

***cycloSal*-Nucleotide - Ansätze zur Optimierung eines Wirkstoffsystems**



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Christian Ducho

aus

Hamburg

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Hamburg, im Juni 2005

**Meinem Großvater
Dr. Heinrich Schmitz †**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier in der Zeit von November 2001 bis Januar 2005 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Francke

Datum der letzten mündlichen Prüfung: 28.7.2005

Herrn Prof. Dr. C. Meier danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und zahlreiche anregende Gespräche.

Einen besonderen Dank möchte ich an die zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten richten, die im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten für mich durchführten. Besonders hervorzuheben sind hierbei meine ehemaligen Schwerpunktpraktikanten, Dipl.-Chem. H. Jessen, Dipl.-Chem. U. Görbig, Dipl.-Chem. C. Glöckler, Dipl.-Chem. S. Jessel und Dipl.-Chem. N. Gisch.

Herrn Dr. V. Sinnwell, Herrn Dr. E. T. K. Haupt und ihren Mitarbeitern möchte ich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren danken. Besonders dankbar bin ich dabei für die hervorragende Kooperation bei der Messung luftempfindlicher Substanzen sowie der Durchführung der ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien.

Herrn M. Preuße, Frau A. Meiners und Frau C. Christ spreche ich meinen Dank für die Messung von EI-, FAB- bzw. ESI-Massenspektren aus.

Herrn Prof. Dr. J. Balzarini und Dr. L. Naesens, Rega-Institut Leuven, Belgien, danke ich für die Durchführung von *in vitro*-Zelltests bzw. die Bereitstellung von humanem CEM/0-Zellextrakt. Des weiteren geht an Prof. Dr. P. Wutzler und Dr. A. Meerbach, Universität Jena, ein herzlicher Dank für die großzügige Bereitstellung von BVDU.

Meinen Eltern und der Studienstiftung des deutschen Volkes gebührt Dank für die jahrelange finanzielle Unterstützung meines Studiums. Dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für ein Promotionsstipendium.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin Karin für ihre liebevolle Unterstützung und ihr Verständnis für viele lange Laborabende und -wochenenden.

Abkürzungen und Symbole

3TC	L-3'-Thiacytidin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir
abs.	Absolut
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
ACV	Acyclovir
Äquiv.	Äquivalent(e)
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AM	Acetoxymethyl
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin
BChE	Butyrylcholinesterase
BVDU	(E)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin
BVU	(E)-5-(2-Bromvinyl)-uracil
CC ₅₀	cytotoxische Konzentration
CD	Circulardichroismus
CDG	Congenital Disorder of Glycosylation
CMV	Cytomegalie-Virus
Cy	Cyclohexyl
<i>cycloAmb</i>	<i>cyclo</i> Aminobenzyl
<i>cycloSal</i>	<i>cyclo</i> Saligenyl
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
d4T	2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts
ddA	2',3'-Dideoxyadenosin
ddC	2',3'-Dideoxycytidin

ddd	Dublett von Dubletts von Dubletts
ddG	2',3'-Didesoxyguanosin
ddl	2',3'-Didesoxyinosin
ddT	2',3'-Didesoxythymidin
DFP	Diisopropylfluorophosphat
dG	2'-Desoxyguanosin
dI	2'-Desoxyinosin
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin ("Hünig-Base")
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dppf	1,1'-(Bis-diphenylphosphino)-ferrocenyl
dT	2'-Desoxythymidin
EBV	Epstein-Barr-Virus
E.C.	Enzyme Commission
EC ₅₀	effektive Konzentration
ECM	Ethoxycarbonylmethyl
Et	Ethyl
FCS	fötales Kälber-Serum
FdU	5-Fluor-2'-desoxyuridin
FU	5-Fluoruracil
GCV	Ganciclovir
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSV	Herpes-Simplex-Virus
<i>i</i> -Bu	<i>iso</i> -Butyryl
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration
IN	virale Integrase
Isopr-Sal	Isopropylidensaligen-3'-yl

<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante (NMR)
Lev	Levulinyl
m	Multiplett
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MOM	Methoxymethyl
mRNA	Botenribonucleinsäure (messenger RNA)
Ms	Methylsulfonyl (Mesyl)
MS	Massenspektrometrie
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NMP	Nucleosidmonophosphat
NNRTI	Nicht-nucleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	Nucleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PCV	Penciclovir
PMEA	9-(2-(Phosphonylmethoxy)-ethyl)-adenin
PMPA	(<i>R</i>)-9-(2-(Phosphonylmethoxy)-propyl)-adenin
POC	<i>iso</i> -Propyloxycarbonyloxymethyl
POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	Parts Per Million
Py	Pyridin
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
R_t	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RU	Rappaport Units
s	Singulett
Sal	Saligen-3'-yl
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt

t	Triplett
T	Thymin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymin-Kinase
TK ⁻	Thymin-Kinase-defizient
TMS	Trimethylsilyl
vergl.	vergleiche
VZV	Varizella-Zoster-Virus

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	8
2.1	Das Pronucleotid-Konzept	8
2.2	Das <i>cycloSal</i> -Konzept	14
3	Aufgabenstellung	20
4	Resultate und Diskussion	22
4.1	Synthese einiger Edukte und Reagenzien	22
4.1.1	Synthese von Chlormethylmethylether (MOM-Chlorid) 51	22
4.1.2	Synthese von Phenylboronsäure 52	23
4.1.3	Synthese von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) 4	24
4.1.4	Synthese von 2',3'-Dideoxythymidin (ddT) 57	25
4.1.5	Synthese von <i>iso</i> -2'-Desoxyadenosin (<i>iso</i> -dA) 58	25
4.2	Synthesestrategien	27
4.3	Ein neues Synthesekonzept für Salicylalkohol-Derivate	30
4.3.1	Erläuterung des Konzeptes	30
4.3.2	Synthese der Salicylalkoholisopropylidenacetale 65-67	31
4.3.3	Versuche zur Entschützung Isopropyliden-geschützter Salicylalkohol-Derivate	36
4.3.4	Synthese der Silyl-geschützten Salicylalkohol-Derivate 68,69	38
4.3.5	Synthese der Saligenylchlorphosphite 76-78	38
4.3.6	Synthese und Charakterisierung der <i>cycloSal</i> -Nucleotide 79-81 und 82-84	39
4.4	Bis-(<i>cycloSal</i> -Nucleotide)	46
4.4.1	Erläuterung des Konzeptes	46
4.4.2	Synthesestrategien	49
4.4.3	Synthese des Salicylalkohol-Derivates 91	51
4.4.4	Synthese des Salicylalkohol-Derivates 95	63

4.4.5	Umsetzung der Salicylalkohol-Derivate 91,95 zu den Bis-(<i>cycloSal</i> -Nucleotiden) 46,47	65
4.4.6	Synthese der Referenzverbindung 92	83
4.4.7	Charakterisierung der Bis-(<i>cycloSal</i> -d4TMPs) 46,47 und der Referenzverbindung 92	91
4.4.8	Antivirale <i>in vitro</i> -Aktivitäten der Bis-(<i>cycloSal</i> -d4TMPs) 46,47 und der Referenzverbindung 92	105
4.5	Neue Arbeiten zum „lock-in“-Mechanismus von <i>cycloSal</i> -Nucleotiden	108
4.5.1	Erläuterung des Konzeptes	108
4.5.2	Kenntnisstand	109
4.5.3	Zielverbindungen und Synthesestrategien	111
4.5.4	Synthese der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -d4TMPs 48-50	113
4.5.5	Charakterisierung der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -d4TMPs 48-50	118
4.5.6	Antivirale <i>in vitro</i> -Aktivitäten der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -d4TMPs 48-50	131
4.5.7	Versuche zur Synthese der 3-substituierten Regioisomere von 48-50	133
4.6	Interaktion von Cholinesterasen mit <i>cycloSal</i> -Nucleotiden	137
4.6.1	Kenntnisstand	137
4.6.2	Methodik des Cholinesterase-Assays	140
4.6.3	Cholinesterase-Assay mit verschiedenen Quellen von Cholinesterase-Aktivität	142
4.6.4	Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die Inhibition von BChE durch <i>cycloSal</i> -Nucleotide	145
4.6.5	Mechanistische Aspekte der BChE-Inhibition durch <i>cycloSal</i> -Nucleotide	160
4.6.6	Wege zur Vermeidung der BChE-Inhibition durch <i>cycloSal</i> -Nucleotide	169
4.6.7	Konzeption, Synthese und Anwendung einer optimierten <i>cycloSal</i> -Maske	190
4.6.8	Interaktion von humaner BChE mit Bis-(<i>cycloSal</i> -Nucleotiden)	194
5	Zusammenfassung	197
6	Summary	204

7	Ausblick	206
8	Experimentalteil	209
8.1	Allgemeines	209
8.1.1	Edukte und Reagenzien	209
8.1.2	Lösungsmittel	210
8.1.3	Absolute Lösungsmittel	210
8.1.4	Chromatographie	211
8.1.5	Spektroskopie	213
8.1.6	Geräte	214
8.2	Synthesen	215
8.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	215
8.2.2	Synthese einiger Edukte und Reagenzien	219
8.2.3	Synthese der geschützten Vorläufer 65-67 und 68,69 sowie der entsprechenden <i>cycloSal</i> -Nucleotide 79-81 und 82-84	229
8.2.4	Synthese der Bis-(<i>cycloSal</i> -Nucleotide) 46,47	248
8.2.5	Synthese der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -Nucleotide 48-50	293
8.2.6	Synthese von Verbindungen für den Cholinesterase-Assay	310
8.3	Hydrolysestudien an den <i>cycloSal</i> -Nucleotiden	363
8.3.1	Chemische Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer bei pH 7.3	363
8.3.2	Hydrolysekinetiken in humanem Zellextrakt	365
8.3.3	Hydrolysekinetiken in humanem Blutserum	365
8.3.4	Hydrolysekinetiken in Kulturmedium	366
8.3.5	pH-Stabilitätsuntersuchungen	366
8.3.6	³¹ P-NMR-Hydrolysestudien	367
8.4	Cholinesterase-Assay	367
8.4.1	Allgemeines	367
8.4.2	Assay nach Balzarini	368
8.4.3	Assay nach Rappaport et al.	370

9	Literaturverzeichnis	373
----------	-----------------------------	------------

Anhang

Anhang I	I
Anhang II	III
Anhang III	IV
Gefahrstoffliste	V

Ausklapptafel

Hydrolyse von Bis-(<i>cycloSal</i> -d4TMP) 46	I
Verbindungsliste	II

1 Einleitung

Die Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) stellt eine der bedrohlichsten Infektionserkrankungen dar. Verantwortlich für das Auftreten der Krankheit ist das HI-Virus (Human Immunodeficiency Virus), welches zu Beginn der 1980er Jahre von Montagnier et al. isoliert und untersucht wurde. Das HI-Virus bildet zwei Familien, HIV-1 (Vorkommen in Nordamerika, Europa und Nordafrika) und HIV-2 (Vorkommen vor allem in Asien), die ihrerseits wieder in Subtypen unterteilt werden. In einigen Ländern der dritten Welt hat die Verbreitung von HIV bereits bedrohliche Ausmaße angenommen, und auch in den westlichen Industrienationen kommt es trotz zahlreicher Kampagnen zur gesundheitlichen Aufklärung täglich zu Neuinfektionen mit HIV. Erst zu Beginn des Jahres 2005 wurde in New York die Mutante 3-DCR-HIV identifiziert, eine besonders aggressive Variante des Virus^[1]. Gegenwärtig sind mehrere Substanzen zur Unterdrückung der Proliferation von HIV im menschlichen Körper im Einsatz, eine Medikamentenkombination zur vollständigen Abtötung des Virus existiert jedoch nicht, so daß eine Heilung der infizierten Patienten noch unmöglich bleibt. Die Tabelle 1 zeigt eine verkürzte Übersicht über einige der handelsüblichen Präparate zur HIV-Therapie^[2].

Name	Wirkstoff	Hersteller
Retrovir [®]	2',3'-Didesoxy-3'-azidothymidin (AZT)	GlaxoSmithKline
Videx [®]	2',3'-Didesoxyinosin (ddI)	Bristol-Myers Squibb
Hivid [®]	2',3'-Didesoxycytidin (ddC)	Hoffmann-La Roche
Zerit [®]	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T)	Bristol-Myers Squibb
Ziagen [®]	Abacavir (ABC)	GlaxoSmithKline
Epivir [®]	L-2',3'-Didesoxy-3'-thiacytidin (3TC)	GlaxoSmithKline
Emtriva [®]	L-5-Fluor-2',3'-didesoxy-3'-thiacytidin (FTC)	Gilead Sciences
Viread [®]	Bis-(POC)-PMPA	GlaxoSmithKline

Tab. 1 Übersicht über einige der handelsüblichen Präparate zur HIV-Therapie (Stand: Mai 2005)

HIV gehört zur Familie der Retroviren, d. h. die genetische Information des Virus liegt in Form von RNA vor, die dann mit Hilfe des ebenfalls im Viruspartikel enthaltenen

Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA transkribiert wird. Die Abbildung 1 (S. 2) zeigt den typischen Replikationszyklus eines Retrovirus.

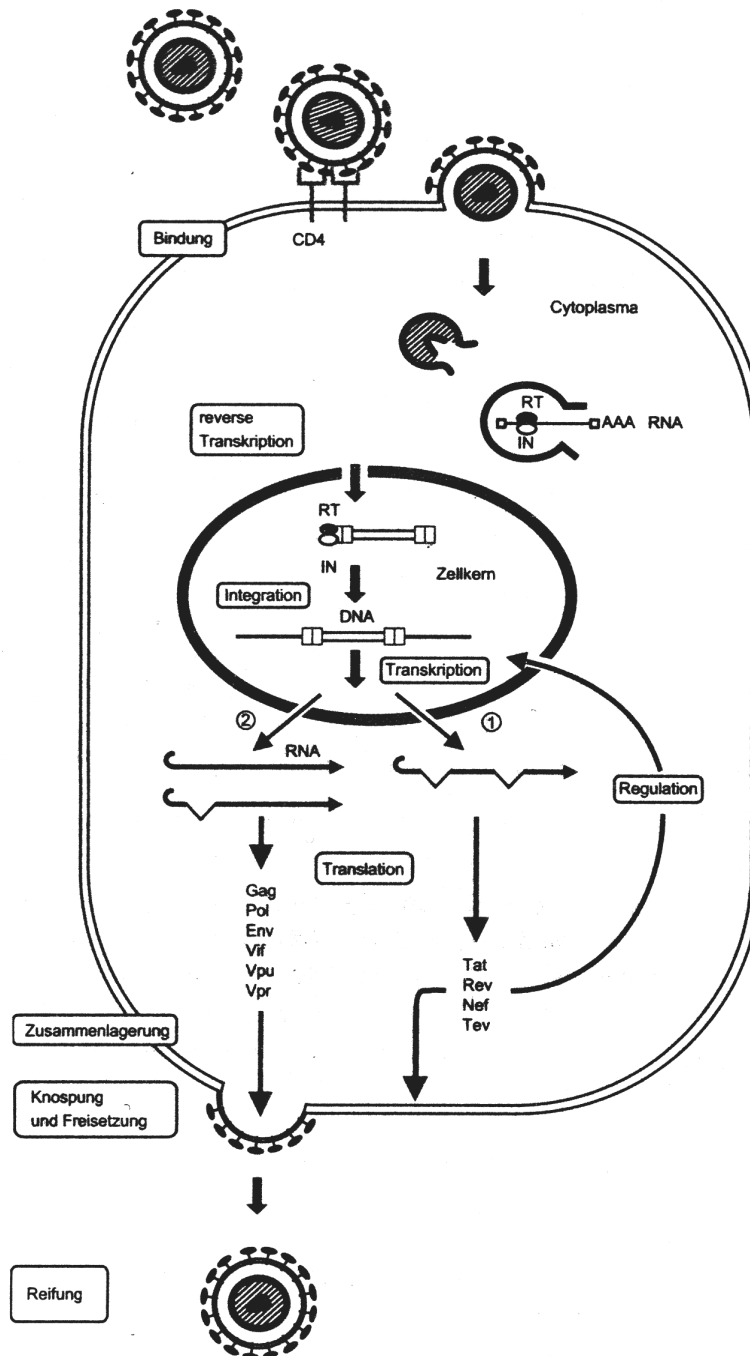


Abb. 1 Retroviraler Replikationszyklus (aus: S. Modrow, D. Falke, Molekulare Virologie, Spektrum Verlag, Heidelberg 1998)

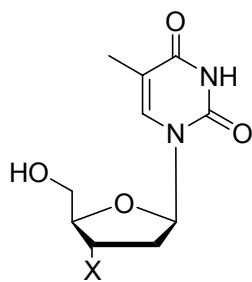
HIV befällt in der Regel CD4-positive Zellen, also Zellen, welche den Oberflächenrezeptor CD4 tragen (z. B. die T-Helferzellen des Immunsystems). In einem ersten Schritt bindet das Virus über den äußeren Teil seines Glycoproteinkomplexes an CD4, woraufhin die Virushülle mit der Zellmembran verschmilzt. Das freiwerdende

RNA-Genom des Virus wird durch die RT in doppelsträngige komplementäre DNA transkribiert. Nach Eindringen des Transkripts in den Zellkern wird dieses mit Hilfe der viralen Integrase (IN) in das Genom der Wirtszelle integriert. Es folgt die Transkription der proviralen DNA durch die RNA-Polymerase II der Wirtszelle, die zunächst zur Bildung mehrfach gespleißter mRNAs führt (Schritt 1 in Abb. 1). Die Translation dieser mRNAs liefert die regulatorischen Proteine Tat, Rev, Nef und Tef, deren Import in den Zellkern eine Amplifikation der Transkription und die Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs bewirkt (Schritt 2 in Abb. 1). Die Translation dieser mRNA-Stränge im Cytosol führt nunmehr zur Bildung der viralen Strukturproteine, welche sich an der Cytoplasmamembran mit den als Virusgenom dienenden mRNAs zusammenlagern. Auf diese Weise kommt es zur Knospung und Freisetzung noch unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Die Reifung zu infektiösen Partikeln erfolgt anschließend durch die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease^[3]. Da die RT des HI-Virus verhältnismäßig fehlerhaft arbeitet, zeigt HIV eine stark erhöhte Mutationsrate, welche die Therapie erheblich erschwert^[4].

