cm⁻¹]: 3328, 2955, 2914, 2847, 1747, 1605, 1509, 1463, 1410, 1386, 1330, 1312, 1291, 1272, 1252, 1217, 1165, 1150, 1101, 1034, 1014, 949, 924, 845, 817, 759, 718, 581, 511, 391.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 391.3201, gef.: 391.3132 [M+H]⁺.

5.6.4 Synthese von Bis(4-alkanoyloxybenzyl)phosphonaten 40

Synthese von Bis(4-nonanoyloxybenzyl)phosphonat 40a

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 1.07 g (4.04 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat **42a** wurde in 20 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.35 mL (1.84 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.



Ausbeute: 535 mg (931 μ mol, 51 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.67 (PE/EtOAc 3:2).

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.39 - 7.33 (m, 4H, **2-H**), 7.11 - 7.05 (m, 4H, **3-H**), 6.94 (d, ³J_{H,P} = 708 Hz, 1H, **P-H**), 5.10 - 4.97 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, **b-H**), 1.75 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.36 (m, 4H, **d-H**), 1.36 - 1.22 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.89 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 6H, **i-H**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 172.2 (**C-a**), 151.0 (**C-4**), 132.9 (d, ³J_{C,P} = 6.0 Hz, **C-1**), 129.3 (**C-2**), 122.0 (**C-3**), 66.7 (d, ²J_{H,P} = 5.9 Hz, **CH₂-Ph₂**), 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**).

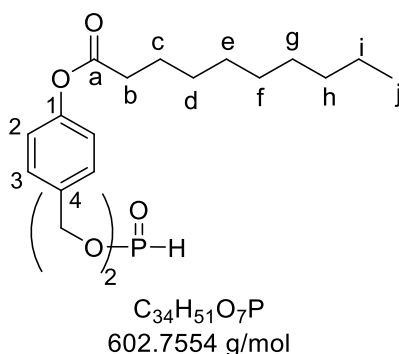
- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 7.71.

- **IR:** [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, gef: 597.2929 [M+Na]⁺.

Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)phosphonat 40b

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 1.30 g (4.69 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat **42b** wurde in 20 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.45 mL (2.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.



Ausbeute: 821 mg (1.36 mmol, 58 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.44 (PE/EtOAc 2:1).

- **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 7.40 - 7.32 (m, 4H, **2-H**), 7.12 - 7.04 (m, 4H, **3-H**), 6.94 (d, $^3J_{H,P}$ = 708 Hz, 1H, **P-H**), 5.12 - 4.97 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, 4H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{H,H}$ = 7.4 Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.36 (m, 4H, **d-H**), 1.36 - 1.21 (m, 20H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H**), 0.88 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.0 Hz, 6H, **j-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (**C-a**), 151.0 (**C-4**), 133.0 (d, $^3J_{C,P}$ = 6.0 Hz, **C-1**), 129.3 (**C-2**), 122.0 (**C-3**), 66.7 (d, $^2J_{H,P}$ = 5.9 Hz, **CH₂-Ph₂**), 34.4 (**C-b**), 29.4, 29.2, 29.2, 29.1, 29.1, 22.7 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i**), 24.9 (**C-c**), 14.1 (**C-j**).

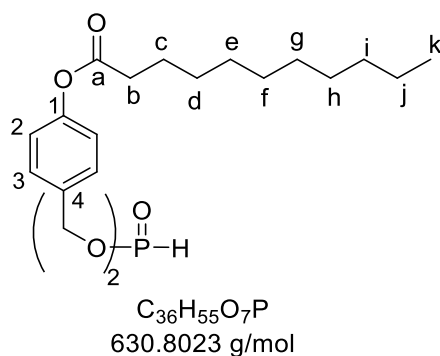
- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (162 MHz, $CDCl_3$): 7.72.

- **IR:** [cm^{-1}]: 2956, 3922, 2853, 1746, 1607, 1512, 1411, 1382, 1343, 1307, 1286, 1252, 1218, 1165, 1131, 1118, 1060, 1030, 1020, 997, 924, 872, 833, 765, 752, 749, 739, 723, 691, 577, 539, 514, 471, 466, 448, 423.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 620.3711, gef.: 620.3259 [M+NH₄]⁺.

Synthese von Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat 40c

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 1.18 g (4.05 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylundecanoat **42c** wurde in 20 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.35 mL (1.80 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.



Ausbeute: 896 mg (1.42 mmol, 77 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.29 (PE/EtOAc 2:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.39 - 7.32 (m, 4H, **2-H**), 7.11 - 7.05 (m, 4H, **3-H**), 6.94 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 708$ Hz, 1H, **P-H**), 5.10 - 4.98 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.45 - 1.37 (m, 4H, **d-H**), 1.36 - 1.20 (m, 24H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **k-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.3 (**C-a**), 151.1 (**C-4**), 133.1 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.0$ Hz, **C-1**), 129.4 (**C-2**), 122.1 (**C-3**), 66.9 (d, $^2J_{\text{H,P}} = 5.9$ Hz, **CH₂-Ph₂**), 34.5 (**C-b**), 32.2, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 25.0 (**C-c**), 14.3 (**C-k**).

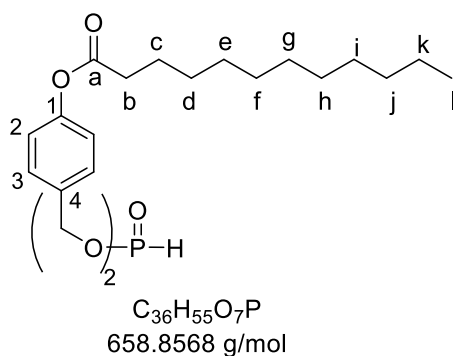
- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 7.69.

- **IR:** [cm^{-1}]: 2955, 2916, 2849, 2616, 1748, 1510, 1469, 1412, 1381, 1363, 1339, 1310, 1275, 1250, 1220, 1167, 1151, 1123, 1063, 997, 977, 925, 888, 834, 769, 736, 721, 694, 669, 644, 621, 581, 540, 515, 500, 473, 453, 423, 405, 394, 380.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 648.4024, gef.: 648.3488 [M+NH₄]⁺.

Synthese von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat 40d

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 3.00 g (9.79 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecanoat **42d** wurde in 20 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.85 mL (4.45 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.



Ausbeute: 2.30 g (3.50 mmol, 79 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.50 (PE/EtOAc 2:1).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.40 - 7.32 (m, 4H, **2-H**), 7.12 - 7.04 (m, 4H, **3-H**), 6.94 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 709$ Hz, 1H, **P-H**), 5.12 - 4.96 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.47 - 1.35 (m, 4H, **d-H**), 1.35 - 1.19 (m, 28H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l-H**).

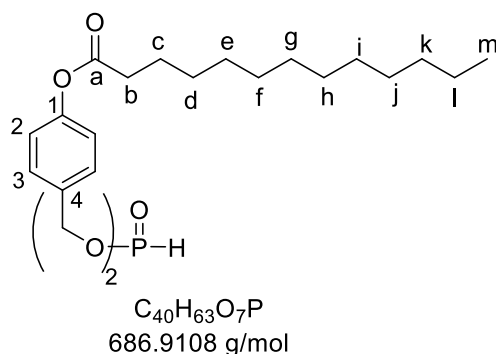
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 172.3 (**C-a**), 151.1 (**C-4**), 133.1 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.0$ Hz, **C-1**), 129.4 (**C-2**), 122.1 (**C-3**), 66.9 (d, $^2J_{\text{H,P}} = 5.9$ Hz, **CH₂-Ph₂**), 34.5 (**C-b**), 32.1, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**), 25.1 (**C-c**), 14.3 (**C-l**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 7.70.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 659.4071, gef.: 659.3472 [M+H]⁺.

Synthese von Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)phosphonat 40e

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 3.10 g (10.6 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyltridecanoat **42e** wurde in 30 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.93 mL (4.45 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.



Ausbeute: 2.75 g (4.00 mmol, 83 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.30 (PE/EtOAc 2:1).

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.40 – 7.33 (m, 4H, **2-H**), 7.11 – 7.05 (m, 4H, **3-H**), 6.93 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 708$ Hz, 1H, **P-H**), 5.11 – 4.98 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.46-1.37 (m, 4H, **d-H**), 1.36 – 1.20 (m, 32H, **e-H**, **f-H**, **g-H**, **h-H**, **i-H**, **j-H**, **k-H**, **l-H**), 0.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 6H, **m-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.2 (**C-a**), 151.0 (**C-4**), 132.9 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.0$ Hz, **C-1**), 129.3 (**C-2**), 122.0 (**C-3**), 66.8 (d, $^2J_{\text{H,P}} = 5.9$ Hz, **CH₂-Ph₂**), 34.4 (**C-b**), 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**), 25.0 (**C-c**), 14.1 (**C-m**).

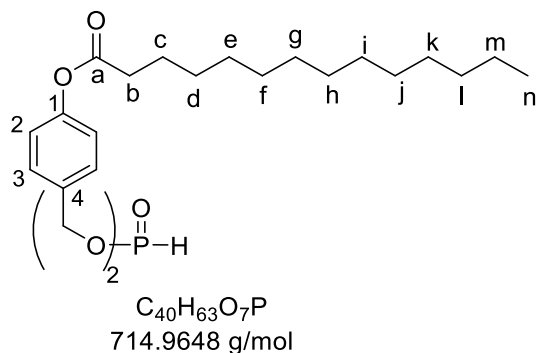
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 7.71.

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2955, 2914, 1848, 1748, 1606, 1510, 1464, 1411, 1383, 1340, 1314, 1286, 1250, 1218, 1166, 1149, 1125, 1061, 997, 924, 879, 834, 769, 719, 693, 635, 581, 540, 514, 492, 454, 437, 421.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 704.4650, gef.: 704.4490 [M+H]⁺.

Synthese von Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)phosphonat 40f

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 0.94 g (2.81 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyltetradecanoat **42f** wurde in 30 mL abs. Pyridin gelöst und mit 0.25 mL (1.28 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Kristallisation aus Methanol.



Ausbeute: 771 mg (1.08 mmol, 84 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.38 (PE/EtOAc 2:1).

- **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 7.41 - 7.33 (m, 4H, **2-H**), 7.12 - 7.05 (m, 4H, **3-H**), 6.93 (d, $^3J_{H,P}$ = 708 Hz, 1H, **P-H**), 5.11 - 4.97 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, 4H, **b-H**), 1.75 (p, $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, 4H, **c-H**), 1.45 - 1.36 (m, 4H, **d-H**), 1.36 - 1.21 (m, 32H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H, l-H, m-H**), 0.89 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.2 Hz, 6H, **n-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (**C-a**), 151.0 (**C-4**), 132.9 (d, $^3J_{C,P}$ = 6.0 Hz, **C-1**), 129.3 (**C-2**), 122.0 (**C-3**), 66.8 (d, $^2J_{H,P}$ = 5.9 Hz, **CH₂-Ph₂**), 34.4 (**C-b**), 32.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l**), 25.0 (**C-c**), 14.1 (**C-n**).

- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (162 MHz, $CDCl_3$): 7.70.

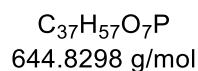
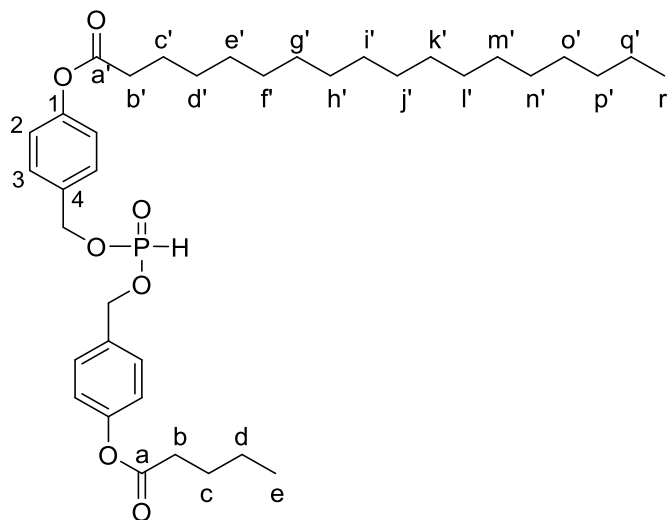
- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2955, 2914, 2847, 1748, 1607, 1510, 1464, 1410, 1383, 1328, 1303, 1277, 1250, 1217, 1167, 1149, 1060, 997, 924, 834, 769, 719, 693, 581, 540, 516, 461, 443, 421.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 737.4517, gef.: 737.4112 [M+Na]⁺.

Synthese von (4-Pentanoyloxybenzyl)-(4-octadecanoyloxybenzyl)phosphonat

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.28 mL (1.46 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat **41** in 10 mL abs. Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 572 mg (1.46 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyloctadecanoat zur Lösung gegeben und die erhaltene Suspension für zehn Minuten bei 0 °C gerührt. Nach Rühren für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 305 mg (1.46 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-

phenylpentanoat zur Reaktion gegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen aller flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde der Rückstand einmal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan coevaporiert und abschließend säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 → 3:1 + 2% AcOH) gereinigt.



Ausbeute: 447 mg (693 μmol , 48 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert = 0.22 (PE/EtOAc 4:1, 2% AcOH).

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, CDCl_3): 7.38 - 7.34 (m, 4H, **2-H**), 7.10 - 7.06 (m, 4H, **3-H**), 6.93 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 708 \text{ Hz}$, 1H, **P-H**), 5.09 - 4.98 (m, 4H, **Ph-CH}_2**), 2.59 - 2.52 (m, 4H, **b-H**, **b'-H**), 1.78 - 1.70 (m, 4H, **c-H**, **c'-H**), 1.48 - 1.37 (m, 4H, **d-H**, **d'-H**), 1.37 - 1.21 (m, 26H, **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**), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, **e-H**), 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, **r'-H**)

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 172.3 (C-a, C-a'), 151.1 (C-1), 133.1 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.0 \text{ Hz}$, **C-4**), 129.4 (C-2), 122.1 (C-3), 66.9, 66.8 (Ph- CH_2), 34.5 (C-b), 34.2 (C-b'), 32.1, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (**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'**), 27.1 (**C-c**), 25.0 (**C-c'**), 22.8 (**C-q'**), 22.4 (**C-d**), 14.3 (**C-e**), 13.9 (C-r').

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, CDCl_3): 7.71.

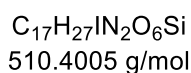
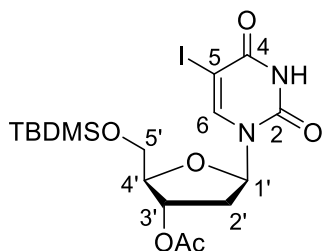
- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 2956, 2914, 2848, 1748, 1607, 1510, 1464, 1412, 1383, 1348, 1331, 1292, 1251, 1234, 1219, 1167, 1150, 1103, 1061, 1009, 993, 925, 896, 877, 834, 769, 727, 719, 693, 580, 557, 538, 518, 508, 470, 449, 420.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 667.3734, gef.: 667.3737 [M+Na]⁺.

5.6.5 Synthese bicyclischer Nucleosidanaloga (BCNAs)

5-Iod-3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **58**

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 5.01 g (14.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Iod-2'-desoxyuridin **56** wurde in 50 mL abs. Pyridin gelöst und 2.55 g (16.9 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 4.00 mL (42.4 mmol, 3.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 3:2 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 5.67 g (11.1 mmol, 79 %) eines farblosen Pulvers.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 3:2 v/v): 0.48.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 11.77 (s, 1H, **NH**), 8.00 (s, 1H, **6-H**), 6.09 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 5.7 \text{ Hz}$, 1H, **1'-H**), 5.15 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, **3'-H**), 4.12 - 4.05 (m, 1H, **4'-H**), 3.87-3.78 (m, 2H, **5'-Ha**, **5'-Hb**), 2.37 - 2.16 (m, 2H, **2'-Ha**, **2'-Hb**), 2.06 (s, 3H, **OAc**), 0.90 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.13 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**), 0.12 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**).

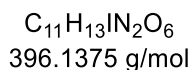
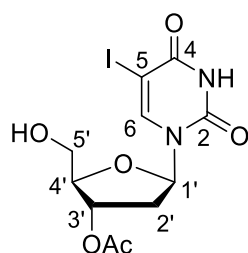
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 170.0 (**q-OAc**), 160.5 (**C-4**), 150.1 (**C-2**), 143.7 (**C-6**), 84.7 (**C-1'**), 84.6 (**C-4'**), 74.4 (**C-3'**), 70.2 (**C-5**), 63.2 (**C-5'**), 37.3 (**C-2'**), 26.0 (**-SiC(CH₃)₃**), 20.8 (**OAc**), 18.1 (**-Si(CH₃)₃**), -5.3, -5.4 (**-Si(CH₃)₂**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3203, 3116, 3085, 3053, 2951, 2926, 2881, 2853, 2809, 1719, 1685, 1611, 1469, 1438, 1410, 1388, 1372, 1353, 1321, 1299, 1276, 1250, 1206, 1145, 1120, 1106, 1076, 1046, 1022, 1003, 956, 922, 889, 864, 829, 812, 781, 750, 707, 673, 649, 607, 592, 541, 453, 438, 416.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 533.0575, gef.: 533.0574 [M+Na]⁺.

Synthese von 5-Iod-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin **54**

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt. 2.08 g (3.92 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Iod-3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **58** wurden in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 3.83 mL (23.5 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 1.44 g (3.64 mmol, 93 %) eines farblosen Pulvers.

- **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v): 0.47.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, MeOD-*d*₄): 8.55 (s, 1H, **6-H**), 6.27 (dd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 1H, **1'-H**), 5.34 (dt, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.1 Hz, 1H, **3'-H**), 4.16 – 4.13 (m, 1H, **4'-H**), 3.89-3.80 (m, 2H, **5'-Ha**, **5'-Hb**), 2.49 – 2.32 (m, 2H, **2'-Ha**, **2'-Hb**), 2.12 (s, 3H, **-OAc**).

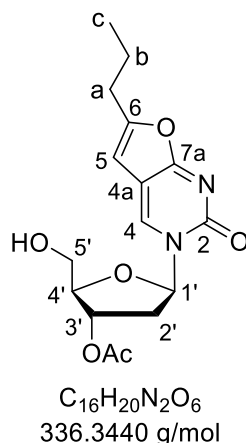
- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, MeOD-*d*₄): 172.2 (**q-OAc**), 162.8 (**C-4**), 152.0 (**C-2**), 147.0 (**C-6**), 87.0 (**C-1'**), 86.8 (**C-4'**), 76.4 (**C-3'**), 68.8 (**C-5**), 62.8 (**C-5'**), 39.2 (**C-2'**), 20.9 (**OAc**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3520, 3188, 3106, 3042, 3943, 2853, 2809, 1711, 1662, 1608, 1453, 1408, 1387, 1371, 1351, 1330, 1319, 1300, 1288, 1248, 1203, 1141, 1099, 1066, 1023, 987, 956, 894, 880, 835, 809, 774, 675, 631, 602, 555, 474, 437, 416, 384.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 418.9711, gef.: 418.9702 [M+Na]⁺.

Synthese von 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-BCNA 52

Die Reaktion wurde nach der **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 1.17 g (2.95 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Iod-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin **54** in 30 mL abs. DMF mit 341 mg (295 μmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0), 0.87 mL (8.86 mmol, 3.0 Äquiv.) Pent-1-in, 113 mg (591 μmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 0.85 mL (5.02 mmol, 1.7 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Zur Cyclisierung wurden 113 mg (591 μmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 13.5 mL (97.5 mmol, 33 Äquiv.) Triethylamin zugegeben. Das Rohprodukt wurde mehrfach säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v, EtOAc/MeOH 40:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 863 mg (2.57 mmol, 87 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (EtOAc/MeOH 40:1 v/v): 0.33.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.81 (s, 1H, **4-H**), 6.42 (t, $^4J_{H,H} = 1.2$ Hz, **5-H**), 6.35 (dd, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.34 (dt, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.3$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.30 - 4.27 (m, 1H, **4'-H**), 3.92 (dd, $^2J_{H,H} = 12.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.0$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.85 (dd, $^2J_{H,H} = 12.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.0$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.75 (ddd, $^2J_{H,H} = 14.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.2$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.71 (td, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.1$ Hz, 2H, **a-H**), 2.30 (dd, $^2J_{H,H} = 14.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 2.13 (s, 3H, **-OAc**), 1.77 (h, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 1.04 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.2 (**C-7a**), 172.2 (**q-OAc**), 161.34 (**C-6**), 156.8 (**C-2**), 138.0 (**C-4**), 109.7 (**C-4a**), 100.8 (**C-5**), 89.8 (**C-1'**), 87.9 (**C-4'**), 76.2 (**C-3'**), 62.7 (**C-5'**), 40.3 (**C-2'**), 30.9 (**C-a**), 21.4 (**C-b**), 20.9 (**OAc**), 13.8 (**C-c**).

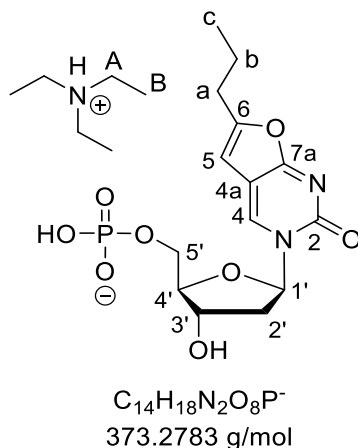
- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3364, 3058, 2970, 2945, 2875, 2755, 2106, 1730, 1667, 1621, 1606, 1560, 1494, 1425, 1371, 1341, 1305, 1282, 1242, 1230, 1194, 1179, 1161, 1127, 1108, 1078, 938, 918, 899, 879, 861, 850, 782, 681, 664, 635, 608, 595, 567.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 359.1219, gef.: 359.1225 [M+Na]⁺.

Synthese von dBCNA-5'-monophosphat (dBNCA-MP) 50

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante A) durchgeführt. Zur Phosphorylierung wurden 103 mg (0.30 mmol, 1.0 Äquiv.) 3-O-Acetyl-2'-desoxy-BCNA **52** in 5 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 233 mg (0.45 mmol, 1.5 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **60** versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1.43 mL (0.36 mmol, 1.2 Äquiv.) 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril). Die Oxidation erfolgte mit 80.0 μ L (0.45 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in n-Decan). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Zur Entschützung wurde das geschützte Monophosphat in 9 mL Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1 v/v/v) aufgenommen und für 72 h gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



Ausbeute: 98.1 mg (0.21 mmol, 70 %) farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.97 (s, 1H, **4-H**), 6.54 (s, 1H, **5-H**), 6.36 (t, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **1'-H**), 4.51 (dt, ³*J*_{H,H} = 6.1 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, **3'-H**), 4.21 (ddd, ²*J*_{H,H} = 11.4 Hz, ³*J*_{H,P} = 4.5 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.16 - 4.13 (m, 1H, **4'-H**), 4.11 (ddd, ²*J*_{H,H} = 11.4 Hz, ³*J*_{H,P} = 5.0 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, **5'-Hb**), 3.14 (q, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 6H, **A-H**), 2.68 (td, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, ³*J*_{H,H} = 1.1 Hz, 2H, **a-H**), 2.56 (ddd, ²*J*_{H,H} = 13.7 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.2 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.28 (dt, ²*J*_{H,H} = 13.7 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.75 (h, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **b-H**), 1.29 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 9H, **B-H**), 1.02 (t, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, **c-H**).

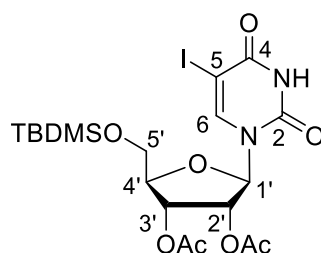
- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, MeOH-*d*₄): 171.7 (**C-7a**), 159.3 (**C-6**), 155.6 (**C-2**), 137.6 (**C-4**), 108.4 (**C-4a**), 100.2 (**C-5**), 88.2 (**C-4'**), 87.0 (**C-1'**), 69.9 (**C-3'**), 63.7 (d, ²*J*_{C,P} = 4.6 Hz, **C-5'**), 46.2 (**C-A**), 41.2 (**C-2'**), 29.5 (**C-a**), 20.0 (**C-b**), 12.4 (**C-c**), 8.0 (**C-B**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): 1.02.

- **HRMS** (ESI⁻, *m/z*): ber.: 373.0806 gef.: 373.0740 [M]⁻.

5-Iodo-2',3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyluridin 59

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 5.05 g (13.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Ioduridin **57** wurde in 50 mL abs. Pyridin gelöst und 2.63 g (16.4 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 7.74 mL (81.9 mmol, 6.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 7:4 v/v) gereinigt.



$C_{19}H_{29}IN_2O_8Si$
568.4365 g/mol

Ausbeute: 6.86 g (12.1 mmol, 88 %) eines farblosen Pulvers.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 7:4 v/v): 0.35.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.45 (s, 1H, -NH), 8.10 (s, 1H, **6-H**), 6.27 (d, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.34 (dd, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.4$ Hz, 1H, **3'-H**), 5.27 (, $^3J_{H,H} = 7.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 5.4$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.25 – 4.19 (m, 1H, **4'-H**), 3.94 (dd, $^3J_{H,H} = 11.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.8$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.87 (dd, $^3J_{H,H} = 11.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.9$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.14 (s, 3H, **OAc**), 2.07 (s, 3H, **OAc**), 0.99 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 0.22 (s, 3H, -Si(CH₃)₂), 0.21 (s, 3H, -Si(CH₃)₂).

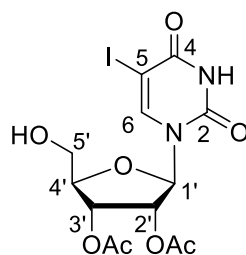
- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 170.2 (**q-OAc**), 169.9 (**q-OAc**), 159.4 (**C-4**), 150.0 (**C-2**), 143.6 (**C-6**), 85.1 (**C-1'**), 84.3 (**C-4'**), 73.3 (**C-3'**), 72.1 (**C-2'**), 69.7 (**C-5**), 63.3 (**C-5'**), 26.2 (-SiC(CH₃)₃), 20.8 (**OAc**), 20.4 (**OAc**), 18.5 (-SiC(CH₃)₃), -5.2, -5.3 (-Si(CH₃)₂).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3197, 3065, 2953, 2930, 2857, 1746, 1687, 1612, 1439, 1364, 1231, 1211, 1164, 1118, 1088, 1047, 1008, 976, 937, 886, 829, 777, 698, 627, 604, 590, 558, 533, 429, 409.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 569.0811, gef.: 569.0782 [M+H]⁺.

Synthese von 5-Iodo-2',3'-O-acetyl-desoxyuridin 55

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt. 4.09 g (7.20 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Iodo-2',3'-O-acetyl-5'-O-tert-butylidimethylsilyluridin **59** wurden in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 7.03 mL (43.2 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



$C_{13}H_{15}IN_2O_8$
454.1735 g/mol

Ausbeute: 3.18 g (6.99 mmol, 97 %) eines farblosen Schaums.

- **DC:** R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1 v/v): 0.36.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 8.51 (s, 1H, **NH**), 8.26 (s, 1H, **6-H**), 6.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.51 - 5.42 (m, 2H, **2'-H**, **3'-H**), 4.28 - 4.22 (m, 1H, **4'-H**), 4.01 (dt $^3J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.90 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 11.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.48 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz), 2.14 (s, 3H, **-OAc**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**).

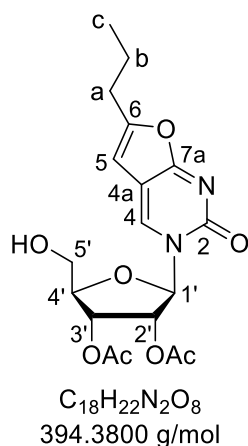
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 170.2 (**q-OAc**), 169.9 (**q-OAc**), 159.6 (**C-4**), 149.5 (**C-2**), 145.3 (**C-6**), 87.7 (**C-1'**), 83.8 (**C-4'**), 73.5 (**C-3'**), 71.4 (**C-2'**), 69.3 (**C-5**), 62.0 (**C-5'**), 20.8 (**OAc**), 20.6 (**OAc**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3444, 3187, 3056, 1674, 1611, 1440, 1368, 1213, 1103, 1078, 1044, 955, 924, 899, 875, 766, 650, 619, 591, 561, 531, 430.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 476.9765, gef.: 476.9794 [M+Na]⁺.

Synthese von 2',3'-O-Acetyl-BCNA 53

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 3.17 g (6.98 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Iod-2',3'-O-acetyluridin **55** in 40 mL abs. DMF mit 807 mg (698 μmol , 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0), 2.07 mL (20.9 mmol, 3.0 Äquiv.) Pent-1-in, 266 mg (1.40 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 2.02 mL (11.9 mmol, 1.7 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Zur Cyclisierung wurden 266 mg (1.40 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und 8.66 mL (62.5 mmol, 33 Äquiv.) Triethylamin zugegeben. Das Rohprodukt wurde mehrfach säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1 v/v, EtOAc/MeOH 80:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 2.34 g (5.92 mmol, 85 %) eines leicht gelben Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1 v/v): 0.38.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 8.48 (s, 1H, **4-H**), 6.25 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H, **1'-H**), 6.13 (d, $^3J = 1.2$ Hz, 1H, **5-H**), 5.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, 1H, **2'-H**), 5.47 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, 1H, **3'-H**).

H), 4.28 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **4'-H**), 4.07 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 12.5$ Hz, 2.1 Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.88 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 12.5$ Hz, 2.1 Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.60 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, **a-H**), 2.10 (s, 6H, **OAc**), 1.70 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 0.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 172.4 (**C-7a**), 170.3 (**q-OAc**), 169.6 (**q-OAc**), 160.4 (**C-4**), 155.1 (**C-2**), 135.9 (**C-4**), 108.8 (**C-4a**), 99.3 (**C-5**), 90.2 (**C-1'**), 83.2 (**C-4'**), 73.9 (**C-2'**), 70.3 (**3'-H**), 61.2 (**5'-H**), 30.3 (**a-C**), 20.7 (**OAc**), 20.3 (**b-C**), 13.6 (**c-C**).

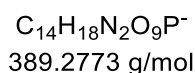
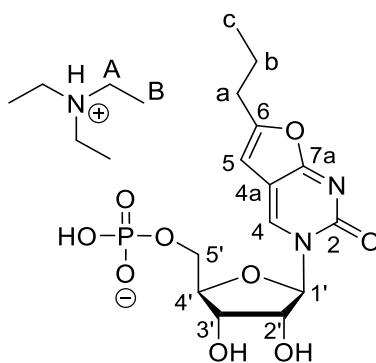
- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3240, 3122, 3097, 3030, 2968, 2917, 2878, 1752, 1663, 1627, 1617, 1568, 1428, 1381, 1369, 1336, 1229, 1209, 1172, 1141, 1119, 1103, 1081, 1058, 1037, 999, 954, 915, 900, 882, 869, 819, 800, 787, 761, 726, 676, 666, 648, 620, 594, 581, 556, 542, 497, 469, 436, 421.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 417.1268, gef.: 417.1329 [M+Na]⁺.

Synthese von BCNA-5'-monophosphat (BCNA-MP) 51

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante A) durchgeführt. Zur Phosphorylierung wurden 1.88 g (4.77 mmol, 1.0 Äquiv.) 2',3'-O-Acetyl-BCNA **53** in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 3.73 g (7.15 mmol, 1.5 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **60** versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 22.8 mL (5.72 mmol, 1.2 Äquiv.) 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril). Die Oxidation erfolgte mit 1.47 mL (8.10 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in n-Decan). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) gereinigt.

Zur Entschützung wurde das geschützte Monophosphat in 30 mL Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1 v/v/v) aufgenommen und für 48 h gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



Ausbeute: 1.49 g (3.03 mmol, 64 %) farblosen, kristallinen Feststoffs.

- **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, MeOH-*d*₄): 9.04 (s, 1H, **4-H**), 6.55 (t, ³*J*_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, **5-H**), 6.02 (d, ³*J*_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, **1'-H**), 4.33 (ddd, ²*J*_{H,H} = 11.8 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.3 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.27 (dd, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, **3'-H**), 4.22 (dq, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, **4'-H**), 4.18 (dd, *J* = 4.7, 2.3 Hz, 1H, **2'-H**), 4.14 (ddd, ²*J*_{H,H} = 11.8 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.7 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, **5'-Hb**), 3.20 (q, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 7H, **A-H**), 2.66 (td, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.2 Hz, 2H, **b-H**), 1.73 (h, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **b-H**), 1.32 (td, *J* = 7.2, 4.9 Hz, 13H, **B-H**), 1.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, **c-H**).

- **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, MeOH-*d*₄): 173.2 (**C-7a**), 160.8 (**C-4**), 157.2 (**C-2**), 139.1 (**C-4**), 110.0 (**C-4a**), 101.7 (**C-5**), 93.6 (**C-1'**), 84.6 (**C-4'**), 77.1 (**C-2'**), 69.6 (**C-3'**), 64.1 (²*J*_{P,C} = 4.9 Hz, **C-5'**), 47.8 (**C-A**), 30.9 (**a-C**), 21.3 (**b-C**), 12.5 (**c-C**), 9.2 (**C-B**).

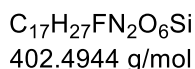
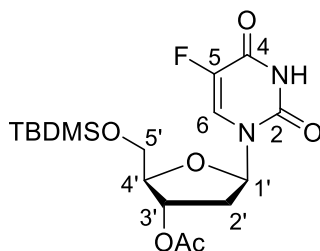
- **³¹P-NMR**: δ [ppm] (161 MHz, MeOH-*d*₄): 0.73.

- **HRMS** (ESI⁻, *m/z*): ber.: 389.0755 gef.: 389.0763 [M]⁻.