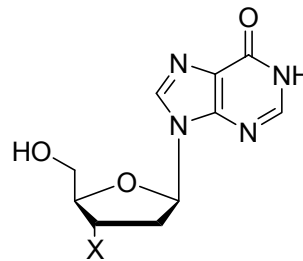
Der retrovirale Replikationszyklus legt mehrere Ansatzpunkte zur HIV-Therapie nahe^[5], so beispielsweise eine Blockade des Glycoproteins gp120 der Virushülle (sogenannte „Entry-Inhibitoren“) oder der viralen Protease (Protease-Inhibitoren). Von ihnen soll hier lediglich auf die Inhibierung der RT näher eingegangen werden, die die Bildung von DNA aus der viralen RNA unterbinden soll. Diese Hemmung der reverse Transkription soll einen virusspezifischen Vorgang stören und somit für die Wirtszelle ohne Bedeutung sein. Die in Tabelle 1 (S. 1) vorgestellten Präparate sind allesamt RT-Inhibitoren.

Man unterscheidet zwischen nucleosidischen und nicht-nucleosidischen RT-Inhibitoren (NRTIs bzw. NNRTIs). Bei den NRTIs, die hier ausschließlich behandelt werden sollen, handelt es sich um Nucleosid-Analoga. Die in der Abbildung 2 (S. 4) dargestellten Verbindungen **1-5** und **6a,b** entsprechen den ersten sieben Wirkstoffen aus der Tabelle 1 (S. 1). AZT **1** und d4T **4** leiten sich vom natürlichen 2'-Desoxythymidin (dT) **7** ab, ddI **2** ist ein Analogon des 2'-Desoxyinosins (dI) **8**, ddC **3** hingegen ein Analogon des 2'-Desoxycytidins (dC) **9**. ABC **5** stellt ein Basenmodifiziertes carbocyclisches Purin-Nucleosid dar, während es sich bei 3TC **6a** um ein Glycon-modifiziertes L-Cytidin handelt, dessen Derivat FTC **6b** noch eine zusätzliche Basen-Modifikation besitzt. Allen RT-inhibierenden Nucleosid-Analoga ist

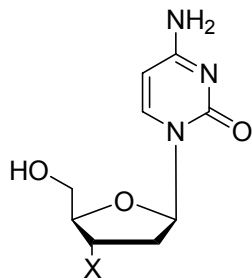
gemein, daß sie keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Werden sie also in einen entstehenden DNA-Strang eingebaut, so kann keine weitere Elongation in 3'-Richtung erfolgen, so daß die reverse Transkription an dieser Stelle abbricht. Im Gegensatz zur Reversen Transkriptase besitzen die körpereigenen DNA-Polymerasen ein "Proof-reading"-System (verwirklicht unter anderem durch die 3'→5'-Exonucleaseaktivität der δ - und ε -DNA-Polymerasen), welches die in den DNA-Strang eingebauten Nucleosid-Analoga erkennt und entfernt. Der Replikationszyklus der Wirtszelle sollte somit durch die Applikation der beschriebenen RT-Inhibitoren nicht negativ tangiert werden.



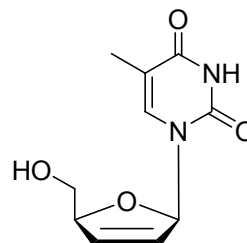
X = N₃: 2',3'-Dideoxy-3'-azidothymidin (AZT) **1**
X = OH: 2'-Desoxythymidin (dT) **7**



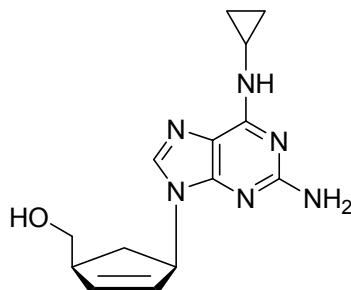
X = H: 2',3'-Dideoxyinosin (ddI) **2**
X = OH: 2'-Desoxyinosin (dI) **8**



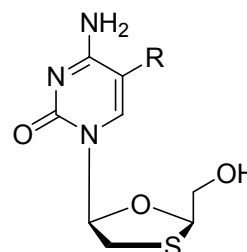
X = H: 2',3'-Dideoxycytidin (ddC) **3**
X = OH: 2'-Desoxycytidin (dC) **9**



2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) **4**



Abacavir (ABC) **5**



R = H: L-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin (3TC) **6a**
R = F: L-5-Fluor-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin (FTC) **6b**

Abb. 2 Einige Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (**1** bis **6**) und ihre natürlichen Stammverbindungen (**7** bis **9**)

Zur Familie der Herpes-Viren gehören unter anderem das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Varizella-Zoster-Virus (VZV) und das Cytomegalie-Virus (CMV). Sie rufen so unterschiedliche Krankheitsbilder wie den einfachen Lippenherpes, den Herpes genitalis, das Pfeiffersche Drüsenfieber, Windpocken oder Herpes zoster hervor. Im Gegensatz zu HIV handelt es sich bei den Herpes-Viren um sogenannte DNA-Viren, da sie ihre Erbinformation nicht in Form von RNA, sondern von DNA tragen. Daher unterscheidet sich auch ihr Replikationszyklus signifikant von dem des HIV (Abb. 3).

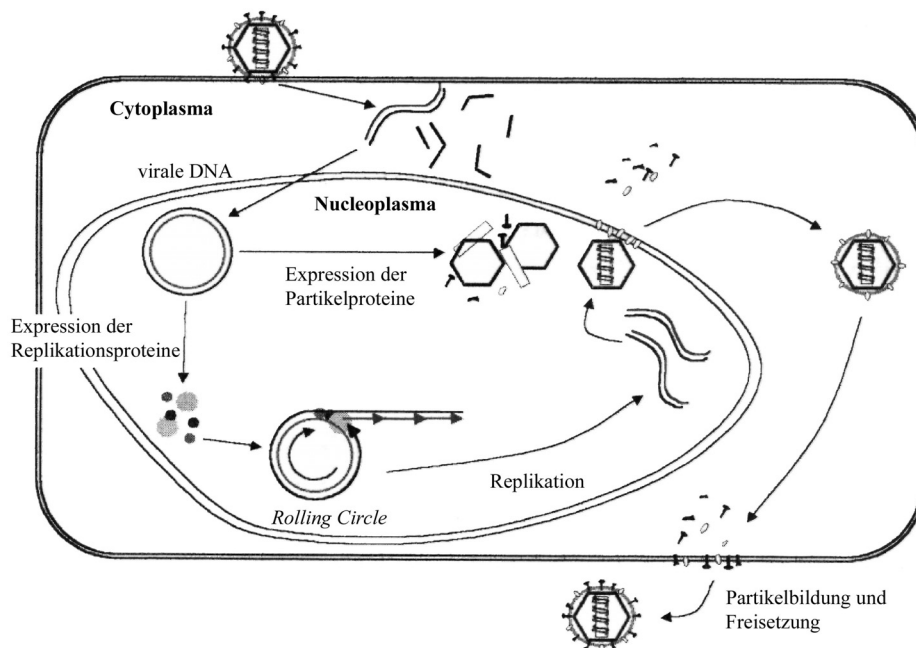


Abb. 3 Replikationszyklus von Herpes-Viren

Durch Binden an einen Membranrezeptor und Eindringen in die Wirtszelle gelangt das virale Capsid in das Cytoplasma und schließlich zu einer Kernpore. Dort wird die virale DNA in das Nucleoplasma entlassen und zirkularisiert^[6]. Nunmehr werden sowohl die viralen Partikel- als auch die Replikationsproteine durch den zelleigenen Transkriptions- und Translationsapparat exprimiert. Zu den Replikationsproteinen zählen unter anderem die virale DNA-Polymerase, eine Helicase und eine Primase. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt unter Beteiligung der drei genannten Proteine durch Abrollen eines fortlaufend synthetisierten neuen DNA-Stranges über die Matrize, einen zirkulären Einzelstrang des ursprünglichen Virus-Genoms (Prinzip des „rolling circle“). Nach Vervollständigung zum Doppelstrang und dessen Teilung in die einzelnen Genom-Einheiten bilden diese zusammen mit den Partikelproteinen neue Virione, die durch Ausknospung an der Zellmembran als infektiöse Viren

säzerniert werden. Darüber hinaus ist auch die Verbreitung der Viren durch Zell-Zell-Kontakte oder Zellfusion möglich^[7].

Da die virale DNA-Polymerase der Herpes-Viren eine zentrale Funktion im Replikationszyklus besitzt, stellt sie einen vielversprechenden Angriffspunkt in der antiviralen Herpes-Therapie dar. Zur Inhibition dieses Schlüssel-Enzyms werden vor allem acyclische Nucleosid-Analoga wie Acyclovir (ACV) **10**, Penciclovir (PCV) **11** und Ganciclovir (GCV) **12** eingesetzt (Abb. 4).

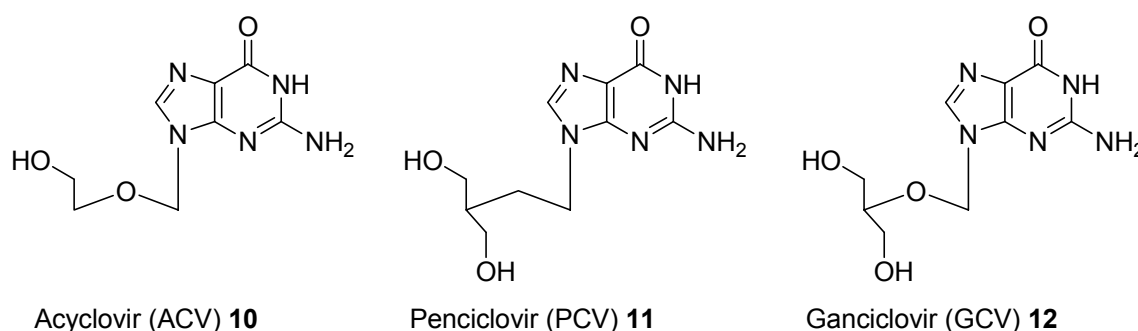


Abb. 4 Antiviral aktive acyclische Nucleosid-Analoga

Da diese acyclischen Nucleosid-Analoga zu polar für eine passive Membrandiffusion sind, werden anstelle von Acyclovir **10** dessen desoxygenierte Form Desciclovir **13** und anstelle von Penciclovir **11** das desoxygenierte und diacetylierte Derivat Famciclovir **14** oral appliziert (Abb. 5)^[8,9].

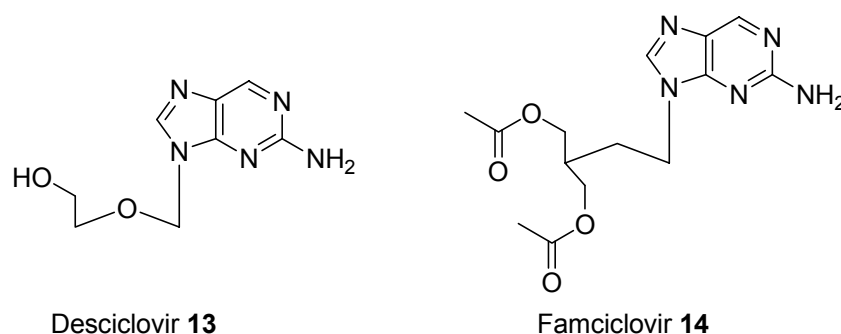
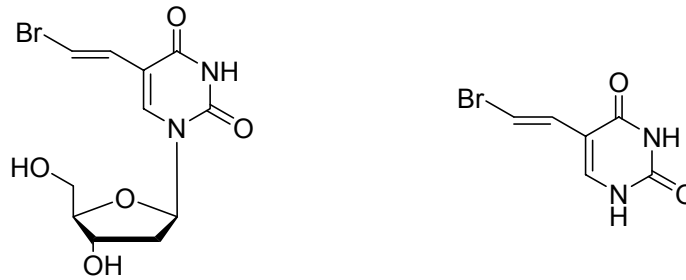


Abb. 5 Orale Darreichungsformen einiger acyclischer Nucleosid-Analoga

Ein neuartiges Herpes-Therapeutikum stellt das cyclische Nucleosid-Analogen (*E*)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin (BVDU) **15** dar. Die Synthese der modifizierten Nucleobase (*E*)-5-(2-Bromvinyl)-uracil (BVU) **16**^[10] sowie des entsprechenden Desoxyribonucleosids BVDU **15**^[11] gelang erstmals in den 1970er Jahren und folgte unmittelbar auf die von Fissekis et al. berichtete Darstellung von 5-Vinyluracil^[12]

(vergl. Abb. 6). Nach der Entdeckung der guten antiviralen Eigenschaften von BVDU **15** im Jahre 1979 durch De Clercq et al.^[13] erfolgten weitere Untersuchungen, in deren Verlauf die Wirksamkeit von **15** gegenüber VZV, CMV sowie beiden Subtypen von HSV nachgewiesen werden konnte^[14,15,16]. Als problematisch erwies sich jedoch die in humanem Blut erfolgende enzymatische Spaltung von **15** zu BVU **16** und 2'-Desoxyribose^[17].



(E)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin (BVDU) **15** (E)-5-(2-Bromvinyl)-uracil (BVU) **16**

Abb. 6 Das neuartige Herpes-Therapeutikum BVDU **15** und seine modifizierte Nucleobase BVU **16**

Die antivirale Wirkung von **15** beruht auf der kompetitiven Inhibition der viralen DNA-Polymerase durch das BVDU-Triphosphat, welches intrazellulär durch enzymatische Phosphorylierung von **15** gebildet werden muß. Kommt es zum Einbau in die DNA, so stört die Bromvinyl-Funktion unter anderem durch Ausbildung sogenannter "cross links" mit anderen DNA-Strängen die Ausbildung der nativen DNA-Struktur und behindert so die Funktion der synthetisierten DNA.

Gegenwärtig findet BVDU **15** unter dem Handelsnamen Brivudin[®] medizinische Anwendung als Virustatikum und läßt sich beispielsweise bei Herpes-Zoster-Erkrankungen deutlich niedriger dosieren als Famciclovir **14**^[18].

2 Kenntnisstand

2.1 Das Pronucleotid-Konzept

Da Nucleotide stets aus Nucleosid-Triphosphaten als aktivierten Vorstufen in DNA-Stränge eingebaut werden, müssen auch die therapeutisch eingesetzten Nucleosid-Analoga zu Triphosphaten metabolisiert werden. Dies geschieht in der Regel durch die zelleigenen Kinasen, welche auch die natürlichen Nucleoside phosphorylieren. Im Falle von BVDU **15** sind darüber hinaus auch virale Kinasen am Metabolismus beteiligt. Insgesamt müssen drei Phosphorylierungsreaktionen katalysiert werden (Abb. 7): d4T **4** beispielsweise wird von der zellulären Thymidin-Kinase (TK), einem Enzym des "salvage pathways" für Thymidin, zunächst zum 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidylat (d4TMP) phosphoryliert. Dieses wird nun wiederum durch die Thymidylat-Kinase zum 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidindiphosphat (d4TDP) umgesetzt. Die Nucleosiddiphosphat-Kinase katalysiert schließlich die Reaktion von d4TDP zum biologisch aktiven 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidintriphosphat (d4TTP).

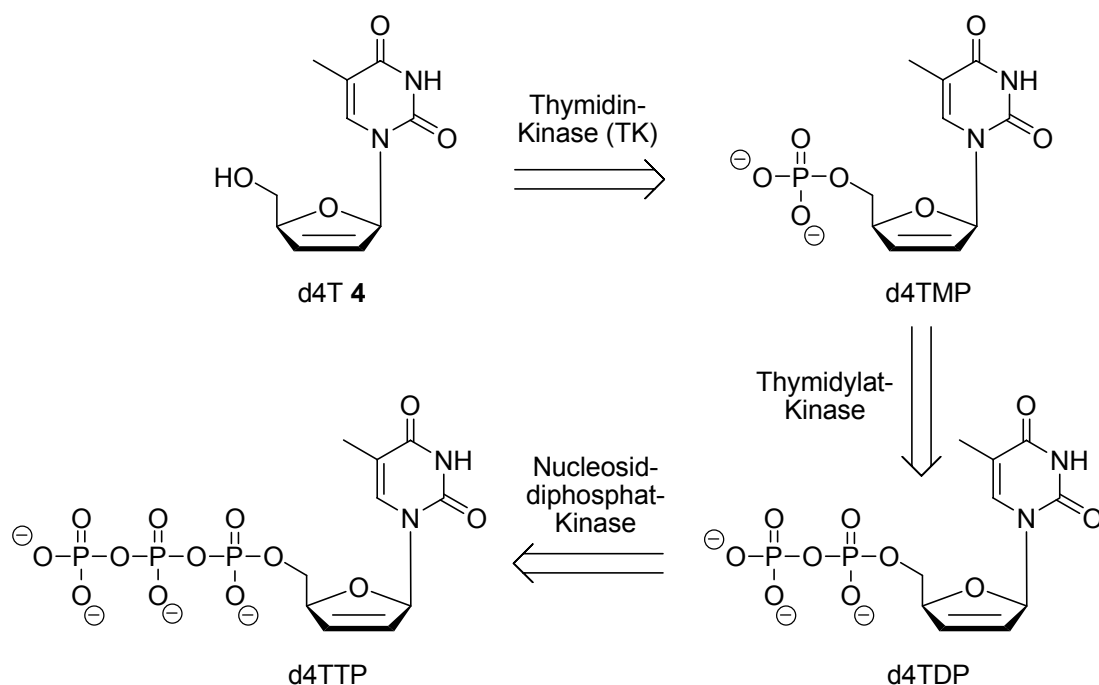


Abb. 7 Metabolisierung von d4T **4**

Aufgrund der Substratspezifität der beteiligten Kinasen können die Phosphorylierungsschritte für die Nucleosid-Analoga gehemmt sein^[19]. Für d4T **4** lässt sich

feststellen, daß insbesondere die erste Phosphorylierung durch die Thymidin-Kinase nur sehr langsam abläuft, wohingegen die nachfolgenden Reaktionen zumindest eine geringere Beeinträchtigung der enzymkinetischen Parameter aufweisen. Somit sollte die direkte Applikation von d4TMP die therapeutische Wirksamkeit der d4T-basierten Medikamente entscheidend verbessern (TK-Bypass, Abb. 8). Allerdings sind phosphorylierte Nucleosid-Analoga nicht therapeutisch applizierbar: Zum einen sind sie als geladene Moleküle nicht ausreichend lipophil für einen passiven Transport durch die selektiv permeable Zellmembran, ein aktiver Transportmechanismus existiert nicht. Darüber hinaus werden derartige Verbindungen im Blut durch nichtspezifische Phosphatasen schnell dephosphoryliert, was ihre Verfügbarkeit im Organismus stark einschränkt.

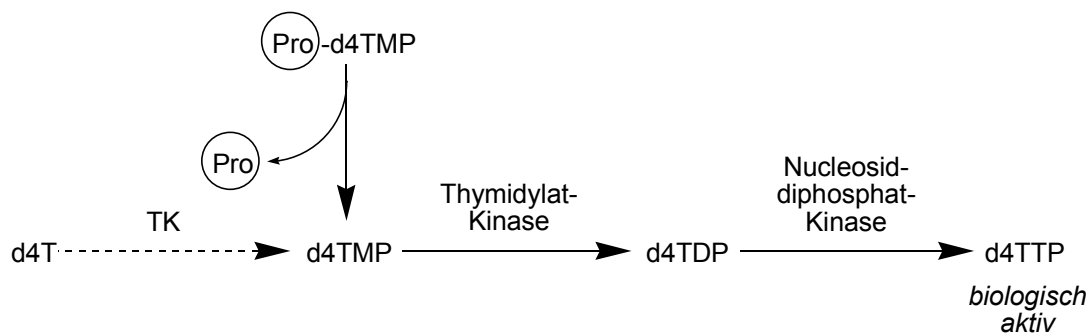


Abb. 8 Schematische Darstellung des TK-Bypass-Konzeptes

Ein Lösungsansatz für das geschilderte Problem besteht in der intrazellulären Freisetzung der Nucleosid-5'-Monophosphate (Nucleotide) aus Wirkstoff-Vorläufern, sogenannten "Prodrugs" (hier: Pronucleotide). Ein Prodrug sollte generell lipophil genug sein, um passiv durch die Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke diffundieren zu können. Außerdem muß der Wirkstoff durch enzymatische oder hydrolytische Abspaltung einer sogenannten "Maske" freigesetzt werden, wobei die Maske natürlich nicht toxisch sein darf.

Im Falle von Pronucleotiden gilt es, zwei negativ geladene Sauerstoffatome an der Phosphatgruppe zu maskieren, so daß die Verwendung von zwei Masken unumgänglich ist. Erste Versuche mit Dialkylphosphateestern zeigten, daß die Abspaltung einer Maske durch nucleophile Reaktion am Phosphorzentrum sehr wohl möglich ist. Die negative Ladung des entstehenden Phosphatdiesters verhinderte jedoch eine weitere Hydrolyse, so daß es nicht zur Freisetzung des Wirkstoffes kam^[20]. Neuere Ansätze gehen von Masken aus, bei denen eine erste selektive

chemische oder enzymatische Reaktion innerhalb der Maske zu einer zweiten spontanen Reaktion führt, die schließlich das biologisch aktive Nucleotid liefert. Als Beispiele für derartige Systeme seien hier genannt:

- Bis-(POM)-Nucleotide [bis(**P**ivaloyloxymethyl)-]^[21-25]
- Bis-(POC)-Nucleotide [bis(*iso*-**P**ropylloxycarbonyloxymethyl)-]^[26,27]
- Bis-(SATE)-Nucleotide [bis(**S**-Acyl-2-thioethyl)-]^[28-32]
- Bis-(SDTE)-Nucleotide [bis(**S**-(2-Hydroxyethylsulfidyl)-2-thioethyl)-]^[28]
- Varianten des SATE-Konzepts^[32-34]
- Phosphoramidat-Nucleoside^[35-43]

Ohne den Mechanismus aller dieser Systeme detailliert zu erläutern, läßt sich doch festhalten, daß sie prinzipiell auf demselben Spaltungsmechanismus basieren: sie alle besitzen eine Ester-Substruktur, die durch das intrazellulär vermehrt vorkommende Enzym Carboxyesterase gespalten wird. Das verbleibende Fragment ist instabil und zerfällt in einem oder mehreren Folgeschritten unter Freisetzung des gewünschten Nucleotids. Zur Verdeutlichung dieses Pronucleotid-Ansatzes ist in der Abbildung 9 (S. 11) exemplarisch die Spaltung der Bis-(POM)- und Bis-(POC)-Nucleotide detailliert dargestellt.

Das Bis-(POM)-Nucleotid **17** liefert nach Spaltung der Esterfunktion durch Carboxyesterase das halbacetalische Intermediat **18**, welches instabil ist und sofort unter Freisetzung von Formaldehyd zum Phosphatdiester **19** zerfällt. Die zweite POM-Modifikation in **19** (Rest R) wird analog gespalten, so daß es schließlich zur Freisetzung des gewünschten Nucleosid-Monophosphates **20** kommt. Das Bis-(POC)-Nucleotid **21** hingegen liefert nach der Esterase-vermittelten Reaktion den Kohlensäurehalbester **22**. Dieses instabile Zwischenprodukt zerfällt spontan unter Freisetzung von Kohlendioxid zu einem zweiten instabilen Intermediat **23**, einem Analogon von **18**, und somit schließlich zum Phosphatdiester **24**, dem Analogon von **19**. Nach Abspaltung der zweiten POC-Modifikation (Rest R') resultiert auch hier wie gewünscht das Produkt **20**.

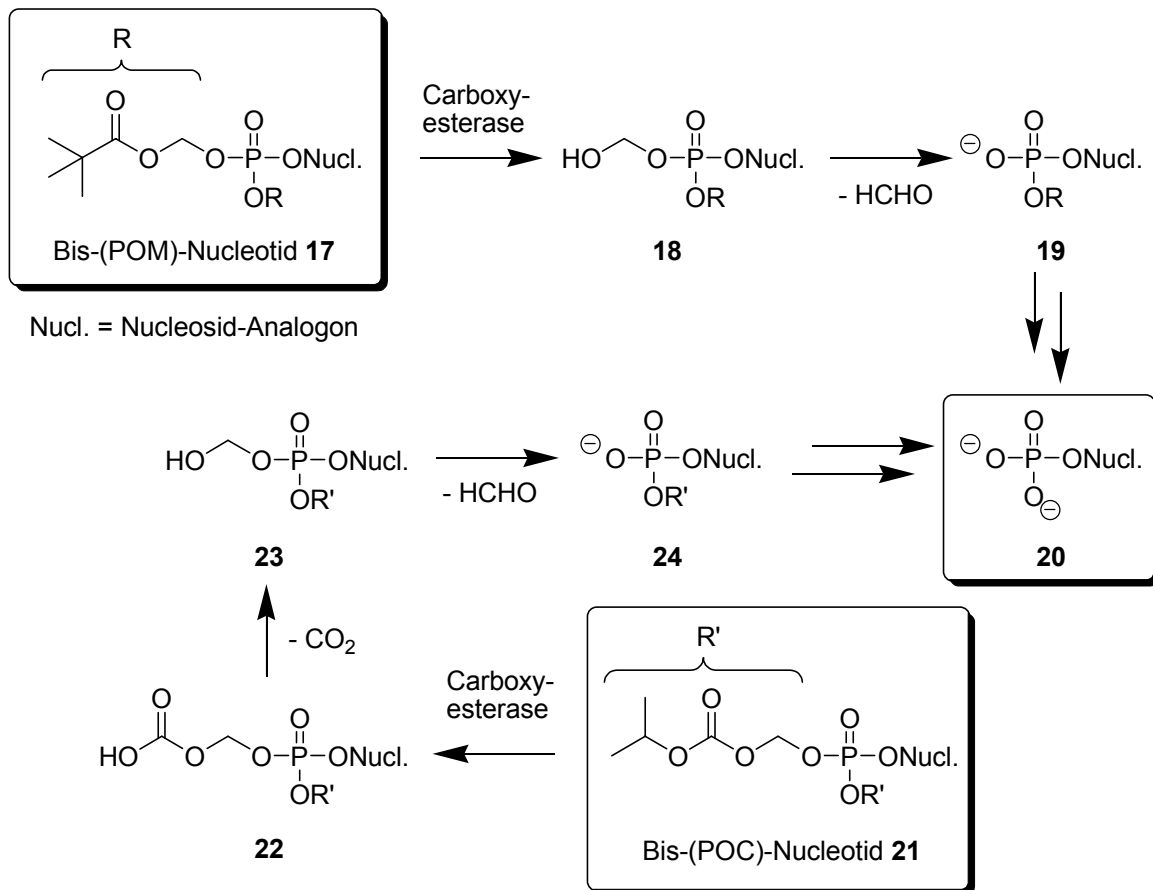


Abb. 9 Spaltungsmechanismus von Bis-(POM)- und Bis-(POC)-Nucleotiden

Generell lässt sich für das POM- und POC-Konzept wie für alle Esterase-basierten Pronucleotid-Systeme anführen, daß der erste Esterase-katalysierte Schritt sehr schnell erfolgt und es somit schnell zur Freisetzung eines geladenen Intermediates (wie **19** und **24** in Abb. 9) kommt. Dieses polare Zwischenprodukt kann naturgemäß keine Rückdiffusion durch die Zellmembran mehr eingehen. Der zweite Esterase-katalysierte Schritt hingegen verläuft meist deutlich langsamer, so daß es zu einer allmählichen Freisetzung des Nucleotid-Analogons kommt^[20]. Als Grund hierfür wird angeführt, daß die negative Ladung am Phosphatrest Intermediate wie **19** und **24** zu schlechten Substraten der Carboxyesterase macht. Dies gilt nicht für die Aryl-SATE-Nucleotide und die Phosphoramidat-Nucleoside, da sie lediglich eine Esterfunktion verwenden. Die Verlangsamung der zweiten Maskenabspaltung wird teilweise auch als problematisch angesehen, weshalb Friis und Bundgaard komplexere Maskenstrukturen mit größerem Abstand zwischen Phosphatrest und Esterfunktion eingeführt haben^[44]. Diese Derivate besitzen einen zusätzlichen Linker zwischen der Carbonsäure- und der Phosphatesterfunktion, so daß das halbacetalische Intermediat **25** (ein Analogon von **18** und **23** in der Abb. 9) erst nach einer

intramolekularen Cyclisierung des Alkohols **26** freigesetzt wird. Dieses neue Konzept wurde zunächst nur an Prodrugs **27** von Phenylphosphat und -phosphonat als Modellsystemen erprobt (Abb. 10).

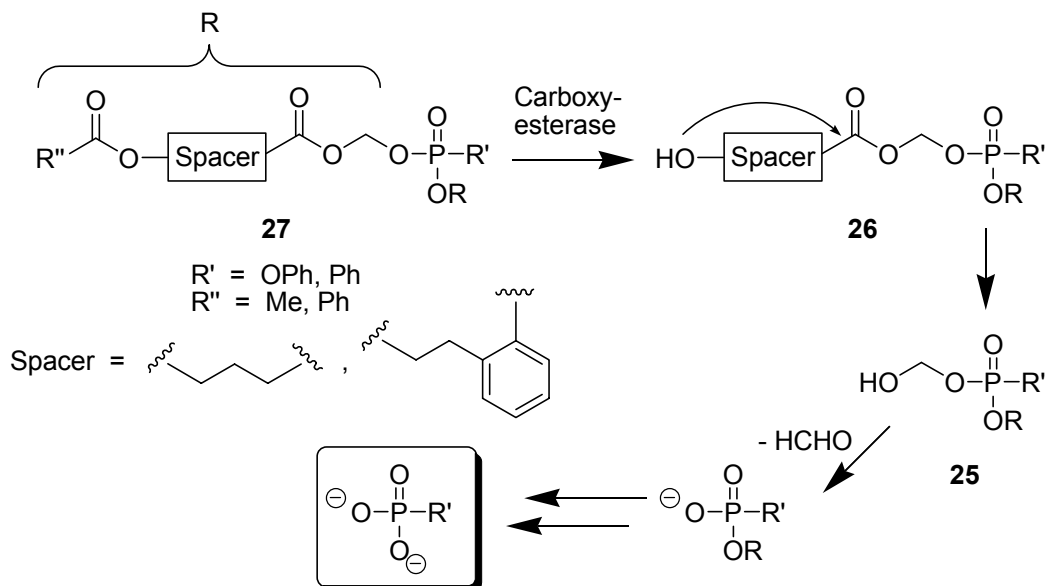


Abb. 10 Spaltungsmechanismus von Pronucleotiden nach Friis und Bundgaard

Ein vollkommen neuer Pronucleotid-Ansatz ist das erst 2004 vorgestellte HepDirect[®]-Konzept (Abb. 11)^[45].

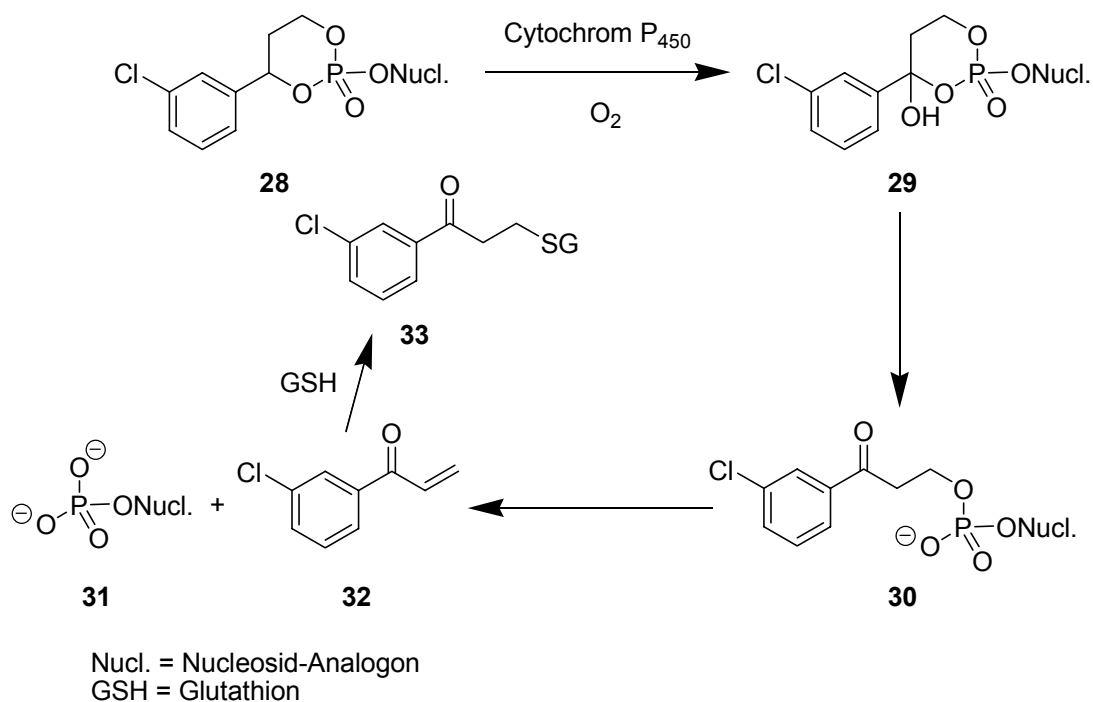


Abb. 11 Spaltungsmechanismus von HepDirect[®]-Pronucleotiden

Die Spaltung des HepDirect[®]-Prodrugs **28** beruht auf einer Cytochrom P₄₅₀-vermittelten Hydroxylierung der Benzyl-Position der Maske. Das resultierende halbacetalische Intermediat **29** zerfällt spontan zu der β -substituierten Carbonylverbindung **30**, die durch β -Eliminierung den Wirkstoff **31** freisetzt. Das potentiell toxische Nebenprodukt **32**, ein α,β -ungesättigtes Keton, bildet ein Glutathion-Addukt **33** und sollte daher keine cytotoxischen Effekte hervorrufen. Die Besonderheit des HepDirect[®]-Ansatzes besteht in der Möglichkeit, Wirkstoffe selektiv in die Leber zu dirigieren^[46], da Cytochrom P₄₅₀ dort bevorzugt exprimiert wird.