5.6.6 Synthese von FdU-Monophosphat 68

5-Fluor-3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin 76

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 3.00 g (8.47 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluor-2'-desoxyuridin **2** wurden in 30 mL abs. Pyridin gelöst und 1.53 g (10.2 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 2.40 mL (25.4 mmol, 3.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 2:1 → 1:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 3.12 g (7.75 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 2:1 v/v): 0.36.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, $CDCl_3$): 9.23 (d, $^3J_{H,F} = 5.7$ Hz 1H, **-NH**), 8.03 (d, $^3J_{H,F} = 6.1$ Hz, 1H, **6-H**), 6.37 (ddd, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.5$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.24 (d, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.15 - 4.12 (m, 1H, **4'-H**), 3.95 - 3.88 (m, 2H, **5'-Ha**, **5'-Hb**), 2.47 (ddd, 1H, $^2J_{H,H} = 14.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.2$ Hz, **2'-Ha**), 2.16 - 2.12 (m, 1H, **2'-Hb**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**), 0.92 (s, 9H, **-Si(CH₃)₃**), 0.14 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**), 0.14 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, $CDCl_3$): 170.7 (**q-OAc**), 156.9 (d, $^2J_{C,F} = 25.4$ Hz, **C-4**), 149.1 (**C-2**), 140.8 (d, $^1J_{C,F} = 240$ Hz, **C-5**), 124.1 (d, $^2J_{C,F} = 34.9$ Hz, **C-6**) 86.0 (**C-4'**), 85.6 (**C-1'**), 75.6 (**C-3'**), 63.9 (**C-5'**), 38.4 (**C-2'**), 26.0 (**-Si(CH₃)₃**), 21.3 (**OAc**), 18.5 (**-Si(CH₃)₃**), -5.5 (**-Si(CH₃)₂**).

- **^{19}F -NMR:** δ [ppm] (565 MHz, $CDCl_3$): -163.65 (dd, $^3J_{F,H} = 6.1$ Hz, $^4J_{F,H} = 1.5$ Hz).

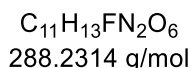
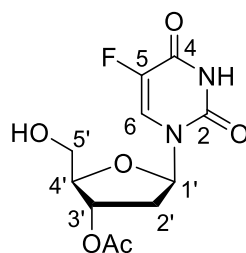
- **IR:** [cm^{-1}]: 3211, 3079, 2953, 2930, 2883, 2856, 1718, 1702, 1666, 1463, 1435, 1401, 1380, 1362, 1316, 1299, 1347, 1203, 1123, 1105, 1076, 1046, 1020, 1004, 971, 952, 920, 886, 828, 811, 782, 752, 709, 688, 671, 655, 626, 613, 552, 487, 473, 450, 410.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 425.1515, gef.: 425.1473 [M+Na]⁺.

5-Fluor-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin 73

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 3.49 g (8.67 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluor-3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **76** wurden in 40 mL abs. Dichlormethan

gelöst und mit 8.47 mL (52.0 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 2.47 g (8.55 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/MeOH v/v): 0.48.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 8.23 (d, ³J_{H,F} = 6.9 Hz 1H, **6-H**), 6.30 (ddd, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, **1'-H**), 5.33 (dt, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, **3'-H**), 4.14 - 4.11 (m, 1H, **4'-H**), 3.84 (d, ³J_{H,H} = 2.8 Hz, 2H, **5'-H**), 2.43 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 14.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, **2'-Ha**), 2.34 (ddd, ²J_{H,H} = 14.4 Hz, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz 1H, **2'-Hb**), 2.11 (s, 3H, **-OAc**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 172.2 (**q-OAc**), 159.4 (d, ²J_{C,F} = 26.4 Hz, **C-4**), 150.9 (**C-2**), 142.0 (d, ¹J_{C,F} = 233 Hz, **C-5**), 126.0 (d, ²J_{C,F} = 35.0 Hz, **C-6**), 87.0 (**C-4'**), 86.7 (**C-1'**), 76.5 (**C-3'**), 62.9 (**C-5'**), 38.7 (**C-2'**), 20.9 (**OAc**).

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, CDCl₃): -168.29 (d, ³J_{F,H} = 6.7 Hz).

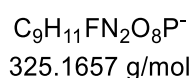
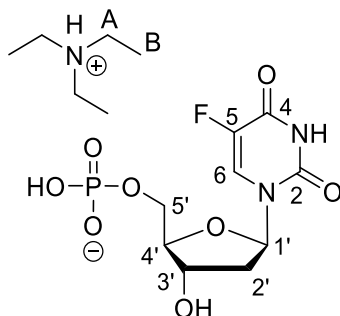
- **IR:** [cm⁻¹]: 3565, 3157, 3057, 2935, 2848, 2825, 1731, 1703, 1661, 1510, 1477, 1442, 1411, 1379, 1361, 1313, 1268, 1239, 1192, 1132, 1108, 1071, 1063, 1018, 997, 986, 971, 955, 912, 898, 885, 828, 791, 773, 743, 693, 652, 621, 604, 564, 492, 453, 431, 408, 379.

- **HRMS (ESI⁺, m/z):** ber.: 311.0655, gef.: 311.0641 [M+Na]⁺.

5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (FdU-MP) 68

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante A) durchgeführt. Zur Phosphorylierung wurden 1.11 g (3.85 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluor-3'-O-acetyl-2'-deoxyuridin **73** in 50 mL abs. THF gelöst und mit 3.01 g (5.77 mmol, 1.5 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **60** versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 18.5 mL (4.61 mmol, 1.2 Äquiv.) 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril). Die Oxidation erfolgte mit 1.05 mL (5.77 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in n-Decan). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Zur Entschützung wurde das geschützte Monophosphat in 30 mL Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1 v/v/v) aufgenommen und für 72 h gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



Ausbeute: 1.27 g (2.97 mmol, 77 %) eines farblosen Harzes.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.12 (d, ³J_{H,F} = 6.6 Hz, 1H, **6-H**), 6.29 (ddd, ³J_{H,H} = 7.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, **1'-H**), 4.52 - 4.46 (m, 1H, **3'-H**), 4.09 - 3.99 (m, 1H, **4'-H, 5'-H**), 3.10 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 6H, **A-H**), 2.30 - 2.17 (m, 2H, **2'-H**), 1.26 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 9H, **B-H**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, MeOH-*d*₄): 158.3 (**C-4**), 149.6 (**C-2**), 126.3 (d, ²J_{C,F} = 35.0 Hz, **C-6**), 124.9 (d, ¹J_{C,F} = 182.5 Hz, **C-5**), 88.0 (²J_{C,P} = 8.7 Hz, **C-5'**), 86.8 (**C-1'**), 72.9 (**C-3'**), 65.9 (d, ³J_{C,P} = 5.3 Hz, **C-4'**), 47.6 (**C-A**), 40.9 (**C-2'**), 9.3 (**C-B**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): 1.03.

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-*d*₄): -167.59 (d, ³J_{F,H} = 6.5 Hz).

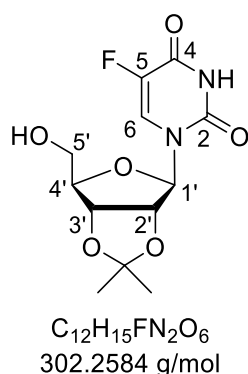
- **IR:** [cm⁻¹]: 2947, 2687, 2495, 2120, 1699, 1659, 1468, 1400, 1306, 1230, 1180, 1121, 981, 916, 807, 746, 648, 610, 516, 414.

- **HRMS (ESI⁺, m/z):** ber.: 326.0243, gef.: 326.0632 [M+H]⁺.

5.6.7 Synthese von FU-5'-monophosphat 77

7.2.3 Synthese von 5-Fluor-2',3'-O'-isopropylidenuridin 79

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.05 g (4.01 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluoruridin **76** in 40 mL abs. Aceton gelöst. Anschließend wurde bei 0 °C 0.50 mL konz. Schwefelsäure tropfenweise zugegeben. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit wässriger Ammoniaklösung neutralisiert und alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



- **Ausbeute:** 1.06 g (3.50 mmol, 88 %) eines farblosen Pulvers.

- **DC:** Rf-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v): 0.24.

- **1H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.36 (s, 1H, **-NH**), 7.68 (d, ³J_{F,H} = 6.0 Hz, 6-H), 5.71 (d, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **1'-H**), 4.94 – 4.88 (m, 2H, **2'-H, 3'-H**), 4.34 (q, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, 1H, **4'-H**), 3.97 (dd, ²J_{H,H} = 11.8 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.84 (dd, ²J_{H,H} = 11.8 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, **5'-Hb**), 1.36 (s, 3H, **-CH₃**), 1.25 (s, 3H, **-CH₃**).

- **13C-NMR** δ [ppm] (101 MHz, MeOH-d₄): 150.8 (**C-4**), 143.0 (**C-2**), 141.8 (¹J_{C,F} = 233 Hz, **C-5**), 127.3 (d, ²J_{F,C} = 35.1 Hz, **C-6**), 115.1 (**C(CH₃)₂**), 93.7 (**C-1'**), 88.3 (**C-4'**), 85.9 (**C-2'**), 82.1 (**C-3'**), 62.9 (**C-5'**), 27.5 (**CH₃**), 25.5 (**CH₃**).

- **IR:** ν [cm⁻¹]: 3419, 3229, 3121, 2987, 2940, 1701, 1679, 1651, 1470, 1406, 1683, 1347, 1309, 1270, 1246, 1231, 1208, 1156, 1117, 1089, 1073, 1050, 1035, 999, 971, 935, 885, 854, 830, 803, 766, 726, 698, 669, 620, 579, 556, 516, 496, 453, 421, 407, 386.

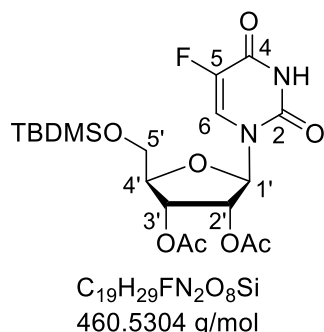
- **19F-NMR** δ [ppm] (565 MHz, CDCl₃): -164.8 (d, ³J_{F,H} = 5.6 Hz).

- **HRMS** (ESI+, m/z): ber.: 303.0987, gef.: 303.0996 [M+H]⁺.

5-Fluor-3',4'-O-diacetyl-5'-O-tert-butylidimethylsilyluridin **81**

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 2.4 g (9.16 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluoruridin **76** wurde in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 1.65 g (11.0 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butylidimethylsilylchlorid zugegeben. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 6.06 mL (64.1 mmol,

7.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 3:2 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 3.44 g (7.47 mmol, 82 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 3:2 v/v): 0.39.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, DMSO- d_6): 11.96 (s, 1H, **-NH**), 7.97 (d, $^3J_{F,H} = 6.7$ Hz, 1H, **6-H**), 6.01 (dd, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.6$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.32 (t, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, 1H, **3'-H**), 5.29 (dd, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.0$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.22 (q, $^3J_{H,H} = 2.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 3.90 (dd, $^3J_{H,H} = 11.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.8$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.82 (dd, $^3J_{H,H} = 11.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.09 (s, 3H, **OAc**), 2.02 (s, 3H, **OAc**), 0.90 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.11 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**), 0.11 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, DMSO- d_6): 169.4 (**q-OAc**), 169.3 (**q-OAc**), 156.9 (d, $^2J_{C,F} = 26.3$ Hz, **C-4**), 149.1 (**C-2**), 140.4 (d, $^1J_{C,F} = 234$ Hz, **C-5**), 123.6 (d, $^2J_{C,F} = 34.6$ Hz, **C-6**), 85.6 (**C-1'**), 82.7 (**C-4'**), 72.5 (**C-3'**), 70.6 (**C-2'**), 62.8 (**C-5'**), 25.7 (**-SiC(CH₃)₃**), 20.4 (**OAc**), 20.2 (**OAc**), 18.0 (**-SiC(CH₃)₃**), -5.7 (**-Si(CH₃)**), -5.7 (**-Si(CH₃)**).

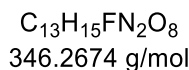
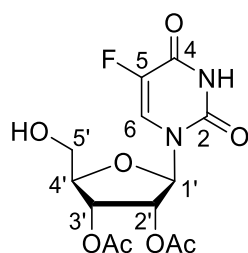
- **^{19}F -NMR:** δ [ppm] (565 MHz, DMSO- d_6): -167.37 (d, $^3J_{F,H} = 7.1$ Hz).

- **IR:** [cm^{-1}]: 3171, 3065, 2929, 2858, 1733, 1705, 1666, 1464, 1374, 1309, 1228, 1162, 1123, 1091, 1044, 1000, 968, 937, 895, 828, 782, 742, 718, 700, 684, 666, 636, 600, 571, 562, 537, 491, 470, 423, 405, 394, 384.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 461.1750, gef.: 461.1768 [M+H]⁺.

5-Fluor-3',4'-O-diacetyluridin 78

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 3.43 g (7.45 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluor-2',3'-O-diacetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-uridin **81** wurden in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 14.6 mL (89.4 mmol, 12.0 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.



Ausbeute: 2.47 g (7.14 mmol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (EtOAc): 0.62.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 11.9 (s, 1H, **-NH**), 8.25 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 7.0$ Hz, 1H, **6-H**), 6.04 – 5.97 (m, 1H, **1'-H**), 5.54 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, **5'-OH**), 5.33 (dd, $J = 3.7, 1.4$ Hz, 2H, **2'-H, 3'-H**), 4.17 – 4.10 (m, 1H, **4'-H**), 3.69 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.64 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**), 2.02 (s, 4H, **-OAc**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 169.5 (**q-OAc**), 169.3 (**q-OAc**), 156.9 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26.4$ Hz, **C-4**), 149.2 (**C-2**), 140.3 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 232.0$ Hz, **C-5**), 124.3 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 34.9$ Hz, **C-6**), 85.6 (**C-1'**), 83.3 (**C-4'**), 72.5 (**C-3'**), 70.9 (**C-2'**), 60.7 (**C-5'**), 20.4 (**OAc**), 20.2 (**OAc**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, DMSO- d_6): -166.21 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.7$ Hz).

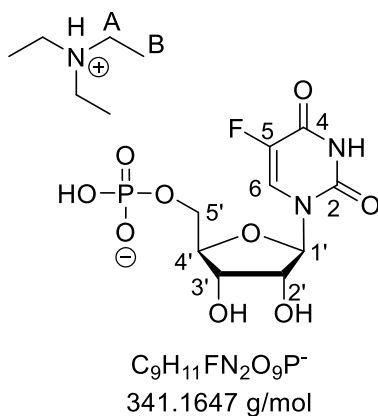
- **IR:** [cm^{-1}]: 3600, 3203, 3072, 2941, 2828, 1699, 1663, 1469, 1433, 1971, 1213, 1161, 1104, 1077, 1042, 961, 893, 789, 765, 655, 639, 592, 569, 536, 490, 416.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 347.0885, gef.: 347.0716 [M+H]⁺.

Synthese von 5-Fluoruridin-5'-monophosphat (FU-MP) 77

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante A) durchgeführt. Zur Phosphorylierung wurden 0.52 g (1.51 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Fluor-2',3'-O-diacetyluridin **78** in 30 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 1.14 g (2.19 mmol, 1.5 Äquiv.) Bis-O-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **60** versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 7.21 mL (1.80 mmol, 1.2 Äquiv.) 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril). Die Oxidation erfolgte mit 0.55 mL (3.00 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) gereinigt.

Zur Entschützung wurde das geschützte Monophosphat in 15 mL Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1 v/v/v) aufgenommen und für 72 h gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



Ausbeute: 0.42 g (0.95 mmol, 63%) eines farblosen Harzes.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.11 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 7.0$ Hz, 1H, **6-H**), 5.96 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.24 - 4.20 (m, 2H, **2'-H**, **3'-H**), 5.15 - 4.04 (m 3H, **4'-H**, **5'-H**), 3.19 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H, **A-H**), 1.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 9H, **B-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 159.5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26.6$ Hz, **C-4**), 151.2 (**C-2**), 141.9 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 234.2$ Hz, **C-5**), 126.3 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 34.3$ Hz, **C-6**), 89.8 (**C-1'**), 85.4 (**C-4'**), 75.4 (**C-3'**), 71.7 (**C-2'**), 65.78 (**C-5'**), 47.8 (**C-A**), 9.2 (**C-B**).

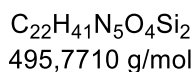
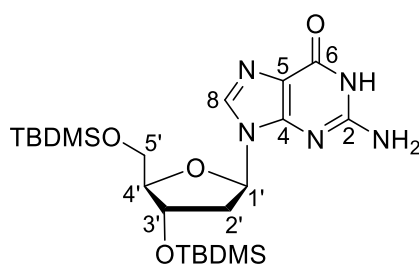
- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): 0.60.

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, DMSO- d_6): -167.55 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.7$ Hz).

5.6.8 Synthese von Cladribin-5'-monophosphat 102

Synthese von 3',5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin 97

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.01 g (15.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-Desoxyguanosin **84** in 80 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid suspendiert und 10.2 g (150 mmol, 10 Äquiv.) Imidazol und 9.05 g (60.0 mmol, 4.0 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Nach Rühren für 18 h bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde aus Methanol kristallisiert.



Ausbeute: 6.32 g (12.8 mmol, 85 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1 v/v): 0.30.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.87 (s, 1H, **8-H**), 6.46 (s, 2H, **-NH₂**), 6.10 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.49 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 3.85 - 3.77 (m, 1H, **4'-H**), 3.69 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$, 1H, **5'-Ha**), 3.63 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.64 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.23 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 0.89 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.87 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.10 (s, 6H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.04 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 6H, **-SiC(CH₃)₃**).

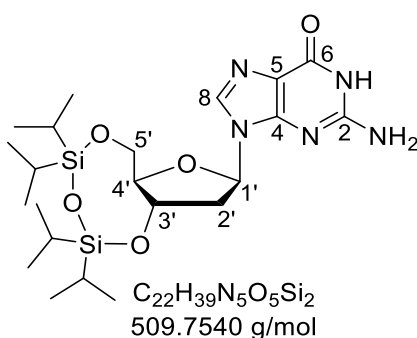
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 156.7 (**C-6**), 153.7 (**C-2**), 151.0 (**C-4**), 134.9 (**C-8**), 116.6 (**C-5**), 87.0 (**C-4'**), 82.1 (**C-1'**), 72.2 (**C-3'**), 62.8 (**C-5'**), 39.5 (**C-2'**), 25.8 (**-SiC(CH₃)₃**), 25.7 (**-SiC(CH₃)₃**), 18.0 (**-SiC(CH₃)₃**), 17.7 (**-SiC(CH₃)₃**), -4.8 (**-Si(CH₃)**), -5.0 (**-Si(CH₃)**), -5.5 (**-Si(CH₃)**), -5.5 (**-Si(CH₃)**).

- **IR:** [cm^{-1}]: 3317, 3168, 2952, 2927, 2956, 2739, 1679, 1648, 1603, 1572, 1538, 1485, 1471, 1439, 1416, 1384, 1360, 1323, 1281, 1251, 1231, 1208, 1168, 1121, 1093, 1069, 1025, 1004, 987, 967, 936, 885, 829, 773, 710, 695, 671, 640, 607, 571, 497, 465.

- **HRMS (ESI⁺, m/z):** ber.: 496.2770, gef.: 496.2965 [M+H]⁺.

Synthese von 3',5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 605 mg (2.26 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-Desoxyguanosin in 12 mL abs. Pyridin suspendiert und tropfenweise 0.87 mL (2.71 mmol, 1.2 Äquiv.) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra*s*propyldisiloxan zugegeben. Nach Rühren für 18 h bei Raumtemperatur wurden erneut 0.87 mL (2.71 mmol, 1.2 Äquiv.) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra*s*propyldisiloxan zugegeben und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und einmal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan coevaporiert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Methanol kristallisiert.



Ausbeute: 375 mg (736 μ mol, 33%) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): 0.51.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (500 MHz, $DMSO-d_6$): 10.6 (s, 1H, **-NH**), 7.82 (s, 1H, **8-H**), 6.45 (s, 2H, **-NH₂**), 6.05 (dd, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.67 (q, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 1H, **3'-H**), 3.96 - 3.86 (m, 2H, **5'-H**), 3.78 (td, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.7$ Hz, 1H, **4'-H**), 2.66 (ddd, $^2J_{H,H} = 14.3$ Hz, $^4J_{H,H} = 6.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.3$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.50 - 2.44 (m, 1H, **2'-Hb**), 1.13 - 0.88 (m, 24H, **-SiC(CH₃)₃**).

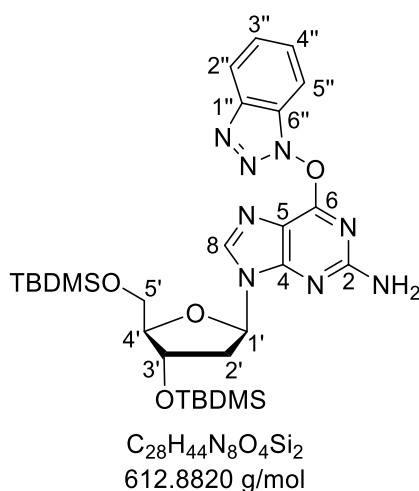
- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (126 MHz, $DMSO-d_6$): 157.1 (**C-6**), 154.1 (**C-2**), 151.0 (**C-4**), 135.0 (**C-8**), 117.1 (**C-5**), 84.8 (**C-4'**), 81.2 (**C-1'**), 71.3 (**C-3'**), 62.5 (**C-5'**), 39.7 (**C-2'**), 17.7, 17.6, 17.5, 17.3, 17.3, 17.2 (**-SiC(CH₃)₃**), 13.1, 12.9, 12.6, 12.3 (**-SiC(CH₃)₃**).

- **IR:** [cm^{-1}]: 3149, 2942, 2891, 2865, 2750, 1692, 1654, 1605, 1573, 1536, 1486, 1462, 1416, 1365, 1335, 1319, 1289, 1244, 1209, 1185, 1167, 1141, 1120, 1095, 1068, 1030, 1011, 990, 90, 919, 884, 869, 816, 782, 740, 685, 638, 600, 570, 545, 512, 488, 448, 421.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 510.2562, gef.: 510.2803 [M+H]⁺.

Synthese *O*⁶-(Benzotriazol-1-yl)-3',5'-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin **96**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.02 g (10.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilylguanosin **97** in 80 mL abs. Acetonitril suspendiert und 8.94 g (20.3 mmol, 2.0 Äquiv.) BOP-Reagenz **98** zugegeben. Anschließend wurde 3.02 mL (20.3 mmol, 2.0 Äquiv.) DBU tropfenweise bei Raumtemperatur zugegeben und die erhaltene Lösung für 1.5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde daraufhin in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit Wasser gewaschen, worauf die wässrige Phase einmal mit Ethylacetat extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 5:2 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 4.21 g (6.87 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 5:2 v/v): 0.66.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8.29 (s, 1H, **C-8**), 8.17 (dt, ³ $J_{H,H}$ = 8.5 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ = 0.9 Hz, 1H, **2''-H**), 7.75 (dt, ³ $J_{H,H}$ = 8.4 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 1.0 Hz, 1H, **5''-H**), 7.64 (ddd, ³ $J_{H,H}$ = 8.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 6.9 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ = 0.9 Hz, 1H, **4''-H**), 7.53 (ddd, ³ $J_{H,H}$ = 8.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 6.9 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ = 1.0 Hz, 1H, **3''-H**), 6.73 (s, 2H, **NH₂**), 6.25 (dd, ³ $J_{H,H}$ = 7.3 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 6.2 Hz, 1H, **1'-H**), 4.54 (dt, ³ $J_{H,H}$ = 6.1 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ = 3.3 Hz, 1H, **3'-H**), 3.88 – 3.81 (m, 1H, **4'-H**), 3.73 (dd, ² $J_{H,H}$ = 11.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 5.9 Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.66 (dd, ² $J_{H,H}$ = 11.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 4.6 Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.79 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 13.1 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 7.3 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 5.7 Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.32 (ddd, ² $J_{H,H}$ = 13.2 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 6.3 Hz, ³ $J_{H,H}$ = 3.7 Hz, 1H, **2'-Hb**), 0.89 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.86 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.11 (s, 6H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.04 (s, 3H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.03 (s, 3H, **-SiC(CH₃)₃**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 159.3 (**C-6**), 158.7 (**C-2**), 156.3 (**C-4**), 142.8 (**C-1''**), 140.4 (**C-8**), 129.2 (**C-4''**), 128.5 (**C-6''**), 125.2 (**C-3''**), 119.9 (**C-2''**), 111.3 (**C-5**), 109.3 (**C-5''**), 87.1 (**C-4'**), 82.7 (**C-1'**), 72.0 (**C-3'**), 62.6 (**C-5'**), 38.6 (**C-2'**), 25.8 (**-SiC(CH₃)₃**), 25.7

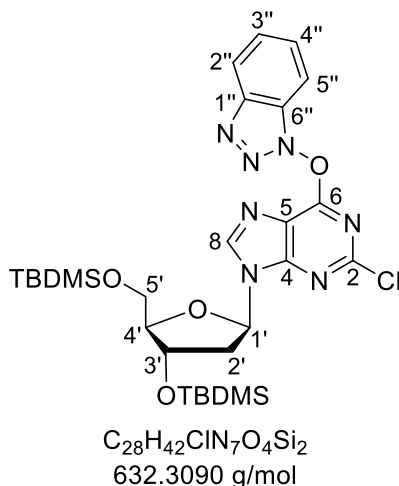
(-SiC(CH₃)₃), 18.0 (-SiC(CH₃)₃), 17.7 (-SiC(CH₃)₃), -4.8 (-Si(CH₃)), -5.0 (-Si(CH₃)), -5.5 (-Si(CH₃)), -5.5 (-Si(CH₃)).

- IR: [cm⁻¹]: 3320, 3207, 2953, 2929, 2885, 2856, 1636, 1570, 1514, 1469, 1445, 1431, 1399, 1321, 1280, 1253, 1226, 1190, 1087, 1018, 967, 944, 882, 832, 776, 741, 671, 632, 496.

- HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 613.3097, gef.: 613.2785 [M+H]⁺.

Synthese von O⁶-(Benzotriazol-1-yl)-2-chloro-3',5'-tert-butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin **95**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.23 g (3.65 mmol, 1.00 Äquiv.) O⁶-(Benzotriazol-1-yl)-3',5'-tert-butyldimethylsilylguanosin **96** in 30 mL abs. Dichlormethan gelöst und 1.16 g (5.10 mmol, 1.40 Äquiv.) Antimon(III)-chlorid zugegeben. Nach Kühlen auf -15 °C wurde tropfenweise 1.53 mL (12.8 mmol, 3.5 Äquiv.) tert-Butylnitrit zugegeben und für fünf Stunden bei -15 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde einmal mit ges. Natriumchloridlösung und einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 4:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 1.52 g (2.40 mmol, 66 %) eines farblosen Feststoffs.

- DC: R_f-Wert (PE/EtOAc 4:1 v/v): 0.53.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8.83 (s, 1H, **C-8**), 8.22 (dt, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 0.9 Hz, 1H, **2''-H**), 7.81 (dt, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ³J_{H,H} = 1.0 Hz, 1H, **5''-H**), 7.68 (ddd, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 0.9 Hz, 1H, **4''-H**), 7.57 (ddd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ⁴J_{H,H} = 0.9 Hz, 1H, **3''-H**), 6.42 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, **1'-H**), 4.74 - 4.68 (m, 1H, **3'-H**), 3.90 - 3.85 (m, 1H, **4'-H**), 3.81 (dd, ²J_{H,H} = 11.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.66 (dd,

$^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.2$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.94 (dt, $^2J_{H,H} = 13.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.42 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.0$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 0.90 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.80 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.12 (s, 6H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.00 (s, 3H, **-SiC(CH₃)₃**), -0.04 (s, 3H, **-SiC(CH₃)₃**).

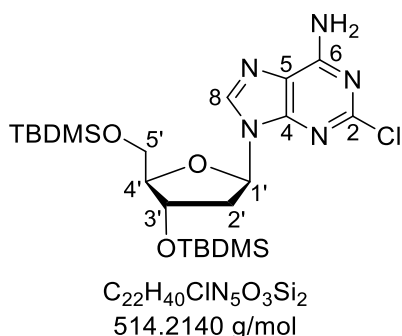
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 158.4 (**C-6**), 155.0 (**C-5**), 150.4 (**C-2**), 146.6 (**C-8**), 142.7 (**C-1''**), 129.5 (**C-4''**), 128.3 (**C-6''**), 125.5 (**C-3''**), 120.0 (**C-2''**), 118.8 (**C-4**), 109.4 (**C-5''**), 87.1 (**C-4'**), 84.5 (**C-1'**), 71.2 (**C-3'**), 62.0 (**C-5'**), 38.2 (**C-2'**), 25.7 (**-SiC(CH₃)₃**), 25.6 (**-SiC(CH₃)₃**), 17.9 (**-SiC(CH₃)₃**), 17.7 (**-SiC(CH₃)₃**), -4.8 (**-Si(CH₃)**), -5.0 (**-Si(CH₃)**), -5.6 (**-Si(CH₃)**), -5.7 (**-Si(CH₃)**).

- IR: [cm⁻¹]: 3325, 3199, 2952, 2929, 2885, 2856, 1636, 1570, 1514, 1469, 1431, 1400, 1320, 1280, 1252, 1226, 1189, 1086, 1018, 967, 944, 881, 831, 776, 740, 670, 631, 555, 537, 494, 457, 427, 417.

- HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 632.2598, gef.: 632.2213 [M+H]⁺.

Synthese von 2-Chlor-3',5'-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyadenosin 101

2.61 g (4.12 mmol, 1.0 Äquiv.) O⁶-(Benzotriazol-1-yl)-2-chloro-3',5'-*tert*-butyldimethylsilyl-guanosin **95** wurden in 30 mL 1,2-Dimethoxyethan gelöst und 2.81 mL Ammoniaklösung (25% in Wasser) zugegeben. Nach Rühren für 72 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde daraufhin einmal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 1:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 1.83 g (3.56 mmol, 86 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f-Wert (PE/EtOAc 1:1 v/v): 0.53.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8.29 (s, 1H, **C-8**), 7.80 (s, 2H, **NH₂**), 6.24 (t, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.65 (dt, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 3.88 - 3.78 (m, 2H, **4'-H**, **5'-Ha**), 3.65 (dd, $^2J_{H,H} = 10.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.0$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.93 - 2.84 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.31

(ddd, $^2J_{H,H} = 13.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.2$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 0.90 (s, 9H, **-Si(CH₃)₃**), 0.83 (s, 9H, **-Si(CH₃)₃**), 0.12 (s, 6H, **-Si(CH₃)₂**), 0.01 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**), -0.01 (s, 3H, **-Si(CH₃)₂**).

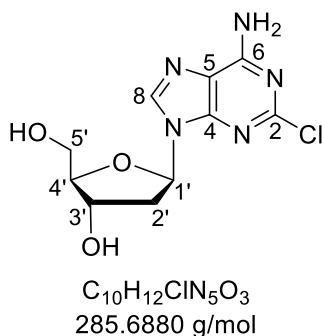
- **¹³C-NMR**: δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 156.8 (**C-6**), 152.9 (**C-2**), 149.9 (**C-4**), 140.3 (**C-8**), 118.4 (**C-5**), 87.0 (**C-4'**), 83.6 (**C-1'**), 71.6 (**C-3'**), 62.3 (**C-5'**), 38.3 (**C-2'**), 25.7 (**-Si(CH₃)₃**), 25.6 (**-Si(CH₃)₃**), 17.9 (**-Si(CH₃)₃**), 17.7 (**-Si(CH₃)₃**), -4.8 (**-Si(CH₃)**), -5.0 (**-Si(CH₃)**), -5.6 (**-Si(CH₃)**), -5.6 (**-Si(CH₃)**).

- **IR**: [cm⁻¹]: 3344, 3254, 2951, 2928, 2857, 1651, 1597, 1570, 1507, 1470, 1463, 1388, 1349, 1309, 1295, 1251, 1214, 1194, 1166, 1112, 1092, 1073, 1032, 1006, 957, 935, 906, 834, 778, 705, 682, 637, 608, 552, 495.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 514.2431, gef.: 514.2344 [M+H]⁺.

Synthese von 2-Chlor-2'-desoxyadenosin (Cladribin) **24**

Die Reaktion wurde nach AAV **4** durchgeführt. 1.05 g (2.04 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Chlor-3',5'-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyadenosin **101** wurde in 30 mL Dichlormethan gelöst und mit 3.99 mL (24.5 mmol, 12 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 530 mg (1.86 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC**: R_f-Wert (EtOAc/MeOH 9:1 v/v): 0.25.

- **¹H-NMR**: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8.35 (s, 1H, **8-H**), 7.81 (s, 2H, **NH₂**), 6.26 (dd, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.31 (d, $^3J_{H,H} = 4.2$ Hz, 1H, **5'-OH**), 4.95 (t, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, 1H, **3'-OH**), 4.42 - 4.35 (m, 1H, **3'-H**), 3.86 (td, $^3J_{H,H} = 4.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 3.64 - 3.56 (m, 1H, **5'-Ha**), 3.55 - 3.47 (m, 1H, **5'-Hb**), 2.64 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.28 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.2$ Hz, 1H, **2'-Hb**).

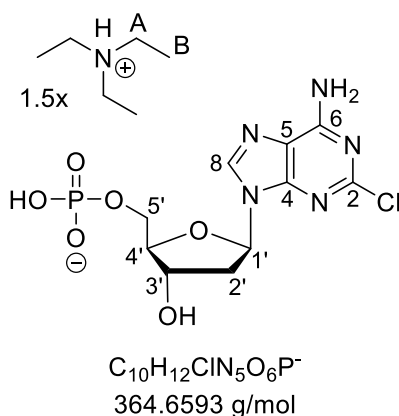
- **¹³C-NMR**: δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 157.2 (**C-6**), 153.3 (**C-2**), 150.4 (**C-4**), 140.2 (**C-8**), 118.5 (**C-5**), 88.3 (**C-4'**), 83.9 (**C-1'**), 71.1 (**C-3'**), 62.0 (**C-5'**), 40.3 (**C-2'**).

- **IR:** [cm^{-1}]: 3544, 3391, 3261, 3208, 1649, 1596, 1572, 1506, 1476, 1447, 1396, 1351, 1303, 1254, 1224, 1190, 1179, 1095, 1052, 1001, 969, 940, 929, 889, 867, 855, 827, 786, 749, 675, 570, 533, 518, 497, 481.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 286.0701, gef.: 286.0843 [M+H]⁺.

2-Chlor-2'-desoxyadenosin-5'-monophosphat (CdA-MP) 102

Die Reaktion wurde nach AAV **6** (Variante B) durchgeführt. Es wurden 40.2 mg (140 μmol , 1.0 Äquiv.) 2-Chlor-2'-desoxyadenosin **24** in 3 mL Trimethylphosphat suspendiert. Nach Kühlen auf 0 °C wurden 70.0 μL (280 μmol , 2.0 Äquiv.) Tributylamin und 30.0 μL (280 μmol , 2.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid zugegeben und für vier Stunden gerührt. Das Rohprodukt wurde mehrfach mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt. Die erste Chromatographie wurde mit einem Triethylammoniumbicarbonat-Puffer/Acetonitril Gradienten durchgeführt, während die zweite mit Wasser/Acetonitril erfolgte.



Ausbeute: 41.2 mg (86.0 μmol , 63 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.47 (s, 1H, **8-H**), 6.41 (dd, ³*J*_{H,H} = 7.6 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.1 Hz, 1H, **1'-H**), 4.64 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.9 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.9 Hz, 1H, **3'-H**), 4.15 - 4.12 (m, 1H, **4'-H**), 4.09 - 3.99 (m, 2H, **5'-H**), 3.07 (q, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 9H, **A-H**), 2.74 (ddd, ²*J*_{H,H} = 13.5 Hz, ³*J*_{H,H} = 7.6 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.8 Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.44 (ddd, ²*J*_{H,H} = 13.5 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.2 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.25 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 14H, **B-H**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 158.0 (**C-6**), 155.3 (**C-2**), 151.7 (**C-4**), 141.3 (**C-8**), 119.0 (**C-5**), 88.2 (d, ³*J*_{C,P} = 8.6 Hz, **C-4'**), 85.4 (**C-1'**), 73.0 (**C-3'**), 66.0 (d, ²*J*_{C,P} = 5.1 Hz, **C-5'**), 47.4 (**C-A**), 41.5 (**C-2'**), 9.4 (**C-B**).

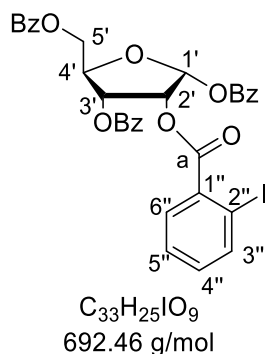
- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, MeOH-*d*₄): 1.32.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 364.0219, gef.: 364.0347 [M+H]⁺.

5.6.9 Synthese von Fludarabin-5'-Monophosphat (2FaraA-MP) 103

Synthese von 2'-O-(2-Iodbenzoyl)-1',3',5'-tri-O-benzoyl- α -D-ribofuranosid 114

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 3.96 g (8.55 mmol, 1.0 Äquiv.) 1',3',5'-tri-O-benzoyl- α -D-ribofuranosid **108** in 40 mL abs. Pyridin gelöst. 1.80 mL (3.47 g, 13.0 mmol, 1.5 Äquiv.) 2-Iodbenzoylchlorid wurden in 10 mL abs. THF gelöst und tropfenweise bei Raumtemperatur zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck schloss sich die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc 5:1 \rightarrow 4:1 v/v) an.



Ausbeute: 4.56 g (6.59 mmol, 77 %) eines farblosen Schaums.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 5:1 v/v): 0.37.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 8.11 - 7.99 (m, 6H, **Bz-ortho**), 7.97 (m, 1H, **3''-H**), 7.73 - 7.67 (m, 3H, **Bz-para**), 7.60-7.55 (m, 3H, **4''-H**, **5''-H**, **6''-H**), 7.25 - 7.19 (m, 6H, **Bz-meta**), 6.90 (d, $^3J_{H,H} = 4.4$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.92 (dd, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.4$ Hz, 1H, **3'-H**), 5.82 (dd, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 4.4$ Hz, 1H, **2'-H**), 5.02 (td, $^3J_{H,H} = 3.9$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.3$ Hz, 1H, **4'-H**), 4.70 - 4.64 (m, 2H, **5'-Ha**, **5'-Hb**).

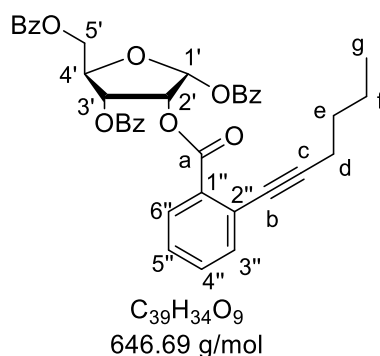
- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (125 MHz, DMSO- d_6): 165.8, 165.4, 164.9, 164.5 (**C-a**, 3x **C=O**), 141.8 (**C-3''**), 134.4, 134.3, 134.2, 134.0 (**C-4''**, 3x **Bz-C-para**), 133.0, 129.6, 129.4, 129.3 (**C-1''**, 3x **Bz-C-quart.**), 131.1, 129.8, 129.7, 129.3, 129.1, 129.1, 128.3 (3x **Bz-C-ortho**, 3x **Bz-C-meta**, **C-5''**, **C-6''**), 95.6 (**C-2''**), 94.9 (**C-1'**), 82.4 (**C-4'**), 72.0 (**C-2'**), 70.7 (**C-3'**), 64.4 (**C-5'**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3061, 2108, 1716, 1600, 1582, 1562, 1491, 1450, 1429, 1378, 1314, 1240, 1176, 1136, 1092, 1065, 1011, 952, 870, 803, 739, 704, 684, 637, 616, 594, 534, 456.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 715.0435, gef.: 715.0455 [M+Na]⁺.

Synthese von 2'-O-(2-Hexinylbenzoyl)-1',3',5'-tri-O-benzoyl- α -D-ribo-furanosid 112

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 6.25 g (9.03 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-O-(2-Iodbenzoyl)-1',3',5'-tri-O-benzoyl- α -D-ribofuranosid **114**, 91.2 mg (0.48 mmol, 0.05 Äquiv.) Kupferiodid und 0.32 g (0.45 mmol, 0.05 Äquiv.) Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid in 60 mL abs. THF und abs. Triethylamin (1:3 v/v) gelöst. Unter Rühren wurden bei Raumtemperatur 1.3 mL (0.94 g, 11.4 mmol, 1.3 Äquiv.) 1-Hexin tropfenweise zugefügt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch 12 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und nach Trocknen über Natriumsulfat schloss sich die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc 8:1 → 4:1 v/v) an.



Ausbeute: 5.21 g (8.06 mmol, 89 %) eines orangefarbenen Sirups.

- **DC:** R_f-Wert (PE/EtOAc 8:1 v/v): 0.38.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8.11 - 7.98 (m, 6H, **Bz-ortho**), 7.73 - 7.54 (m, 6H, **Bz-meta**), 7.52 - 7.48 (m, 2H, **3''-H, 5''-H**), 7.48 - 7.42 (m, 4H, **Bz-para, 4''-H**), 7.14 - 7.11 (m, 1H, **6''-H**), 6.88 (d, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, **1'-H**), 5.89 (dd, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, **3'-H**), 5.80 (dd, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, **2'-H**), 5.01 (td, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, **4'-H**), 4.66 - 4.67 (m, 2H, **5'-Ha, 5'-Hb**), 2.30 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, **d-H**), 1.44 - 1.32 (m, 4H, **e-H, f-H**), 0.84 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, **g-H**).

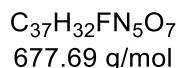
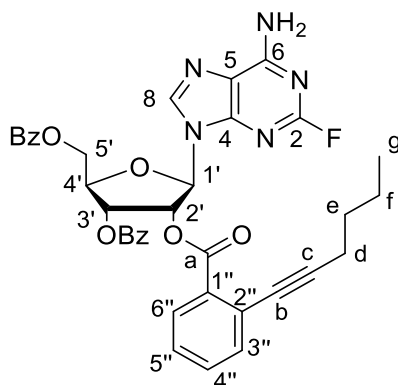
- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (125 MHz, DMSO-*d*₆): 165.8, 165.4, 164.9, 163.9 (**C-a**, 3x **C=O**), 134.4, 134.3, 134.2, 134.0 (**C-4''**, 3x **Bz-C-para**), 130.3, 129.6, 129.4, 129.3 (**C-1''**, 3x **Bz-C-quart.**), 133.0, 129.9, 129.7, 129.7, 129.7, 129.6, 129.2, 129.1, 127.7 (3x **Bz-C-ortho**, 3x **Bz-C-meta, C3'', C-5'', C-6''**), 96.9 (**C-2''**), 95.0 (**C-1'**), 82.3 (**C-4'**), 78.9 (**C-b**), 71.6 (**C-2'**), 70.8 (**C-3'**), 64.4 (**C-5'**), 30.3 (**C-e**), 21.7 (**C-f**), 19.0 (**C-d**), 13.8 (**C-g**).

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3062, 2956, 2871, 1718, 1600, 1583, 1565, 1484, 1450, 1377, 1314, 1260, 1241, 1176, 1137, 1093, 1065, 1017, 955, 871, 803, 755, 705, 616, 600, 535, 469.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 669.2095, gef.: 669.2063 [M+Na]⁺.

Synthese von 2-Fluor-2'-O-(2-hexinylbenzoyl)-3',5'-di-O-benzoyl-adenosin 111

Unter Stickstoff als Inertgas wurde eine Suspension aus 957 mg (6.25 mmol, 1.2 Äquiv.) 2-Fluoradenin **107** in 60 mL abs. Acetonitril mit 5.10 mL (4.24 g, 20.8 mmol, 4.0 Äquiv.) Bis(trimethylsilyl)acetamid versetzt. Die Lösung wurde 30 Minuten bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3.36 g (5.20 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-O-(2-Hexinylbenzoyl)-1',3',5'-*tri*-O-benzoyl- α -D-ribofuranosid **112**, gelöst in 20 mL abs. Acetonitril, zur Reaktionslösung gegeben. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurde diese tropfenweise mit 3.80 mL (4.68 g, 21.1 mmol, 4.1 Äquiv.) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch 3 Stunden bei 80 °C gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde die Reaktionslösung zu gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck schloss sich die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1 v/v) an.



Ausbeute: 2.83 g (4.18 mmol, 80 %) eines gelblichen Schaums.

- **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/MeOH 50:1 v/v): 0.49.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, DMSO-*d*₆): 8.26 (s, 1H, **8-H**), 7.84 - 7.80 (m, 4H, **Bz-ortho**), 7.69 - 7.67 (m, 1H, **6''-H**), 7.53 - 7.50 (m, 2H, **Bz-para**), 7.41 (td, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.4 Hz, 1H, **3''-H**), 7.36 - 7.30 (m, 5H, **Bz-meta, 5-H**), 7.22 (td, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.4 Hz, 1H, **4''-H**), 6.32 (d, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, **1'-H**), 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ⁴J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, **2'-H**), 6.09 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **3'-H**), 4.67 - 4.64 (m, 1H, **4'-H**), 4.61 - 4.50 (m, 2H, **5'-Ha, 5'-Hb**), 2.15 (td, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 2H, **d-H**), 1.27 - 1.15 (m, 4H, **e-H, f-H**), 0.67 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, **g-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 165.9, 165.1, 164.5 (**C-a**, 2x **C=O**), 159.8 (**C-2**), 158.5 (**C-6**), 158.4 (**C-4**), 158.2 (**C-8**), 134.6, 134.3, 134.0 (**C-4''**, 2x **Bz-C-para**), 140.9, 130.7, 129.9, 129.7, 129.2, 129.1, 128.1 (2x **Bz-C-ortho**, 2x **Bz-C-meta**, **C3''**, **C-5''**, **C-6''**), 130.4, 129.6, 129.1 (**C-1''**, 2x **Bz-C-quart.**), 124.3 (**C-5**), 96.9 (**C-c**), 86.5 (**C-1'**), 79.6 (**C-4'**), 79.2 (**C-b**), 73.8 (**C-2'**), 70.8 (**C-3'**), 63.7 (**C-5'**), 30.5 (**C-e**), 21.8 (**C-f**), 19.0 (**C-d**), 13.9 (**C-g**).

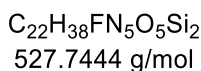
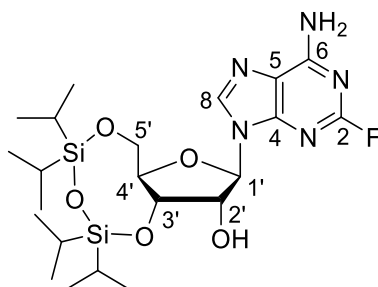
- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): -51.2.

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3318, 3180, 2959, 2097, 1848, 1722, 1642, 1600, 1550, 1533, 1483, 1450, 1371, 1314, 1262, 1177, 1089, 1067, 1025, 845, 790, 756, 707, 638, 534, 462, 422, 413, 397, 388.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 700.2178, gef.: 700.2174 [M+Na]⁺.

Synthese von 2-Fluoro-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxandiyl]-adenosin 117

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 825 mg (2.89 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Fluoradenosin **106** zusammen mit 35.6 mg (289 μmol , 0.1 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin in 30 mL abs. DMF suspendiert. Anschließend wurden tropfenweise 1.11 mL (3.47 mmol, 1.2 Äquiv.) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen die organische Phase einmal mit verdünnter Salzsäurelösung (1 mol/L) gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen. Nach erneutem Extrahieren der wässrigen Phase mit Dichlormethan wurden die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EtOAc 1:2 v/v).



Ausbeute: 1.35 g (2.55 mmol, 88 %) eines farblosen kristallinen Feststoffs.

- **DC**: R_f -Wert (PE/EtOAc 1:2 v/v): 0.29.

- **¹H-NMR**: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8.18 (s, 1H, **8-H**), 7.92 (s, 1H, **NH₂**), 7.81 (s, 1H, **NH₂**), 5.79 (d, ³*J*_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, **1'-H**), 5.63 (d, ³*J*_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, **2'-OH**), 4.70 (dd, ³*J*_{H,H} = 8.7 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, **3'-H**), 4.53 - 4.48 (m, 1H, **2'-H**), 4.04 (dd, ²*J*_{H,H} = 12.8 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.98 (dt, ³*J*_{H,H} = 8.7 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.0 Hz, 1H, **4'-H**), 3.92 (dd, ²*J*_{H,H} = 12.9 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, **5'-Hb**), 1.08 - 0.97 (m, 24H, **-SiC(CH₃)₃**).

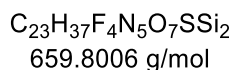
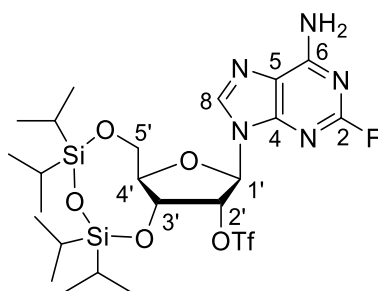
- **¹³C-NMR**: δ [ppm] (150 MHz, DMSO-*d*₆): 159.0 (d, ¹*J*_{C,F} = 204 Hz, **C-2**), 158.1 (d, ³*J*_{C,F} = 21.4 Hz, **C-6**), 150.3 (d, ³*J*_{C,F} = 20.3 Hz, **C-4**), 140.1 (**C-8**), 118.2 (d, ⁴*J*_{C,F} = 3.8 Hz, **C-5**), 89.9 (**C-1'**), 81.2 (**C-4'**), 73.8 (**C-2'**), 70.2 (**C-3'**), 61.2 (**C-5'**), 17.8, 17.7, 17.6, 17.6, 17.5, 17.4, 17.3 (**-SiC(CH₃)₃**), 13.2, 12.9, 12.7, 12.5 (**-SiC(CH₃)₃**).

- **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3362, 3341, 3315, 3280, 3166, 3153, 2944, 1890, 2867, 2230, 2165, 2041, 1687, 1643, 1608, 1588, 1492, 1464, 1354, 1274, 1248, 1203 1160, 1121, 1059, 1033, 987, 909, 883, 854, 811, 789, 777, 729, 694, 645, 599, 569, 560, 549, 475, 466, 450, 439, 425.

- **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 528.2468, gef.: 528.2676 [M+H]⁺.

Synthese von 2-Fluoro-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxandiyl]-2'-O-trifluormethansulfonyl-adenosin **118**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.01 g (3.79 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Fluoro-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxandiyl]adenosin **117** in 80 mL abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3.42 mL (10.6 mmol, 2.8 Äquiv.) abs. Pyridin und die tropfenweise Zugabe von 0.83 mL (4.93 mmol, 1.3 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid. Nach Rühren für drei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen und die wässrige Phase einmal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und anschließend die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Alle organischen Phasen wurden abschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 3:1 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 2.01 g (3.05 mmol, 76 %) eines rötlichen, kristallinen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 3:1 v/v): 0.34.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.22 (s, 1H, **8-H**), 7.98 (s, 1H, **NH₂**), 7.92 (s, 1H, **NH₂**), 6.42 (s, 1H, **1'-H**), 6.02 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, 1H, **2'-H**), 5.22 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.09 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.03 - 3.93 (m, 2H, **4'-H**, **5'-Hb**), 1.15 – 0.95 (m, 24H, **-SiC(CH₃)₃**).

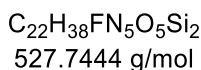
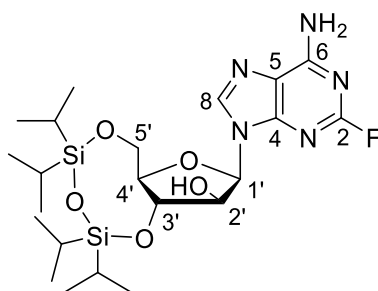
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 159.1 ($^1J_{\text{C,F}} = 201$ Hz, **C-2**), 154.5 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 21.9$ Hz, **C-6**), 145.0 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 20.3$ Hz, **C-4**), 140.2 (**C-8**), 117.3 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 3.8$ Hz, **C-5**), 89.4 (**C-2'**), 85.8 (**C-1'**), 80.3 (**C-4'**), 68.6 (**C-3'**), 60.4 (**C-5'**), 17.2, 17.1, 17.1, 17.0, 16.7, 16.7, 16.6 (**-SiC(CH₃)₃**), 12.5, 12.3, 12.2, 12.1 (**-SiC(CH₃)₃**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3286, 3154, 2946, 2869, 1688, 1647, 1613, 1568, 1493, 1465, 1422, 1379, 1353, 1325, 1278, 1246, 1205, 1168, 1142, 1123, 1079, 1040, 1026, 979, 965, 922, 884, 857, 844, 789, 771, 752, 731, 695, 665, 643, 613, 585, 559, 509, 496, 451, 437.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 660.1961, gef.: 660.2214 [M+H]⁺.

Synthese von 2-Fluor-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxanediyl]-arabinosyladenosin 116

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.01 g (3.05 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Fluor-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxanediyl]-2'-O-trifluormethansulfonyladenosin **118** zusammen mit 1.29 g (15.2 mmol, 5.0 Äquiv.) Kaliumnitrit und 80.6 mg (305 μmol , 0.1 Äquiv.) 18-Krone-6 in 50 mL abs. DMF gelöst und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 1:2 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 1.09 g (2.06 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 1:2 v/v): 0.35.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.01 (s, 1H, **8-H**), 7.91 (s, 1H, **NH₂**), 7.78 (s, 1H, **NH₂**), 6.08 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.80 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, 1H, **2'-OH**), 4.55 - 4.45 (m, 2H, **2'-H**, **3'-H**), 4.10 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.92 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 3.83 - 3.74 (m, 1H, **4'-H**), 1.14 - 0.99 (m, 24H, **-SiC(CH₃)₃**).

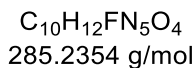
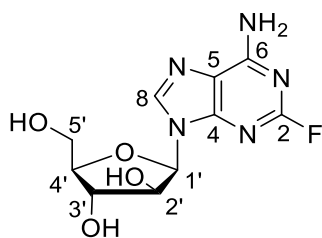
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 158.6 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 194.7$ Hz, **C-2**), 157.5 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 12.5$ Hz, **C-6**), 150.8 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 20.4$ Hz, **C-4**), 139.7 (**C-8**), 117.0 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 4.2$ Hz, **C-5**), 82.1 (**C-1'**), 79.6 (**C-4'**), 74.8 (**C-2'**), 74.7 (**C-3'**), 61.4 (**C-5'**), 17.4, 17.2, 17.0, 16.9, 16.8, 16.8 (**-SiC(CH₃)₃**), 12.8, 12.4, 12.2, 12.0 (**-SiC(CH₃)₃**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3326, 3165, 2944, 2867, 1651, 1607, 1586, 1492, 1464, 1364, 1271, 1249, 1218, 1203, 1158, 1093, 1054, 1031, 950, 920, 883, 861, 790, 769, 729, 693, 600, 579, 542, 517, 485, 458, 423, 410.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 528.2468, gef.: 528.2691 [M+H]⁺.

Synthese von 2-Fluor-arabinosyladenosin (Fludarabin) 25

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 217 mg (411 μmol , 1.0 Äquiv.) 2-Fluor-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxandiyl]arabinosyladenosin **116** gelöst in 10 mL Dichlormethan wurde mit 0.80 mL (2.47 mmol, 12 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt und für 24 h gerührt. Das Rohprodukt wurden zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) und anschließend mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



Ausbeute: 82.8 mg (291 μmol , 71 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v): 0.20.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.17 (s, 1H, **8-H**), 7.78 (s, 2H, **NH₂**), 6.10 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.62 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 1H, **2'-OH**), 5.51 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, **3'-OH**), 5.06 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, 1H, **5'-OH**), 4.15 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.11 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 3.77 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, 1H, **4'-H**), 3.67 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.63 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, **5'-Hb**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 159.0 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 202.8$ Hz, **C-2**), 157.9 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 21.5$ Hz, **C-6**), 151.2 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 17.5$ Hz, **C-4**), 141.0 (**C-8**), 117.1 (**C-5**), 84.5 (**C-4'**), 84.1 (**C-1'**), 76.0 (**C-2'**), 75.1 (**C-3'**), 61.2 (**C-5'**).

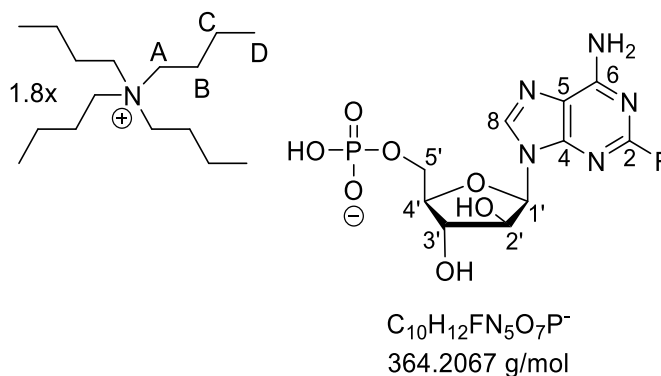
- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): -52.49.

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3311, 3119, 2945, 2869, 1674, 1618, 1576, 1525, 1489, 1463, 1357, 1344, 1277, 1249, 1225, 1201, 1164, 1092, 1080, 1052, 996, 911, 883, 836, 804, 789, 730, 696, 678, 597, 513, 491, 466, 450, 418.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 286.2429, gef.: 286.2432 [M+H]⁺.

Synthese von Fludarabin-5'-monophosphat (2FaraA-MP) 103

Die Reaktion wurde nach AAV **6** (Variante B) durchgeführt. Es wurden 45.7 mg (158 μmol , 1.0 Äquiv.) Fludarabin **25** in 3 mL Trimethylphosphat gelöst. Nach Kühlen auf 0 °C wurden 80.0 μL (316 μmol , 2.0 Äquiv.) Tributylamin und 35.0 μL (316 μmol , 2.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid zugegeben und für vier Stunden gerührt. Das Rohprodukt wurde mehrfach mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt, wobei das Rohprodukt in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer (pH = 6.0, 2 mmol/L) aufgenommen wurde, um das Monophosphat mit Tetra-*n*-butylammoniumionen zu erhalten.



Ausbeute: 41.2 mg (86.0 μ mol, 63 %) eines farblosen Feststoffs.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.44 (s, 1H, **8-H**), 6.23 (d, $^3J_{H,H} = 4.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.52 (t, $^3J_{H,H} = 4.6$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.22 (t, $^3J_{H,H} = 4.7$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.13 (dd, $^3J_{H,H} = 6.0$, $^3J_{P,H} = 4.5$ Hz, 2H, **5'-H**), 4.03 - 3.98 (m, 1H, **4'-H**), 3.26 - 3.20 (m, 15H, **A-H**), 1.70 - 1.61 (m, 15H, **B-H**), 1.41 (h, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 15H, **C-H**), 1.02 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 22H, **D-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 160.5 (d, $^1J_{C,F} = 208.4$ Hz, **C-2**), 158.8 (d, $^3J_{C,F} = 20.2$ Hz, **C-6**), 152.2 (d, $^3J_{C,F} = 19.4$ Hz, **C-4**), 143.0 (**C-8**), 117.7 (**C-5**), 85.9 (**C-1'**), 85.2 (d, $^3J_{C,P} = 8.2$ Hz, **C-4'**), 77.4 (**C-2'**), 76.6 (**C-3'**), 64.4 (d, $^2J_{C,P} = 4.6$ Hz, **C-5'**), 59.8 (**C-A**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 13.9 (**C-D**).

- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): 4.20.

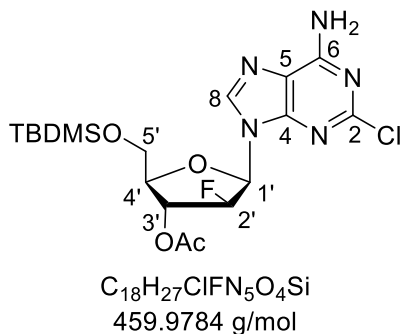
- **^{19}F -NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -53.94.

- **HRMS (ESI $^-$, m/z):** ber.: 364.0464, gef.: 364.0599 [M] $^-$.

5.6.10 Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat (ClFaraA-MP) 120

Synthese von 3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilylclofarabin 122

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante B) durchgeführt. 2.00 g (6.59 mmol, 1.0 Äquiv.) Clofarabin **26** wurden in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 1.19 g (7.92 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 3.80 mL (40.2 mmol, 6.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 2:1 → 3:2 v/v) gereinigt.



Ausbeute: 2.61 g (5.68 mmol, 86 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_f -Wert (PE/EtOAc 2:1 v/v): 0.24.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.18 (d, $^3J_{H,H} = 2.4$ Hz, 1H, **8-H**), 7.95 (s, 2H, **NH₂**), 6.32 (dd, $^3J_{H,H} = 15.8$ Hz, $^4J_{H,H} = 4.3$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.62 - 5.52 (m, 1H, **2'-H**), 5.52 - 5.46 (m, 1H, **3'-H**), 4.12 (q, $^3J_{H,H} = 4.6$ Hz, 1H, **4'-H**), 3.94 - 3.85 (m, 2H, **5'-H**), 2.16 - 2.10 (m, 3H, **-OAc**), 0.88 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.06 (s, 6H, **-Si(CH₃)₂**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 170.1 (**q-OAc**), 156.8 (**C-6**), 153.4 (**C-2**), 150.1 (**C-4**), 141.1 (**C-8**), 117.5 (**C-5**), 93.0 (d, $^2J_{C,F} = 194.3$ Hz, **C-2'**), 81.6 (d, $^3J_{C,F} = 15.3$ Hz, **C-1'**), 80.5 (**C-4'**), 74.4 (d, $^2J_{C,F} = 27.1$ Hz, **C-3'**), 62.0 (**C-5'**), 25.7 (**OAc**), 20.6 (**OAc**), 17.9 (**-SiC(CH₃)₃**), -5.5 (**-Si(CH₃)₂**).

- **^{19}F -NMR:** δ [ppm] (565 MHz, DMSO- d_6): -197.4.

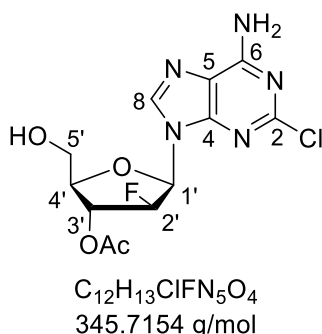
- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3319, 3164, 2953, 2930, 2884, 2857, 1749, 1644, 1592, 1575, 1507, 1462, 1432, 1347, 1304, 1212, 1177, 1143, 1094, 1035, 940, 919, 897, 833, 812, 777, 681, 637, 602, 553, 485.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 460.1583, gef.: 460.1567 [M+H]⁺.

Synthese von 3'-O-acetylclofarabin 121

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 2.58 g (5.62 mmol, 1.0 Äquiv.) 3'-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilylclofarabin **122** wurden in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 5.50 mL (33.8 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene

Rohprodukt wurde mehrfach säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v, EtOAc) gereinigt.



Ausbeute: 1.65 g (4.78 mmol, 85 %) eines farblosen Feststoffs.

- **DC:** R_F-Wert (EtOAc): 0.33.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.29 (d, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, **8-H**), 7.92 (s, 2H, **NH₂**), 6.34 (dd, ³J_{H,H} = 17.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 4.1 Hz, 1H, **1'-H**), 5.53 - 5.46 (m, 1H, **2'-H**), 5.45 - 5.42 (m, 1H, **3'-H**), 5.15 (t, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, **5'-OH**), 4.08 (q, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, **4'-H**), 3.74 - 3.73 (m, 2H, **5'-H**), 2.13 (s, 3H, **-OAc**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 169.6 (**q-OAc**), 156.8 (**C-6**), 153.4 (**C-2**), 150.1 (**C-4**), 140.1 (**C-8**), 117.2 (**C-5**), 93.0 (d, ¹J_{C,F} = 197 Hz, **C-2'**), 82.0 (d, d, ²J_{C,F} = 17.0 Hz, **C-1'**), 81.4 (d, ³J_{C,F} = 2.9 Hz, **C-4'**), 75.0 (d, ²J_{C,F} = 28.0 Hz, **C-3'**), 60.3 (**C-5'**), 20.6 (**OAc**).

- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, DMSO-*d*₆): -197.4.

- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3304, 3142, 2990, 2931, 1743, 1661, 1592, 1574, 1514, 1474, 1428, 1376, 1349, 1306, 1273, 1219, 1182, 1121, 1087, 1069, 1044, 1013, 949, 921, 885, 866, 834, 810, 788, 763, 726, 681, 630, 600, 551, 511, 486, 468.

- **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 346.0718, gef.: 346.0725 [M+H]⁺.

Synthese von Clofarabin-5'-monophosphat 120

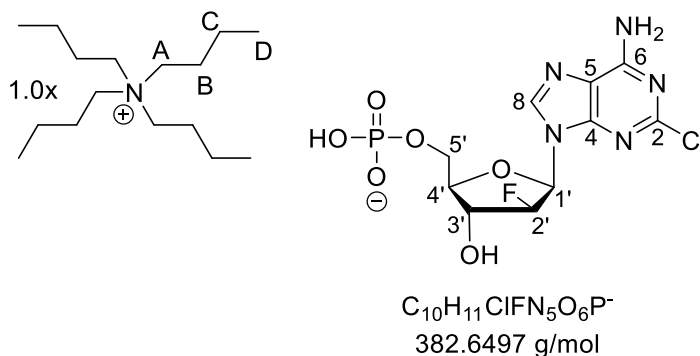
Variante A:

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante B) durchgeführt. Es wurden 210 mg (692 μmol, 1.0 Äquiv.) Clofarabin **26** in 5 mL Trimethylphosphat suspendiert. Nach Kühlen auf 0 °C wurden 0.33 mL (1.38 mmol, 2.0 Äquiv.) Tributylamin und 130 μL (1.38 mmol, 2.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt, wobei das Rohprodukt in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer (pH = 6.0, 2 mmol/L) aufgenommen wurde, um das Monophosphat mit Tetra-*n*-butylammoniumionen zu erhalten.

Variante B:

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante A) durchgeführt. Zur Phosphorylierung wurden 201 mg (0.58 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-O-Acetylclofarabin **121** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 677 mg (1.30 mmol, 2.2 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylamino-phosphoramidit **60** versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3.38 mL (0.85 mmol, 1.2 Äquiv.) 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril). Die Oxidation erfolgte mit 0.26 mL (1.40 mmol, 2.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in n-Decan). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Zur Entschützung wurde das geschützte Monophosphat in 15 mL Wasser/Methanol/Triethylamin (1:1:1 v/v/v) aufgenommen und für 48 h gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



Ausbeute: 284 mg (454 μ mol, 66 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.34 (d, ⁴*J*_{H,H} = 2.1 Hz, 1H, **8-H**), 6.41 (dd, ³*J*_{H,F} = 15.1 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.2 Hz, 1H, **1'-H**), 5.15 (dt, ²*J*_{H,F} = 52.2 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.8 Hz, 1H, **2'-H**), 4.62 (dt, ³*J*_{H,F} = 17.9 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, **3'-H**), 4.17 - 4.08 (m, 3H, **4'-H, 5'-H**), 3.26 - 3.18 (m, 8H, **A-H**), 1.71 - 1.58 (m, 8H, **B-H**), 1.40 (h, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 8H, **C-H**), 1.01 (t, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 12H, **D-H**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 158.1 (**C-6**), 155.5 (**C-2**), 151.7 (**C-4**), 139.6 (**C-8**), 118.4 (**C-5**), 97.3 (C-2'), 93.0 (d, ¹*J*_{C,F} = 197 Hz, **C-2'**), 82.0 (d, d, ²*J*_{C,F} = 17.0 Hz, **C-1'**), 81.4 (d, ³*J*_{C,F} = 2.9 Hz, **C-4'**), 75.0 (d, ²*J*_{C,F} = 28.0 Hz, **C-3'**), 60.3 (**C-5'**), 58.1 (**C-A**), 23.4 (**C-B**), 19.3 (**C-C**), 12.4 (**C-D**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): 3.14.