Ein Beleg für die Nützlichkeit des Pronucleotid-Ansatzes dürfte sein, daß gegenwärtig bereits zwei entsprechende Substanzen klinisch in der antiviralen Chemotherapie verwendet werden. Die acyclischen Phosphonat-Nucleotid-Analoga PMEA **34** (9-(2-(Phosphonylmethoxy)-ethyl)-adenin, Adefovir) und PMPA **35** ((R)-9-(2-(Phosphonylmethoxy)-propyl)-adenin, Tenofovir) zeigen zwar ein breites Spektrum antiviraler Aktivität, weisen jedoch aufgrund ihrer hohen Polarität schlechte orale Bioverfügbarkeiten auf. Das Prodrug Bis-(POM)-PMEA **36** (Adefovir Dipivoxil, Hepsara[®])^[47-49] zeigt hohe Aktivität gegen HIV und das Hepatitis-B-Virus (HBV). Die weitere Entwicklung als anti-HIV-Therapeutikum wurde wegen des Auftretens nephrotoxischer Effekte in den klinischen Studien gestoppt^[50]. Allerdings erfolgte wenig später die Zulassung der Substanz für die anti-HBV-Therapie^[51]. Das Fumarsäuresalz des Prodrugs Bis-(POC)-PMPA **37** (Tenofovir Disoproxil Fumarat, Viread[®], der letzte Wirkstoff aus der Tabelle 1 (S. 1))^[52,53] hingegen wurde für die Behandlung von HIV-Infektionen zugelassen (Strukturen vergl. Abb. 12, S. 14).

Auch in der Herpes-Therapie ist eine Applikation von BVDU-Monophosphat (BVDUMP) in Form eines geeigneten Pronucleotids überaus wünschenswert, da beispielsweise für EBV im Gegensatz zu HSV-1 und VZV keine virale TK existiert. Ohne dieses Enzym erfolgt keine Metabolisierung von BVDU **15** zu BVDUMP, so daß eine herkömmliche Therapie in diesem Fall erfolglos bleibt. Für BVDUMP wurden zunächst zwei Prodrug-Systeme erprobt (Phenylester von 5',5'-Bis-Nucleotiden^[54] sowie trimere 2',5'-Oligonucleotide mit BVDU am 2'-Ende^[55]), die jedoch beide nicht das gewünschte Nucleosidmonophosphat freisetzen. McGuigan et al. haben schließlich Phosphoramidat-Prodrugs von BVDUMP synthetisiert^[56].

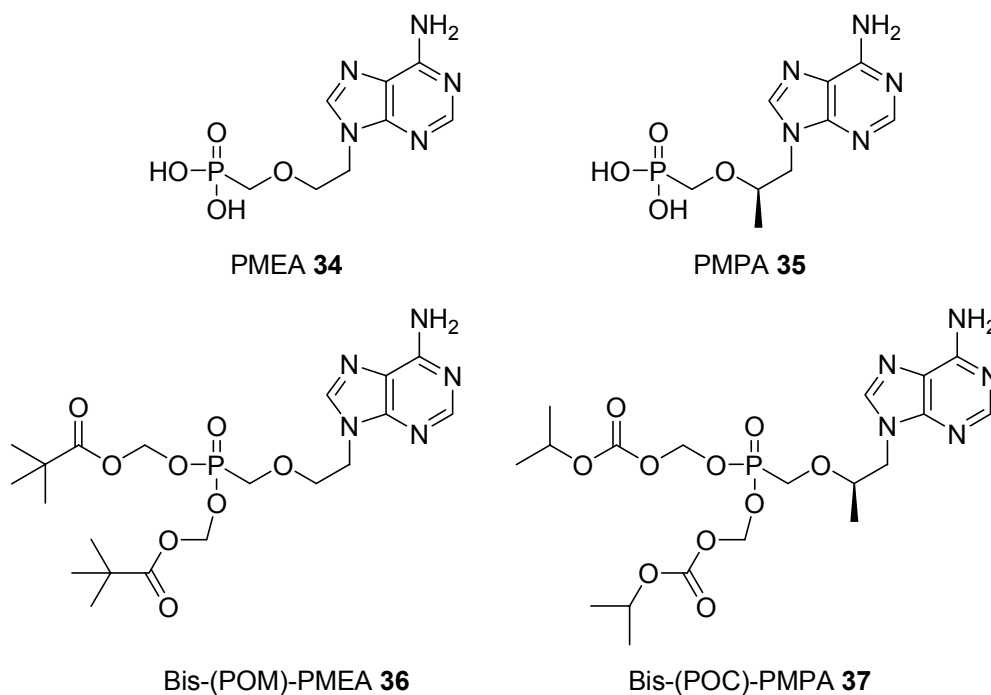


Abb. 12 Die antiviralen Agentien **34,35** und ihre Prodrugs **36,37**

Ein vollkommen neuartiges Pronucleotid-Konzept geht auf Meier et al. zurück: das *cycloSal*-Konzept (**cycloSaligenyl-Nucleotide**; *cycloSal*-NMPs). Das *cycloSal*-Konzept verwendet im Unterschied zu den anderen Pronucleotid-Systemen nur eine einzige cyclische Maske. Darüber hinaus wird die Abspaltung der Maske ausschließlich durch chemische Hydrolyse induziert, so daß die Anwendung der *cycloSal*-Pronucleotide nicht auf Zellen beschränkt ist, welche die zur Abspaltung der Maske notwendigen Enzyme enthalten.

2.2 Das *cycloSal*-Konzept

Die Abbildung 13 zeigt die Grundstruktur eines *cycloSal*-Nucleotids^[57-59].

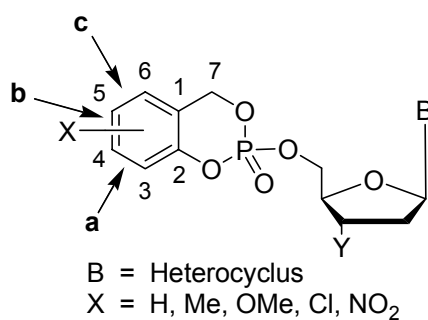


Abb. 13 Grundstruktur eines *cycloSal*-Nucleotids mit der Numerierung der Kohlenstoffatome und der Benennung der Ringseiten in der Aryl-Einheit

Es sei darauf hingewiesen, daß sowohl die Numerierung der Kohlenstoffatome als auch die Benennung der Ringseiten in der Aryl-Einheit nicht den IUPAC-Regeln folgt, sondern willkürlich ist. Die Besonderheit der *cycloSal*-Nucleotide besteht in der Abspaltung der cyclischen Maske durch eine selektiv verlaufende chemische Hydrolyse. Diese Selektivität wird durch die unterschiedlichen Stabilitäten der Benzyl-^[60], Phenyl-^[61] und Alkylphosphatester-Bindungen erreicht. Die Abbildung 14 gibt ein Reaktionsschema für die Hydrolyse der *cycloSal*-Nucleotide am Beispiel von d4T-Derivaten wieder.

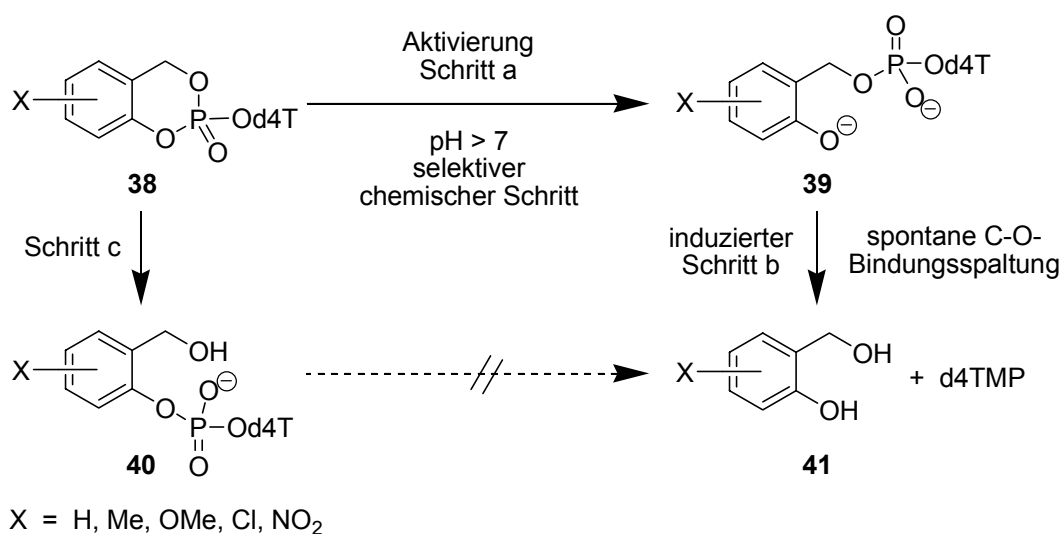


Abb. 14 Reaktionsschema für die selektive chemische Hydrolyse eines *cycloSal*-d4TMP-Phosphattriesters

In einem ersten Hydrolyseschritt wird die Phenylester-Bindung des *cycloSal*-NMPs (im Beispiel in Abb. 14 ein *cycloSal*-d4TMP **38**) gespalten. Diese stellt die labilste Esterbindung des Pronucleotids dar, da aus der Spaltung dieser Bindung ein mesomeriestabilisierter (2-Hydroxybenzyl)-d4T-phosphatdiester **39** resultiert (Schritt a, Abb. 14). Die alternativ denkbare Spaltung der Benzylester-Bindung von **38** würde hingegen zu einem (2-(Hydroxymethyl)-phenyl)-d4T-phosphatdiester **40** führen (Schritt c, Abb. 14). Da jedoch die Phosphatestergruppe als äußerst schwacher Donor-Substituent in *ortho*-Position zum Benzylester dessen Hydrolyse stark verlangsamt^[60], kommt es kaum zu dieser Reaktion, und der Schritt a aus Abbildung 14 verläuft als praktisch selektiver chemischer Schritt. Bedingung hierfür ist lediglich ein schwach alkalisches pH-Milieu, wie es in biologischen Systemen häufig vorliegt (physiologische pH-Bedingungen). Durch den ersten Hydrolyseschritt wird der schwache Donor-Substituent in der C-2-Position der *cycloSal*-Maske (eine

Phosphatestergruppe) in einen starken Donor-Substituenten (Hydroxylgruppe) überführt. Die daraus resultierende Änderung der elektronischen Verhältnisse im Aromaten induziert schließlich die spontane Spaltung des Phosphatdiesters **39** zum potentiellen Wirkstoff d4TMP und dem Salicylalkohol-Derivat **41** (Schritt b, Abb. 14, S. 15)^[62]. Insgesamt liegt somit eine Tandem-Reaktion vor. Es sei angemerkt, daß der Phenylphosphatdiester **40** aufgrund der negativen Ladung an der Phosphatgruppe gegen den erneuten nucleophilen Angriff eines Hydroxid-Anions auf das Phosphor-Atom inert ist, so daß es nicht zur Bildung von d4TMP und **41** kommt.

Das *cycloSal*-Konzept wurde unter anderem bereits für die folgenden Nucleosid-Analoga etabliert:

- d4T **4** (TK-Bypass)^[62-64]
- 2',3'-Dideoxyadenosin (ddA) und seine Derivate (d4A, 2'-Fluor-*ara*-ddA, 2'-Fluor-*ribo*-ddA; Adenosindesaminase-Bypass)^[65-68]
- acyclische Nucleosid-Analoga^[69-72]
- ABC **5** und das strukturell verwandte Carbovir^[73]
- BVDU **15** sowie 3'-O-Acyl- und 3'-O-Aminoacyl-Derivate des BVDUs (erstmalige Darstellung anti-EBV-aktiver BVDU-Derivate)^[74-76]

Diese Pronucleotide wurden in Hydrolysestudien sowie antiviralen *in vitro*-Tests untersucht. Für die *cycloSal*-d4TMPs wurde der folgende Zusammenhang zwischen dem Substitutionsmuster des aromatischen Ringes, den Hydrolyseeigenschaften und der antiviralen Aktivität gefunden: Wählte man für den Substituenten X Elektronendonatoren, so erhielt man eine erhöhte Hydrolysestabilität (beispielsweise für X = 3-Me $t_{1/2}$ = 17 h gegenüber 4.4 h für X = H, pH 7.3, 37°C) und sehr gute Aktivitäten gegen HIV-1 und HIV-2 in CEM/0-Zellen (Wildtyp-Zellen). Für Elektronenakzeptoren (beispielsweise X = 5-Cl) wurden Hydrolyse-Halbwertszeit (0.7 h) und antivirale Aktivität vermindert. In Thymidin-Kinase-defizienten CEM/TK-Zellen (Mutanten) ergab sich für die stabilisierten Verbindungen ein voller Erhalt der anti-HIV-2-Aktivitäten aus den Wildtyp-Zelltests, was eine gute Bestätigung des TK-Bypass-Konzeptes darstellte. Die labilisierten Pronucleotide wiesen hier einen Verlust an Aktivität auf. Die Tendenz, daß eine gewisse Stabilisierung des Pronucleotids durch Wahl des Substituenten X von Vorteil ist und eine Labilisierung ungünstige Auswirkungen hat, wurde prinzipiell für alle bisher synthetisierten

cycloSal-Nucleotide bestätigt. Auch wurden Metabolismus-Studien mit Tritium-markierten *cycloSal*-Nucleotiden durchgeführt^[77,78].

Außer der Synthese von *cycloSal*-Nucleotiden mit Substituenten im aromatischen Kern wurde auch eine Funktionalisierung der Benzyl-Position (7-Substitution) erprobt^[62,79-81]. Hierbei ergab sich jedoch das Problem, daß Substituenten in der Benzyl-Position zu einer vermehrten Bildung des unerwünschten Phenylphosphatdiesters **40** (vergl. Abb. 14, S. 15) bei der Hydrolyse des Pronucleotids führten. Hieraus ergaben sich schlechtere antivirale Aktivitäten. Die Bildung von **40** war bei den herkömmlichen *cycloSal*-Nucleotiden zuvor nur in geringem Maße (meist einige Prozent am Hydrolyseprodukt) festzustellen gewesen.

Bei der Anwendung des *cycloSal*-Konzeptes auf Nucleosid-Phosphonate wie PMEA **34** und PMPA **35** wurde festgestellt, daß die resultierenden Prodrugs **42** für antivirale Anwendungen zu labil waren^[82]. Daher wurde das phenolische Sauerstoffatom der *cycloSal*-Maske gegen ein Stickstoffatom ausgetauscht, um so die Elektrophilie des Phosphor-Atoms herabzusetzen. Die entsprechenden *cycloAminobenzyl*-(*cycloAmb*)-Prodrugs **43** waren deutlich hydrolysestabiler^[83], was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für *cycloAmb*-d4TMPs **44** stand^[84] (Abb. 15).

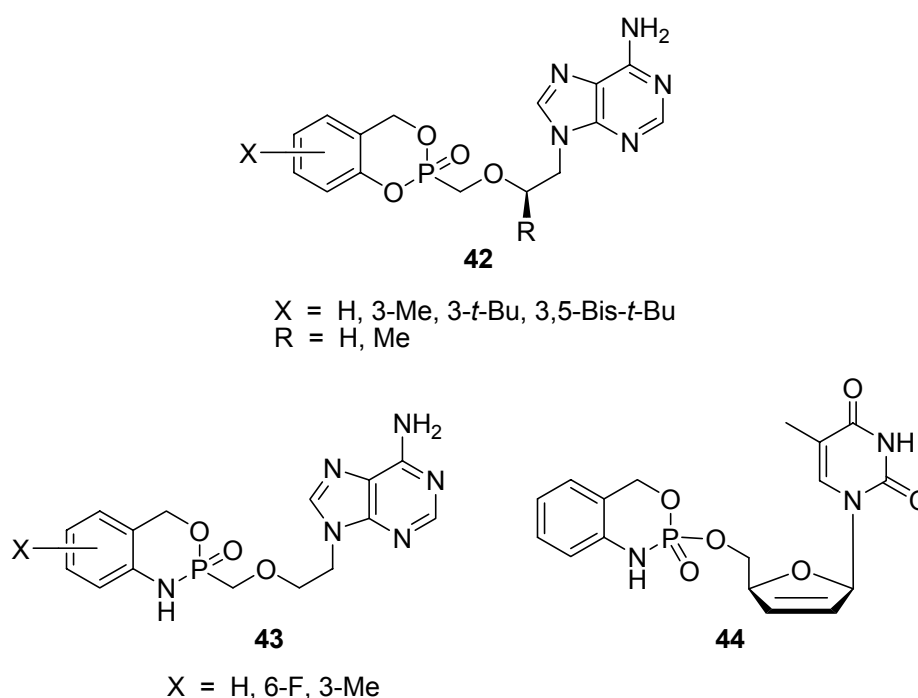


Abb. 15 Strukturen der *cycloSal*-Prodrugs **42** und der *cycloAmb*-Prodrugs **43,44**

Neben der Synthese von Pronucleotiden konnte das *cycloSal*-Konzept auch zur Darstellung lipophil maskierter Glycosylphosphate genutzt werden. Bei diesen

Prodrugs handelt es sich um potentiell nützliche Therapeutika für Kinder mit der Erbkrankheit CDG (**C**ongenital **D**isorder of **G**lycosylation). Der dieser Krankheit zugrunde liegende Gendefekt führt zur ungenügenden Synthese von Mannose-1-phosphat, somit zum Aufbau unvollständiger Kohlenhydratstrukturen und schließlich zum frühen Tod der betroffenen Kinder. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Applikation von 3-Methyl-*cycloSal*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-Mannose-1-phosphat **45** (Abb. 16) *in vitro* zur Vollkorrektur bei der Synthese der Kohlenhydratstrukturen führte^[85].

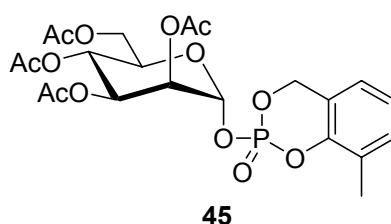


Abb. 16 Struktur von 3-Methyl-*cycloSal*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-Mannose-1-phosphat **45**

Außer zur Darstellung von Substanzen mit bestimmten biologischen Aktivitäten eignen sich *cycloSal*-Verbindungen auch als Synthesebausteine, wenn aktivierte Phosphat-Donatoren benötigt werden. So lassen sie sich beispielsweise zur Darstellung von modifizierten Nucleosid-Monophosphaten einsetzen, was bei der Synthese neuer Analoga des AZT-Monophosphats genutzt wurde^[86,87]. Die Verwendung von *cycloSal*-Nucleotiden zur Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Pyranosen durch nucleophilen Angriff eines geschützten Glycosyl-1-phosphates an den Phosphatrest eines *cycloSal*-Nucleotids wird gegenwärtig erprobt (Abb. 17).

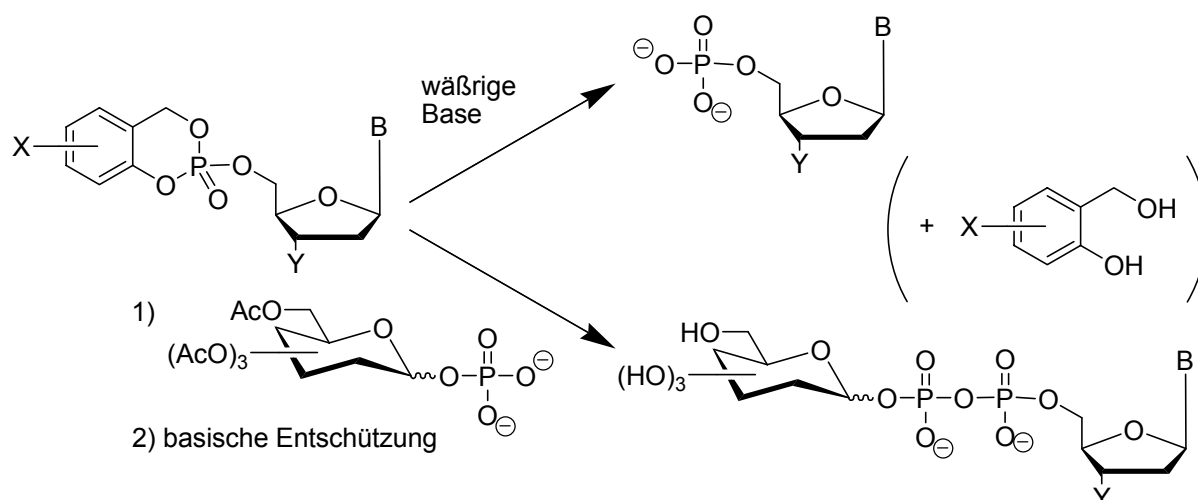


Abb. 17 Synthetisches Potential von *cycloSal*-Verbindungen

Für die hier vorliegende Arbeit hingegen soll ausschließlich die Anwendung des *cycloSal*-Konzeptes im Zusammenhang mit Pronucleotiden von Bedeutung sein.

3 Aufgabenstellung

cycloSal-Nucleotide - Ansätze zur Optimierung eines Wirkstoffsystems

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sollte die Bearbeitung drei verschiedener Aspekte zur potentiellen Optimierung des *cycloSal*-Pronucleotid-Konzeptes sein.

In einem ersten Teil sollte untersucht werden, ob das *cycloSal*-Konzept, welches zu Prodrugs mit einem Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1 : 1 führt, auch für die Synthese von Prodrugs mit einem Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1 : 2 geeignet ist. Hierzu sollten Biaryl-Derivate als Maskenstrukturen Verwendung finden und auf das Nucleosid-Analogon d4T **4** angewendet werden, um auf diese Weise sogenannte Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** zu erhalten (Abb. 18). Das Hydrolyseverhalten der synthetisierten Derivate sollte untersucht und ihre antiviralen Eigenschaften sowie Cytotoxizitäten in anti-HIV-*in vitro*-Tests bestimmt werden (Kooperation mit Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien).

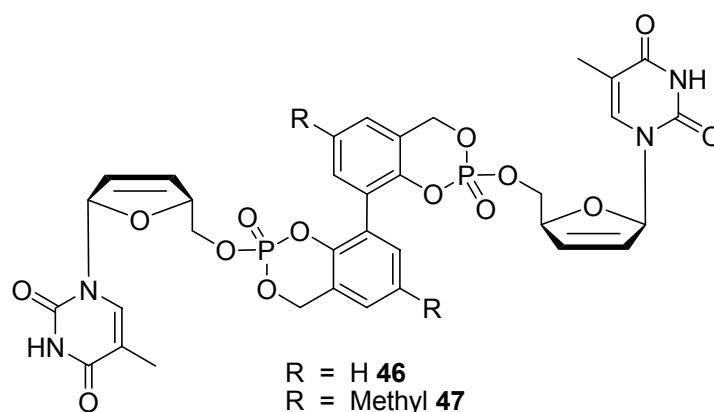


Abb. 18 Die Zielverbindungen **46,47**

Im zweiten Teil sollten neuartige „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-d4TMPs dargestellt und untersucht werden. Ziel war dabei, eine Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärem Hydrolyseverhalten der *cycloSal*-Nucleotide zu erreichen, indem intrazellulär durch eine enzymatische Reaktion an der entsprechend modifizierten *cycloSal*-Maske eine polare Gruppe freigesetzt wird. Der Efflux des Prodrugs aus der Zelle sollte so verhindert werden. Die entsprechenden Zielverbindungen **48-50** (Abb. 19, S. 21) sollten in verschiedenen Medien im Hinblick auf ihr Hydrolyseverhalten untersucht werden, wobei die Frage im Vordergrund stand, ob in biologischen

Medien wie beispielsweise CEM/0-Zellextrakten die gewünschte enzymatische Reaktion tatsächlich zu beobachten war. Auch hier sollte überprüft werden, ob die konzeptionelle Erweiterung des *cycloSal*-Ansatzes zu einer Verbesserung der antiviralen Eigenschaften der Pronucleotide führte.

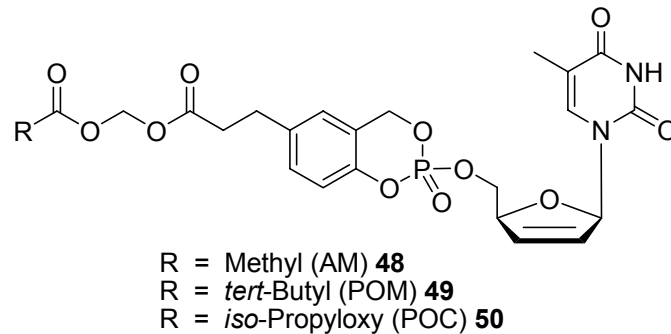


Abb. 19 Die Zielverbindungen **48-50**

Der dritte Teil dieser Arbeit schließlich sollte eine Untersuchung der Interaktion von Cholinesterasen mit *cycloSal*-Nucleotiden zum Gegenstand haben. Eine Inhibition insbesondere von Acetylcholinesterase könnte in einer potentiellen therapeutischen Anwendung der *cycloSal*-Prodrugs zu ernsthaften Nebenwirkungen führen. Daher war zunächst unter Verwendung eines Cholinesterase-Assays zu bestimmen, ob der bereits aus Vorarbeiten^[88] bekannte Effekt der Cholinesterase-Inhibition Acetylcholinesterase (AChE) oder Butyrylcholinesterase (BChE) betrifft. Hierbei sollte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt werden. Anschließend galt es, Wege zur Vermeidung der unerwünschten Cholinesterase-Inhibition zu erarbeiten. Ziel war dabei das Design und die Synthese einer *cycloSal*-Maske, deren Anwendung nicht nur zum Ausbleiben der Cholinesterase-Inhibition durch das Pronucleotid führt, sondern die auch eine selektive Hydrolyse zum Nucleosid-Monophosphat bei hinreichender Hydrolysestabilität und somit gute antivirale Eigenschaften gewährleistet. Diese neue Maske sollte auf die Nucleosid-Analoga d4T **4** und BVDU **15** angewendet werden. Die entsprechenden Verbindungen waren in Hydrolysestudien und im Cholinesterase-Assay sowie in antiviralen *in vitro*-Tests zu untersuchen.

4 Resultate und Diskussion

4.1 Synthese einiger Edukte und Reagenzien

Im Rahmen des synthetischen Teils dieser Arbeit wurden einige Substanzen als Edukte und Reagenzien eingesetzt, die zunächst darzustellen waren. Ihre Synthese soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

4.1.1 Synthese von Chlormethylmethylether (MOM-Chlorid) **51**

Für die Einführung der Methoxymethyl-Schutzgruppe (MOM-Schutzgruppe) für Hydroxygruppen ist der Chlormethylmethylether (MOM-Chlorid) **51** ein überaus nützliches Reagenz. Ein großer Nachteil besteht jedoch in der außerordentlich hohen Toxizität dieser Verbindung, welche ihre kommerzielle Verfügbarkeit stark einschränkt. Zur Herstellung einer Reagenzlösung von MOM-Chlorid **51** wurde ein Verfahren von Amato et al. angewendet^[89].

Unter trockenen Bedingungen wurden Dimethoxymethan und Methanol mit Acetylchlorid versetzt. Dieses reagierte mit Methanol unter Bildung von Methylacetat und Chlorwasserstoff. Der Chlorwasserstoff reagierte mit dem Dimethoxymethan im Sinne einer S_N2-Reaktion unter Bildung von **51** und Methanol, so daß insgesamt die Zugabe einer katalytischen Menge Methanol reichte (Abb. 20). Auf diese Weise wurde eine Lösung von **51** in Methylacetat erhalten, deren Konzentration Amato et al. mit etwa 6 M angeben. Als größter Vorteil des Verfahrens wird angeführt, daß der stark cancerogene Bis-(chlormethyl)-ether nicht als Nebenprodukt entsteht.

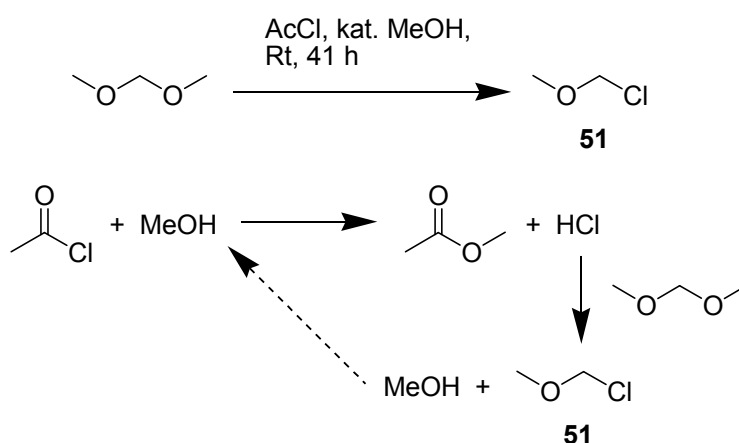


Abb. 20 Synthese von Chlormethylmethylether **51** und deren Mechanismus

4.1.2 Synthese von Phenylboronsäure **52**

Für die nachfolgend noch beschriebene Methode der *ortho*-selektiven Hydroxymethylierung am Aromaten nach Nagata, aber auch für die Suzuki-Kreuzkupplung stellt Phenylboronsäure **52** ein nützliches Edukt dar. Sie ist zwar kommerziell verfügbar, aber sehr teuer, so daß ihre Darstellung lohnend erscheint.

Zur Synthese von **52** mußte zunächst das Edukt Tris-(*n*-butyl)-borat **53** dargestellt werden. Dies geschah durch Veresterung von Borsäure mit *n*-Butanol in Gegenwart von Molekularsieb unter Dean-Stark-Bedingungen in hoher Ausbeute^[90]. Bei der nachfolgenden Umsetzung des Grignard-Reagenzes Phenylmagnesiumbromid (hergestellt aus Brombenzol) mit **53**^[91] wurde jedoch stets ein Gemisch aus Phenylboronsäure **52** und Phenylboronsäureanhydrid **54** erhalten (Abb. 21).

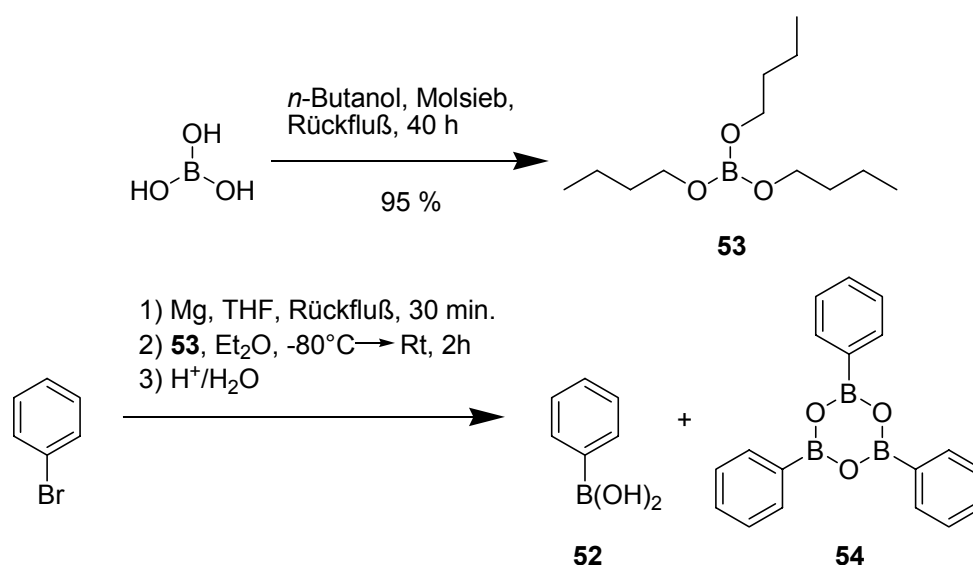


Abb. 21 Synthese von Tris-(*n*-butyl)-borat **53** und Phenylboronsäure **52**

Aus diesem Gemisch konnte zwar das reine Anhydrid **54** durch Erhitzen erhalten werden, welches in Suzuki-Kupplungen anstelle der Phenylboronsäure **52** eingesetzt werden konnte. Die reine Säure **52**, die für die Umsetzungen nach Nagata benötigt wird, war jedoch nicht zugänglich. Ein leichtes Anfeuchten des Gemisches kam nicht in Frage, da größere Mengen Wassers die Hydroxymethylierung nach Nagata stören können. Das Gemisch aus **52** und **54** erwies sich als für diese Reaktion ungeeignet. Für die Hydroxymethylierung nach Nagata wurde daher weiterhin die kommerziell verfügbare Phenylboronsäure verwendet.

4.1.3 Synthese von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) **4**

Zur Synthese von d4T **4** wurde auf eine etablierte Methode zurückgegriffen^[92,93], die daher hier nur kurz umrissen werden soll. Aus 2'-Desoxythymidin (dT) **7** wurde das Di-O-mesyl-Derivat **55** dargestellt, welches durch Behandlung mit wässriger Base die Anhydro-Verbindung **56** ergab. Die Umsetzung von **56** mit Kalium-*tert*-butanolat als nicht-nucleophiler starker Base lieferte in einer E₂-Eliminierung d4T **4** (Abb. 22).