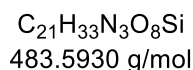
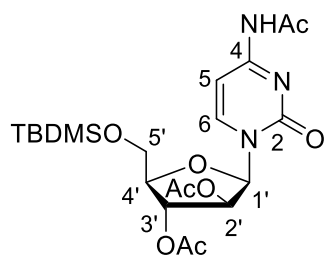
- **¹⁹F-NMR:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH-*d*₄): -199.6.

- **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 382.0119, gef.: 382.0119 [M].

5.6.11 Synthese von Cytarabin-5'-monophosphat 125

Synthese von 2',3'-O-Diacetyl-N-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilylarabinosylcytosin 127

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. 1.65 g (6.76 mmol, 1.0 Äquiv.) Cytarabin **22** wurden in 20 mL abs. Pyridin suspendiert und 1.22 g (8.12 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 6.39 mL (67.6 mmol, 10.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 1:2 v/v → EtOAc) gereinigt.



Ausbeute: 2.84 g (6.17 mmol, 87 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.9 (s, 1H, **NH**), 8.09 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **C-6**), 7.25 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **C-5**), 6.24 (d, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 1H, **1'-H**), 5.52 (dd, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, **2'-H**), 5.24 (dd, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, ³J_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, **3'-H**), 4.14 (dt, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, ³J_{H,H} = 4.1 Hz, 1H, **4'-H**), 3.91 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, 1H, **5'-Ha**), 3.83 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**), 2.08 (s, 3H, **-OAc**), 1.85 (s, 3H, **NHAc**), 0.89 (s, 9H, **-SiC(CH₃)₃**), 0.09 (s, 3H, **-SiC(CH₃)₂**), 0.08 (s, 3H, **-SiC(CH₃)₂**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, DMSO-*d*₆): 171.1 (**q-NHAc**), 169.5 (**q-OAc**), 168.4 (**q-OAc**), 162.6 (**C-4**), 154.0 (**C-2**), 145.0 (**C-6**), 95.0 (**C-5**), 83.9 (**C-1'**), 81.0 (**C-4'**), 74.3 (**C-3'**), 74.2 (**C-2'**), 61.5 (**C-5'**), 25.7 (**OAc**), 24.4 (**OAc**), 20.5 (**NHAc**), 20.1 (**-SiC(CH₃)₃**), 18.0 (**-SiC(CH₃)₃**), -5.5 (**-Si(CH₃)**), -5.6 (**-Si(CH₃)**).

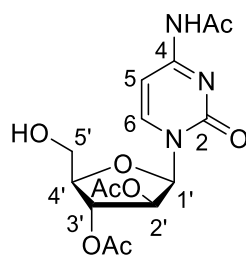
- **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3117, 3038, 2930, 2856, 1753, 1717, 1662, 1610, 1557, 1488, 1438, 1403, 1370, 1331, 1308, 1232, 1222, 1207, 1189, 1144, 1112, 1089, 1069, 1045, 1027, 1004, 961, 936, 924, 904, 888, 833, 814, 793, 778, 722, 702, 674, 656, 623, 600, 555, 508, 487, 446, 423.

- **HRMS (ESI⁺, m/z):** ber.: 484.2110, gef.: 484.2216 [M].

Synthese von 2',3'-O-Diacetyl-N-acetylarabinosylcytosin 126

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. 2.97 g (6.14 mmol, 1.0 Äquiv.) 2',3'-O-Diacetyl-N-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilylarabinosylcytosin **127** wurden in 50 mL abs.

Dichlormethan gelöst und mit 6.00 mL (36.8 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin Trihydrofluorid versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 15:1 v/v) gereinigt.



C₁₅H₁₉N₃O₈
369.3300 g/mol

Ausbeute: 2.04 g (5.52 mmol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.9 (s, 1H, **NHAc**), 8.21 (d, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, **6-H**), 7.25 (d, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, **5-H**), 6.20 (d, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, **1'-H**), 5.41 (dd, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, ³J_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, **2'-H**), 5.26 - 5.05 (m, 2H, **3'-H**, **5'-OH**), 4.09 (dt, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.1 Hz, 1H, **4'-H**), 3.77 - 3.68 (m, 1H, **5'-Ha**), 3.63 (dt, ²J_{H,H} = 11.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**), 2.10 (s, 3H, **-OAc**), 1.86 (s, 3H, **OAc**).

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, DMSO-*d*₆): 171.1 (**q-NHAc**), 169.5 (**q-OAc**), 168.5 (**q-OAc**), 162.6 (**C-4**), 154.0 (**C-2**), 145.8 (**C-6**), 95.0 (**C-5**), 84.4 (**C-1'**), 82.3 (**C-4'**), 75.1 (**C-3'**), 74.1 (**C-2'**), 60.1 (**C-5'**), 24.4 (**OAc**), 20.6 (**OAc**), 20.2 (**OAc**).

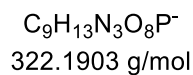
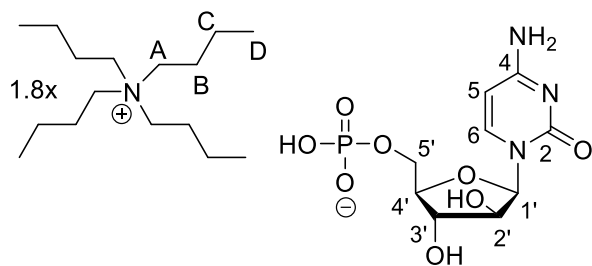
- IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3410, 3234, 3080, 3039, 2931, 2857, 1750, 1711, 1656, 1613, 1560, 1489, 1443, 1395, 1370, 1310, 1212, 1143, 1106, 1055, 1005, 962, 935, 898, 830, 799, 785, 751, 704, 671, 634, 599, 590, 549, 509, 493, 452, 422.

- HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 370.1245, gef.: 370.1393 [M+H]⁺.

Synthese von Cytarabin-5'-monophosphat (araC-MP) 125

Variante B:

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante B) durchgeführt. Es wurden 640 mg (2.63 mmol, 1.0 Äquiv.) Cytarabin **22** in 5 mL Trimethylphosphat suspendiert. Nach Kühlen auf 0 °C wurde 0.36 mL (3.95 mmol, 1.5 Äquiv.) Phosphorylchlorid zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt, wobei das Rohprodukt in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer (pH = 6.0, 2 mmol/L) aufgenommen wurde, um das Monophosphat mit Tetra-*n*-butylammoniumionen zu erhalten.



Ausbeute: 938 mg (2.01 mmol, 76 %) eines farblosen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, D_2O): 8.02 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, **6-H**), 6.23 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, 1H, **1'-H**), 6.12 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **5-H**), 4.41 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.13 - 3.96 (m, 3H, **4'-H**, **5'-H**), 3.29 - 3.12 (m, 19H, **A-H**), 1.76 - 1.56 (m, 19H, **B-H**), 1.45 - 1.29 (m, 19H, **C-H**), 0.96 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 28H, **D-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, D_2O): 166.2 (**C-4**), 157.5 (**C-2**), 143.0 (**C-6**), 95.6 (**C-5**), 85.4 (**C-1'**), 82.0 (**C-4'**), 75.4 (**C-3'**), 74.3 (**C-2'**), 62.3 (**C-5'**), 58.1 (**C-A**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**).

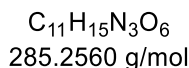
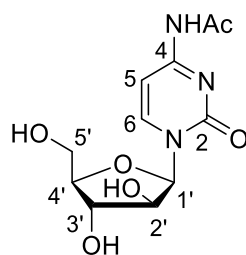
- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (162 MHz, D_2O): 3.80.

- **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 322.0446, gef.: 322.0453 [M] $^-$.

7.6.12 Synthese von *N*-Acetylcytarabin-5'-monophosphat (Ac-araC-MP) 132

Synthese von *N*-Acetylarabinosylcytosin 133

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.02 g (4.11 mmol, 1.0 Äquiv.) Cytarabin **22** in 20 mL abs. DMF suspendiert und tropfenweise 0.47 mL (4.93 mmol, 1.2 Äquiv.) Essigsäureanhydrid bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach Rühren für 16 Stunden bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand einmal mit Methanol und einmal mit Toluol coevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde in Diethylether/Methanol (8:1) kristallisiert.



Ausbeute: 1.04 g (3.65 mmol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

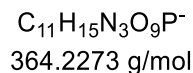
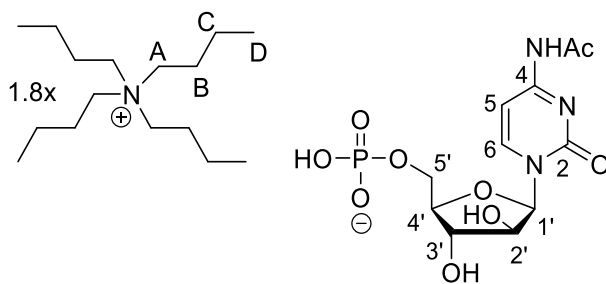
- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 10.83 (s, 1H, **NHAc**), 8.05 (d, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 1H, **6-H**), 7.18 (d, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 1H, **5-H**), 6.05 (d, $^3J_{H,H} = 3.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.51 - 5.46 (m, 2H, **2'-OH, 3'-OH**), 5.06 (t, $^3J_{H,H} = 5.5$ Hz, 1H, **5'-OH**), 4.06 (td, $^3J_{H,H} = 4.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.3$ Hz, 1H, **2'-H**), 3.92 (dt, $^3J_{H,H} = 4.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.7$ Hz, 1H, **3'-H**), 3.82 (td, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 3.64 - 3.58 (m, 2H, **5'-H**), 2.10 (s, 3H, **OAc**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 171.3 (**q-NHAc**), 162.5 (**C-4**), 154.9 (**C-2**), 147.1 (**C-6**), 94.6 (**C-5**), 87.3 (**C-1'**), 86.1 (**C-4'**), 76.5 (**C-3'**), 75.0 (**C-2'**), 61.4 (**C-5'**), 24.7 (**OAc**).

- **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3290, 3235, 3134, 2946, 2877, 2790, 1726, 1707, 1634, 1613, 1570, 1491, 1435, 1391, 1315, 1272, 1246, 1209, 1182, 1114, 1084, 1067, 1043, 1023, 1004, 966, 938, 916, 858, 803, 793, 781, 717, 675, 626, 601, 554, 455, 429.

Synthese von Cytarabin-5'-Monophosphat (araC-MP) 125

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** (Variante B) durchgeführt. Es wurden 130 mg (0.46 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Acetyl-cytarabin **132** in 5 mL Trimethylphosphat suspendiert. Nach Kühlen auf 0 °C wurde 0.12 mL (1.37 mmol, 3.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid zugegeben und für eine Stunde gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt, wobei das Rohprodukt in Tetra-*n*-butylammoniumacetat-Puffer (pH = 6.0, 2 mmol/L) aufgenommen wurde, um das Monophosphat mit Tetra-*n*-butylammoniumionen zu erhalten.



Ausbeute: 243 mg (199 μmol , 62 %) eines farblosen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 8.31 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **6-H**), 7.45 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 1H, **5-H**), 6.23 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.30 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.20 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.18 – 4.06 (m, 3H, **4'-H**, **5'-H**), 3.30 - 3.19 (m, 15H, **A-H**), 2.18 (s, 3H, **-NHAc**), 1.76 - 1.56 (m, 19H, **B-H**), 1.45 - 1.29 (m, 19H, **C-H**), 0.96 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 28H, **D-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 172.8 (**q-NHAc**), 164.1 (**C-4**), 153.0 (**C-2**), 148.2 (**C-6**), 97.2 (**C-5**), 88.2 (**C-1'**), 85.7 (**C-4'**), 77.4 (**C-3'**), 76.7 (**C-2'**), 59.6 (**C-5'**), 58.1 (**C-A**), 24.9 (**OAc**), , 20.7 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 13.9 (**C-D**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, D_2O): 3.72.

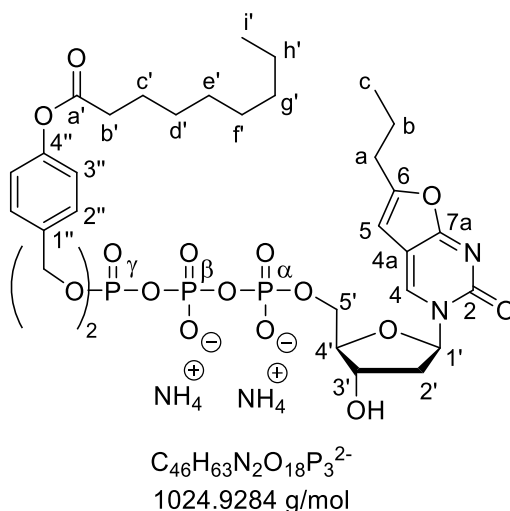
- **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 364.0551, gef.: 364.0679 [M] $^-$.

5.6.13 Synthese von dBCNA-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-2'-desoxy-BCNA-5'-triphosphat **30a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 202 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 90.1 mg (0.67 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 272 mg (0.30 mmol, 89 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung gelöst, in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.35 mL (0.53 g, 2.52 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.56 mL (0.41 g, 4.04 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.35 mL (0.26 g, 2.52 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.12 mL (0.12 g, 1.51 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 120 mg (0.25 mmol, 0.8 Äquiv.) dBCNA-5'-monophosphat **50** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 113 mg (0.11 mmol, 42 %) eines farblosen Pulvers.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.88 (s, 1H, **4-H**), 7.41 - 7.36 (m, 4H, **2''-H**), 7.06 - 7.02 (m, 4H, **3''-H**), 6.57 (s, 1H, **5-H**), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.21 - 5.12 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.54 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.39 - 4.34 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.36 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.15 - 4.10 (m, 1H, **4'-H**), 2.61 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 2H, **a-H**), 2.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b'-H**), 2.55 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.25 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.78 - 1.66 (m, 6H, **b-H, c'-H**), 1.49 - 1.42 (m, 4H, **d'-H**), 1.42 - 1.32 (m, 16H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H**), 0.99 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.93 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **i'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.3 (**C-a'**), 171.6 (**C-7a**), 159.1 (**C-6**), 155.4 (**C-2**), 150.9 (**C-4''**), 137.4 (**C-4**), 133.5 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.8$ Hz, **C-4'**), 129.0 (**C-2''**), 121.4 (**C-3''**), 108.5 (**C-4a**), 100.4 (**C-5**), 88.1 (**C-1'**), 86.6 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 9.0$ Hz, **4'-H**), 69.6 (**C-3**), 68.9 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.3$ Hz, **Ph-CH₂**), 64.6 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.3$ Hz, **C-5'**), 40.9 (**C-2'**), 33.6 (**C-b'**), 29.5 (**C-a**), 24.6 (**C-c'**), 31.6, 29.0, 28.9, 28.8, 22.3 (**C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**), 20.0 (**C-b**), 13.0 (**C-i'**), 12.5 (**C-c**).

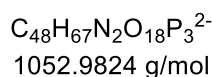
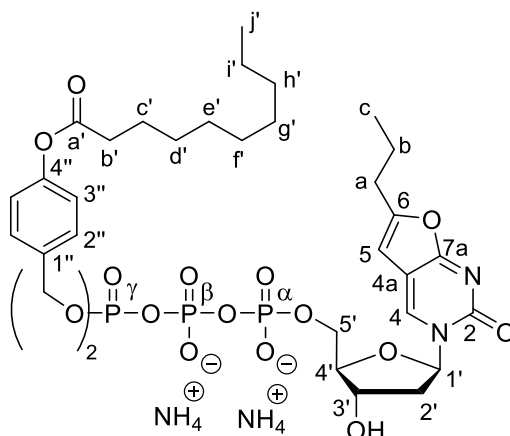
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.34 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.0$ Hz, **P- α**), -12.95 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 14.7$ Hz, **P- γ**), -23.25 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 18.2$ Hz, **P- β**).

- HRMS (MALDI⁻, m/z): ber.: 1025.3372, gef.: 1025.1460 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-decanoyloxybenzyl)-2'-desoxy-BCNA-5'-triphosphat **30b**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 200 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)phosphonat **40b** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 89.1 mg (0.67 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 258 mg (0.27 mmol, 81 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.29 mL (0.44 g, 2.10 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.47 mL (0.34 g, 3.37 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.29 mL (0.21 g, 2.10 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.10 mL (0.10 g, 1.26 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 99.0 mg (0.21 mmol, 0.8 Äquiv.) dBCNA-5'-monophosphat **50** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 92.8 mg (86.6 μ mol, 41 %) einer farblosen Watte.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.88 (s, 1H, **4-H**), 7.42 - 7.36 (m, 4H, **2''-H**), 7.08 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.58 (s, 1H, **5-H**), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.21 - 5.12 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.57 - 4.52 (m, 1H, **3'-H**), 4.36 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 11.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.6$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.30 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.16 - 4.11 (m, 1H, **4'-H**), 2.64 - 2.52 (m, 6H, **a-H**, **b'-H**), 2.56 - 2.52 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.28 - 2.22 (m, 1H, **2'-Hb**), 1.79 - 1.68 (m, 6H, **b-H**, **c'-H**), 1.48 - 1.41 (m, 4H, **d'-H**), 1.42 - 1.28 (m, 20H, **e'-H**, **f'-H**, **g'-H**, **h'-H**, **i'-H**), 1.00 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.93 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **j'-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, MeOH- d_4): 172.3 (**C-a'**), 171.6 (**C-7a**), 159.1 (**C-6**), 155.4 (**C-2**), 150.9 (**C-4''**), 137.4 (**C-4**), 133.5 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.8$ Hz, **C-4'**), 129.0 (**C-2''**), 121.4 (**C-3''**), 108.5 (**C-4a**), 100.4 (**C-5**), 88.1 (**C-1'**), 86.6 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 9.0$ Hz, **4'-H**), 69.6 (**C-3**), 68.9 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.3$ Hz, **Ph-CH₂**), 64.6 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.3$ Hz, **C-5'**), 40.9 (**C-2'**), 33.6 (**C-b'**), 29.5 (**C-a**), 24.6 (**C-c'**), 31.5, 29.0, 28.9, 28.8, 28.8, 22.3 (**C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**), 20.0 (**C-b**), 13.0 (**C-j'**), 12.5 (**C-c**).

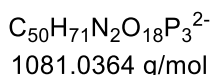
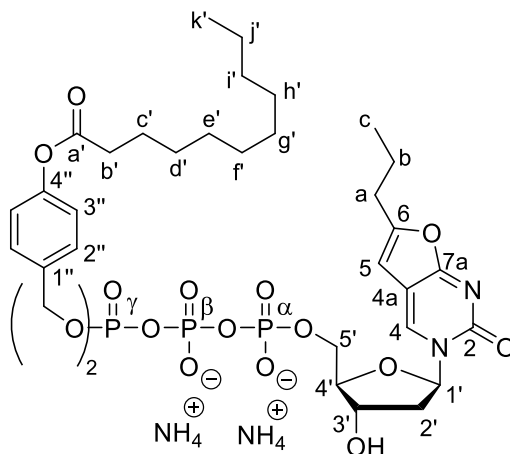
- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -10.95 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 18.7$ Hz, **P- α**), -12.61 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 15.1$ Hz, **P- γ**), -22.73 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 17.3$ Hz, **P- β**).

- **HRMS (MALDI⁻, m/z):** ber.: 1053.3685, gef.: 1053.1670 [M].

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-2'-desoxy-BCNA-5'-triphosphat **30c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 200 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 94.5 mg (0.68 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 272 mg (0.26 mmol, 81 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.29 mL (0.44 g, 2.10 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.47 mL (0.34 g, 3.37 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.29 mL (0.21 g, 2.10 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.10 mL (0.10 g, 1.26 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 102 mg (0.21 mmol, 0.8 Äquiv.) dBCNA-5'-monophosphat **50** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 65.9 mg (60.0 μmol , 29 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 8.88 (s, 1H, **4-H**), 7.41 - 7.35 (m, 4H, **2''-H**), 7.07 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.57 (s, 1H, **5-H**), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.21 - 5.12 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.57 - 4.52 (m, 1H, **3'-H**), 4.39 - 4.34 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.31 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.15 - 4.10 (m, 1H, **4'-H**), 2.61 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **a-H**), 2.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b'-H**), 2.57 - 2.53 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.25 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **b-H**), 1.70 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **c'-H**), 1.48 - 1.41 (m, 4H, **d'-H**), 1.41 - 1.28 (m, 24H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H, i'-H, j'-H**), 0.99 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.93 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **k'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 172.3 (**C-a'**), 171.6 (**C-7a**), 159.1 (**C-6**), 155.4 (**C-2**), 150.9 (**C-4''**), 137.4 (**C-4**), 133.5 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.8$ Hz, **C-4'**), 129.0 (**C-2''**), 121.4 (**C-3''**), 108.5 (**C-4a**), 100.4 (**C-5**), 88.1 (**C-1'**), 86.6 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.9$ Hz, **4'-H**), 69.6 (**C-3**), 68.9 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.5$ Hz, **Ph-CH₂**), 64.6 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.5$ Hz, **C-5'**), 40.9 (**C-2'**), 33.6 (**C-b'**), 29.5 (**C-a**), 24.6 (**C-c'**), 31.7, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8 (**C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j'**), 20.0 (**C-b**), 13.0 (**C-k'**), 12.5 (**C-c**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): -11.14 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 18.9$ Hz, **P- α**), -12.75 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.2$ Hz, **P- γ**), -22.97 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 17.9$ Hz, **P- β**).

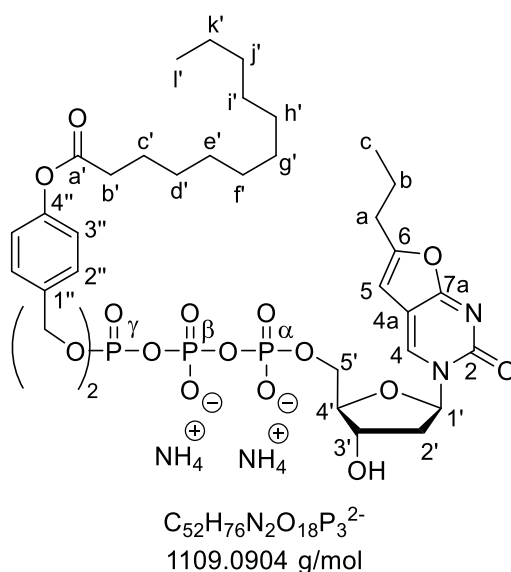
- **HRMS** (MALDI⁺, m/z): ber.: 1081.3998, gef.: 1081.2172 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-2'-desoxy-BCNA-5'-triphosphat **30d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 204 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 92.3 mg (0.68 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt

wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 267 mg (0.27 mmol, 80 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.27 mL (0.41 g, 1.94 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.43 mL (0.31 g, 3.10 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.27 mL (0.20 g, 1.94 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.09 mL (95.3 mg, 1.16 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 92.0 mg (0.19 mmol, 0.8 Äquiv.) dBCNA-5'-monophosphat **50** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: mg (60.0 μ mol, 35 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.88 (s, 1H, **4-H**), 7.41 - 7.35 (m, 4H, **2''-H**), 7.07 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.58 (s, 1H, **5-H**), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.20-5.12 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.57 - 4.52 (m, 1H, **3'-H**), 4.38 - 4.34 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.31 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.15 - 4.10 (m, 1H, **4'-H**), 2.61 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **a-H**), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b'-H**), 2.57 - 2.52 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.24 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.75 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **b-H**), 1.70 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **c'-H**), 1.49 - 1.42 (m, 4H, **d'-H**), 1.42 - 1.26 (m, 28H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H, i'-H, j'-H, k'-H**), 0.99 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.92 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, MeOH- d_4): 172.3 (**C-a'**), 171.6 (**C-7a**), 159.1 (**C-6**), 155.4 (**C-2**), 150.9 (**C-4''**), 137.4 (**C-4**), 133.5 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.8$ Hz, **C-4'**), 129.0 (**C-2''**), 121.4 (**C-3''**), 108.5 (**C-4a**), 100.4 (**C-5**), 88.1 (**C-1'**), 86.6 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.9$ Hz, **4'-H**), 69.6 (**C-3**), 68.9 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.5$ Hz, **Ph-CH₂**), 64.6 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.5$ Hz, **C-5'**), 40.9 (**C-2'**), 33.6 (**C-b'**), 29.5 (**C-a**), 24.6

(**C-c'**), 31.7, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8, 28.8 (**C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**), 20.0 (**C-b**), 13.0 (**C-l'**), 12.5 (**C-c**).

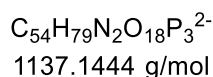
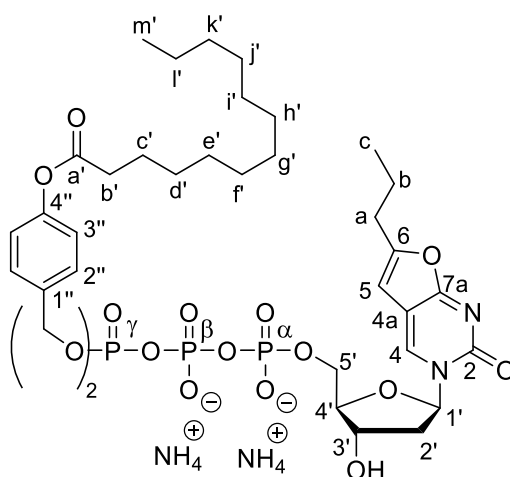
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.10 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.1$ Hz, **P- α**), -12.71 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.3$ Hz, **P- γ**), -22.90 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 17.8$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (MALDI $^-$, m/z): ber.: 1109.4311, gef.: 1109.2121 [M] $^-$.

Synthese von γ -Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)-2'-desoxy-BCNA-5'-triphosphat **30e**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 202 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)phosphonat **40e** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 90.6 mg (0.68 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 210 mg (0.21 mmol, 61 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.29 mL (0.43 g, 2.05 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.45 mL (0.33 g, 3.30 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.28 mL (0.21 g, 2.05 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.10 mL (101 mg, 1.23 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 68.2 mg (0.14 mmol, 0.7 Äquiv.) dBCNA-5'-monophosphat **50** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 60.5 mg (52.4 μmol , 37 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.88 (s, 1H, **4-H**), 7.41 - 7.35 (m, 4H, **2''-H**), 7.07 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.58 (s, 1H, **5-H**), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.21 - 5.12 (m,

4H, **Ph-CH₂**), 4.57 - 4.52 (m, 1H, **3'-H**), 4.38 - 4.33 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.31 (ddd, $^2J_{H,H} = 11.7$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.1$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.15 - 4.11 (m, 1H, **4'-H**), 2.61 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **a-H**), 2.59 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 4H, **b'-H**), 2.57 - 2.53 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.25 (dt, $^2J_{H,H} = 13.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.75 (p, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 4H, **b-H**), 1.70 (h, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **c'-H**), 1.49 - 1.42 (m, 4H, **d'-H**), 1.42 - 1.26 (m, 28H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H, i'-H, j'-H, k'-H, l'-H**), 0.99 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.92 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **m'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, MeOH-*d*₄): 172.3 (**C-a'**), 171.6 (**C-7a**), 159.1 (**C-6**), 155.4 (**C-2**), 150.9 (**C-4''**), 137.4 (**C-4**), 133.5 (d, $^3J_{C,P} = 7.8$ Hz, **C-4'**), 129.0 (**C-2''**), 121.4 (**C-3''**), 108.5 (**C-4a**), 100.4 (**C-5**), 88.1 (**C-1'**), 86.6 (d, $^3J_{C,P} = 8.9$ Hz, **4'-H**), 69.6 (**C-3**), 68.9 (d, $^3J_{C,P} = 5.5$ Hz, **Ph-CH₂**), 64.6 (d, $^2J_{C,P} = 6.5$ Hz, **C-5'**), 40.9 (**C-2'**), 33.6 (**C-b'**), 29.5 (**C-a**), 24.6 (**C-c'**), 31.7, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8, (**C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j', C-k', C-l'**), 20.0 (**C-b**), 13.0 (**C-m'**), 12.5 (**C-c**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.05 (d, $^2J_{P,P} = 18.6$ Hz, **P- α**), -12.69 (d, $^2J_{P,P} = 15.8$ Hz, **P- γ**), -22.86 (t, $^2J_{P,P} = 17.6$ Hz, **P- β**).

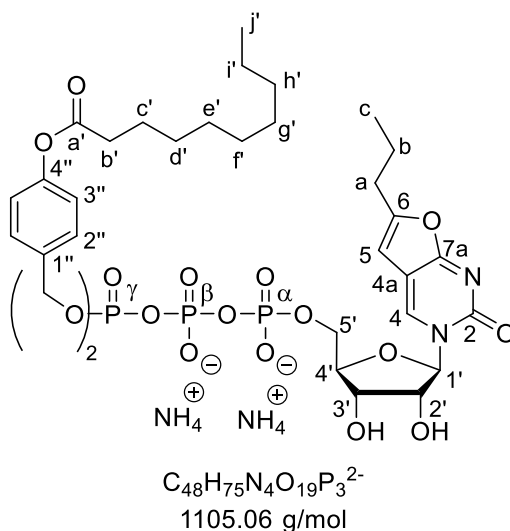
- **HRMS** (MALDI⁺, m/z): ber.: 1137.4624, gef.: 1137.2730 [M].

5.6.14 Synthese von BCNA-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-decanoyloxybenzyl)-BCNA-5'-triphosphat **31b**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 202 mg (0.47 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)phosphonat **40b** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 124 mg (0.93 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.90 mL (1.16 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 429 mg (0.46 mmol, 98 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.63 mL (4.55 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 1.01 mL (7.28 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.63 mL (4.55 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.22 mL (2.73 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 156 mg (0.32 mmol, 0.7 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **51** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 204 mg (185 μ mol, 58 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.94 (s, 1H, **4-H**), 7.38 - 7.33 (m, 4H, **2''-H**), 7.04 - 6.98 (m, 4H, **3''-H**), 6.57 - 6.53 (m, 1H, **5-H**), 5.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.19 - 5.09 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.51 - 4.45 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, $^2J_{\text{H,P}} = 2.3$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.41 - 4.36 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, $^2J_{\text{H,P}} = 2.1$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.33 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 4.25 - 4.20 (m, 1H, **3'-H**), 4.17 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **2'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 6H, **b'-H, a-H**), 1.76 - 1.70 (m, 4H, **c'-H**), 1.70 - 1.63 (m, 2H, **b-H**), 1.47 - 1.40 (m, 4H, **d'-H**), 1.40 - 1.25 (m, 20H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H, i'-H**), 0.96 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.91 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **j'-H**).

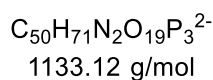
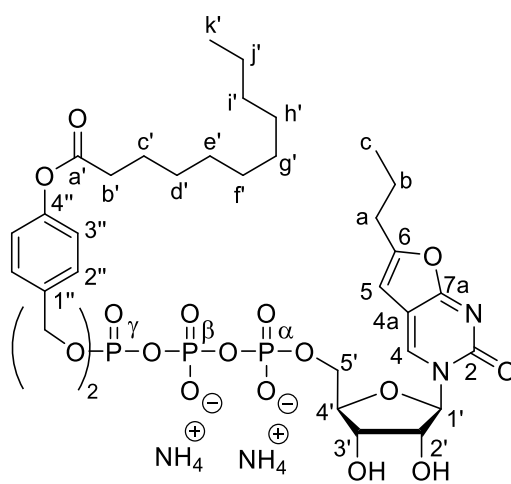
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a'**), 173.1 (**C-7a**), 160.6 (**C-6**), 157.1 (**C-2**), 152.3 (**C-4''**), 139.0 (**C-4**), 134.9 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.1$ Hz, **C-1''**), 130.4 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 110.0 (**C-4a**), 101.9 (**C-5**), 93.6 (**C-1'**), 84.4 (**C-3'**), 77.0 (**C-2'**), 70.4 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.1$ Hz, **Ph-CH₂**), 69.3 (**C-4'**), 65.2 ($^2J_{\text{C,P}} = 5.9$ Hz, **C-5'**), 35.3 (**C-b'**), 30.6 (**C-a**), 26.0 (**C-c'**), 21.3 (**C-b**), 33.1, 30.9, 30.4, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**), 14.5 (**C-j'**), 13.9 (**C-c**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.84 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.0$ Hz, **P- α**), -13.27 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1$ Hz, **P- γ**), -23.94 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1$ Hz, **P- β**).

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-BCNA-5'-triphosphat **31c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 320 mg (0.51 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 136 mg (1.02 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.17 mL (1.16 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 389 mg (0.41 mmol, 79 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.56 mL (4.02 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.89 mL (6.43 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.56 mL (4.02 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.19 mL (2.41 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 152 mg (0.31 mmol, 0.7 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **51** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 91.2 mg (80.5 μmol , 26 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.96 (s, 1H, **4-H**), 7.38 - 7.32 (m, 4H, **2''-H**), 7.04 - 6.99 (m, 4H, **3''-H**), 6.56 (s, 1H, **5-H**), 5.99 (d, ³J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, **1'-H**), 5.21 - 5.06 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.50 - 4.45 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.40 - 4.35 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.34 (dd, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, **4'-H**), 4.24 - 4.20 (m, 1H, **3'-H**), 4.17 (dd, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, ³J_{H,H} = 2.1 Hz, 1H, **2'-H**), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 6H, **b'-H, a-H**), 1.76 - 1.70 (m, 4H, **c'-H**), 1.70 - 1.62 (m, 2H, **b-H**), 1.49 - 1.40 (m, 4H, **d'-H**), 1.40 - 1.24 (m, 24H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H, i'-H, j'-H**), 0.96 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, **c-H**), 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 6H, **k'-H**).