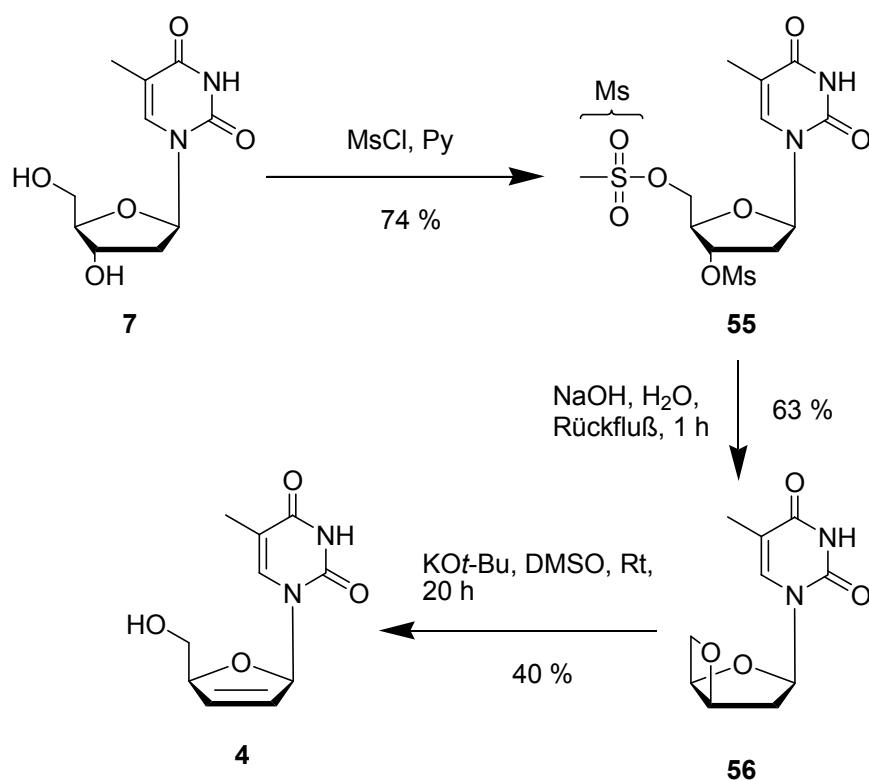


Abb. 22 Synthese von d4T **4**

Als problematischster Punkt der Synthese erwies sich die Reinigung der polaren Verbindung **4**. Das bei der Reaktion zunächst anfallende Alkoholat wurde durch Eingießen in Toluol ausgefällt, abfiltriert, in Wasser aufgenommen und durch Neutralisation in die gewünschte Verbindung **4** überführt. In bisherigen Synthesen wurde die so erhaltene wässrige Phase meist mit Ethylacetat extrahiert, um **4** zu erhalten, was aufgrund der großen Hydrophilie von **4** jedoch schwierig und zeitaufwendig war. Es wurde daher die Alternative erprobt, die wässrige Phase einer Gefriertrocknung zu unterziehen und anschließend den verbliebenen Rückstand (eine Mischung aus **4** und Salzen) durch eine Kieselgelfiltration von den Salzen zu befreien. In der Tat ließ sich die Aufarbeitung der Reaktion auf diese Weise sehr viel

schneller durchführen, allerdings ergab sich für diesen Syntheseschritt mit 40 % eine nur mäßige Ausbeute. Wahrscheinlich war es vor der Kieselgelfiltration nicht gelungen, das Produkt **4** vollständig in Lösung zu bringen, so daß an dieser Stelle Verluste auftraten. Auch die Ausbeuten der ersten beiden Stufen waren mit 74 und 63 % (47 % über zwei Stufen) lediglich befriedigend. Sie lassen sich eventuell erhöhen, indem man auf eine Reinigung von **55** durch Umkristallisation verzichtet und diese erst für **56** durchführt, um so die Ausbeuteverluste zu minimieren.

4.1.4 Synthese von 2',3'-Dideoxythymidin (ddT) **57**

Das Nucleosid-Analogon 2',3'-Dideoxythymidin (ddT) **57** wurde gemäß den Arbeiten von Agrofoglio et al. durch katalytische Hydrierung von d4T **4** an Palladium/Kohle erhalten (Abb. 23)^[94]. Die Ausbeute war mit 62 % befriedigend. Ausbeuteverluste sind möglicherweise dadurch entstanden, daß das Reaktionsgemisch durch Celite filtriert wurde, um den Katalysator abzutrennen, da nucleosidische Substanzen häufig dazu neigen, fest an Celite gebunden und nicht oder nur langsam eluiert zu werden.

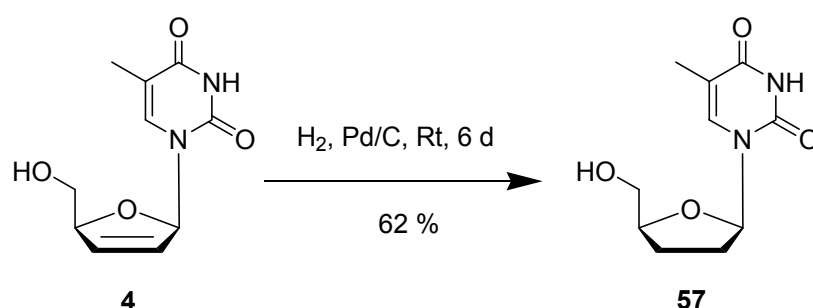


Abb. 23 Synthese von ddT **57**

4.1.5 Synthese von *iso*-2'-Desoxyadenosin (*iso*-dA) **58**

Auch die Synthese des Basen-modifizierten Nucleosid-Analogons *iso*-2'-Desoxyadenosin (*iso*-dA) **58** erfolgte prinzipiell nach einer bereits etablierten Syntheseroute^[95]. Zunächst wurde 2'-Desoxyguanosin in guter Ausbeute (79 %) dreifach mit Isobutyryl-Gruppen geschützt, um so in das in organischen Solventien lösliche Derivat **59** überführt zu werden. Dieses wurde einer Verschwefelungs-Reaktion unterzogen, in welcher das Carbonyl-Sauerstoffatom der Nucleobase

gegen Schwefel ausgetauscht wurde. Die so in 71 % Ausbeute erhaltene Thio-Verbindung **60** wurde anschließend basisch entschützt und führte auf diese Weise zu 6-Thio-2'-desoxyguanosin **61** (72 % Ausbeute)^[96]. Diese Verbindung wiederum konnte unter Wasserstoffatmosphäre in Gegenwart von Raney-Nickel entschwefelt werden (76 % Ausbeute), um so das gewünschte Produkt **58** in einer Gesamtausbeute von 31 % über vier Stufen zu liefern (Abb. 24).

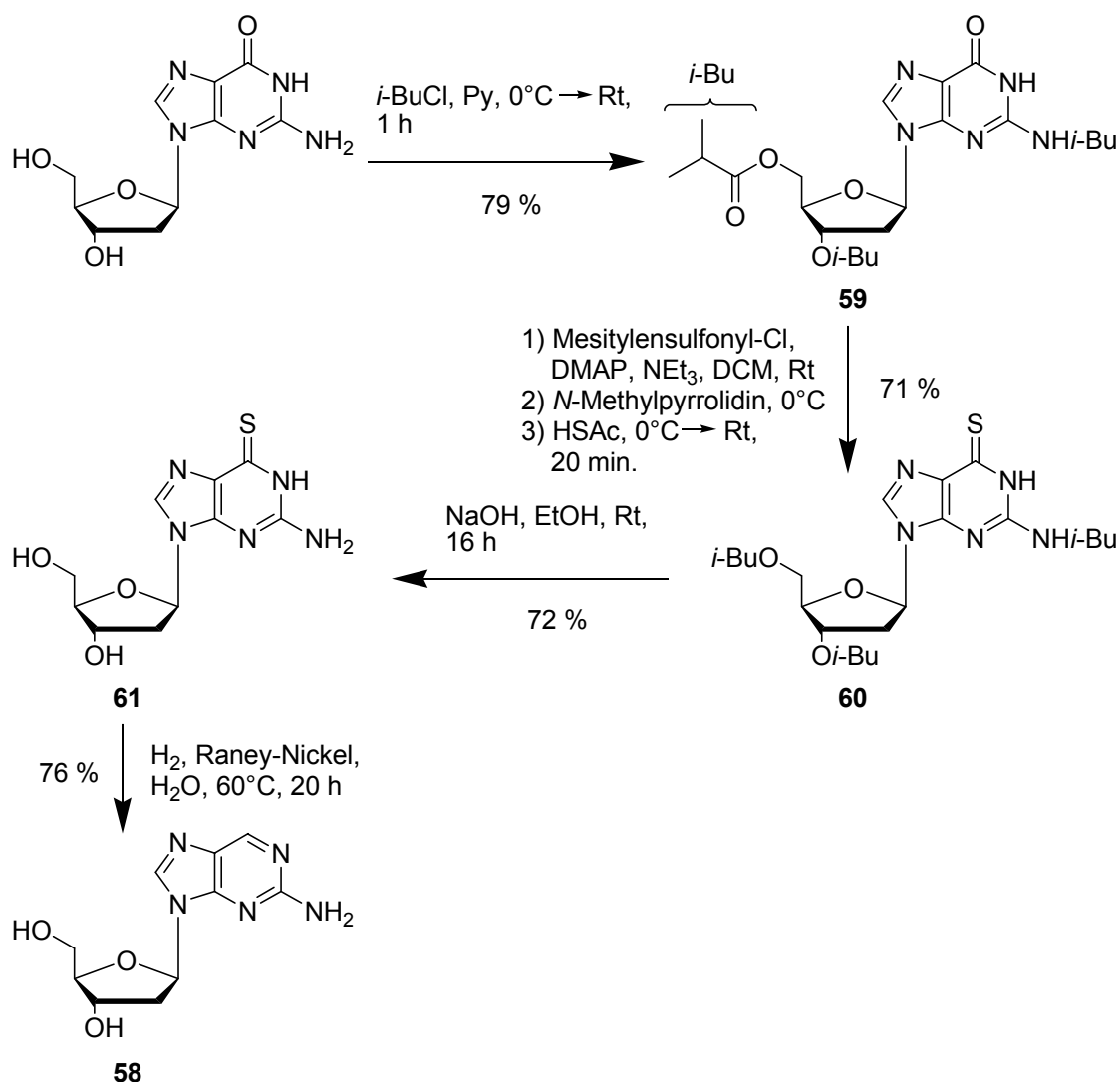


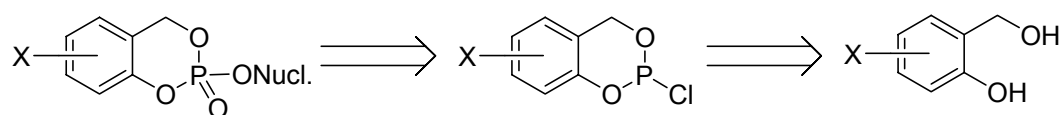
Abb. 24 Synthese von *iso*-dA **58**

Als entscheidender Schritt dieser Synthese erwies sich die Verschwefelungs-Reaktion von **59** zu **60**, welche auf einer zweifachen Aktivierung der Carbonylgruppe der Nucleobase zunächst durch Mesitylsulfonylchlorid und dann durch *N*-Methylpyrrolidin, der nucleophilen Substitution der Pyrrolidiniumgruppe durch Thioessigsäure und der abschließenden Hydrolyse des S-Acyl-Intermediates in einer

Eintopfreaktion beruht. Die chromatographische Reinigung des Produktes **60** erwies sich als schwierig und langwierig, insbesondere wenn die abschließende Teilreaktion mit Thioessigsäure nicht rechtzeitig abgebrochen wurde, was zur Bildung nicht näher zu identifizierender Nebenprodukte führte. Bei der anschließenden basischen Entschützung zu **61** mußte unbedingt darauf geachtet werden, bei der im Zuge der Aufarbeitung erfolgenden Neutralisation nicht versehentlich zu stark anzusäuern, da andernfalls die rasche Depurinierung des Produktes **61** eintrat.

4.2 Synthesestrategien

Zur Darstellung der *cycloSal*-Nucleotide sollte das in der Abbildung 25 dargelegte, etablierte Retrosyntheschema Anwendung finden^[58,59].



Nucl. = Nucleosid-Analogon

Abb. 25 Retrosyntheschema zur Darstellung der *cycloSal*-Nucleotide

Ausgehend von entsprechend substituierten Salicylalkohol-Derivaten sollten durch Umsetzung mit Phosphor(III)-chlorid cyclische Saligenylchlorphosphite bereitete werden. Diese dienen dann in Umsetzungen mit Nucleosid-Analoga als phosphitylierende Agentien. Die resultierenden Phosphor(III)-Verbindungen sollten dann zu den gewünschten Phosphor(V)-Verbindungen oxidiert werden.

Für einige Nucleosid-Analoga, beispielsweise BVDU **15**, ergibt sich bei Anwendung der dargestellten Synthesestrategie das Problem der Gegenwart freier nucleophiler Gruppen (im Falle von BVDU **15** die freie 3'-Hydroxylfunktion), die in Nebenreaktionen ebenfalls mit den cyclischen Saligenylchlorphosphiten reagieren können. In solchen Fällen wurde die Anwendung einer meist aufwendigen Schutzgruppen-Strategie wenn möglich vermieden, indem die Bedingungen (Menge des Chlorphosphits, Lösungsmittel, Temperatur) so verändert wurden, daß eine direkte Synthese der *cycloSal*-Nucleotide möglich war. Dies wird im Einzelnen in den entsprechenden Fällen erläutert werden.

An dieser Stelle soll eine kurze Anmerkung zur Nomenklatur der *cycloSal*-Nucleotide sowie ihrer synthetischen Vorläufer gemacht werden. Nach IUPAC müßte man die

Salicylalkohol-Derivate als X-substituierte 2-(Hydroxymethyl)-phenole und die Saligenylchlorphosphite sowie die *cycloSal*-Nucleotide nach der Heterocyclen-Nomenklatur benennen. Es ist offensichtlich, daß die sich daraus ergebenden Namen sehr kompliziert wären, weshalb eine abgewandelte Nomenklatur in Abweichung von den IUPAC-Regeln Verwendung finden soll. So werden die entsprechenden Verbindungen nachfolgend als X-substituierte Salicylalkohol-Derivate, Saligenylchlorphosphite und *cycloSal*-Nucleotide bezeichnet werden. Für die Numerierung der Kohlenstoff-Atome in der Aryl-Einheit zur Angabe des Substitutionsmusters gilt dabei die in Kapitel 2.2 erläuterte, ebenfalls von den IUPAC-Regeln abweichende Festlegung.

Da die Umsetzungen der Salicylalkohol-Derivate mit Phosphor(III)-chlorid und der entstehenden Chlorphosphite mit Nucleosid-Analoga etablierte Reaktionen darstellen, besteht die eigentliche synthetische Herausforderung in der Darstellung entsprechend substituierter Salicylalkohol-Derivate. Generell existierten bisher drei verschiedene Synthesemethoden zur Darstellung von *ortho*-hydroxymethylierten Phenolen. Die wohl einfachste Variante besteht in der direkten Umsetzung des jeweiligen Phenols mit Formaldehyd im wäßrigen Milieu oder in Methanol unter Zusatz von Base zur Erzeugung des in einer elektrophilen Substitution hochreaktiven Phenolats (Abb. 26).

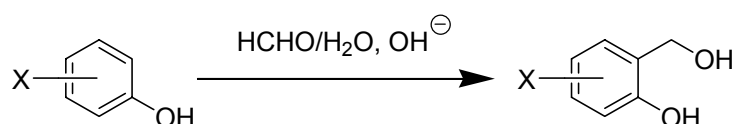


Abb. 26 Synthese von Salicylalkohol-Derivaten durch Umsetzung von Phenolen mit Formaldehyd

Die wesentlichen Nachteile dieser Methode bestehen in den nicht immer überzeugenden Ausbeuten sowie der mangelnden Regioselektivität. In der Tat ist eine derartige Umsetzung nur sinnvoll, wenn die *para*-Position des Phenols bereits substituiert ist, so daß es nicht zur Bildung komplexer Produktgemische kommen kann.

Eine weitere Synthesemethode für Salicylalkohol-Derivate geht auf Nagata et al. zurück^[97]. Diese Methode beruht auf einer *ortho*-Hydroxymethylierung des jeweiligen Phenols mit *para*-Formaldehyd unter Beteiligung eines Phenylboronsäureesters, welcher *in situ* gebildet wird. Es ergeben sich 4*H*-Benzo[1.3.2]-dioxaborine, welche

zwar aufgearbeitet, aber nur in Ausnahmefällen gereinigt werden. Häufig werden sie als Rohgemische weiter umgesetzt, indem sie mit Wasserstoffperoxid oxidativ gespalten werden, wodurch das gewünschte Salicylalkohol-Derivat freigesetzt wird (Abb. 27). Als Vorteile dieser Methode sind die meist guten Ausbeuten und die hohe Regioselektivität zu nennen, Nachteile liegen in der schlechten Atomökonomie sowie den relativ hohen Kosten für die Phenylboronsäure (vergl. auch Kapitel 4.1.2).

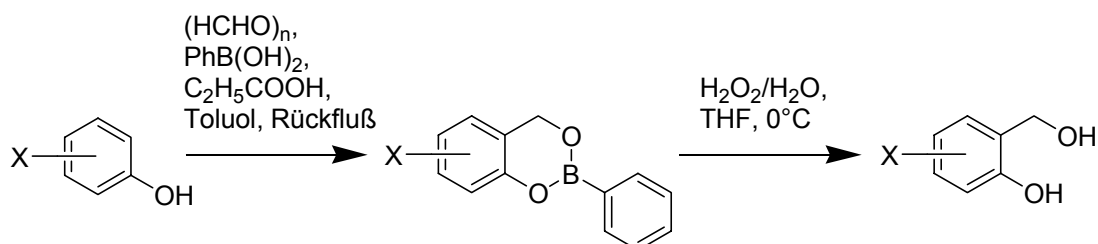


Abb. 27 Synthese von Salicylalkohol-Derivaten nach Nagata et al.