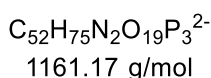
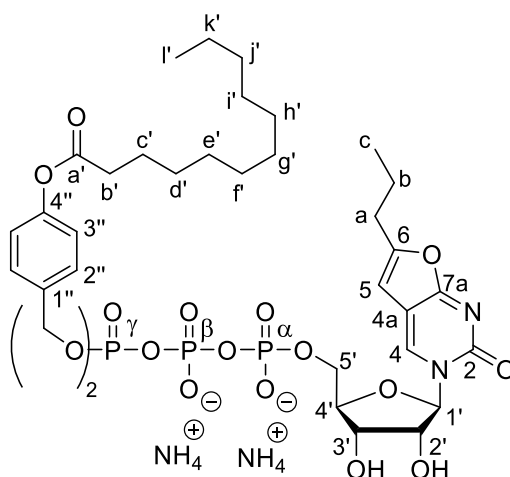
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 173.7 (**C-a'**), 173.1 (**C-7a**), 160.7 (**C-6**), 157.3 (**C-2**), 152.8 (**C-4''**), 139.0 (**C-4**), 134.8 (**C-1''**), 130.4 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 110.0 (**C-4a**), 101.9 (**C-5**), 93.6 (**C-1'**), 84.3 (**C-3'**), 77.1 (**C-2'**), 70.4 (d, ²J_{C,P} = 5.8 Hz, **Ph-CH₂**), 69.3 (**C-4'**), 65.1 (²J_{C,P} = 5.9 Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b'**), 30.6 (**C-a**), 26.5 (**C-c'**), 21.3 (**C-b**), 33.1, 30.9, 30.7, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j'**), 14.5 (**C-k'**), 13.9 (**C-c**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.67 (d, ²J_{P,P} = 20.0 Hz, **P-α**), -13.18 (d, ²J_{P,P} = 17.1 Hz, **P-γ**), -23.70 (t, ²J_{P,P} = 17.1 Hz, **P-β**).

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-BCNA-5'-triphosphat **31d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 331 mg (0.50 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 134 mg (1.00 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.14 mL (1.23 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 350 mg (0.35 mmol, 70 %) eines gelblichen Harzes.

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.49 mL (3.51 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.78 mL (5.62 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.49 mL (3.51 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.17 mL (2.11 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 103 mg (0.21 mmol, 0.6 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **51** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 81.0 mg (69.8 μmol , 33 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 8.96 (s, 1H, **4-H**), 7.38 - 7.31 (m, 4H, **2''-H**), 7.04 - 6.98 (m, 4H, **3''-H**), 6.56 (s, 1H, **5-H**), 5.99 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.19 - 5.09 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.50 - 4.44 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.38 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.34 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 4.25 - 4.20 (m, 1H, **3'-H**), 4.17 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **2'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 6H, **b'-H, a'-H**), 1.77 - 1.70 (m, 4H, **c'-H**), 1.70 - 1.63 (m, 2H, **b-H**), 1.46 - 1.40 (m, 4H, **d'-H**), 1.40 - 1.23 (m, 28H, **e'-H, f'-H, g'-H, h'-H, i'-H, j'-H, k'-H**), 0.96 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 174.2 (**C-a'**), 173.2 (**C-7a**), 160.8 (**C-6**), 157.1 (**C-2**), 151.8 (**C-4''**), 139.1 (**C-4**), 135.0 (**C-1''**), 130.4 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 109.9 (**C-4a**), 101.9 (**C-5**), 93.6 (**C-1'**), 84.4 (**C-3'**), 77.1 (**C-2'**), 70.4 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, **Ph-CH₂**), 69.3 (**C-4'**), 64.9 ($^2J_{\text{C,P}} = 5.9$ Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b'**), 30.6 (**C-a**), 26.0 (**C-c'**), 21.3 (**C-b**), 33.1, 30.9, 30.8, 30.7, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-d', C-e', C-f', C-g', C-h', C-i', C-j', C-k'**), 14.5 (**C-l'**), 13.9 (**C-c**).

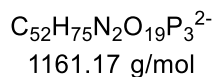
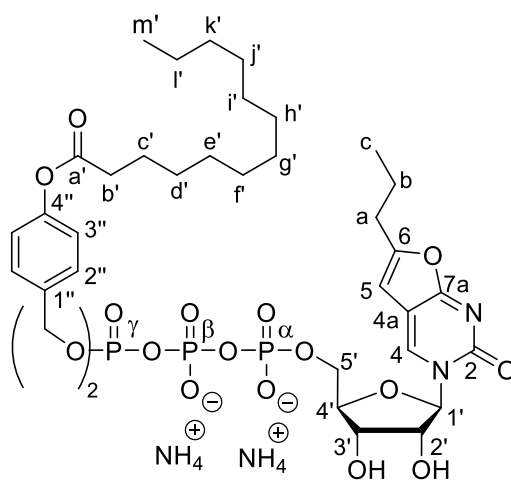
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): -11.76 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.6$ Hz, **P- α**), -13.26 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.83 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1$ Hz, **P- β**).

Synthese von γ -Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)-BCNA-5'-triphosphat **31e**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 448 mg (0.65 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)phosphonat **40e** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 174 mg (1.30 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 4.08 mL (1.63 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt

wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 463 mg (0.45 mmol, 69 %) eines gelblichen Harzes.

Die Synthese des TriPPP-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.63 mL (4.52 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 1.00 mL (7.23 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.63 mL (4.52 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.21 mL (2.71 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 133 mg (0.21 mmol, 0.6 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **51** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugegeben und für dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 51.0 mg (42.9 μmol , 16 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 8.97 (s, 1H, **4-H**), 7.37 - 7.31 (m, 4H, **2''-H**), 7.02 - 6.98 (m, 4H, **3''-H**), 6.57 (s, 1H, **5-H**), 5.99 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.18 - 5.09 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.50 - 4.45 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.41 - 4.37 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.35 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 4.24 - 4.20 (m, 1H, **3'-H**), 4.17 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **2'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 6H, **b'-H**, **a-H**), 1.77 - 1.69 (m, 4H, **c'-H**), 1.69 - 1.62 (m, 2H, **b-H**), 1.47 - 1.40 (m, 4H, **d'-H**), 1.40 - 1.24 (m, 28H, **e'-H**, **f'-H**, **g'-H**, **h'-H**, **i'-H**, **j'-H**, **k'-H**, **l'-H**), 0.96 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l'-H**).

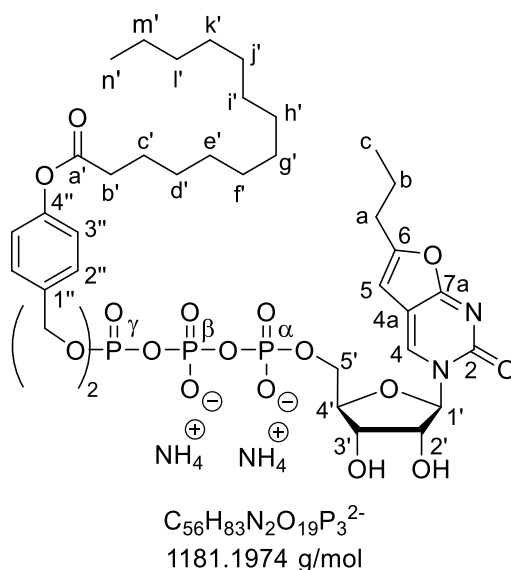
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 173.9 (**C-a'**), 173.2 (**C-7a**), 160.5 (**C-6**), 156.9 (**C-2**), 151.4 (**C-4''**), 139.1 (**C-4**), 134.9 (**C-1''**), 130.4 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 110.1 (**C-4a**), 101.9 (**C-5**), 93.6 (**C-1'**), 84.4 (**C-3'**), 77.1 (**C-2'**), 70.4 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.8$ Hz, **Ph-CH₂**), 69.3 (**C-4'**), 65.3 ($^2J_{\text{C,P}} = 5.9$ Hz, **C-5'**), 35.4 (**C-b'**), 30.6 (**C-a**), 26.0 (**C-c'**), 21.3 (**C-b**), 33.1, 30.9, 30.8, 30.8, 30.7, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**), 14.5 (**C-m'**), 13.9 (**C-c**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.82 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.3$ Hz, **P- α**), -13.22 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.85 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 19.1$ Hz, **P- β**).

Synthese von γ -Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)-BCNA-5'-triphosphat **31f**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 410 mg (0.57 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)phosphonat **40f** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 153 mg (1.15 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.58 mL (1.43 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 508 mg (0.48 mmol, 84 %) eines gelblichen Harzes.

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AVV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.67 mL (4.83 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 1.07 mL (7.72 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.67 mL (4.83 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.23 mL (2.90 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 119 mg (0.24 mmol, 0.5 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **51** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 87.4 mg (72.0 μmol , 30 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.97 (s, 1H, **4-H**), 7.37 - 7.31 (m, 4H, **2''-H**), 7.02 - 6.98 (m, 4H, **3''-H**), 6.57 (s, 1H, **5-H**), 5.99 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.18 - 5.09 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.50 - 4.45 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.41 - 4.37 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.35 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, **4'-H**), 4.24 - 4.20 (m, 1H, **3'-H**), 4.17 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **2'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 6H, **b'-H**, **a-H**), 1.77 - 1.69 (m, 4H, **c'-H**), 1.69 - 1.62 (m, 2H, **b-**

H), 1.47 - 1.40 (m, 4H, **d'-H**), 1.40 - 1.24 (m, 28H, **e'-H**, **f'-H**, **g'-H**, **h'-H**, **i'-H**, **j'-H**, **k'-H**, **l'-H**, **m'-H**), 0.96 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **n'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a'**), 173.1 (**C-7a**), 160.1 (**C-6**), 157.5 (**C-2**), 152.3 (**C-4''**), 139.1 (**C-4**), 134.9 (**C-1''**), 130.4 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 110.0 (**C-4a**), 101.9 (**C-5**), 93.6 (**C-1'**), 84.3 (**C-3'**), 77.1 (**C-2'**), 70.4 (d, $^2J_{C,P} = 5.8$ Hz, **Ph-CH₂**), 69.3 (**C-4'**), 65.1 ($^2J_{C,P} = 5.9$ Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b'**), 30.6 (**C-a**), 26.0 (**C-c'**), 21.4 (**C-b**), 33.1, 30.9, 30.8, 30.8, 30.5, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-d'**, **C-e'**, **C-f'**, **C-g'**, **C-h'**, **C-i'**, **C-j'**, **C-k'**, **C-l'**, **C-m'**), 14.5 (**C-n'**), 13.9 (**C-c**).

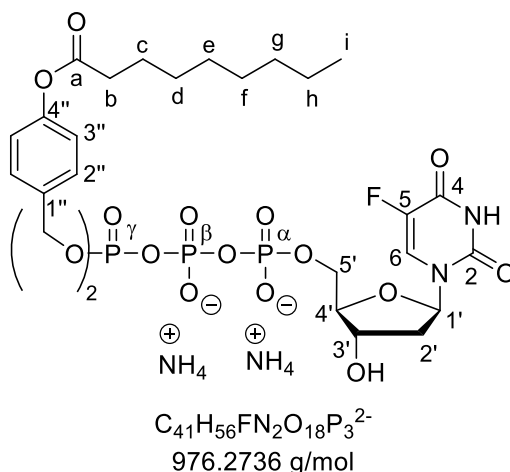
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.79 (d, $^2J_{P,P} = 20.1$ Hz, **P- α**), -13.26 (d, $^2J_{P,P} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.86 (t, $^2J_{P,P} = 18.6$ Hz, **P- β**).

5.6.15 Synthese von FdU-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-FdU-5'-triphosphat **32a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 320 mg (0.56 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 149 mg (1.11 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.48 mL (1.39 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 436 mg (0.48 mmol, 86 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.65 mL (4.67 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 1.03 mL (7.47 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.65 mL (4.67 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.22 mL (2.80 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 99.7 mg (0.23 mmol, 0.5 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 114 mg (113 μ mol, 48 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.05 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.6$ Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.37 (m, 4H, **2''-H**), 7.05 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.25 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.9$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.56 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.25 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.20 - 4.14 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.02 - 3.99 (m, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b-H**), 2.25 - 2.16 (m, 2H, **2'-H**), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 4H, **c-H**), 1.45 - 1.38 (m, 4H, **d-H**), 1.38 - 1.25 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **i'-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.3 (**C-a**), 157.4 (**C-4**), 150.9 (**C-4''**), 149.3 (**C-2**), 133.8 (**C-1''**), 129.0 (**C-2''**), 124.9 ($^2J_{\text{C,F}} = 34.5$ Hz, **C-6**), 124.2 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 188.3$ Hz, **C-5**),

121.4 (**C-3''**), 86.2 (**C-4'**), 85.1 (**C-1'**), 70.9 (**C-3'**), 69.0 (**Ph-CH₂**), 65.3 (**C-5'**), 39.1 (**C-2'**), 33.6 (**C-b**), 29.0 (**C-d**), 24.6 (**C-c**), 31.6, 28.9, 28.8, 23.4 (**C-e, C-f, C-g, C-h**), 13.0 (**C-i**).

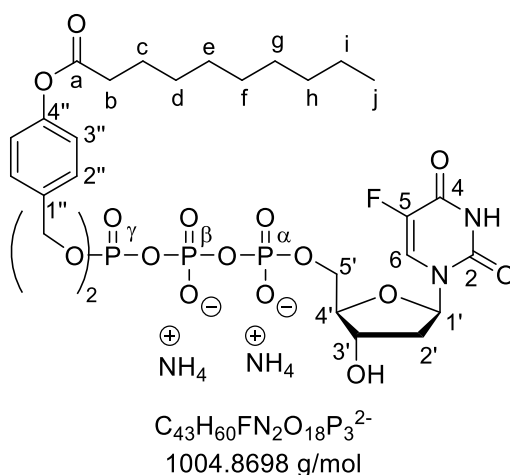
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.67 (d, ²J_{P,P} = 19.9 Hz, **P-α**), -13.30 (d, ²J_{P,P} = 17.8 Hz, **P-γ**), -23.77 (t, ²J_{P,P} = 18.8 Hz, **P-β**).

- ¹⁹F-NMR: δ [ppm] (565 MHz, MeOH-*d*₄): -167.31 (dd, ³J_{F,H} = 6.8 Hz, ⁴J_{F,H} = 1.4 Hz).

Synthese von γ-Bis(4-decanoyloxybenzyl)-FdU-5'-triphosphat **32b**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 200 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)phosphonat **40b** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 90.0 mg (0.67 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 292 mg (0.31 mmol, 92 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP_{ro}-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.43 mL (3.11 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.69 mL (4.97 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.43 mL (3.11 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.15 mL (1.86 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurden 92.9 mg (0.22 mmol, 0.5 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 75.1 mg (72.1 μmol, 33 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.05 (d, ³J_{H,F} = 6.6 Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.37 (m, 4H, **2''-H**), 7.05 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.25 (td, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, ³J_{H,P} = 8.9 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.56 (dt, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, **3'-H**), 4.25 (ddd, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.20 - 4.14 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.02 -

3.99 (m, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 4H, **b-H**), 2.25 - 2.16 (m, 2H, **2'-H**), 1.72 (p, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 4H, **c-H**), 1.45 - 1.38 (m, 4H, **d-H**), 1.38 - 1.25 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **j-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.3 (**C-a**), 157.4 (**C-4**), 150.9 (**C-4''**), 149.3 (**C-2**), 133.8 (**C-1''**), 129.0 (**C-2''**), 124.9 ($^2J_{C,F} = 34.5$ Hz, **C-6**), 124.2 (d, $^1J_{C,F} = 188.3$ Hz, **C-5**), 121.4 (**C-3''**), 86.2 (**C-4'**), 85.1 (**C-1'**), 70.9 (**C-3'**), 69.0 (**Ph-CH₂**), 65.3 (**C-5'**), 39.1 (**C-2'**), 33.6 (**C-b**), 29.0 (**C-d**), 24.6 (**C-c**), 31.6, 28.9, 28.8, 23.4 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i**), 13.0 (**C-j**).

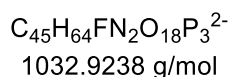
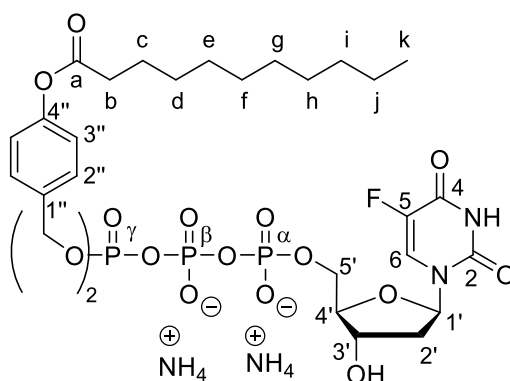
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.67 (d, $^2J_{P,P} = 19.9$ Hz, **P- α**), -13.30 (d, $^2J_{P,P} = 17.8$ Hz, **P- γ**), -23.77 (t, $^2J_{P,P} = 18.8$ Hz, **P- β**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -167.31 (dd, $^3J_{F,H} = 6.8$ Hz, $^4J_{F,H} = 1.4$ Hz).

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-FdU-5'-triphosphat **32c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 215 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 90.0 mg (0.67 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 300 mg (0.32 mmol, 92 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.44 mL (3.19 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.71 mL (5.10 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.44 mL (3.19 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.15 mL (1.91 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurden 92.9 mg (0.22 mmol, 0.5 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 55.6 mg (52.0 μ mol, 23 %) einer farblosen Watte.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.05 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.6$ Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.37 (m, 4H, **2''-H**), 7.06 - 7.02 (m, 4H, **3''-H**), 6.26 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.20 - 5.13 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.55 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.24 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.18 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.04 - 4.00 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b-H**), 2.26 - 2.18 (m, 2H, **2'-H**), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.40 (m, 4H, **d-H**), 1.40 - 1.25 (m, 24H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **k-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.3 (**C-a**), 157.4 (**C-4**), 150.9 (**C-4''**), 149.3 (**C-2**), 133.8 (**C-1''**), 129.1 (**C-2''**), 124.9 ($^2J_{\text{C,F}} = 35.0$ Hz, **C-6**), 121.4 (**C-3''**), 86.2 (**C-4'**), 85.2 (**C-1'**), 70.9 (**C-3'**), 69.0 (**Ph-CH₂**), 65.3 (**C-5'**), 39.1 (**C-2'**), 33.6 (**C-b**), 29.0 (**C-d**), 24.6 (**C-c**), 31.6, 29.3, 29.2, 29.1, 28.8, 22.3 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 13.0 (**C-k**).

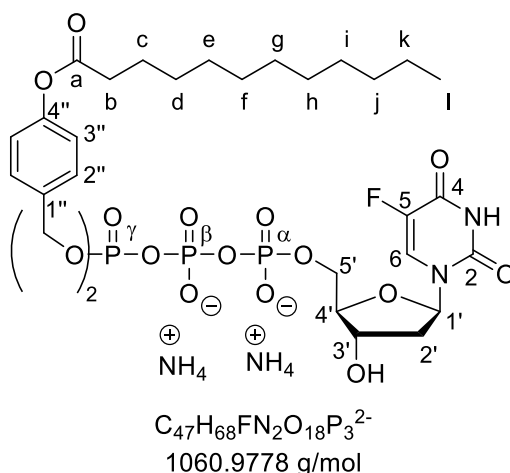
- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.43 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.9$ Hz, **P- α**), -13.05 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.0$ Hz, **P- γ**), -23.38 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 18.0$ Hz, **P- β**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -167.33 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.6$ Hz).

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-FdU-5'-triphosphat **32d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 204 mg (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 90.5 mg (0.67 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.11 mL (0.84 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 268 mg (0.27 mmol, 80 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP_{ro}-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.34 mL (2.42 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.54 mL (3.87 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.34 mL (2.42 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.11 mL (1.45 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurden 72.4 mg (0.17 mmol, 0.5 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 55.4 mg (50.5 μ mol, 30 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.06 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.5$ Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.38 (m, 4H, **2''-H**), 7.06 - 7.02 (m, 4H, **3''-H**), 6.26 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.17 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.57 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.27 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.19 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.03 - 4.00 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b-H**), 2.26 - 2.17 (m, 2H, **2'-H**), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.40 (m, 4H, **d-H**), 1.40 - 1.26 (m, 28H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **l-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 157.4 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 149.5 (**C-2**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 124.2 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 188.3$ Hz, **C-5**), 122.8 ($^2J_{\text{C,F}} = 34.5$ Hz, **C-6**), 121.4 (**C-3''**), 87.6 (**C-4'**), 86.6 (**C-1'**), 72.3 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.7 (**C-5'**), 40.6 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 14.4 (**C-l**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.73 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.5$ Hz, **P- α**), -13.32 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.8$ Hz, **P- γ**), -23.89 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 19.1$ Hz, **P- β**).

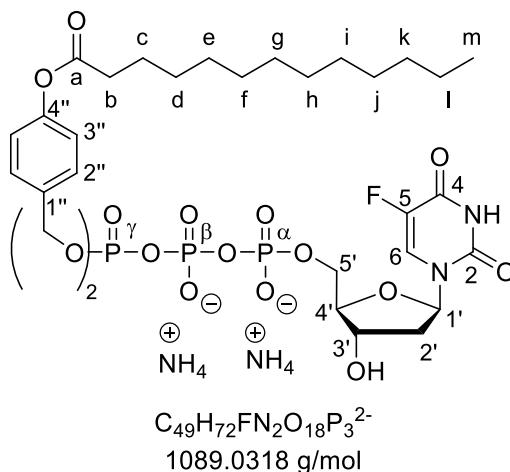
- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -167.27 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.0$ Hz).

Synthese von γ -Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)-FdU-5'-triphosphat **32e**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 254 mg (0.39 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-tridecanoyloxybenzyl)phosphonat **40e** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 103 mg (0.77 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.41 mL (0.96 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 247 mg (0.24 mmol, 63 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs.

Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.34 mL (2.48 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.55 mL (3.97 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.34 mL (2.48 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.12 mL (1.49 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurden 74.2 mg (0.17 mmol, 0.7 Äquiv.) FdU-5'-Monophosphat **68** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 61.3 mg (54.5 μ mol, 31 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.06 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.6$ Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.37 (m, 4H, **2''-H**), 7.06 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.26 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.56 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.25 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.18 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.8$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.04 - 4.00 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b-H**), 2.27 - 2.17 (m, 2H, **2'-H**), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.47 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.24 (m, 32H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H, l-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **m-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 157.4 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 150.8 (**C-2**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 ($^2J_{\text{C,F}} = 34.5$ Hz, **C-6**), 124.2 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 188.3$ Hz, **C-5**), 121.4 (**C-3''**), 87.6 (**C-4'**), 86.6 (**C-1'**), 72.3 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.7 (**C-5'**), 40.6 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 24.8 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l**), 14.4 (**C-m**).

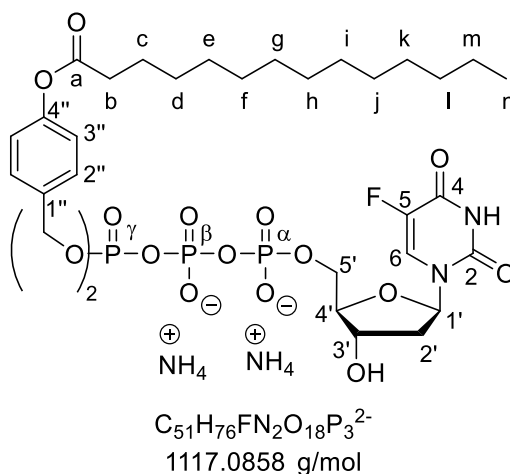
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.57 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.3$ Hz, **P- α**), -13.18 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.1$ Hz, **P- γ**), -23.61 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 18.6$ Hz, **P- β**).

- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -167.27 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.0$ Hz).

Synthese von γ -Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)-FdU-5'-triphosphat **32f**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 410 mg (0.57 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)phosphonat **40f** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 153 mg (1.15 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.58 mL (1.53 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 508 mg (0.48 mmol, 84 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPPro-NTP-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.32 mL (2.28 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.50 mL (3.64 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.32 mL (2.28 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.11 mL (1.37 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurden 68.0 mg (0.16 mmol, 0.7 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 23.5 mg (20.4 μ mol, 13 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.04 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.6$ Hz, 1H, **6-H**), 7.41 - 7.37 (m, 4H, **2''-H**), 7.05 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.26 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.56 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.27 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.22 - 4.17 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.05 - 4.00 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **b-H**), 2.27 - 2.17 (m, 2H, **2'-H**), 1.74 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.47 - 1.38 (m, 4H, **d-H**), 1.38 - 1.24 (m, 36H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H, l-H, m-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, **n-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 157.4 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 150.8 (**C-2**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 124.2 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 188.3$ Hz, **C-5**), 122.8 ($^2J_{\text{C,F}} = 34.5$ Hz, **C-6**), 121.4 (**C-3''**), 87.6 (**C-4'**), 86.6 (**C-1'**), 72.3 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.7 (**C-5'**), 40.6 (**C-2'**),

35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 24.8 (**C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**), 14.4 (**C-n**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.70 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.9$ Hz, **P- α**), -13.20 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.9$ Hz, **P- γ**), -23.80 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 18.6$ Hz, **P- β**).

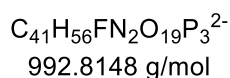
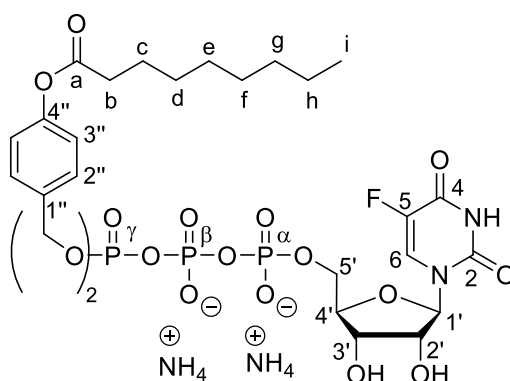
- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -167.27 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.0$ Hz).

5.6.16 Synthese von FU-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-FU-5'-triphosphat **33a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 330 mg (0.57 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 153 mg (1.15 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.59 mL (1.44 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 482 mg (0.53 mmol, 92 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Produkts wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.67 mL (4.84 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 1.07 mL (7.74 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.67 mL (4.84 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.23 mL (2.90 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 132 mg (0.24 mmol, 0.5 Äquiv.) FU-5'-monophosphat **77** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 80.5 mg (77.8 μmol , 32 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.11 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.6$ Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.37 (m, 4H, **2''-H**), 7.07 - 7.02 (m, 4H, **3''-H**), 5.93 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 8.9$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.32 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.28 - 4.24 (m, 2H, **5'-H**), 4.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.13 - 4.09 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} =$

7.4 Hz, **b-H**), 1.73 (p, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.48 - 1.40 (m, 4H, **d-H**), 1.40 - 1.25 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **i-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 172.9 (**C-a**), 158.7 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 150.9 (**C-2**), 142.0 (d, $^1J_{C,F} = 188.3$ Hz, **C-5**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 126.3 ($^2J_{C,F} = 37.6$ Hz, **C-6**), 122.8 (**C-3''**), 89.6 (**C-1'**), 85.1 (**C-4'**), 75.3 (**C-2'**), 71.3 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.4 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h**), 14.4 (**C-i**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.69 (d, $^2J_{P,P} = 19.9$ Hz, **P- α**), -13.24 (d, $^2J_{P,P} = 17.8$ Hz, **P- γ**), -23.74 (t, $^2J_{P,P} = 18.8$ Hz, **P- β**).

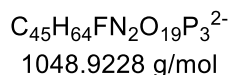
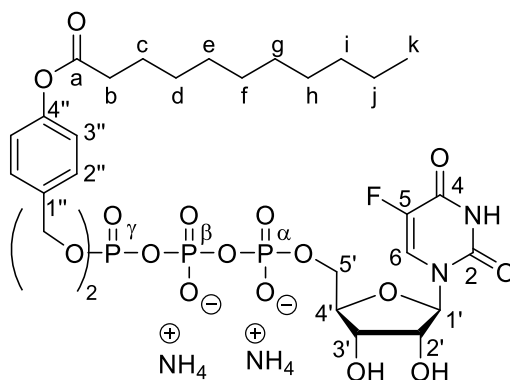
- $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (565 MHz, MeOH- d_4): -167.20 (d, $^3J_{F,H} = 6.8$ Hz).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 993.2758, gef.: 993.2676 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-FU-5'-triphosphat **33c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 315 mg (0.50 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 133 mg (1.00 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.12 mL (1.25 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 439 mg (0.45 mmol, 91 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.61 mL (4.41 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.98 mL (7.05 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.61 mL (4.41 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.21 mL (2.64 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 120 mg (0.22 mmol, 0.5 Äquiv.) FU-5'-monophosphat **77** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 81.3 mg (74.7 μmol , 34 %) einer farblosen Watte.

- **¹H-NMR**: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.11 (d, $^3J_{H,F}$ = 6.6 Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.36 (m, 4H, **2''-H**), 7.07 - 7.00 (m, 4H, **3''-H**), 5.93 (dd, $^3J_{H,H}$ = 5.5 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.7 Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, $^3J_{H,P}$ = 9.1 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.32 (dd, $^3J_{H,H}$ = 5.2 Hz, $^3J_{H,H}$ = 3.9 Hz, 1H, **3'-H**), 4.31 - 4.24 (m, 2H, **5'-H**), 4.23 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.4 Hz, 1H, **2'-H**), 4.13 - 4.09 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.4 Hz, **b-H**), 1.73 (p, $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, 4H, **c-H**), 1.48 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.25 (m, 20H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.9 Hz, 6H, **k-H**).

- **¹³C-NMR**: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 174.2 (**C-a**), 158.8 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 151.2 (**C-2**), 141.8 (d, $^1J_{C,F}$ = 241.3 Hz, **C-5**), 134.5 (**C-1''**), 130.9 (**C-2''**), 126.4 ($^2J_{C,F}$ = 37.6 Hz, **C-6**), 122.8 (**C-3''**), 89.8 (**C-1'**), 85.2 (**C-4'**), 75.3 (**C-2'**), 71.3 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.4 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.7, 30.6, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 14.4 (**C-k**).

- **³¹P-NMR**: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.73 (d, $^2J_{P,P}$ = 19.9 Hz, **P- α**), -13.25 (d, $^2J_{P,P}$ = 17.2 Hz, **P- γ**), -23.73 (t, $^2J_{P,P}$ = 19.6 Hz, **P- β**).

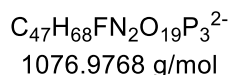
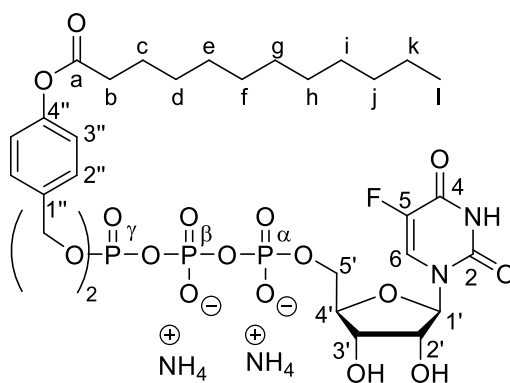
- **¹⁹F-NMR**: δ [ppm] (565 MHz, MeOH-*d*₄): -167.18 (d, $^3J_{F,H}$ = 6.7 Hz).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 1049.3384, gef.: 1049.3341 [M].

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-FU-5'-triphosphat **33d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 320 mg (0.49 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 130 mg (0.97 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.04 mL (1.21 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 394 mg (0.40 mmol, 81 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.55 mL (3.96 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.88 mL (6.33 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.55 mL (3.96 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.19 mL (2.37 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 108 mg (0.20 mmol, 0.5 Äquiv.) FU-5'-monophosphat **77** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 79.5 mg (71.0 μmol , 36 %) einer farblosen Watte.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 8.11 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.6$ Hz, 1H, **6-H**), 7.42 - 7.36 (m, 4H, **2''-H**), 7.06 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 5.93 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 9.1$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.33 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.29 - 4.24 (m, 2H, **5'-H**), 4.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.13 - 4.09 (m, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, **b-H**), 1.73 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.47 - 1.40 (m, 4H, **d-H**), 1.40 - 1.24 (m, 20H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 173.8 (**C-a**), 159.5 (**C-4**), 152.7 (**C-4''**), 151.3 (**C-2**), 141.9 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 234.8$ Hz, **C-5**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 126.3 ($^2J_{\text{C,F}} = 37.6$ Hz, **C-6**), 122.8 (**C-3''**), 89.4 (**C-1'**), 85.1 (**C-4'**), 75.3 (**C-2'**), 71.3 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.4 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.5$ Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 14.4 (**C-l**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): -11.70 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.6$ Hz, **P- α**), -13.21 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1$ Hz, **P- γ**), -23.68 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 22.3$ Hz, **P- β**).

- **$^{19}\text{F-NMR}$:** δ [ppm] (565 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): -167.19 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.6$ Hz).

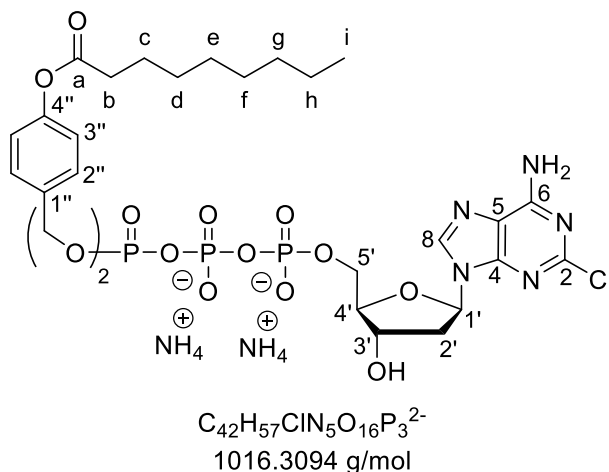
- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 1077.3697, gef.: 1077.3610 [M]⁻.

5.6.17 Synthese von CdA-TriPPP-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-CdA-5'-triphosphat **34a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 281 mg (0.49 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 130 mg (0.98 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.06 mL (1.22 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 405 mg (0.44 mmol, 91 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.57 mL (4.07 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.90 mL (6.50 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.56 mL (4.07 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.19 mL (2.44 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 94.8 mg (0.20 mmol, 0.5 Äquiv.) CdA-5'-monophosphat **102** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 89.4 mg (84.9 μ mol, 42 %) einer farblosen Watte.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.57 (s, 1H, **8-H**), 7.39 - 7.33 (m, 4H, **2''-H**), 7.02 – 6.97 (m, 4H, **3''-H**), 6.37 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.16 - 5.12 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.67 (dt, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.6$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.30 - 4.20 (m, 2H, **5'-H**), 4.15 - 4.12 (m, 1H, **4'-H**), 2.68 - 2.62 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, **b-H**), 2.42 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.9$ Hz), 1.72 (p, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.48 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.26 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **i-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 155.5 (**C-6**), 152.3 (**C-4''**), 151.5 (**C-4**), 141.2 (**C-8**), 134.8 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 119.2 (**C-5**), 87.7 (**C-4'**), 85.6 (**C-1'**), 72.3 (**C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.9 (**C-5'**), 41.4 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.0 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h**), 14.4 (**C-i**).

- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.74 (d, $^2J_{P,P} = 19.4$ Hz, **P- α**), -13.24 (d, $^2J_{P,P} = 16.9$ Hz, **P- γ**), -23.90 (t, $^2J_{P,P} = 18.3$ Hz, **P- β**).

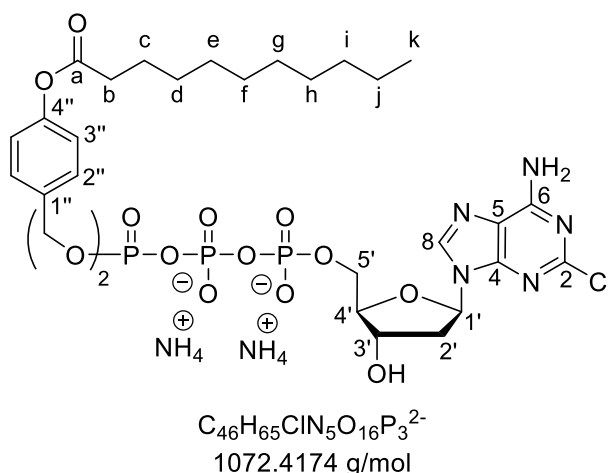
- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 1016.2785, gef.: 1016.2422 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-CdA-5'-triphosphat **34c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 295 mg (0.47 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 125 mg

(0.94 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.92 mL (1.17 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 402 mg (0.42 mmol, 89 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.58 mL (4.15 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.92 mL (6.64 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.58 mL (4.15 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 0.20 mL (2.49 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 96.9 mg (0.21 mmol, 0.5 Äquiv.) CdA-5'-monophosphat **102** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 85.2 mg (76.9 μ mol, 37 %) einer farblosen Watte.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.52 (s, 1H, **8-H**), 7.37 - 7.33 (m, 4H, **2''-H**), 7.07 - 7.02 (m, 4H, **3''-H**), 6.37 (dd, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.14 (d, $^3J_{H,P} = 8.2$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.68 (dt, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.4$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.26 (ddd, $^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H,P} = 6.3$ Hz, $^3J_{H,P} = 3.4$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.24 - 4.20 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.15 - 4.11 (m, 1H, **4'-H**), 2.67 - 2.62 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.57 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, **b-H**), 2.41 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.8$ Hz), 1.72 (p, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.24 (m, 24H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **k-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 157.0 (**C-6**), 152.3 (**C-4''**), 151.0 (**C-4**), 139.4 (**C-8**), 134.7 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 119.1 (**C-5**), 87.8 (**C-4'**), 85.4 (**C-1'**), 72.4 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.9 (**C-5'**), 39.3 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 14.4 (**C-k**).

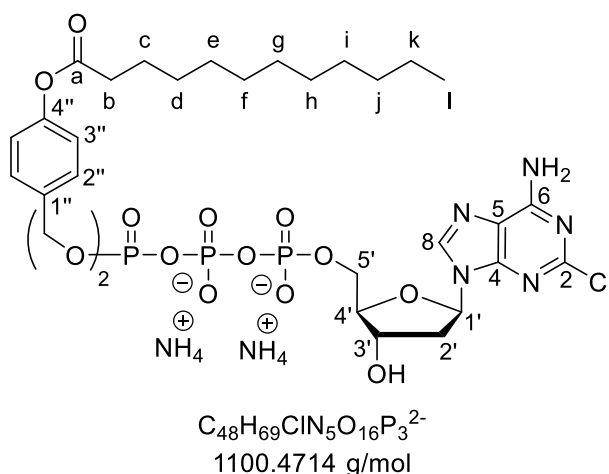
- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.71 (d, $^2J_{P,P} = 19.9$ Hz, **P- α**), -13.30 (d, $^2J_{P,P} = 17.6$ Hz, **P- γ**), -23.90 (t, $^2J_{P,P} = 18.5$ Hz, **P- β**).

- HRMS (ESI⁻, m/z): ber.: 1072.3411, gef.: 1072.3231 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-CdA-5'-triphosphat **34d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 251 mg (0.38 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 101 mg (0.76 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.38 mL (0.95 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 244 mg (0.27 mmol, 70 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.34 mL (2.45 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.54 mL (3.92 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.34 mL (2.45 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.12 mL (1.47 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 57.1 mg (0.12 mmol, 0.5 Äquiv.) CdA-5'-Monophosphat **102** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 60.3 mg (52.8 μ mol, 43 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.51 (s, 1H, **8-H**), 7.38 - 7.32 (m, 4H, **2''-H**), 7.02 - 6.97 (m, 4H, **3''-H**), 6.37 (dd, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, **1'-H**), 5.19 - 5.10 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.69 (dt, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, **3'-H**), 4.26 (ddd, ²J_{H,H} = 10.0 Hz, ³J_{H,P} = 6.3 Hz, ³J_{H,P} = 3.4 Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.24 - 4.18 (m, 1H, **5'-Hb**), 4.14 - 4.11 (m, 1H, **4'-H**), 2.68 - 2.61 (m, 1H, **2'-Ha**), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, **b-H**), 2.40 (ddd, ²J_{H,H} = 13.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.7 Hz), 1.72 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, **c-H**), 1.47 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.23 (m, 24H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 6H, **l-H**).

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 173.3 (**C-a**), 157.0 (**C-6**), 152.1 (**C-4''**), 151.0 (**C-4**), 139.4 (**C-8**), 134.9 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 119.1 (**C-5**), 87.8 (**C-4'**), 85.3 (**C-1'**), 72.5 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.8 (**C-5'**), 41.4 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 14.5 (**C-l**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.60 (d, ²J_{P,P} = 19.9 Hz, **P-α**), -13.20 (d, ²J_{P,P} = 16.9 Hz, **P-γ**), -23.72 (t, ²J_{P,P} = 18.3 Hz, **P-β**).

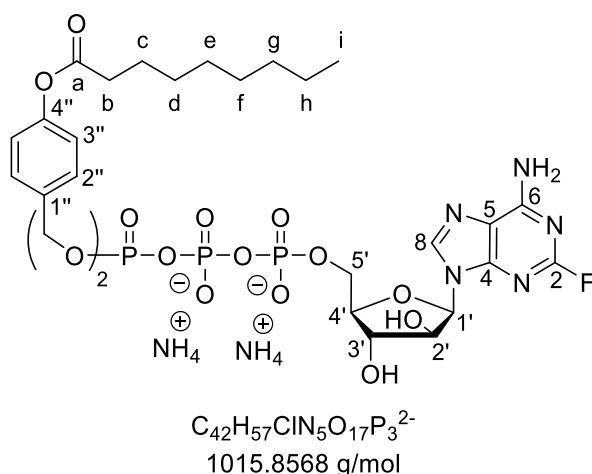
- HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 1100.3724, gef.: 1100.3663 [M].

5.6.18 Synthese von 2FaraA-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-2FaraA-5'-triphosphat **35a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 250 mg (0.44 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 116 mg (0.87 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.72 mL (1.09 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 346 mg (0.38 mmol, 87 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.53 mL (3.79 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.84 mL (6.07 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.53 mL (3.79 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 0.18 mL (2.28 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 146 mg (0.17 mmol, 0.5 Äquiv.) 2-FaraA-5'-Monophosphat **103** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 35.0 mg (33.7 μ mol, 20 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.37 (s, 1H, **8-H**), 7.39 - 7.35 (m, 4H, **2''-H**), 7.03 - 6.99 (m, 4H, **3''-H**), 6.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.17 - 5.14 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.45 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.34 - 4.30 (m, 2H, **5'-H**), 4.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.05 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, **b-H**), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.29 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **i-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 159.0 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 200.4$ Hz, **C-2**), 157.9 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 20.5$ Hz, **C-6**), 152.3 (**C-4''**), 151.2 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 17.1$ Hz, **C-4**), 141.0 (**C-8**), 134.8 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 117.1 (**C-5**), 85.7 (**C-1'**), 84.1 (**C-4'**), 77.2 (**C-2'**), 76.1

(**C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.5 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h**), 14.4 (**C-i**).

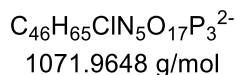
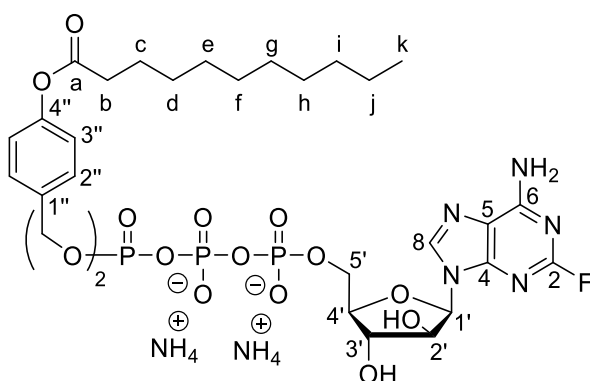
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.48 (d, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, **P-α**), -13.37 (d, ²J_{P,P} = 17.4 Hz, **P-γ**), -23.74 (dd, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, ²J_{P,P} = 17.4 Hz, **P-β**).

- HRMS (ESI⁻, m/z): ber.: 1016.3030, gef.: 1016.2918 [M]⁻.

Synthese von **γ-Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-2FaraA-5'-triphosphat 35c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 260 mg (0.41 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 110 mg (0.83 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.58 mL (1.03 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 315 mg (0.33 mmol, 80 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP_{ro}-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.37 mL (2.69 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.60 mL (4.30 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.37 mL (2.69 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.13 mL (1.61 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 102 mg (0.13 mmol, 0.5 Äquiv.) 2-FaraA-5'-monophosphat **103** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 35.6 mg (32.5 μmol, 20 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.40 (s, 1H, **8-H**), 7.39 – 7.34 (m, 4H, **2''-H**), 7.04 – 6.97 (m, 4H, **3''-H**), 6.24 (d, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 1H, **1'-H**), 5.19 – 5.14 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.48 – 4.41 (m, 1H, **3'-H**), 4.39 – 4.33 (m, 2H, **5'-H**), 4.32 – 4.27 (m, 1H, **2'-H**), 4.08 – 4.04 (m, 1H,

4'-H), 2.56 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, **b-H**), 1.72 (p, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.49 – 1.38 (m, 4H, **d-H**), 1.38 – 1.24 (m, 24H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **k-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.0 (**C-a**), 159.0 (d, $^1J_{C,F} = 203.0$ Hz, **C-2**), 157.9 (d, $^3J_{C,F} = 20.5$ Hz, **C-6**), 152.4 (**C-4''**), 151.2 (d, $^3J_{C,F} = 17.1$ Hz, **C-4**), 141.0 (**C-8**), 135.1 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 117.1 (**C-5**), 85.9 (**C-1'**), 84.1 (**C-4'**), 77.2 (**C-2'**), 76.1 (**C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.1 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 14.4 (**C-k**).

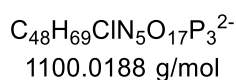
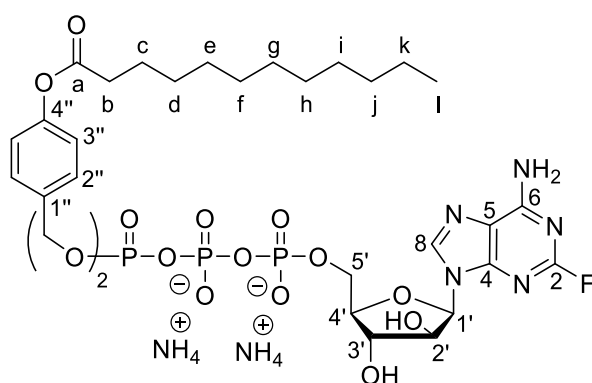
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.57 (d, $^2J_{P,P} = 20.0$ Hz, **P- α**), -13.40 (d, $^2J_{P,P} = 17.4$ Hz, **P- γ**), -24.00 (dd, $^2J_{P,P} = 20.2$ Hz, $^2J_{P,P} = 17.4$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI, m/z): ber.: 1072.3656, gef.: 1072.3511 [M].

Synthese von γ -Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-2FaraA-5'-triphosphat **35d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 268 mg (0.41 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 108 mg (0.82 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.54 mL (1.02 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 269 mg (0.27 mmol, 66 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.38 mL (2.70 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.60 mL (4.32 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.37 mL (2.70 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.13 mL (1.62 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 104 mg (0.14 mmol, 0.5 Äquiv.) 2FaraA-5'-monophosphat **103** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 14.3 mg (12.6 μmol , 10 %) einer farblosen Watte.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 8.38 (s, 1H, **8-H**), 7.39 - 7.33 (m, 4H, **2''-H**), 7.03 – 6.97 (m, 4H, **3''-H**), 6.23 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.20 - 5.11 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.45 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.35 - 4.31 (m, 2H, **5'-H**), 4.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.05 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, **b-H**), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.48 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.24 (m, 28H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 173.0 (**C-a**), 159.0 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 203.0$ Hz, **C-2**), 157.9 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 20.5$ Hz, **C-6**), 152.3 (**C-4''**), 151.2 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 17.1$ Hz, **C-4**), 141.0 (**C-8**), 135.1 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 116.6 (**C-5**), 85.8 (**C-1'**), 84.1 (**C-4'**), 77.2 (**C-2'**), 76.1 (**C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.5 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 14.4 (**C-l**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): -11.41 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.0$ Hz, **P- α**), -13.26 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.1$ Hz, **P- γ**), -26100 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 20.1$ Hz, $^2J_{\text{P,P}} = 17.2$ Hz, **P- β**).

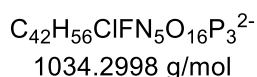
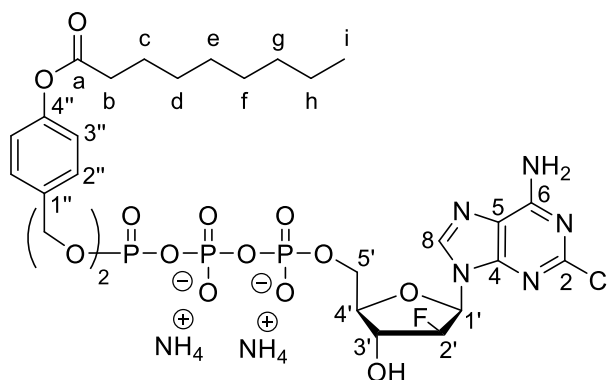
- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 1100.3969, gef.: 1100.3855 [M].

5.6.19 Synthese von ClFaraA-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ClFaraA-5'-triphosphat 36a

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 302 mg (0.53 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 140 mg (1.00 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.30 mL (1.32 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 146 mg (0.16 mmol, 31 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.22 mL (1.60 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.35 mL (2.60 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.22 mL (1.60 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 80.0 μ L (0.96 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 50.5 mg (0.81 mmol, 0.5 Äquiv.) ClFaraA-5'-Monophosphat **103** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 47.7 mg (44.6 μ mol, 56 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.35 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **8-H**), 7.38 - 7.34 (m, 4H, **2''-H**), 7.02 - 6.98 (m, 4H, **3''-H**), 6.36 (dd, $^3J_{\text{H,F}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.17 - 5.14 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 5.13 (dt, $^2J_{\text{H,F}} = 50.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, **2'-H**) 4.64 (ddd, $^3J_{\text{H,F}} = 18.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.8$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.36 - 4.25 (m, 1H, **5'-H**), 4.12 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, **b-H**), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.46 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.26 (m, 28H, **e-H, f-H, g-H, h-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **i-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 155.4 (**C-2**), 152.2 (**C-4''**), 151.7 (**C-4**), 138.4 (**C-8**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 118.6 (**C-5**), 96.4 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 198.4$ Hz, **C-2'**), 83.8 (**C-4'**), 83.8 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 22.0$ Hz, **C-1'**), 74.4 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.2$ Hz, **C-3'**),

70.4 (**Ph-CH₂**), 66.5 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 14.5 (**C-i**).

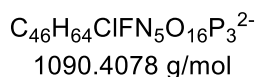
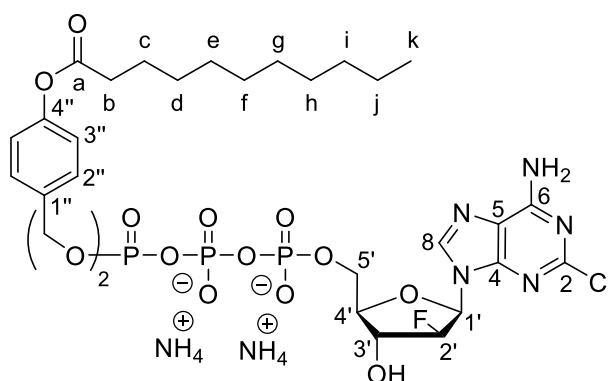
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.56 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, **P-α**), -13.37 (d, ²J_{P,P} = 17.6 Hz, **P-γ**), -23.81 (t, ²J_{P,P} = 18.8 Hz, **P-β**).

- HRMS (ESI⁻, m/z): ber.: 1034.2691, gef.: 1034.2587 [M]⁻.

Synthese von γ-Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-ClFaraA-5'-triphosphat **36c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 302 mg (0.48 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 128 mg (0.96 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 3.30 mL (1.32 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 432 mg (0.45 mmol, 94 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP_{ro}-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.62 mL (4.52 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.99 mL (7.12 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.62 mL (4.52 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.21 mL (2.73 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 141 mg (0.23 mmol, 0.5 Äquiv.) ClFaraA-5'-monophosphat **103** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 121 mg (107 μmol, 48 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.37 (s, 1H, **8-H**), 7.39 - 7.35 (m, 4H, **2''-H**), 7.03 - 6.99 (m, 4H, **3''-H**), 6.22 (d, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, **1'-H**), 5.17 - 5.14 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.45 (t, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, **3'-H**), 4.34 - 4.30 (m, 2H, **5'-H**), 4.29 (t, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, **2'-H**), 4.05 (q, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, **b-H**), 1.72 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, **c-H**), 1.46 -

1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.29 (m, 16H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **k-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 159.0 (d, $^1J_{C,F} = 200.4$ Hz, **C-2**), 157.9 (d, $^3J_{C,F} = 20.5$ Hz, **C-6**), 152.3 (**C-4''**), 151.2 (d, $^3J_{C,F} = 17.1$ Hz, **C-4**), 141.0 (**C-8**), 134.8 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 117.1 (**C-5**), 85.7 (**C-1'**), 84.1 (**C-4'**), 77.2 (**C-2'**), 76.1 (**C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.5 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 14.4 (**C-k**).

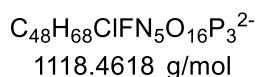
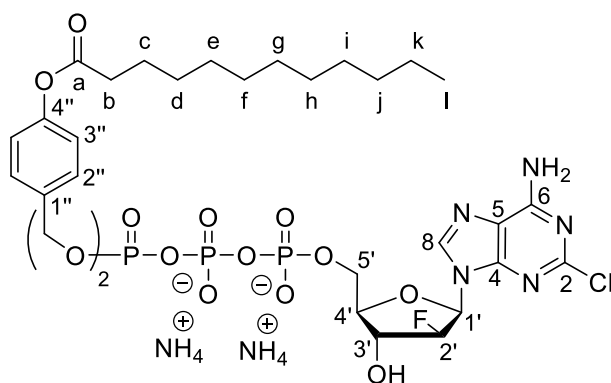
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.48 (d, $^2J_{P,P} = 20.2$ Hz, **P- α**), -13.37 (d, $^2J_{P,P} = 17.4$ Hz, **P- γ**), -23.74 (dd, $^2J_{P,P} = 20.2$ Hz, $^2J_{P,P} = 17.4$ Hz, **P- β**).

- HRMS (ESI, m/z): ber.: 1090.3317, gef.: 1090.3190 [M].

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-ClFaraA-5'-triphosphat **36d**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 260 mg (0.40 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-phosphonat **40d** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 105 mg (0.79 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.47 mL (0.99 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 309 mg (0.31 mmol, 79 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPP-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.47 mL (3.39 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.75 mL (5.42 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.47 mL (3.39 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.16 mL (2.03 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 107 mg (0.17 mmol, 0.5 Äquiv.) ClFaraA-5'-monophosphat **103** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 36.5 mg (35.2 μ mol, 21 %) einer farblosen Watte.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.34 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 1H, **8-H**), 7.39 - 7.34 (m, 4H, **2''-H**), 7.02 - 6.97 (m, 4H, **3''-H**), 6.36 (dd, $^3J_{\text{H,F}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.19 - 5.15 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 5.13 (dt, $^2J_{\text{H,F}} = 50.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$ Hz, 1H, **2'-H**) 4.70 - 4.63 (m, 1H, **3'-H**), 4.38 - 4.31 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.32 - 4.24 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.11 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, 1H, **4'-H**), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, **b-H**), 1.72 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, **c-H**), 1.45 - 1.38 (m, 4H, **d-H**), 1.38 - 1.25 (m, 28H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H, k-H**), 0.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 6H, **l-H**).

- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 174.0 (**C-a**), 155.2 (**C-2**), 152.1 (**C-4''**), 151.7 7 (**C-4**), 138.4 (**C-8**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 120.9 (**C-5**), 96.3 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 198.4$ Hz, **C-2'**), 83.8 (**C-4'**), 83.7 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 22.0$ Hz, **C-1'**), 74.4 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.2$ Hz, **C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.5 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 14.5 (**C-l**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.64 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 21.4$ Hz, **P- α**), -13.49 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.7$ Hz, **P- γ**), -20.08 (dd, $^2J_{\text{P,P}} = 21.3$ Hz, $^2J_{\text{P,P}} = 17.6$ Hz, **P- β**).

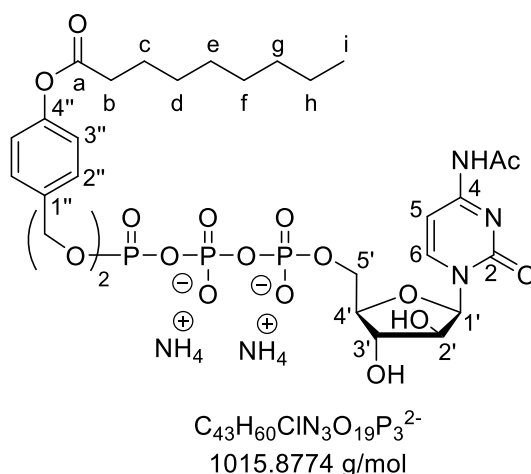
- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 1118.3630, gef.: 1118.3514 [M].

5.6.20 Synthese von Ac-araC-TriPPPro-Verbindungen

Synthese von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-Ac-araC-5'-triphosphat **131a**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 210 mg (0.37 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)phosphonat **40a** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 98 mg (0.73 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.28 mL (0.92 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 303 mg (0.33 mmol, 91 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.46 mL (3.32 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.74 mL (5.32 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.46 mL (3.32 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.16 mL (1.99 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 142 mg (0.18 mmol, 0.5 Äquiv.) Ac-araC-5'-monophosphat **132** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 67.3 mg (63.7 μ mol, 38 %) einer farblosen Watte.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, MeOH- d_4): 8.27 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1H, **5-H**), 7.41 - 7.35 (m, 5H, **6-H**, **2''-H**), 7.09 - 6.99 (m, 4H, **3''-H**), 6.23 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.23 - 5.11 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.37 - 4.28 (m, 3H, **3'-H**, **5'-H**), 4.29 - 4.25 (m, 1H, **2'-H**), 4.12 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, **4'-H**), 2.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, **b-H**), 2.17 (s, 3H, **-NHAc**), 1.74 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, **c-H**), 1.48 - 1.40 (m, 4H, **d-H**), 1.40 - 1.28 (m, 16H, **e-H**, **f-H**, **g-H**, **h-H**), 0.92 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 6H, **i-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.4 (**C-a**), 172.7 (**C-NHAc**), 164.0 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 148.2 (**C-5**), 134.9 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 97.4 (**C-6**), 89.0 (**C-1'**), 85.2

(**C-4'**), 77.1 (**C-5'**), 76.5 (**C-2'**, **C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.2 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 14,4 (**C-i**).

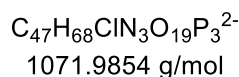
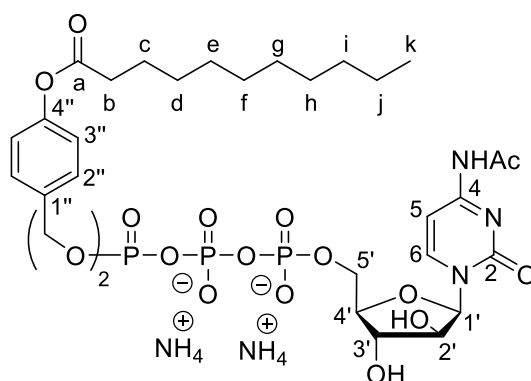
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.49 (d, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, **P-α**), -13.34 (d, ²J_{P,P} = 17.4 Hz, **P-γ**), -23.81 (dd, ²J_{P,P} = 18.4 Hz, ²J_{P,P} = 1843 Hz, **P-β**).

- HRMS (MALDI⁻, m/z): ber.: 1016.3118, gef.: 1016.2996 [M]⁻.

Synthese von **γ-Bis(4-undecanoyloxybenzyl)-araC-5'-triphosphat 131c**

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 250 mg (0.40 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-undecanoyloxybenzyl)phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 105 mg (0.79 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.48 mL (0.99 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 325 mg (0.36 mmol, 85 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.47 mL (3.36 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.74 mL (5.34 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.47 mL (3.35 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.16 mL (2.01 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 165 mg (0.18 mmol, 0.5 Äquiv.) Ac-araC-5'-monophosphat **132** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 85.4 mg (76.7 μmol, 33 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.27 (d, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, **5-H**), 7.42 - 7.35 (m, 5H, **6-H**, **2''-H**), 7.06 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.23 (d, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, **1'-H**), 5.22 - 5.13 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.37 - 4.28 (m, 3H, **3'-H**, **5'-H**), 4.27 (t, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, **2'-H**), 4.13 (q, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, **4'-H**), 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, **b-H**), 2.17 (s, 3H, **-NHAc**), 1.74 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz,

4H, **c-H**), 1.48 - 1.39 (m, 4H, **d-H**), 1.39 - 1.27 (m, 24H, **e-H, f-H, g-H, h-H, i-H, j-H**), 0.90 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 6H, **k-H**).

- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, MeOH- d_4): 173.7 (**C-a**), 172.7 (**C-NHAc**), 164.0 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 148.2 (**C-5**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 97.4 (**C-6**), 89.0 (**C-1'**), 85.3 (**C-4'**), 77.1 (**C-5'**), 76.5 (**C-2', C-3'**), 70.4 (**Ph-CH₂**), 66.2 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.7, 30.6, 30.5, 30.2, 23.7 (**C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j**), 14,4 (**C-k**).

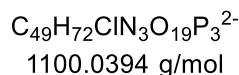
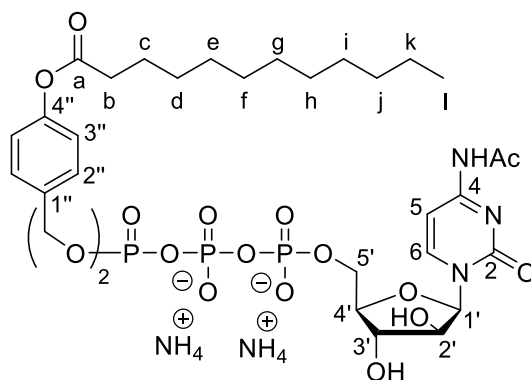
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (243 MHz, MeOH- d_4): -11.45 (d, $^2J_{P,P} = 19.6$ Hz, **P- α**), -13.31 (d, $^2J_{P,P} = 16.8$ Hz, **P- γ**), -23.76 (dd, $^2J_{P,P} = 18.4$ Hz, $^2J_{P,P} = 18.4$ Hz, **P- β**).

- HRMS (ESI⁻, m/z): ber.: 1072.3744, gef.: 1072.3627 [M]⁻.

Synthese von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-Ac-araC-5'-triphosphat 131d

Die Reaktion wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. 250 mg (0.38 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphonat **40c** wurden in 20 mL abs. Acetonitril mit 101 mg (0.76 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid und 2.37 mL (0.95 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aufgrund der hohen Reaktivität ohne weitere Aufarbeitung und Analysen weiterverwendet (Ausbeute: 281 mg (0.28 mmol, 74 %) eines gelblichen Harzes).

Die Synthese des TriPPPro-Prodrugs wurde nach **AAV 8** (Variante A) durchgeführt. Für die Aktivierung des Pyrophosphats wurde die zuvor erhaltene Verbindung, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, mit einer Lösung aus 0.39 mL (2.82 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.63 mL (4.51 mmol, 16 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.39 mL (2.82 mmol, 10 Äquiv.) Triethylamin und 0.13 mL (1.69 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde 89.3 mg (0.14 mmol, 0.5 Äquiv.) Ac-araC-5'-monophosphat **132** gelöst in 5 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 43.0 mg (35.4 μmol , 25 %) einer farblosen Watte.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, MeOH-*d*₄): 8.26 (d, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, **5-H**), 7.40 - 7.33 (m, 5H, **6-H**, **2''-H**), 7.05 - 7.01 (m, 4H, **3''-H**), 6.22 (d, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, **1'-H**), 5.21 - 5.12 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.36 - 4.26 (m, 3H, **3'-H**), 4.35 - 4.28 (m, 3H, **2'-H**, **5'-H**), 4.26 (t, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, **2'-H**), 4.12 (q, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, **4'-H**), 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, **b-H**), 1.73 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, **c-H**), 1.47 - 1.38 (m, 4H, **d-H**), 1.38 - 1.23 (m, 28H, **e-H**, **f-H**, **g-H**, **h-H**, **i-H**, **j-H**, **k-H**), 0.90 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 6H, **l-H**).

- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, MeOH-*d*₄): 173.7 (**C-a**), 172.6 (**C-NHAc**), 164.0 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 148.3 (**C-5**), 135.0 (**C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 97.4 (**C-6**), 89.0 (**C-1'**), 85.2 (**C-4'**), 77.1 (**C-5'**), 76.6 (**C-2'**, **C-3'**), 70.5 (**Ph-CH₂**), 66.2 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.1 (**C-d**), 26.0 (**C-c**), 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.8 (**C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**), 14,4 (**C-l**).

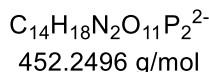
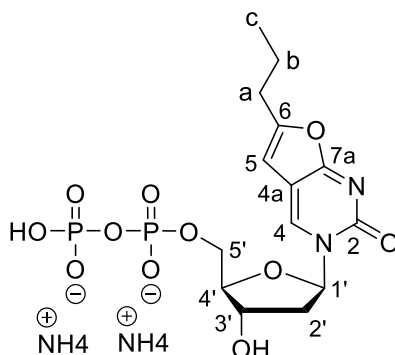
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (243 MHz, MeOH-*d*₄): -11.49 (d, ²J_{P,P} = 20.3 Hz, **P- α**), -13.30 (d, ²J_{P,P} = 17.5 Hz, **P- γ**), -23.81 (dd, ²J_{P,P} = 18.6 Hz, ²J_{P,P} = 18.6 Hz, **P- β**).

- HRMS (ESI⁻, m/z): ber.: 1100.4057, gef.: 1100.3955 [M]⁻.

5.6.21 Synthese von Nucleosid-5'-Diphosphaten

Synthese von 2'-Desoxy-BCNA-5'-Diphosphat 134

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 61.0 mg (128 μmol , 1.0 Äquiv.) 2'-Desoxy-BCNA-5'-monophosphat **40** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.18 mL (1.28 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.28 mL (2.05 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.18 mL (1.28 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 60.0 μL (770 μmol , 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 0.96 mL (0.39 mmol, 3.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 25.4 mg (52.0 μmol , 41 %) eines farblosen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, D_2O): 8.89 (s, 1H, **4-H**), 6.65 (s, 1H, **5-H**), 6.38 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.68 - 4.61 (m, 1H, **3'-H**), 4.37 - 4.25 (m, 2H, **5'-H**), 4.27 - 4.21 (m, 1H, **4'-H**), 2.71 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **a-H**), 2.63 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.33 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.76 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 1.03 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**).

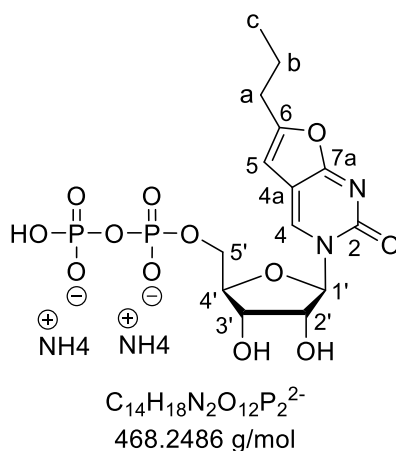
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, D_2O): 171.6 (**C-7a**), 160.0 (**C-6**), 155.6 (**C-2**), 137.5 (**C-4**), 109.1 (**C-4a**), 100.4 (**C-5**), 88.1 (**C-4'**), 86.4 (**C-1'**), 69.7 (**C-3'**), 64.5 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 4.6$ Hz, **C-5'**), 40.6 (**C-2'**), 29.5 (**C-a**), 19.9 (**C-b**), 12.6 (**C-c**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): -8.74 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.5$ Hz, **P- α**), -9.98 ($^2J_{\text{P,P}} = 20.5$ Hz, **P- β**).