Eine dritte Synthesestrategie besteht in der Reduktion entsprechender Salicylaldehyd- und Salicylsäure-Derivate mit gängigen Reduktionsmitteln (Abb. 28). Lithiumaluminiumhydrid erwies sich hierbei aufgrund seiner hohen Reaktivität als sehr geeignet, da die Umsetzungen meist quantitativ verlaufen, eine abschließende Reinigung des Produktes daher nicht erforderlich ist und so meist hohe Ausbeuten resultieren. In einigen Fällen können jedoch bei der Aufarbeitung Salze in die organische Phase gelangen, die dann durch eine abschließende Kieselgelfiltration abgetrennt werden müssen. Überhaupt ist die relativ aufwendige Aufarbeitung als wesentlicher Nachteil dieser Methode zu nennen.

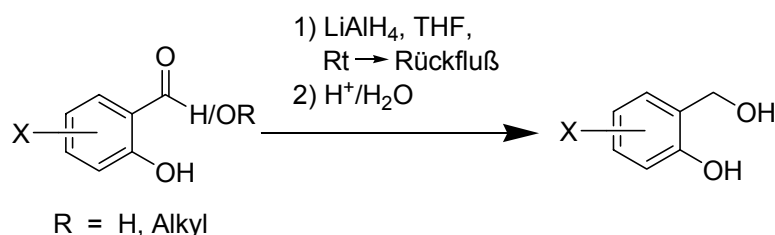


Abb. 28 Synthese von Salicylalkohol-Derivaten durch Reduktion von Carbonylverbindungen

Die Darstellung der genannten Carbonylverbindungen muß unter Umständen zuvor durch *ortho*-Formylierung oder -Carboxylierung von Phenolen erfolgen. Als Formylierungsmethoden seien hier die Reaktionen nach Gattermann-Koch^[98], Vilsmeier-Haack^[99], Rieche^[100,101] und Casiraghi^[102] sowie die Fries-Umlagerung^[103] an

Phenylameisensäureestern und die Reimer-Tiemann-Reaktion^[104] genannt. Für Carboxylierungen bietet sich die Kolbe-Schmitt-Synthese an.

Obwohl die aufgeführten Methoden bereits zur Synthese einer Vielzahl von Salicylalkohol-Derivaten beigetragen haben, sind ihnen doch zwei wichtige Nachteile gemein. Zum einen müssen entsprechend substituierte Phenole als Edukte verfügbar sein, die unter Umständen erst synthetisiert werden müssen. Zum anderen beinhalten alle drei Methoden in zumindest einem Schritt verhältnismäßig harsche Bedingungen, in der ersten Methode das stark basische Reaktionsmilieu, in der zweiten Methode die hohe Temperatur, in der dritten Methode die Verwendung eines sehr reaktiven Reduktionsmittels. Es ist daher prinzipiell möglich, daß die genannten Methoden zur Synthese eines komplexer funktionalisierten Salicylalkohol-Derivates nicht geeignet sein könnten. Es besteht daher im Zusammenhang mit *cycloSal-Nucleotiden* ein außerordentliches Interesse an weiteren Methoden zur Darstellung von Salicylalkohol-Derivaten, die bei hinreichender synthetischer Einfachheit auch die Perspektive der größtmöglichen Diversität beinhalten sollten. Ein solches neues Synthesekonzept wird im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

4.3 Ein neues Synthesekonzept für Salicylalkohol-Derivate

4.3.1 Erläuterung des Konzeptes

Die bisherigen Methoden zur Darstellung von Salicylalkohol-Derivaten gingen grundsätzlich von einer späten Einführung der Hydroxymethyl-Funktion aus, ob durch elektrophile Substitution oder Reduktion einer Carbonylverbindung. In diesem neuen Synthesekonzept soll die Hydroxymethylfunktion früh eingeführt werden und das gewünschte Salicylalkohol-Derivat durch Funktionalisierung eines entsprechend geschützten Salicylalkohols als synthetischem Vorläufer erhalten werden (Abb. 29).

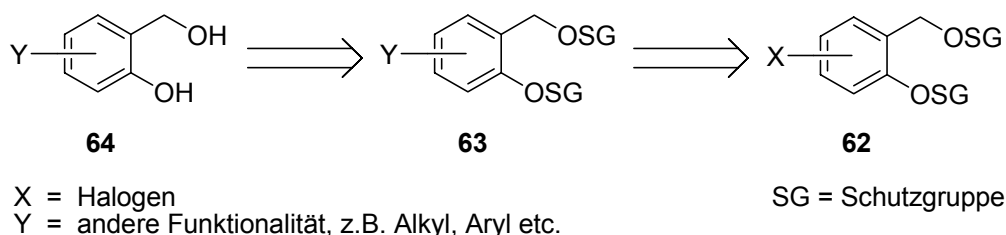


Abb. 29 Retrosyntheschema für das neue Synthesekonzept für Salicylalkohol-Derivate

Ausgehend von einem geschützten halogenierten Vorläufer **62** sollte sich beispielsweise durch eine Kreuzkupplungsreaktion das substituierte Produkt **63** erhalten lassen, welches nach Entschützung das gewünschte Salicylalkohol-Derivat **64** ergeben sollte.

Da eine Funktionalisierung durch Kreuzkupplung für bromierte Aromaten leicht möglich sein sollte, wurde $X = \text{Br}$ gewählt. Als Schutzgruppe erschien besonders eine cyclische acetalische Schutzgruppe wie die Isopropyliden-/Acetonid-Gruppe attraktiv, da so nur eine Schutzgruppe verwendet werden muß und die Anwendung der Isopropyliden-Schutzgruppe aus zahlreichen Vorarbeiten bekannt ist (vergl. z. B. die Arbeiten von Sala und Sargent^[105], Choudhury et al.^[106] und Katz und Cram^[107]). Auch die Verwendung von Silyl-Schutzgruppen ließ sich in Betracht ziehen. Es sollten daher die Verbindungen 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66** und 3,5-Dibromsalicylalkoholisopropylidenacetal **67** als geschützte potentielle Vorläufer für 3-, 5- bzw. 3,5-Di-substituierte Salicylalkohol-Derivate sowie zusätzlich die Bis-O-Silyl-geschützten 5-Bromsalicylalkohole **68,69** als potentielle Vorläufer für 5-substituierte Salicylalkohol-Derivate dargestellt werden (Strukturen vergl. Abb. 30). Die Verbindungen **65** und **67** haben im Rahmen dieser Arbeit weitere Verwendung für die Synthese von Salicylalkohol-Derivaten gefunden, was noch erläutert werden wird.

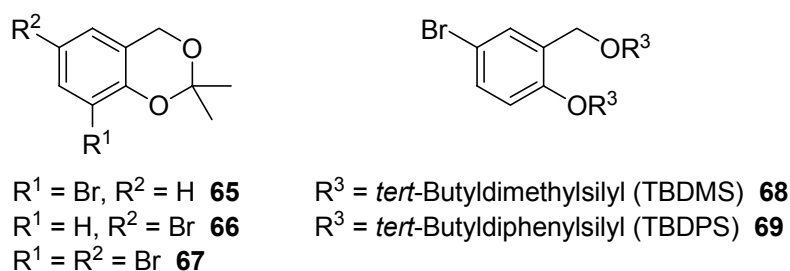


Abb. 30 Die potentiellen synthetischen Vorläufer **65-67** und **68,69** für Salicylalkohol-Derivate

4.3.2 Synthese der Salicylalkoholisopropylidenacetale **65-67**

Zur Synthese der Acetale waren zunächst die entsprechenden bromierten Salicylalkohol-Derivate darzustellen. Der 3-Bromsalicylalkohol **70** wurde nach der Methode von Nagata (vergl. Kapitel **4.2**) aus *ortho*-Bromphenol erhalten (Abb. 31, S. 32).

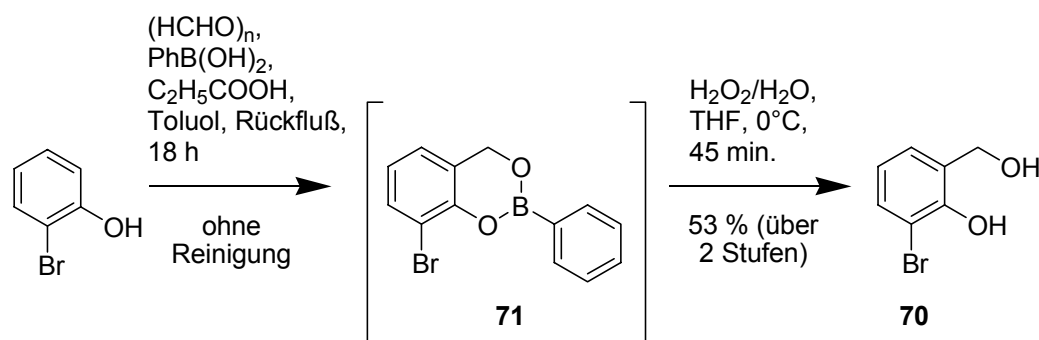


Abb. 31 Synthese von 3-Bromsalicylalkohol **70**

Das Dioxaborin **71** wurde dabei nicht gereinigt, sondern als Rohgemisch in der Oxidation zu **70** eingesetzt. Aus der Oxidation wurde ein Gemisch von drei Substanzen als Rohgemisch erhalten (nicht umgesetztes *ortho*-Bromphenol, Phenol aus der Phenylboronsäure und das Produkt **70**), welches chromatographisch getrennt werden mußte. Da *ortho*-Bromphenol bezüglich elektrophiler aromatischer Substitutionen desaktiviert ist, erfolgte die Bildung von **71** nicht quantitativ und wurde zum limitierenden Faktor für die Ausbeute. In ersten Ansätzen wurden jeweils etwa 50 mmol *ortho*-Bromphenol eingesetzt (Nagata et al. haben meist 10 mmol des jeweiligen Phenols zur Reaktion gebracht), und die Ausbeuten über zwei Stufen betragen meist 30 bis 35 %. Bei einer Durchführung der Reaktion im größeren Maßstab (471 mmol *ortho*-Bromphenol) mußte zwangsläufig konzentrierter gearbeitet werden, und das Resultat war eine auf 53 % über zwei Stufen erhöhte Ausbeute. Die Synthese wurde besonders aufgrund der abschließenden chromatographischen Reinigung zwar langwierig, aber das „Upscalen“ der Reaktion scheint dennoch ratsam zu sein.

Der wesentlichste Nachteil der vorgestellten Synthese von **70** bestand in der Notwendigkeit, große Mengen der teuren Phenylboronsäure einsetzen zu müssen. Es wurde daher nach einer alternativen Darstellungsmöglichkeit gesucht, welche zum Beispiel in der Reduktion von 3-Bromsalicylsäure **72** zu **70** bestanden hätte. Hierzu war jedoch zunächst die Synthese der Säure **72** notwendig, die von Shackelford beschrieben worden war^[108]. Ausgehend von Salicylsäure sollte eine regioselektive Bromierung in 3-Position erfolgen, was durch Zugabe eines Quecksilber(II)-Salzes ermöglicht werden sollte (Abb. 32). Ein exakter Mechanismus zu dieser Reaktion war von Shackelford nicht angegeben worden. Obwohl die Original-Vorschrift dieser Synthese exakt eingehalten wurde, konnte das gewünschte Produkt **72** nicht erhalten werden. Vielmehr lieferte die Reaktion laut $^1\text{H-NMR}$ -

Spektrum des Produkts noch verunreinigte 3,5-Dibromsalicylsäure, die Bromierung war also nicht regioselektiv erfolgt.

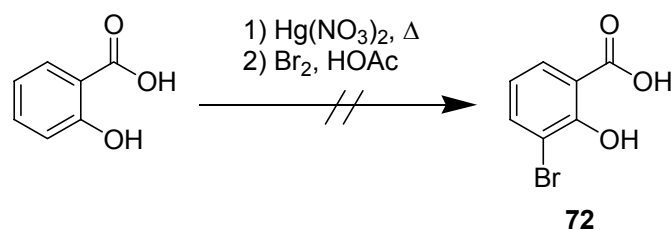


Abb. 32 Versuch der Synthese von 3-Bromsalicylsäure **72**

Der 5-Bromsalicylalkohol **73** ist zwar kommerziell verfügbar, ist aber im Vergleich zu 5-Bromsalicylaldehyd oder 5-Bromsalicylsäure unverhältnismäßig teuer. Der Alkohol **73** wurde daher durch Reduktion von 5-Bromsalicylaldehyd mit Lithiumaluminiumhydrid dargestellt (vergl. Kapitel **4.2**, Abb. 33). Die Synthese verlief prinzipiell problemlos, allerdings war die Trennung der Phasen bei der Aufarbeitung schwierig und langwierig. Trotzdem konnte mit 89 % eine sehr gute Ausbeute erzielt werden.

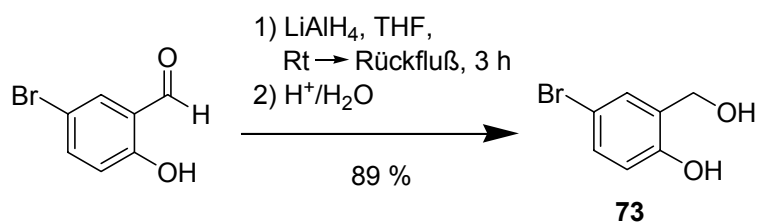


Abb. 33 Synthese von 5-Bromsalicylalkohol **73**

Die Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol **74** erwies sich als etwas komplizierter. Da 3,5-Dibromsalicylsäure kommerziell verfügbar ist, bot sich auch hier zunächst die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid unter Standardbedingungen (2.0 Äquiv. Reduktionsmittel, Erhitzen unter Rückfluß in THF) an. Dabei wurde jedoch nicht das reine Produkt **74**, sondern laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vielmehr ein Gemisch aus 37 % **74**, 10 % 3-Bromsalicylalkohol **70** und 53 % 5-Bromsalicylalkohol **73** erhalten (Abb. 34, S. 34). Offensichtlich war entweder das Edukt oder das Produkt **74** so elektronenarm, daß das überschüssige und stark basische Reduktionsmittel Lithiumaluminiumhydrid eine teilweise Dehydrohalogenierung des Aromaten im Sinne eines Arin-Mechanismus bewirkte. Es mußte daher nach einer Möglichkeit gesucht werden, den Alkohol **74** unter milderem Bedingungen reaktiv aus 3,5-Dibromsalicylsäure oder einem entsprechenden Derivat darzustellen.

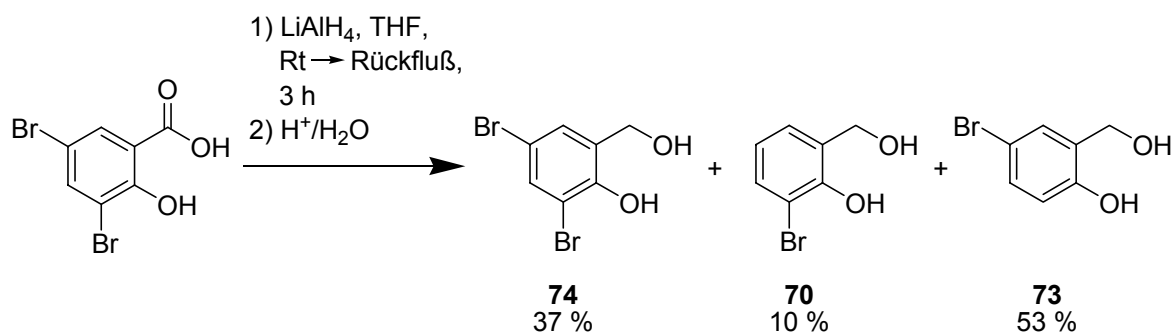


Abb. 34 Versuch der Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol **74** durch direkte Reduktion von 3,5-Dibromsalicylsäure mit Lithiumaluminiumhydrid

Hierzu wurde zunächst der 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75** synthetisiert, da die Reduktion von Carbonsäureestern weniger drastische Bedingungen benötigt als die direkte Reduktion von Carbonsäuren. Die Verbindung **75** wurde durch Veresterung von 3,5-Dibromsalicylsäure in Methanol in Gegenwart eines Überschusses konzentrierter Schwefelsäure in sehr guter Ausbeute (91 %) erhalten (Abb. 35).

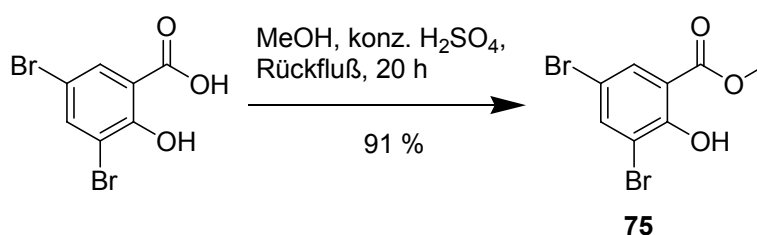


Abb. 35 Synthese von 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75**

Der Ester **75** konnte anschließend unter modifizierten Bedingungen mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert werden: zur vollständigen Umsetzung reichten nunmehr 1.0 Äquiv. Lithiumaluminiumhydrid aus, und auf ein Erhitzen unter Rückfluß wurde verzichtet. Auf diese Weise konnte **74** in 71 % Ausbeute erhalten werden (Abb. 36).