Synthese von BCNA-5'-Diphosphat 135

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 52.0 mg (128 μmol , 1.0 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **41** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.13 mL (0.97 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.21 mL (1.54 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.13 mL (0.97 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 50.0 μL (579 μmol ,

6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 0.72 mL (0.29 mmol, 3.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 44.2 mg (84.4 μ mol, 88 %) eines farblosen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, D_2O): 8.77 (s, 1H, **4-H**), 6.55 (s, 1H, **5-H**), 6.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.46 - 4.38 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.38 - 4.33 (m, 1H, **2'-H**, **3'-H**, **4'-H**), 4.29 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 2.70 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz), 1.72 (h, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**).

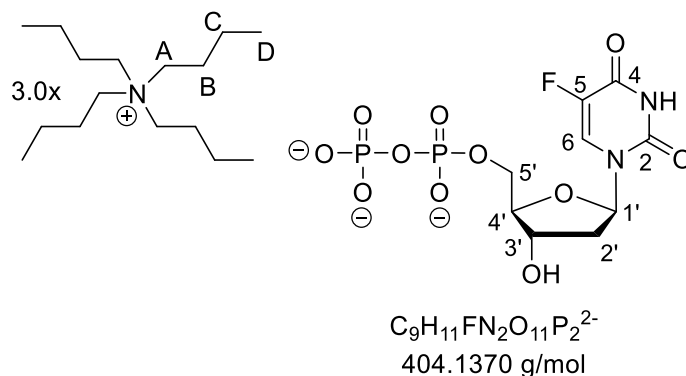
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, D_2O): 172.1 (**C-7a**), 161.4 (**C-4**), 156.6 (**C-2**), 137.5 (**C-4**), 110.4 (**C-4a**), 100.5 (**C-5**), 92.2 (**C-1'**), 82.9 (**C-4'**), 75.5 (**C-2'**), 68.4 (**C-3'**), 64.1 ($^2J_{\text{P,C}} = 4.9$ Hz, **C-5'**), 29.8 (**a-C**), 20.1 (**b-C**), 13.2 (**c-C**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, D_2O): -8.33 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.9$ Hz, **P- α**), -9.93 ($^2J_{\text{P,P}} = 21.1$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 469.0419, gef.: 469.0436 [M] $^-$.

Synthese von FdU-5'-Diphosphat 136

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 195 mg (408 μ mol, 1.0 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.57 mL (4.08 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.90 mL (6.53 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.57 mL (4.08 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 190 μ L (2.45 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 3.05 mL (1.22 mmol, 3.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 260 mg (230 μ mol, 56 %) eines farblosen Feststoffs.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (600 MHz, D_2O): 8.11 (d, $^3J_{H,F} = 6.5$ Hz, 1H, **6-H**), 6.27 (ddd, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.7$ Hz 1H, **1'-H**), 4.65 (dt, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.1$ Hz, 1H, **3'-H**), 4.30 (ddd, $^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.8$ Hz, 1H, **5'-Ha**), 4.15 (dt, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.3$ Hz, 1H, **5'-Hb**), 4.03 - 4.00 (m, 1H, **4'-H**), 3.27 - 3.21 (m, 24H, **A-H**), 2.29 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.22 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.4$ Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.70 - 1.62 (m, 24H, **B-H**), 1.42 (m, 24H, **C-H**), 1.03 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 36H, **D-H**).

- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (151 MHz, D_2O): 158.2 (**C-4**), 149.6 (**C-2**), 126.3 (d, $^2J_{C,F} = 35.0$ Hz, **C-6**), 124.9 (d, $^1J_{C,F} = 182.5$ Hz, **C-5**), 88.0 ($^2J_{C,P} = 8.7$ Hz, **C-5'**), 86.8 (**C-1'**), 72.9 (**C-3'**), 65.9 (d, $^3J_{C,P} = 5.3$ Hz, **C-4'**), 59.5 (**C-A**) 40.9 (**C-2'**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 13.9 (**C-D**).

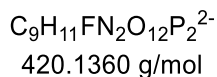
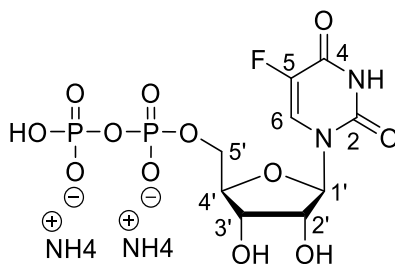
- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (243 MHz, $MeOH-d_4$): -9.66 (d, $^2J_{P,P} = 21.4$ Hz, **P- α**), -10.73 (d, $^2J_{P,P} = 19.8$ Hz, **P- β**).

- **^{19}F -NMR:** δ [ppm] (565 MHz, $MeOH-d_4$): -167.34 (d, $^3J_{F,H} = 6.1$ Hz).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 404.9906, gef.: 404.9882 [M]⁻.

Synthese von FU-5'-Diphosphat 137

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 55.0 mg (101 μ mol, 1.0 Äquiv.) FU-5'-monophosphat **77** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.14 mL (1.01 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.22 mL (1.61 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.14 mL (1.01 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 50.0 μ L (0.61 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 0.76 mL (0.30 mmol, 3.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 26.4 mg (53.2 μmol , 53 %) eines farblosen Feststoffs.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, D_2O): 8.12 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.4$ Hz, 1H, **6-H**), 5.97 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.42 - 4.34 (m, 2H, **2'-H**, **3'-H**), 4.31 - 4.18 (m 3H, **4'-H**, **5'-H**).

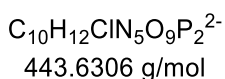
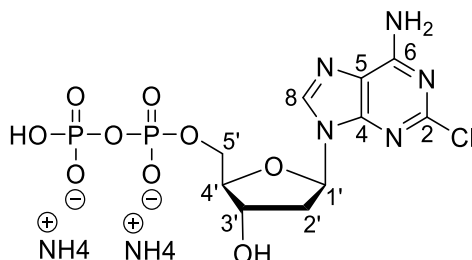
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, D_2O): 160.6 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26.6$ Hz, **C-4**), 150.8 (**C-2**), 141.5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 232.2$ Hz, **C-5**), 125.8 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 35.0$ Hz, **C-6**), 90.0 (**C-1'**), 83.7 (**C-4'**), 74.2 (**C-3'**), 69.9 (**C-2'**), 65.1 (**C-5'**).

- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, D_2O): -10.17 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 21.2$ Hz, **P- α**), -11.38 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 21.6$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 420.9885, gef.: 420.9557 [M] $^-$.

Synthese von CdA-5'-Diphosphat 136

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 51.3 mg (109 μmol , 1.0 Äquiv.) CdA-5'-monophosphat **102** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.15 mL (1.09 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.24 mL (1.75 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.15 mL (1.09 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 50.0 μL (0.66 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 0.82 mL (0.33 mmol, 3.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 40.3 mg (81.0 μmol , 74 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, D₂O): 8.47 (s, 1H, **8-H**), 6.40 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, **1'-H**), 4.27 - 4.21 (m, 1H, **4'-H**), 4.21 - 4.07 (m, 2H, **5'-H**), 2.74 (dt, ²J_{H,H} = 13.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.53 (ddd, ²J_{H,H} = 13.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, **2'-Hb**).

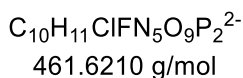
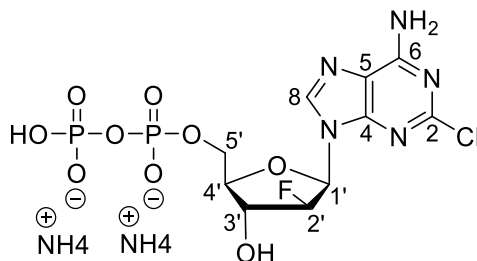
- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, D₂O): 158.0 (**C-6**), 155.3 (**C-2**), 151.6 (**C-4**), 141.3 (**C-8**), 119.0 (**C-5**), 88.2 (d, ³J_{C,P} = 8.6 Hz, **C-4'**), 85.4 (**C-1'**), 73.0 (**C-3'**), 66.0 (d, ²J_{C,P} = 5.1 Hz, **C-5'**), 41.5 (**C-2'**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -10.44 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, **P- α**), -11.20 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 443.9883, gef.: 443.9854 [M].

Synthese von ClFaraA-5'-Diphosphat 140

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 54.7 mg (86.0 μ mol, 1.0 Äquiv.) ClFaraA-5'-monophosphat **107** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.12 mL (0.86 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.19 mL (1.38 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.12 mL (0.86 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 45.0 μ L (0.52 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 0.65 mL (0.26 mmol, 3.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat-Lösung (0.4 M in Acetonitril) in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 40.0 mg (77.6 μ mol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, D₂O): 8.42 (d, ⁴J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, **8-H**), 6.47 (dd, ³J_{H,F} = 14.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, **1'-H**), 5.34 (dt, ²J_{H,F} = 51.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, **2'-H**), 4.73 (dt, ³J_{H,F} = 18.2 Hz, ³J_{H,H} = 4.2 Hz, 1H, **3'-H**), 4.34 - 4.21 (m, 3H, **4'-H**, **5'-H**).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, D₂O): 158.1 (**C-6**), 155.5 (**C-2**), 150.6 (**C-4**), 142.1 (**C-8**), 118.2 (**C-5**), 95.5 (**C-2'**), 93.0 (d, ¹J_{C,F} = 197 Hz, **C-2'**), 82.7 (d, ²J_{C,F} = 16.2 Hz, **C-1'**), 82.1 (d, ³J_{C,F} = 12.7 Hz, **C-4'**), 73.1 (d, ²J_{C,F} = 26.9 Hz, **C-3'**), 64.4 (**C-5'**).

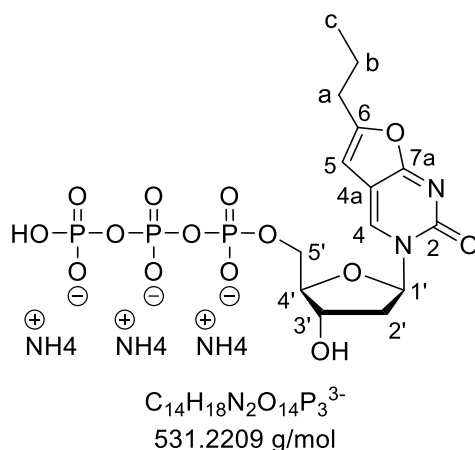
- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -9.03 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, **P- α**), -9.93 (d, ²J_{P,P} = 20.7 Hz, **P- β**).

- HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 461.9788, gef.: 461.9761 [M]⁺.

5.6.22 Synthese von Nucleosid-5'-Triphosphaten

Synthese von 2'-Desoxy-BCNA-5'-Triphosphat 134

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 61.0 mg (128 μmol, 1.0 Äquiv.) 2'-Desoxy-BCNA-5'-monophosphat **40** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.18 mL (1.28 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.28 mL (2.05 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.18 mL (1.28 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 60.0 μL (770 μmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 0.96 mL (0.39 mmol, 3.0 Äquiv.) Tris(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 41.0 mg (81.2 μmol, 63 %) eines farblosen Feststoffs.

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, D₂O): 8.75 (s, 1H, **4-H**), 6.56 (s, 1H, **5-H**), 6.39 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **1'-H**), 4.68 - 4.61 (m, 1H, **3'-H**), 4.37 - 4.25 (m, 3H, **4'-H**, **5'-H**), 2.71 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **a-H**), 2.65 (ddd, ²J_{H,H} = 14.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, 1H, **2'-Ha**), 2.38 (dt, ²J_{H,H} = 14.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 1H, **2'-Hb**), 1.73 (h, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, **b-H**), 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 3H, **c-H**).

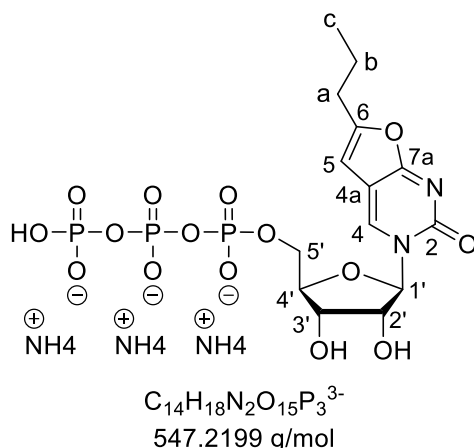
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, D₂O): 171.5 (**C-7a**), 160.9 (**C-6**), 156.0 (**C-2**), 137.1 (**C-4**), 109.9 (**C-4a**), 100.1 (**C-5**), 88.2 (**C-4'**), 86.0 (**C-1'**), 69.8 (**C-3'**), 64.8 (d, ²J_{C,P} = 4.6 Hz, **C-5'**), 40.2 (**C-2'**), 29.4 (**C-a**), 19.7 (**C-b**), 12.8 (**C-c**).

- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, MeOH-*d*₄): -8.94 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, **P-α**), -10.21 (²J_{P,P} = 20.5 Hz, **P-β**).

Synthese von BCNA-5'-Triphosphat 142

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 61.2 mg (128 μmol, 1.0 Äquiv.) BCNA-5'-monophosphat **41** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.16 mL (1.13 mmol, 10.0 Äquiv.)

Trifluoressigsäureanhydrid und 0.25 mL (1.81 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.16 mL (1.13 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 50.0 μ L (679 μ mol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 306 mg (0.34 mmol, 3.0 Äquiv.) Tris(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 39.7 mg (66.1 μ mol, 58 %) eines farblosen Feststoffs.

- **1H -NMR:** δ [ppm] (500 MHz, D_2O): 8.78 (s, 1H, **4-H**), 6.56 (s, 1H, **5-H**), 6.09 (d, $^3J_{H,H} = 2.3$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.50 - 4.43 (m, 1H, **5'-Ha**), 4.38 - 4.31 (m, 4H, **2'-H**, **3'-H**, **4'-H**, **5'-Hb**), 2.70 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz), 1.73 (h, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, **b-H**), 0.97 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, **c-H**).

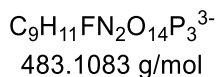
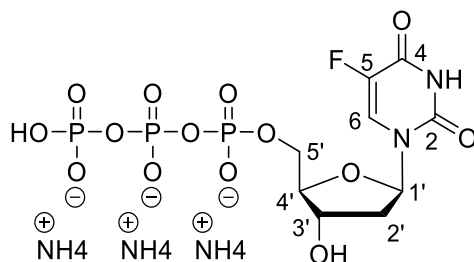
- **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (126 MHz, D_2O): 172.1 (**C-7a**), 161.4 (**C-4**), 156.7 (**C-2**), 137.5 (**C-4**), 110.4 (**C-4a**), 100.6 (**C-5**), 92.1 (**C-1'**), 83.0 (**C-4'**), 75.5 (**C-2'**), 68.4 (**C-3'**), 64.4 ($^2J_{P,C} = 4.9$ Hz, **C-5'**), 29.8 (**a-C**), 20.1 (**b-C**), 13.2 (**c-C**).

- **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (202 MHz, D_2O): -10.67 (d, $^2J_{P,P} = 19.7$ Hz, **P- α**), -11.47 ($^2J_{P,P} = 20.3$ Hz, **P- γ**), -23.15 (t, $^2J_{P,P} = 19.9$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 549.2348, gef.: 549.0079 [M]⁻.

Synthese von FdU-5'-Triphosphat 71

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 72.8 mg (151 μ mol, 1.0 Äquiv.) FdU-5'-monophosphat **68** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.21 mL (1.51 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.33 mL (2.41 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.21 mL (1.51 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 72.0 μ L (903 μ mol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 407 mg (0.45 mmol, 3.0 Äquiv.) Tris(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 45.2 mg (83.3 μmol , 56 %) eines farblosen Feststoffs.

- **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (600 MHz, D_2O): 8.07 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4$ Hz, 1H, **6-H**), 6.28 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz 1H, **1'-H**), 4.65 - 4.58 (m, 1H, **3'-H**), 4.25 - 4.12 (m, 3H, **4'-H**, **5'-H**), 2.44 - 2.28 (m, 2H, **2'-H**).

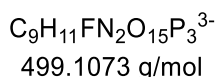
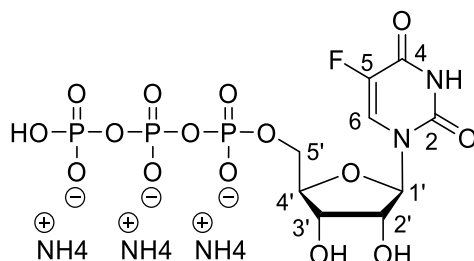
- **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (151 MHz, D_2O): 159.7 (**C-4**), 149.0 (**C-2**), 125.9 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 32.0$ Hz, **C-6**), 124.9 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 182.5$ Hz, **C-5**), 88.6 ($^2J_{\text{C,P}} = 8.7$ Hz, **C-5'**), 85.6 (**C-1'**), 70.5 (**C-3'**), 65.3 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 5.3$ Hz, **C-4'**), 38.7 (**C-2'**).

- **$^{31}\text{P-NMR}$:** δ [ppm] (162 MHz, D_2O): -10.38 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.7$ Hz, **P- α**), -11.49 ($^2J_{\text{P,P}} = 20.1$ Hz, **P- γ**), -23.13 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 19.9$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 484.9569, gef.: 484.9557 [M]⁻.

Synthese von FU-5'-Triphosphat 70

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 51.1 mg (93.5 μmol , 1.0 Äquiv.) FU-5'-monophosphat **77** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.13 mL (0.94 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.21 mL (1.50 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.13 mL (0.94 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 40.0 μL (561 μmol , 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 253 mg (0.28 mmol, 3.0 Äquiv.) Tris(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 49.8 mg (85.9 μmol , 92 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, D₂O): 8.13 (d, $^3J_{F,H} = 6.4$ Hz, 1H, **6-H**), 5.99 (dd, $^3J_{H,H} = 5.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.7$ Hz, 1H, **1'-H**), 4.46 - 4.37 (m, 2H, **2'-H**, **3'-H**), 4.34 - 4.25 (m 3H, **4'-H**, **5'-H**).

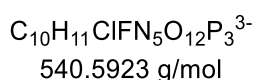
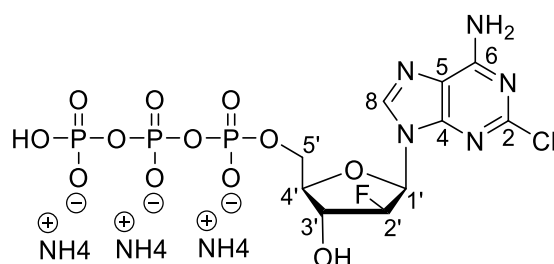
- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (151 MHz, D₂O): 159.4 (d, $^2J_{C-F} = 25.2$ Hz, **C-4**), 150.3 (**C-2**), 140.9 (d, $^1J_{C-F} = 233.0$ Hz, **C-5**), 125.4 (d, $^3J_{C,F} = 35.4$ Hz, **C-6**), 88.5 (**C-1'**), 83.4 (**C-4'**), 73.7 (**C-3'**), 69.5 (**C-2'**), 64.9 (d, $^3J_{C,P} = 4.8$ Hz, **C-5'**).

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -10.70 (d, $^2J_{P,P} = 19.2$ Hz, **P- α**), -11.53 ($^2J_{P,P} = 20.3$ Hz, **P- γ**), -23.09 (t, $^2J_{P,P} = 19.8$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 500.9518, gef.: 500.9506 [M]⁻.

Synthese von ClFaraA-5'-Triphosphat 119

Die Reaktion wurde nach **AAV 7** durchgeführt. 48.0 mg (77.0 μ mol, 1.0 Äquiv.) ClFaraA-5'-monophosphat **107** wurde in 5 mL abs. Acetonitril mit 0.11 mL (0.77 mmol, 10.0 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid und 0.17 mL (1.23 mmol, 16.0 Äquiv.) Triethylamin und anschließend mit 0.11 mL (0.77 mmol, 10.0 Äquiv.) Triethylamin und 40.0 μ L (461 μ mol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung zu 173 mg (0.19 mmol, 3.0 Äquiv.) Tris(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in 5 mL abs. Acetonitril getropft (0.2 mL/min) und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.



Ausbeute: 26.9 mg (43.7 μ mol, 57 %) eines farblosen Feststoffs.

- **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, D₂O): 8.43 (d, $^4J_{H,H} = 2.0$ Hz, 1H, **8-H**), 6.43 (dd, $^3J_{H,F} = 13.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.6$ Hz, 1H, **1'-H**), 5.30 (dt, $^2J_{H,F} = 51.9$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.3$ Hz, 1H, **2'-H**), 4.33 - 4.19 (m, 3H, **4'-H**, **5'-H**).








- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -10.27 (d, $^2J_{P,P} = 18.6$ Hz, **P- α**), -11.32 ($^2J_{P,P} = 19.7$ Hz, **P- γ**), -22.99 (t, $^2J_{P,P} = 19.2$ Hz, **P- β**).

- **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 541.9451, gef.: 541.9422 [M]⁻.





















Gefahrstoffverzeichnis

In der folgenden Tabelle sind Verbindungen, Reagenzien und Lösungsmittel aufgeführt, die im Rahmen dieser Promotion verwendet wurden. Diese Gefahrstoffe sind nach GHS (CLP-Verordnung 1272/2008/EG) eingestuft und die entsprechenden Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.










Tab. 9: Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren-Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
18-Krone-6		302	264-270-301+312-501
Aceton		EU066-225-319-336	210-240-305+351+338-403+233
Acetonitril		225-332-302-312-319	210-305-351+338-403-235
Ammoniak (25%)		290-314-335-400	260-273-280-301+330+331-303+361+351-305+351+338
Antimon(III)chlorid		314-411	273-301+330+331-305+351+338-308+310
Benzotriazolyl-oxyl-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat		228-315-335	210-251
Benzotriazol-1-yl-oxyl-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat		315-319-335	261-305+351+338










GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Bis(trimethylsilyl)acetamide	 	226-302-314	210-233-280-301+312-303+361+353-305+351+338
tert-Butyldimethylsilylchlorid	 	228-314	210-280-305+351+338-309-310
tert-Butylhydroperoxid (5.5 M in n-Decan)	    	301-311-330-314-226-242	210-301+310-303+361+353-304+340-305+351+338-320-330-410
Chloroform	 	302-315-319-331-351-361-372	262-281-305+351+338-311
N-Chlorsuccinimid	 	302-314	280-305+351+338-310
Cladribin		340-350	202-308+313
Clofarabin	 	302+312+332-315-319-335-351	280-301+312-302+352+312-304+340+312-305+351+338-308+313
Cytarabin	 	317-319-341-361	302+352-201-280-308+313
Decanoylchlorid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
2'-Desoxyguanosin		302	-










2'-Desoxy-5-iod- uridin		351-361	201-202-281+308+313- 405-501
1,8- Diazabicyclo[5.4.0]u ndec-7-en		301-314-412-290	273-280-301+310+330- 301+330+331- 303+361+353- +305+351+338
Dichlormethan		315-319-335-336- 351-373	261-281-305+351+338
4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in CH₃CN)		318-302-335-315	280-305+351+338
Diethylether		224-302-336- EU019-EU066	210-240-403+235
<i>N,N</i>- Diisopropylamin		225-302-314-335	210-260-280+310- 303+361+353- 305+351+338-403+235
<i>N,N</i>- Diisopropylethyl- amin		225-331-314-302- 412	210-260-303+361+353- 305+351+338
<i>N,N'</i>-Dimethyl- formamid		360-226-332-312- 319	201-302-352- 305+351+338-308+313
4- (Dimethylamino)pyri din		301+331-310-315- 318-370-411	262-273-280-301+310- 302+352+312- 305+351+338
Dimethyl-	-	--	--

sulfoxid-d₆			
Diphenylphosphit		318-314	280-301+330+331-305+351+338-310
Dowex 50W-X8		315-319-335	261-264-280-302+352-304+340-305+351+338-312-332+313-337+313
Essigsäure		226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338
Essigsäureanhydrid		226, 302, 331, 314, 335	210-260-280-303+361+353-305+351+338-312
Ethanol		225	210-233-240-241-243-280-303+361+353
Ethylacetat		225-319-336	210-240-305+351+338
Ethylenglycoldimethylether		225-332-360FD-EUH019	201-210-240-308+313
2-Fluoradenin		315-319-335	280-304+340-312+332+313-337+313
2-Fluoradenosin		302+315+319+335	261+264+270-301+312-302+352-305+351+338
9-Fluorenylmethanol		-	-












GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

5-Fluoruracil		301-312-315-319- 335-340-360FD	261-280362- 305+351+338-405-502
5-Fluoruridin		360-341-302	264-281-301+312
4-Hydroxybenzyl- alkohol		315-319-335	261-280-304+340- 305+351+338
Hex-1-in		225-304-315-319- 335	210-261-301+310-305
Imidazol	-	302-314-360D	260-280-301+312- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Isopropanol		225-319-336	210-233-240-241-242- 243-264-280- 303+361+353- 305+351+338-337+313
2-Iodbenzoylchlorid		314-335	261-280-305+351+338
5-Ioduridin		315-319-335	261-264-280-302+352- 321-305+351+338- 332+313-362
Kaliumnitrit		272-301-319-400	210-220-264-273- 301+310-305+351+338
Kupfer(I)-iodid		400-410-302-315- 319-335	261-280-304+340- 305+351+338

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Methanol		225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
1-Methylimidazol		302-312-314	260-264-280-301+330+331-302+352-303+361+353-304+340-305+351+338-310-321
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumhydrogen-carbonat		319	264-280-305+351+338-337+313
Natriumhydroxid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310
Natriumsulfat	-	-	-
Nonanoylchlorid		314	280-305-351+338-310
Oxalylchlorid		331-335-314-EU014-EU029	P340
Pent-1-in		225-304-315-319-335	210-280-301+310-305+351+338-315
Petrolether 50-70		225-304-315-336-361f-373-411	201-210-233-240-273-280-281-301+310-302+352-304+340-308+313-331-501
Phosphortrichlorid		EU014-EU029-300-314-330-373	260-264-280-284-301+310-301+330+331-303+361+353-304+340-


GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

			305+351+338-314-320
Phosphorylchlorid		300+330-314-372- EU014-EU029	280-301+330+331- 304+340-305+351+338- 308+310
Pyridin		225-302-312-332	210-233-240-241- 302*352-303+361+353- 304+340-330
Salzsäure (37%)		290-314-335	260-280-303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Schwefelsäure		290-314	280-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338+310
tert-Butylnitrit		225-302+332	210-233-240-241- 301+312-304+340+312
Tetra-<i>n</i>- butylammoniumacetat		315-319-335	302+352-337+313- 304+340-312-280- 332+313
Tetra-<i>n</i>-butyl- ammoniumfluorid (1 M in THF)		225-314-351-302- 335-EU019	210-260-303+361+353- 305+351+338
Tetra-<i>n</i>-butyl- ammoniumhydroxid		314	260-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338
Tetrahydrofuran		EU019-225-302- 319-335-351	210-233-280-370+378- 501
Toluol		225-304-315-336-	201-202-210-223-240- 241-242-243-261-264-

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

		361d-373	280-281-301+310-302+352-303+361+353-308+313-321-331
Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)		302-315-317-319	280-302+352-305+351+338
Tributylamin		260-280	301+312-302+352-304+340
Tridecansäure		315-319-335	261-305+351+338
Triethylamin		225-302-311-312-314-332	210-280-303+361+353-304+340-310-305+351+338-403+233
Triethylamin Trihydrofluorid		300-310-330-314	280-303+361+353-305+351+338-310
Trifluoressigsäureanhydrid		314-332-412-EU014	260-301+330+331-303+361+353-305+351+338
Trifluormethansulfonsäureanhydrid		302-314	280-305+351+338-310
Triethylphosphat		302-319	264-270-280-301+312-305+351+338-337+313
Trimethylphosphat		302-315-319-340+351	201-202-301+312-302+352-305+351+338-308+313
Trimethylsilyltrifluormethansulfonat		226-314	210-233-240-280-303+361+353-305+351+338

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Undecansäure		315-319-335	261-305+351+338
---------------------	---	-------------	-----------------

Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organisation, who.int, Zugriff: 05.08.2022.
- [2] International Agency for Research on Cancer, <https://gco.iarc.fr/today/home>, Zugriff: 05.08.2022.
- [3] Löffler, Petrides; *Biochemie und Pathobiochemie*, (Springer Berlin Heidelberg, **2014**).
- [4] Hanahan, D. & Weinberg, R. A.; Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, **2011**, 144, 646–674.
- [5] Irigaray, P. *et al.*; Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2007**, 61, 640–658.
- [6] Bruce Baguley, D. K.; *Anticancer Drug Development*, /Academic Press, **2001**).
- [7] Armstrong, R. & Diasio, R.; Metabolism and biological activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine, a novel fluoropyrimidine, *Cancer Res*, **1980**, 40, 3333–3338.
- [8] Vaupel, P.; Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology, *Semin Radiat Oncol*, **2004**, 14, 198–206.
- [9] Tredan, O., Galmarini, C. M., Patel, K. & Tannock, I. F.; Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, **2007**, 99, 1441–1454.
- [10] D. Voet, J. Voet & C. Pratt; *Lehrbuch der Biochemie*, (Wiley-VCH, **2010**).
- [11] Kijima, H., Ishida, H., Ohkawa, T., Kashani-Sabet, M. & Scanlon, K. J.; Therapeutic applications of ribozymes, *Pharmacology and Therapeutics*, **1995**, 68, 247–267.
- [12] Zhou, G. *et al.*; Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy, *Oncotarget*, **2016**, 7, 13446–13463.
- [13] Tanner, N. K.; Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs, *FEMS Microbiol Rev*, **1999**, 23, 257–275.
- [14] Meanwell, M. *et al.*; A short de novo synthesis of nucleoside analogs, *Science (1979)*, **2020**, 369, 725–730.
- [15] Christopherson, R. I., Lyons, S. D. & Wilson, P. K.; Inhibitors of de Novo Nucleotide Biosynthesis as Drugs, *Acc Chem Res*, **2002**, 35, 961–971.
- [16] Shelton, J. *et al.*; Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs, *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 14379–14455.
- [17] Y. Shoenfeld & J. George; *Cancer and Autoimmunity*, (Elsevier Science, 2000)..
- [18] Galmarini, C. M., Mackey, J. R. & Dumontet, C.; Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment, *Lancet Oncology*, **2002**, 3, 415–424.
- [19] Ramesh, D., Vijayakumar, B. G. & Kannan, T.; Advances in Nucleoside and Nucleotide Analogues in Tackling Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis Virus Infections, *ChemMedChem*, **2021**, 16, 1403–1419.

-
- [20] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto & L. Stryer; *Biochemie*, (Springer).
- [21] Morrow, M. R., Singh, D., Lu, D. & Grant, C. W.; Glycosphingolipid fatty acid arrangement in phospholipid bilayers: cholesterol effects, *Biophys J*, **1995**, 68, 179–186.
- [22] Yèagle, P. L.; Lipid regulation of cell membrane structure and function, *The FASEB Journal*, **1989**, 3, 1833–1842.
- [23] Singer, S. J. & Nicolson, G. L.; The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **1972**, 175, 720–731.
- [24] Rubio-Aliaga, I. & Daniel, H.; Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition, *Xenobiotica*, **2008**, 38, 1022–1042.
- [25] Simons, K. & Ikonen, E.; Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **1997**, 387, 569–572.
- [26] Jain, R. K.; Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors, *Adv Drug Deliv Rev*, **2001**, 46, 149–168.
- [27] Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E.; Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters, *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2, 48–58.
- [28] Young, J. D., Yao, S. Y. M., Sun, L., Cass, C. E. & Baldwin, S. A.; Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins, *Xenobiotica*, **2008**, 38, 995–1021.
- [29] Hanahan, D. & Weinberg, R. A.; The hallmarks of cancer, *Cell*, **2000**, 100, 57–70.
- [30] Valastyan, S. & Weinberg, R. A.; Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms, *Cell*, **2011**, 147, 275–292.
- [31] Kusumi, A. & Sako, Y.; Cell surface organization by the membrane skeleton, *Curr Opin Cell Biol*, **1996**, 8, 566–574.
- [32] Malumbres, M. & Barbacid, M.; Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm, *Nature Reviews Cancer*, **2009**, 9, 153–166.
- [33] Nowell, P. C.; Tumor progression: A brief historical perspective, *Seminars in Cancer Biology*, **2002**, 12, 261–266.
- [34] Burkhart, D. L. & Sage, J.; Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene, *Nature Reviews Cancer*, **2008**, 8, 671–682.
- [35] Riley, D. J., Lee, E. Y. H. P. & Lee, W. H.; The retinoblastoma protein: More than a tumor suppressor, *Annual Review of Cell Biology*, **1994**, 10, 1–29.
- [36] Adams, J. M. & Cory, S.; The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene*, **2007**, 26, 1324–1337.
- [37] Nurse, P.; A long twentieth century of the cell cycle and beyond, *Cell*, **2000**, 100, 71–78.
-

-
- [38] Blasco, M. A.; Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond, *Nature Reviews Genetics*, **2005**, 6, 611–622.
- [39] Shay, J. W. & Wright, W. E.; Hayflick, his limit, and cellular ageing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2000**, 1, 72–76.
- [40] Hanahan, D. & Folkman, J.; Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*, **1996**, 86, 353–364.
- [41] Bouck, N., Stellmach, V. & Hsu, S. C.; How tumors become angiogenic, *Advances in Cancer Research*, **1996**, 69, 135–174.
- [42] Adams, J. M. & Cory, S.; Transgenic models of tumor development, *Science (1979)*, **1991**, 254, 1161–1167.
- [43] Pavlova, N. N. & Thompson, C. B.; The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism, *Cell Metabolism*, **2016**, 23, 27–47.
- [44] Vogelstein, B. & Kinzler, K. W.; Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, **2004**, 10, 789–799.
- [45] Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D.; Genomic instability an evolving hallmark of cancer, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2010**, 11, 220–228.
- [46] Anderson, N. M. & Simon, M. C.; The tumor microenvironment, *Current Biology*, **2020**, 30, 921–925.
- [47] Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L.; Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, **2001**, 414, 105–111.
- [48] Heppner, G. H. & Miller, B. E.; Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences, *Cancer and Metastasis review*, **1983**, 2, 5–23.
- [49] Gilbertson, R. J. & Rich, J. N.; Making a tumour's bed: Glioblastoma stem cells and the vascular niche, *Nature Reviews Cancer*, **2007**, 7, 733–736.
- [50] Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F.; Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 3983–3988.
- [51] Pasquale, E. B.; Eph receptors and ephrins in cancer: Bidirectional signalling and beyond, *Nature Reviews Cancer*, **2010**, 10, 165–180.
- [52] Aznavoorian, S., Stracke, M. L., Krutzsch, H., Schiffmann, E. & Liotta, L. A.; Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells, *Journal of Cell Biology*, **1990**, 110, 1427–1438.
- [53] Spill, F., Reynolds, D. S., Kamm, R. D. & Zaman, M. H.; Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis, *Current Opinion in Biotechnology*, **2016**, 40, 41–48.
- [54] Arneth, B.; Tumor Microenvironment, *Medicina (B Aires)*, **2019**, 56, 15.
-

-
- [55] Arbeit, J. M. *et al.*; Hypoxia: Importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy, in *International Journal of Radiation Biology*, **2006**, 82, 699–757.
- [56] Hinshaw, D. C. & Shevde, L. A.; The tumor microenvironment innately modulates cancer progression, *Cancer Research*, **2019**, 79, 4557–4567.
- [57] Minchinton, A. I. & Tannock, I. F.; Drug penetration in solid tumours, *Nature Reviews Cancer*, **2006**, 6, 583–592.
- [58] Durand, R. E.; Intermittent blood flow in solid tumours - An under-appreciated source of 'drug resistance', *Cancer and Metastasis Reviews*, **2001**, 20, 57–61.
- [59] Padera, T. P. *et al.*; Cancer cells compress intratumour vessels, *Nature*, **2004**, 427, 695.
- [60] Carmeliet, P. & Jain, R. K.; Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, **2000**, 407, 249–257.
- [61] Sawyers, C.; Targeted cancer therapy, *Nature*, **2004**, 432, 294–297.
- [62] Allen, C., Her, S. & Jaffray, D. A.; Radiotherapy for Cancer: Present and Future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2017**, 109, 1–2.
- [63] Fang, F., Xiao, W. & Tian, Z.; NK cell-based immunotherapy for cancer, *Seminars in Immunology*, **2017**, 31, 37–54.
- [64] Relling, M. v. & Dervieux, T.; Pharmacogenetics and cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, **2001**, 1, 99–108.
- [65] Girling, D. J. *et al.*; Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: A randomised controlled trial, *Lancet*, **2002**, 359, 1727–1733.
- [66] Corrie, P. G.; Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects, *Medicine*, **2008**, 36, 24–28.
- [67] Saffhill, R., Margison, G. P. & O'Connor, P. J.; Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents, *BBA - Reviews on Cancer*, **1985**, 823, 111–145.
- [68] BROOKES, P. & LAWLEY, P. D.; ALKYLATING AGENTS, *Br Med Bull*, **1964**, 20, 91–95.
- [69] Mirkes, P. E.; Cyclophosphamide teratogenesis: A review, *Teratog Carcinog Mutagen*, **1985**, 5, 75–88.
- [70] Zhang, J., F.G. Stevens, M. & D. Bradshaw, T.; Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance, *Curr Mol Pharmacol*, **2012**, 5, 102–114.
- [71] Kartalou, M. & Essigmann, J. M.; Mechanisms of resistance to cisplatin, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2001**, 478, 23–43.
- [72] Heidelberger, C. *et al.*; Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds, *Nature*, **1957**, 179, 663–666.
-

-
- [73] Ramesh, D., Vijayakumar, B. G. & Kannan, T.; Therapeutic potential of uracil and its derivatives in countering pathogenic and physiological disorders, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2020**, 207, 112801.
- [74] Elion, G. B., Singer, S. & Hitchings, G. H.; Microbiological effects of 6-mercaptopurine, *Ann N Y Acad Sci*, **1954**, 60, 200–206.
- [75] Elion, G. B., Singer, S. & Hitchings, G. H.; ANTAGONISTS OF NUCLEIC ACID DERIVATIVES, *Journal of Biological Chemistry*, **1954**, 208, 477–488.
- [76] Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F. & Dumontet, C.; Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2013**, 12, 447–464.
- [77] Watkins, P. B.; Drug safety sciences and the bottleneck in drug development, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2011**, 89, 788–790.
- [78] Gibson, R. J. & Keefe, D. M. K.; Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: Mechanisms of damage and prevention strategies, *Supportive Care in Cancer*, **2006**, 14, 890–900.
- [79] Chen, H. X. & Cleck, J. N.; Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway, *Nature Reviews Clinical Oncology*, **2009**, 6, 465–477.
- [80] Groopman, J. E. & Itri, L. M.; Chemotherapy-Induced Anemia in Adults: Incidence and Treatment, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, **1999**, 91, 1616–1634.
- [81] Morton, L. M. *et al.*; Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008, *Blood*, **2013**, 121, 2996–3004.
- [82] Ludwig, H. *et al.*; The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): A large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients, *Eur J Cancer*, **2004**, 40, 2293–2306.
- [83] Quintieri, L., Fantin, M. & Vizler, C.; Identification of molecular determinants of tumor sensitivity and resistance to anticancer drugs, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2007**, 593, 95–104.
- [84] Muller, P. Y. & Milton, M. N.; The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2012**, 11, 751–761.
- [85] Wigmore, P. M. *et al.*; Effects of 5-FU, *Adv Exp Med Biol*, **2010**, 678, 157–164.
- [86] Ishikawa, T., Fukase, Y., Yamamoto, T., Sekiguchi, F. & Ishitsuka, H.; Antitumor activities of a novel fluoropyrimidine, N4- pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine (Capecitabine), *Biol Pharm Bull*, **1998**, 21, 713–717.
- [87] Walko, C. M. & Lindley, C.; Capecitabine: A review, *Clinical Therapeutics*, **2005**, 27, 23–44.
-

-
- [88] Galmarini, C. M. *et al.*; Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients, *Leuk Res*, **2002**, 26, 621–629.
- [89] Chhikara, B. S. & Parang, K.; Development of cytarabine prodrugs and delivery systems for leukemia treatment, *Expert Opin Drug Deliv*, **2010**, 7, 1399–1414.
- [90] Candelaria, M. *et al.*; Pharmacogenetics and pharmacoepigenetics of gemcitabine, *Medical Oncology*, **2010**, 27, 1133–1143.
- [91] Liliemark, J.; The clinical pharmacokinetics of cladribine, *Clinical Pharmacokinetics*, **1997**, 32, 120–131.
- [92] Gandhi, V. & Plunkett, W.; Cellular and clinical pharmacology of fludarabine, *Clinical Pharmacokinetics*, **2002**, 41, 93–103.
- [93] Bonate, P. L. *et al.*; Discovery and development of clofarabine: A nucleoside analogue for treating cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2006**, 5, 855–863.
- [94] Diab, R., Degobert, G., Hamoudeh, M., Dumontet, C. & Fessi, H.; Nucleoside analogue delivery systems in cancer therapy, *Expert Opin Drug Deliv*, **2007**, 4, 513–531.
- [95] Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E. & Young, J. D.; Nucleoside transporters: Molecular biology and implications for therapeutic development, *Molecular Medicine Today*, **1999**, 5, 216–224.
- [96] Vickers, M. F., Young, J. D., Baldwin, S. A., MacKey, J. R. & Cass, C. E.; Nucleoside transporter proteins: Emerging targets for drug discovery, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **2000**, 4, 515–539.
- [97] Wiley, J. S., Jones, S. P., Sawyer, W. H. & Paterson, A. R. P.; Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia, *Journal of Clinical Investigation*, **1982**, 69, 479–489.
- [98] van Rompay, A. R., Johansson, M. & Karlsson, A.; Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases, *Pharmacology and Therapeutics*, **2003**, 100, 119–139.
- [99] Jackson, S. P. & Bartek, J.; The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, **2009**, 461, 1071–1078.
- [100] Ewald, B., Sampath, D. & Plunkett, W.; Nucleoside analogs: Molecular mechanisms signaling cell death, *Oncogene*, **2008**, 27, 6522–6537.
- [101] Smal, C. *et al.*; Identification of in vivo phosphorylation sites on human deoxycytidine kinase: Role of Ser-74 in the control of enzyme activity, *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, 281, 4887–4893.
- [102] Matsuda, A. & Sasaki, T.; Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides, *Cancer Sci*, **2004**, 95, 105–111.
-

-
- [103] Parker, W. B.; Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer, *Chem Rev*, **2009**, 109, 2880–2893.
- [104] MELVIN, W. T., MILNE, H. B., SLATER, A. A., ALLEN, H. J. & KEIR, H. M.; Incorporation of 6-Thioguanosine and 4-Thiouridine into RNA. Application to Isolation of Newly Synthesised RNA by Affinity Chromatography, *Eur J Biochem*, **1978**, 92, 373–379.
- [105] Sahasranaman, S., Howard, D. & Roy, S.; Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines, *European Journal of Clinical Pharmacology*, **2008**, 64, 753–767.
- [106] Shelton, J. *et al.*; Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs, *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 14379–14455.
- [107] Perez, M. A. S., Cerqueira, N. M. F. S. A., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J.; Ribonucleotide Reductase: A Mechanistic Portrait of Substrate Analogues Inhibitors, *Curr Med Chem*, **2010**, 17, 2854–2872.
- [108] Kicska, G. A. *et al.*; Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98, 4593–4598.
- [109] Eriksson, S.; Is the Expression of Deoxynucleoside Kinases and 5′-nucleotidases in Animal Tissues Related to the Biological Effects of Nucleoside Analogs?, *Curr Med Chem*, **2013**, 20, 4241–4248.
- [110] Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A.; Cancer statistics, 2016, *CA Cancer J Clin*, **2016**, 66, 7–30.
- [111] Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A.; Cancer statistics, 2014, *CA Cancer J Clin*, **2014**, 64, 9–29.
- [112] Lindemalm, S., Liliemark, J., Juliusson, G., Larsson, R. & Albertioni, F.; Cytotoxicity and pharmacokinetics of cladribine metabolite, 2-chloroadenine in patients with leukemia, *Cancer Lett*, **2004**, 210, 171–177.
- [113] Song, X. *et al.*; Amino acid ester prodrugs of the anticancer agent gemcitabine: Synthesis, bioconversion, metabolic bioevasion, and hPEPT1-mediated transport, *Mol Pharm*, **2005**, 2, 157–167.
- [114] Mangravite, L. M., Badagnani, I. & Giacomini, K. M.; Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney, *Eur J Pharmacol*, **2003**, 479, 269–281.
- [115] Månsson, E. *et al.*; Down-regulation of deoxycytidine kinase in human leukemic cell lines resistant to cladribine and clofarabine and increased ribonucleotide reductase activity contributes to fludarabine resistance, *Biochem Pharmacol*, **2003**, 65, 237–247.
-

-
- [116] Ackland, S. P., Clarke, S. J., Beale, P. & Peters, G. J.; Thymidylate synthase inhibitors, *Update on Cancer Therapeutics*, **2006**, 1, 403–427.
- [117] di Paolo, A. & Bocci, G.; Drug distribution in tumors: Mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification, *Current Oncology Reports*, **2007**, 9, 109–114.
- [118] Magzoub, M., Jin, S. & Verkman, A. S.; Enhanced macromolecule diffusion deep in tumors after enzymatic digestion of extracellular matrix collagen and its associated proteoglycan decorin, *The FASEB Journal*, **2008**, 22, 276–284.
- [119] Grantab, R., Sivananthan, S. & Tannock, I. F.; The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells, *Cancer Res*, **2006**, 66, 1033–1039.
- [120] de Schutter, C., Ehteshami, M., Hammond, E. T., Amblard, F. & Schinazi, R. F.; Metabolism of Nucleosides and Nucleotides Prodrugs, *Curr Pharm Des*, **2017**, 23, 6984–7002.
- [121] Inga Reimer; 3'-S-Phosphorthiolatverbrückte Oligonucleotide und Fluoreszierende Nucleotid-Prodrugs für Zellaufnahmestudien, (Universität Hamburg, 2016).
- [122] Srivastva, D. N. & Farquhar, D.; Bioreversible phosphate protective groups: Synthesis and stability of model acyloxymethyl phosphates, *Bioorg Chem*, **1984**, 12, 118–129.
- [123] de Clercq, E.; Current treatment of hepatitis B virus infections, *Reviews in Medical Virology*, **2015**, 25, 354–365.
- [124] Mackman, R. L. *et al.*; Synthesis, anti-HIV activity, and resistance profile of thymidine phosphonomethoxy nucleosides and their bis-isopropylloxymethylcarbonyl (bisPOC) prodrugs, *Bioorg Med Chem*, **2007**, 15, 5519–5528.
- [125] Thornton, P. J., Kadri, H., Miccoli, A. & Mehellou, Y.; Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrug Clinical Candidates, *J Med Chem*, **2016**, 59, 10400–10410.
- [126] Erion, M. D. *et al.*; Design, Synthesis, and Characterization of a Series of Cytochrome P 450 3A-Activated Prodrugs (HepDirect Prodrugs) Useful for Targeting Phosph(on)ate-Based Drugs to the Liver, *J Am Chem Soc*, **2004**, 126, 5154–5163.
- [127] McGuigan, C., Pathirana, R. N., Mahmood, N., Devine, K. G. & Hay, A. J.; Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT, *Antiviral Res*, **1992**, 17, 311–321.
- [128] Keating, G. M. & Vaidya, A.; Sofosbuvir: First global approval, *Drugs*, **2014**, 74, 273–282.
- [129] McGuigan, C. *et al.*; Phosphoramidate prodrugs of the anticancer agent fudr successfully deliver the preformed bioactive monophosphate in cells and confer advantage over the parent nucleoside, *J Med Chem*, **2011**, 54, 7247–7258.
-

-
- [130] Slusarczyk, M. *et al.*; Application of ProTide technology to gemcitabine: A successful approach to overcome the key cancer resistance mechanisms leads to a new agent (NUC-1031) in clinical development, *J Med Chem*, **2014**, 57, 1531–1542.
- [131] Meier, C. & Balzarini, J.; Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules, *Antiviral Research*, **2006**, 71, 282–292.
- [132] Meier, C., Renze, J., Ducho, C. & Balzarini, J.; cycloSal-d4TMP Pronucleotides-Structural Variations, Mechanistic Insights and Antiviral Activity, *Curr Top Med Chem*, **2005**, 2, 1111–1121.
- [133] Meier, C., Meerbach, A. & Balzarini, J.; CycloSal-pronucleotides - Development of first and second generation chemical trojan horses for antiviral chemotherapy, *Frontiers in Bioscience*, **2004**, 9, 873–890.
- [134] Meier, C.; “Lock-in”-cycloSal-Pronucleotides - A New Generation of Chemical Trojan Horses?, *Mini Rev Med Chem*, **2004**, 4.
- [135] Gisch, N., Balzarini, J. & Meier, C.; Enzymatically activated cycloSal-d4T-monophosphates: The third generation of cycloSal-pronucleotides, *J Med Chem*, **2007**, 50, 1658–1667.
- [136] Thomson, W. *et al.*; Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the bis(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) esters of the 5'-monophosphate of AZT, *J Chem Soc Perkin 1*, **1993**, 1239–1245.
- [137] Hostetler, K. Y. *et al.*; Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in Rauscher leukemia virus-infected mice, *Antimicrob Agents Chemother*, **1994**, 38, 2792–2797.
- [138] van Wijk, G. M. T., Hostetler, K. Y. & van den Bosch, H.; Lipid conjugates of antiretroviral agents: Release of antiretroviral nucleoside monophosphates by a nucleoside diphosphate diglyceride hydrolase activity from rat liver mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, **1991**, 1084, 307–310.
- [139] Bonnaffé, D. *et al.*; Potential lipophilic nucleotide prodrugs: Synthesis, hydrolysis, and antiretroviral activity of AZT and d4T acyl nucleotides, *Journal of Organic Chemistry*, **1996**, 61, 895–902.
- [140] Meier, C. *et al.*; Rational Development of Nucleoside Diphosphate Prodrugs: DiPPro-Compounds, *Curr Med Chem*, **2015**, 22, 3933–3950.
- [141] Jessen, H. J., Schulz, T., Balzarini, J. & Meier, C.; Bioreversible protection of nucleoside diphosphates, *Angewandte Chemie - International Edition*, **2008**, 47, 8719–8722.
-

-
- [142] Gollnest, T. *et al.*; Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues, *Angewandte Chemie - International Edition*, **2016**, 55, 5255–5258.
- [143] Tristan Gollnest; Das TriPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nucleosidtriphosphat-Prodrugs, (Universität Hamburg, 2015).
- [144] Julian Witt; Synthese fluoreszenzmarkierter TriPPPro-Verbindungen für Zellaufnahmestudien und Synthese antitumorale TriPPPro-Prodrugs, (Universität Hamburg, 2019).
- [145] Schulz, T., Balzarini, J. & Meier, C.; The DiPPPro approach: Synthesis, hydrolysis, and antiviral activity of lipophilic d4T diphosphate prodrugs, *ChemMedChem*, **2014**, 9, 762–775.
- [146] Gollnest, T., de Oliveira, T. D., Schols, D., Balzarini, J. & Meier, C.; Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals, *Nat Commun*, **2015**, 6.
- [147] Weising, S., Sterrenberg, V., Schols, D. & Meier, C.; Synthesis and Antiviral Evaluation of TriPPPro-AbacavirTP, TriPPPro-CarbovirTP, and Their 1',2'- *cis* - Disubstituted Analogues, *ChemMedChem*, **2018**, 13, 1771–1778.
- [148] Zhao, C., Weber, S., Schols, D., Balzarini, J. & Meier, C.; Prodrugs of γ -Alkyl-Modified Nucleoside Triphosphates: Improved Inhibition of HIV Reverse Transcriptase, *Angewandte Chemie*, **2020**, 132, 22247–22255.
- [149] Jia, X., Schols, D. & Meier, C.; Anti-HIV-Active Nucleoside Triphosphate Prodrugs, *J Med Chem*, **2020**, 63, 6003–6027.
- [150] Jia, X., Weber, S., Schols, D. & Meier, C.; Membrane Permeable, Bioreversibly Modified Prodrugs of Nucleoside Diphosphate- γ -Phosphonates, *J Med Chem*, **2020**, 63, 11990–12007.
- [151] Zhao, C., Weber, S., Schols, D., Balzarini, J. & Meier, C.; Prodrugs of γ -Alkyl-Modified Nucleoside Triphosphates: Improved Inhibition of HIV Reverse Transcriptase, *Angewandte Chemie*, **2020**, 132, 22247–22255.
- [152] Xiao Jia; Membrane-Permeable Nucleoside Triphosphate Prodrugs of Anti-HIV Active Nucleoside Analogues: γ -(Phosphate or Phosphonate)-Modified Nucleotide Analogues, (Universität Hamburg, 2020).
- [153] Chenglong Zhao; Non-Symmetrically-Masked TriPPPro Prodrugs and γ -Modified Nucleoside Triphosphate Compounds as Potential Antivirals against HIV, (Universität Hamburg, 2019).
- [154] Jia, X., Schols, D. & Meier, C.; Lipophilic Triphosphate Prodrugs of Various Nucleoside Analogues, *J Med Chem*, **2020**, 63, 6991–7007.
-

-
- [155] Choi, J. S. & Berdis, A. J.; Visualizing nucleic acid metabolism using non-natural nucleosides and nucleotide analogs, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **2016**, 1864, 165–176.
- [156] Sinkeldam, R. W., Greco, N. J. & Tor, Y.; Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: Design, properties, and applications, *Chem Rev*, **2010**, 110, 2579–2619.
- [157] Li, Y. *et al.*; Synthesis of fluorescent nucleoside analogs as probes for 2'-deoxyribonucleoside kinases, *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**, 20, 841–843.
- [158] Florian Pertenreiter; Fluoreszenzmarkierte cycloSal- und DiPPro-Nucleotide, (Universität Hamburg, 2013).
- [159] Balzarini, J. & McGuigan, C.; Chemotherapy of varicella-zoster virus by a novel class of highly specific anti-VZV bicyclic pyrimidine nucleosides, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, **2002**, 1587, 287–295.
- [160] Xiao, Q. *et al.*; Synthesis of AZT 5'-O-hydrogen phospholipids and their derivatives, *Synthesis*, **2003**, 107–111.
- [161] Sowa, T. & Ouchi, S.; The Facile Synthesis of 5'-Nucleotides by the Selective Phosphorylation of a Primary Hydroxyl Group of Nucleosides with Phosphoryl Chloride, *Bull Chem Soc Jpn*, **1975**, 48, 2084–2090.
- [162] Yoshikawa, M., Kato, T. & Takenishi, T.; A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides, *Tetrahedron Lett*, **1967**, 8, 5065–5068.
- [163] Florian Pertenreiter; Fluoreszenzmarkierte cycloSal- und DiPPro-Nucleotide, (Universität Hamburg, **2013**).
- [164] Baldwin, J. E., Thomas, R. C., Kruse, L. I. & Silberman, L.; Rules for Ring Closure: Ring Formation by Conjugate Addition of Oxygen Nucleophiles, *Journal of Organic Chemistry*, **1977**, 42, 3846–3852.
- [165] Carpino, L. A.; The 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Family of Base-Sensitive Amino-Protecting Groups, *Acc Chem Res*, **1987**, 20, 401–407.
- [166] Lisa Weinschenk; DiPPro-Nucleotide mit asymmetrischer Maskierung der Pyrophosphatereinheit, (Universität Hamburg, **2015**).
- [167] Mohamady, S. & Jakeman, D. L.; An improved method for the synthesis of nucleoside triphosphate analogues, *Journal of Organic Chemistry*, **2005**, 70, 10588–10591.
- [168] Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G.; 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies, *Nature Reviews Cancer*, **2003**, 3, 330–338.
- [169] Wohlhueter, R. M., McIvor, R. S. & Plagemann, P. G. W.; Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells, *J Cell Physiol*, **1980**, 104, 309–319.
- [170] Diasio, R. B. & Harris, B. E.; Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil, *Clinical Pharmacokinetics*, **1989**, 16, 215–237.
-

-
- [171] Yoshioka, A. *et al.*; Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death., *Journal of Biological Chemistry*, **1987**, 262, 8235–8241.
- [172] Lindahl, T.; An N glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1974**, 71, 3649–3653.
- [173] Glazer, R. I. & Lloyd, L. S.; Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture., *Mol Pharmacol*, **1982**, 21.
- [174] Kufe, D. W. & Major, P. P.; 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity, *Journal of Biological Chemistry*, **1981**, 256, 9802–9805.
- [175] Peters, G. J. *et al.*; Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Preprint at 2002, vol. 1587, 194–205.
- [176] Grem, J. L. & Fischer, P. H.; Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole, *Pharmacol Ther*, **1989**, 40, 349–371.
- [177] Srivastava, R. *et al.*; BCL-2 family protein BOK is a positive regulator of uridine metabolism in mammals, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2019**, 116, 15469–15474.
- [178] Yoshikawa, M., Kato, T. & Takenishi, T.; Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides, *Bull Chem Soc Jpn*, **1969**, 42, 3505–3508.
- [179] Burgess, K. & Cook, D.; Syntheses of nucleoside triphosphates, *Chem Rev*, **2000**, 100, 2047–2059.
- [180] Collier, A. & Wagner, G.; A facile two-step synthesis of 8-arylated guanosine mono- and triphosphates (8-aryl GXPs), *Org Biomol Chem*, **2006**, 4, 4526–4532.
- [181] Niles, A. L., Moravec, R. A. & Riss, T. L.; Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development, *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2008**, 3, 655–669.
- [182] McGaw, L. J., Elgorashi, E. E. & Eloff, J. N.; Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells, in *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, (Elsevier Inc., 2014)., 181–233.
- [183] Doege, H. & Stah, A.; Protein-mediated fatty acid uptake: Novel insights from in vivo models, *Physiology*, Preprint at 2006, vol. 21, 259–268.
- [184] Peter G. M. Wuts & Theodora W. Greene; *Greenes protective groups in organic synthesis*, (Wiley-VCH, **2007**).
- [185] Leist, T. P. & Weissert, R.; Cladribine, *Clin Neuropharmacol*, **2011**, 34, 28–35.
-

-
- [186] Gracia, E. *et al.*; Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A₁ adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [³H](R)-pia binding to the caudate nucleus, *J Neurochem*, **2008**, 107, 161–170.
- [187] Liliemark, J.; The clinical pharmacokinetics of cladribine, *Clinical Pharmacokinetics*, **1997**, 32, 120–131.
- [188] Minghong Zhong, Ireneusz Nowak, and & Robins, M. J.; Regiospecific and Highly Stereoselective Coupling of 6-(Substituted-imidazol-1-yl)purines with 2-Deoxy-3,5-di-O-(p-toluoyl)- α -d-erythro-pentofuranosyl Chloride. Sodium-Salt Glycosylation in Binary Solvent Mixtures: Improved Synthesis of Cladribine, 1, **2006**.
- [189] Xu, S., Yao, P., Chen, G. & Wang, H.; A New Synthesis of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine), CdA), *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2011**, 30, 353–359.
- [190] Janeba, Z., Francom, P. & Robins, M. J.; Efficient syntheses of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine) from 2'-deoxyguanosine, *Journal of Organic Chemistry*, **2003**, 68, 989–992.
- [191] Satishkumar, S. *et al.*; Cladribine Analogues via O6-(Benzotriazolyl) Derivatives of Guanine Nucleosides, *Molecules*, **2015**, 20, 18437–18463.
- [192] Peng, Y.; A practical synthesis of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine) from 2'-deoxyadenosine, *J Chem Res*, **2013**, 37, 213–215.
- [193] Deghati, P. Y. F., Bieräugel, H., Wanner, M. J. & Koomen, G. J.; Mild and regioselective nitration of 1-deazapurine nucleosides using TBAN/TFAA, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 569–573.
- [194] Deghati, P. Y. F., Wanner, M. J. & Koomen, G. J.; Regioselective nitration of purine nucleosides: Synthesis of 2-nitroadenosine and 2-nitroinosine, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 1291–1295.
- [195] Debarge, S., Balzarini, J. & Maguire, A. R.; Design and synthesis of α -carboxy phosphononucleosides, *Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 76, 105–126.
- [196] Taniguchi, Y., Fukabori, K., Kikukawa, Y., Koga, Y. & Sasaki, S.; 2,6-Diaminopurine nucleoside derivative of 9-ethyloxy-2-oxo-1,3-diazaphenoxazine (2-amino-Adap) for recognition of 8-oxo-dG in DNA, *Bioorg Med Chem*, **2014**, 22, 1634–1641.
- [197] Lakshman, M. K. & Frank, J.; A simple method for C-6 modification of guanine nucleosides, *Org Biomol Chem*, **2009**, 7, 2933–2940.
- [198] Konstantinova, I. D. *et al.*; A chemo-enzymatic synthesis of β -D-arabinofuranosyl purine nucleosides, *Synthesis (Stuttg)*, **2011**, 2011, 1555–1560.
- [199] Brændvang, M. & Gundersen, L. L.; A novel method for the introduction of fluorine into the purine 2-position: Synthesis of 2-fluoroadenosine and a formal synthesis of the antileukemic drug fludarabine, *Synthesis (Stuttg)*, **2006**, 2006, 2993–2995.
-

-
- [200] Shen, C. *et al.*; Practical Synthesis of Fludarabine and Nelarabine, *Synthesis (Germany)*, **2020**, 52, 417–423.
- [201] Ding, H. *et al.*; Stereoselective synthesis of 2'-modified nucleosides by using ortho-alkynyl benzoate as a gold(i)-catalyzed removable neighboring participation group, *RSC Adv*, **2017**, 7, 1814–1817.
- [202] L. Kürti & B. Czako; *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, (Elsevier, **2005**).
- [203] Melanie Larisch; Synthese der Monophosphat-Verbindung von Fludarabin, (Universität Hamburg, **2020**).
- [204] Secrist, J. A., Shortnacy, A. T. & Montgomery, J. A.; Synthesis and Biological Evaluations of Certain 2-Halo-2'-Substituted Derivatives of 9- β -D-Arabinofuranosyladenine, *J Med Chem*, **1988**, 31, 405–410.
- [205] Montgomery, J. A., Shortnacy-Fowler, A. T., Clayton, S. D., Riordan, J. M. & Secrist, J. A.; Synthesis and Biological Activity of 2'-Fluoro-2-halo Derivatives of 9- β -d-Arabinofuranosyladenine, *J Med Chem*, **1992**, 35, 397–401.
- [206] Locke, F. *et al.*; A novel clofarabine bridge strategy facilitates allogeneic transplantation in patients with relapsed/refractory leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes, *Bone Marrow Transplant*, **2013**, 48, 1437–1443.
- [207] Clarke, M. L., Mackey, J. R., Baldwin, S. A., Young, J. D. & Cass, C. E.; The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs., *Cancer treatment and research*, **2002**, 112, 27–47.
- [208] Cohen, S. S.; The mechanisms of lethal action of arabinosyl cytosine (araC) and arabinosyl adenine (araA), *Cancer*, **1977**, 40, 509–518.
- [209] Drake, J. C., Hande, K. R., Fuller, R. W. & Chabner, B. A.; Cytidine and deoxycytidylate deaminase inhibition by uridine analogs, *Biochem Pharmacol*, **1980**, 29, 807–811.
- [210] Johnson, D. C. & Widlanski, T. S.; Overview of the Synthesis of Nucleoside Phosphates and Polyphosphates, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, **2003**, 15, 13.1.1-13.1.31.
- [211] Verheyden, J. P. H. & Moffatt, J. G.; Halo Sugar Nucleosides. II. Iodination of Secondary Hydroxyl Groups of Nucleosides with Methyltriphenoxyphosphonium Iodide, *Journal of Organic Chemistry*, **1970**, 35, 2868–2877.
- [212] Davisson, V. J., Davis, D. R., Dixit, V. M. & Poulter, C. D.; Synthesis of Nucleotide 5'-diphosphates From 5'-O-tosyl Nucleosides, *Journal of Organic Chemistry*, **1987**, 52, 1794–1801.
- [213] Ludwig, J. & Eckstein, F.; Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-
-

- Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, 54, 631–635.
- [214] Friedrichs, B.; Th. Peters. Jr.: All about Albumin. Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. XX and 432 pages, numerous figures and tables. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, *Food / Nahrung*, **1997**, 41, 382–382.
- [215] Sabbioni, G. & Turesky, R. J.; Biomonitoring human albumin adducts: The past, the present, and the future, *Chemical Research in Toxicology*, **2017**, 30, 332–366.
- [216] Rabbani, G. & Ahn, S. N.; Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2019**, 123, 979–990.
- [217] Ghuman, J. *et al.*; Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J Mol Biol*, **2005**, 353, 38–52.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die Bereitstellung des äußerst interessanten Themas, die fachlichen Anregungen und für den wissenschaftlichen Freiraum, den ich während meiner Promotion genießen konnte.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die großartige und konstruktive Zusammenarbeit während unseres Projektes von den Zellaufnahmestudien über die Proliferationsassays bis hin zur Patentanmeldung. Hierbei möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe am UKE für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich beim technischen Personal der NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Hackl für das Messen unzähliger NMR-Proben bedanken. Hierbei gilt mein besonderer Dank Claudia, die mir zahlreiche Messtermine ermöglichte.

Ebenso danke ich dem technischen Personal der MS-Abteilung unter der Leitung von Dr. Maria Riedner für das Messen zahlreicher Proben.

Auch möchte ich mich bei Michelle, Sarah, Sahra und Alja bedanken, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit sorgfältig zu korrigieren und somit sehr positiv zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein großer Dank gilt dem gesamten AK-Meier für die freundliche und offene Atmosphäre unter der wir alle zusammenarbeiten konnten. Natürlich ist besonders das *Team-Typ* mit Alex, Paddl, Conny, Nils, Giuliano, Michelle, Sarah, Sahra, Tobi und Maria hervorzuheben, mit denen neben den zahlreichen Fachgesprächen und Ratschlägen auch unzählige nicht fachliche Gespräche den Tag bereichert haben. Hierbei waren die morgendliche Kaffeerrunde und alle anderen Kaffeepausen immer wieder ein Erlebnis! Mein besonderer Dank gilt Giuliano, mit dem die tägliche Arbeit von der Masterarbeit bis zum Ende der Promotion sowohl fachlich als auch in allen anderen Dingen unschätzbar war. Einen besseren Laborpartner hätte ich mir nicht wünschen können!

Für das gesamte Studium möchte ich mich bei Tom und Giuliano bedanken, mit denen ich seit dem ersten Semester bis zur Promotion alles zusammen erlebt habe. Dank unserer Gemeinschaft war das erfolgreiche Studium erst möglich und ich habe mit euch zwei unschätzbare Freunde gefunden, mit denen ich auch außerhalb der Uni hoffentlich noch lange verbunden bleibe.

Besonders möchte ich mich bei Laura bedanken, die mich durch das gesamte Studium und auch außerhalb der Promotion immer unterstützt und liebevoll mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat!

Zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie bedanken, die mir immer Rückhalt gegeben und mich auch durch die schwersten Zeiten immer begleitet hat. Ohne euren Zuspruch und eure Unterstützung wäre ich niemals da, wo ich jetzt bin. Ihr seid immer für mich da!

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.