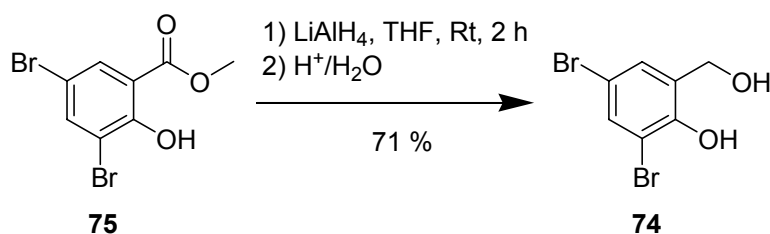


Abb. 36 Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol **74**

Alternativ wurde die Reduktion von **75** mit dem milderen Reduktionsmittel Calciumborhydrid erprobt (Abb. 37, S. 35)^[109]. Das Reduktionsmittel wurde dabei aus

Calciumchlorid und Natriumborhydrid frisch hergestellt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion ergab jedoch, daß keine Umsetzung stattfand, was wahrscheinlich auf die sehr schlechte Löslichkeit von **75** in dem für derartige Umsetzungen gängigen Lösungsmittel Ethanol zurückzuführen war.

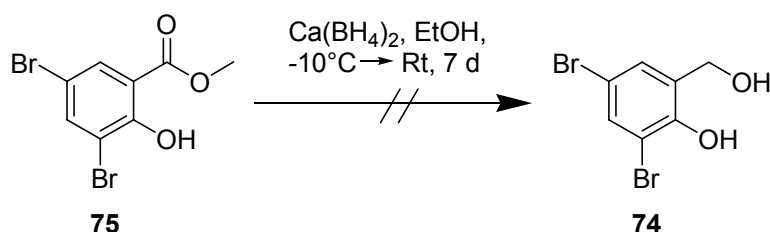


Abb. 37 Versuch der Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol **74** durch Reduktion von 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75** mit Calciumborhydrid

Die bromierten Salicylalkohole **70,73,74** wurden in Analogie zu den Arbeiten von Choudhury et al.^[106] mit 2,2-Dimethoxypropan und einer katalytischen Menge *para*-Toluolsulfonsäure in Aceton im Sinne einer Umacetalisierung zu den Salicylalkoholisopropylidenacetale **65-67** umgesetzt. Hinreichend trockene Bedingungen wurden durch die Zugabe von Natriumsulfat gewährleistet (Abb. 38).

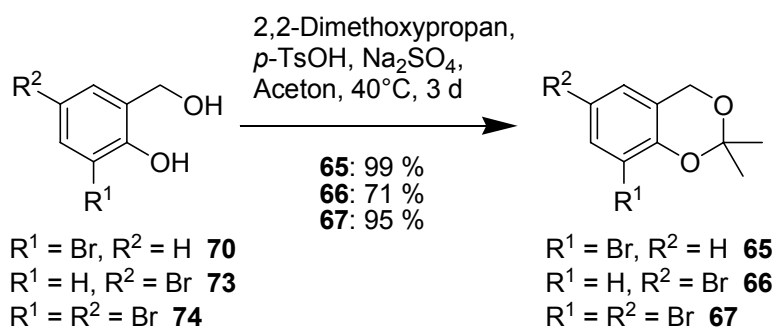


Abb. 38 Synthese der Salicylalkoholisopropylidenacetale **65-67**

Da sich nicht umgesetzter Salicylalkohol durch das Waschen der organischen Phase mit Natronlauge leicht entfernen ließ, wurden die Produkte **65-67** ohne größere Verunreinigungen erhalten, und eine einfache Kieselgelfiltration reichte zur abschließenden Reinigung aus. In Abweichung von der Original-Vorschrift wurde für die Darstellung von **65** und **67** die Verwendung von 5.0 Äquiv. 2,2-Dimethoxypropan anstelle von 1.1 Äquiv. erprobt. Dies führte zu einer Steigerung der Ausbeuten von durchschnittlich etwa 70 % auf deutlich über 90 %. Für die Synthese von **66** wurden

die ursprünglich vorgesehenen 1.1 Äquiv. 2,2-Dimethoxypropan eingesetzt, was eine Ausbeute von lediglich 71 % zur Folge hatte.

4.3.3 Versuche zur Entschützung Isopropyliden-geschützter Salicylalkohol-Derivate

Da eine Verwendung der Acetale **65-67** als synthetische Vorläufer für Salicylalkohol-Derivate nur möglich ist, wenn auch effiziente Methoden zur Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe existieren, sollte die saure Entfernung dieser Schutzgruppe an 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66** als Modellsubstanz erprobt werden (Abb. 39).

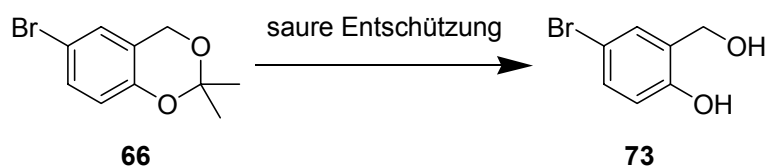


Abb. 39 Modellreaktion zur Entschützung von Salicylalkoholisopropylidenacetalen

Für die saure Abspaltung der Schutzgruppe galten die folgenden Überlegungen: Obwohl in der Literatur durchaus auch drastische Methoden zur Spaltung von Salicylalkoholisopropylidenacetalen beschrieben sind (beispielsweise verwendeten Caira et al. 50 %-ige wäßrige Essigsäure bei 50°C für 6 Stunden^[110]), sollte angesichts der Säurelabilität vieler Salicylalkohol-Derivate eine milde Methode, also möglichst eine Reaktion bei Raumtemperatur und ohne zu hohe Säurekonzentrationen, bevorzugt werden. Sehr schonend wäre es wohl, eine flüchtige Säure zu verwenden, da diese nach Reaktionsende durch Evaporation entfernt werden kann. Es wurde daher Trifluoressigsäure (TFA) gewählt. In Vorversuchen war zunächst eine Menge von 2.5 Äquiv. TFA gewählt worden, wobei eine weitere Erhöhung der TFA-Menge laut dünnschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung keinen positiven Effekt auf den Reaktionsfortschritt zu haben schien. Auch die Verwendung einer an die feste Phase gebundenen Säure erschien attraktiv, da die Säure sich auf diese Weise nach beendeter Reaktion durch Filtration leicht entfernen lassen sollte. Bereits Katz und Cram haben die Entschützung von Salicylalkoholisopropylidenacetalen mit saurem Ionentauscher (Dowex 50) beschrieben^[107], so daß auch diese Methode erprobt werden sollte. Auch könnte die Entfernung des bei der Reaktion

entstehenden Acetons aus dem Reaktionsgemisch von Vorteil sein. Da ein Abdestillieren des Acetons höhere Temperaturen erfordern würde, wurde stattdessen versucht, das Aceton als 2,4-Dinitrophenylhydrazon abzufangen, weshalb in einigen Versuchen dem Reaktionsgemisch 2,4-Dinitrophenylhydrazin zugesetzt wurde. Auch das Lösungsmittel wurde variiert, indem nicht nur aprotische (reines Dichlormethan), sondern auch protische Bedingungen (Dichlormethan/Methanol-Gemisch) erprobt wurden. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Nr.	Säure	Lösungsmittel	2,4-Dinitrophenylhydrazin	Ausbeute
1	TFA	DCM	-----	15 %
2	TFA	DCM	3.2 Äquiv.	(verunr.) ^a
3	TFA	DCM/MeOH 1 : 1	-----	89 %
4	TFA	DCM/MeOH 1 : 1	3.1 Äquiv.	(verunr.) ^a
5	TFA	DCM/MeOH 1 : 1	1.0 Äquiv.	(verunr.) ^a
6	Dowex 50 X 8	DCM/MeOH 1 : 1	-----	69 %

^aProdukt noch mit geringen Mengen 2,4-Dinitrophenylhydrazin verunreinigt

Tab. 2 Durchgeführte Versuche zur sauren Entschützung von **66** (Modellreaktionen)

Ein Vergleich zwischen den Versuchen 1 und 3 mit ihren sehr unterschiedlichen Ausbeuten zeigt klar, daß für eine Entschützung in guten Ausbeuten ein protisches Cosolvens notwendig ist. Aus den Versuchen 2 und 4 geht hervor, daß eine Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin im Überschuß stets dazu führte, daß im Produkt noch geringe Mengen dieses Reagenzes zu finden waren, die sich chromatographisch kaum abtrennen ließen. Auch eine Verringerung der Hydrazin-Menge auf nur 1.0 Äquiv. (Versuch 5) änderte an diesem Befund nichts, so daß geschlossen werden kann, daß der Zusatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin bei der Entschützung nicht empfehlenswert ist. Der Versuch 6 unter Verwendung von Dowex 50 X 8 als saurem Ionentauscher führte zu einer befriedigenden Ausbeute von 69 %. Die Entschützung mit saurem Ionentauscher stellt somit eine potentielle Alternative zur Entschützung mit TFA dar, wenn auch deren Ausbeute in Versuch 3 (89 %) nicht erreicht werden konnte.

4.3.4 Synthese der Silyl-geschützten Salicylalkohol-Derivate 68,69

Die Bis-O-Silyl-geschützten 5-Bromsalicylalkohole **68,69** wurden durch zweifache Silylierung von 5-Bromsalicylalkohol **73** mit einem Überschuß des jeweiligen Silylchlorids unter Aktivierung durch Imidazol in Pyridin als Lösungsmittel erhalten (Abb. 40).

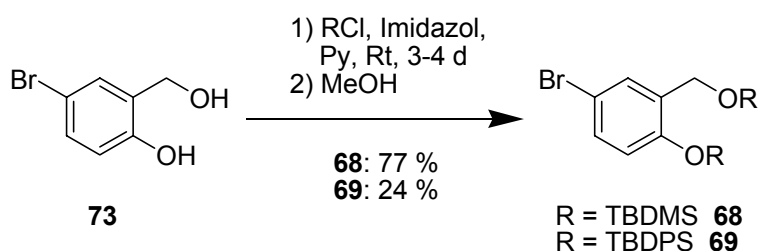


Abb. 40 Synthese der Silyl-geschützten Salicylalkohol-Derivate **68,69**

Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von Methanol abgebrochen, so daß der entsprechende Silylmethylether als Nebenprodukt anfiel. Während sich der TBDMS-Methylether im Falle der Synthese von **68** chromatographisch noch recht gut abtrennen ließ und somit mit 77 % eine gute Ausbeute erzielt werden konnte, fiel dies für den TBDPS-Methylether bei der Synthese von **69** außerordentlich schwer, da der TBDPS-Methylether und das Produkt **69** beinahe identisch eluiert wurden. Es konnte daher nur ein kleiner Teil von **69** isoliert werden, während ein Großteil der Substanz in der Mischfraktion verblieb. Dies erklärt auch die mäßige Ausbeute von nur 24 %.

Die geschützten Salicylalkohol-Derivate **68,69** wurden im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht weiter verwendet, stehen für zukünftige Anwendungen des hier dargelegten Synthesekonzeptes aber nunmehr zur Verfügung. Auch wurde die Abspaltung der Silyl-Schutzgruppen noch nicht untersucht, sie sollte aber prinzipiell mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF), Ammoniumfluorid oder Triethylamintrihydrofluorid möglich sein.

4.3.5 Synthese der Saligenylchlorphosphite 76-78

Obwohl dies nicht unmittelbar mit der Einführung des neuen Synthesekonzeptes für Salicylalkohol-Derivate zusammenhing, bot es sich an, aus den neu synthetisierten Salicylalkohol-Derivaten **70,73,74** entsprechende *cycloSal*-Nucleotide herzustellen. Dies erforderte zunächst die Synthese der cyclischen Saligenylchlorphosphite **76-78**.

Die Synthese der Chlorphosphite erfolgte nach dem etablierten Verfahren, nach dem zu einer Lösung des jeweiligen Salicylalkohol-Derivates in Diethylether bei tiefer Temperatur (-20°C) Phosphor(III)-chlorid gegeben und anschließend Pyridin als Base zum Abfangen des entstehenden Chlorwasserstoffs zugetropft wird, wobei Pyridiniumchlorid ausfällt. Durch die tiefe Temperatur und eine ausreichende Verdünnung wird die intramolekulare Ringschluß-Reaktion gewährleistet. Die resultierenden Chlorphosphite, die nach Filtration und Evaporation erhalten werden können, sind generell außerordentlich feuchtigkeitsempfindlich. Sie werden daher in der Regel nicht weiter gereinigt, sondern in Rohform direkt für die Synthesen der entsprechenden *cycloSal*-Nucleotide eingesetzt. Nach diesem Prinzip konnten auch die Verbindungen **76-78** erhalten werden (Abb. 41).

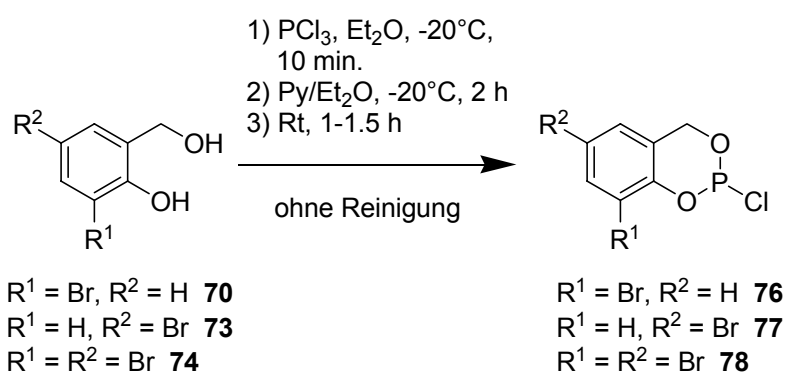


Abb. 41 Synthese der Saligenylchlorphosphite **76-78**

4.3.6 Synthese und Charakterisierung der *cycloSal*-Nucleotide **79-81** und **82-84**

Aus den cyclischen Saligenylchlorphosphiten **76-78** ließen sich nach den etablierten Verfahren *cycloSal*-Nucleotide darstellen. Zunächst wurden die entsprechenden bromierten *cycloSal*-d4T-Monophosphate (*cycloSal*-d4TMPs) **79-81** synthetisiert. Hierzu wurde das Nucleosid-Analogon d4T **4** in Acetonitril mit dem jeweiligen Saligenylchlorphosphit (2.0 Äquiv. bei hypothetischer Reinheit) in Gegenwart der „Hünig-Base“ Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Reaktion gebracht. Nach erfolgter Umsetzung zur Phosphor(III)-Verbindung wurde in einer Eintopf-Reaktion mit *tert*-Butylhydroperoxid zur Phosphor(V)-Verbindung oxidiert. Die gewünschten Pronucleotide konnten nach entsprechender chromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 35 % (3-Brom), 29 % (5-Brom) und 40 % (3,5-Dibrom) erhalten werden (Abb. 42, S. 40).

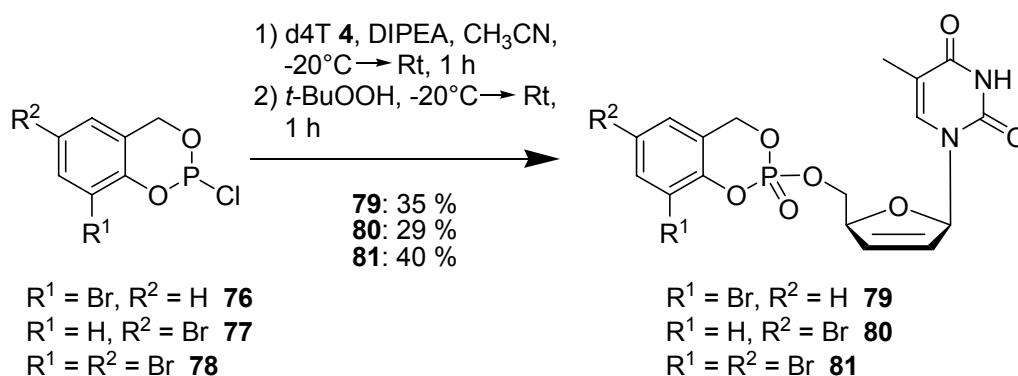


Abb. 42 Synthese der *cycloSal*-d4T-Monophosphate **79-81**

Für die Synthese der entsprechenden *cycloSal*-BVDU-Monophosphate (*cycloSal*-BVDUMPs) **82-84** mußte diese Synthesemethodik, wie bereits aus Vorarbeiten bekannt, verändert werden^[76,88]. Zunächst einmal mußte wegen der mäßigen Löslichkeit des Nucleosid-Analogons BVDU **15** in Acetonitril auf ein DMF/THF-Gemisch als Solvens zurückgegriffen werden. Da BVDU **15** im Gegensatz zu d4T **4** eine zweite freie Hydroxyfunktion besitzt, wurde außerdem die Menge des eingesetzten Chlorphosphits verringert (1.5 Äquiv. bei hypothetischer Reinheit), um so eine doppelte Phosphitylierung des Nucleosid-Analogons möglichst zu unterbinden. Dafür wurde auch eine unvollständige Umsetzung des Nucleosid-Analogons in Kauf genommen. Auf diese Weise konnten die Verbindungen **82-84** ohne Anwendung von Schutzgruppen direkt aus BVDU **15** in Ausbeuten von 42 % (3-Brom), 21 % (5-Brom) und 14 % (3,5-Dibrom) dargestellt werden (Abb. 43).

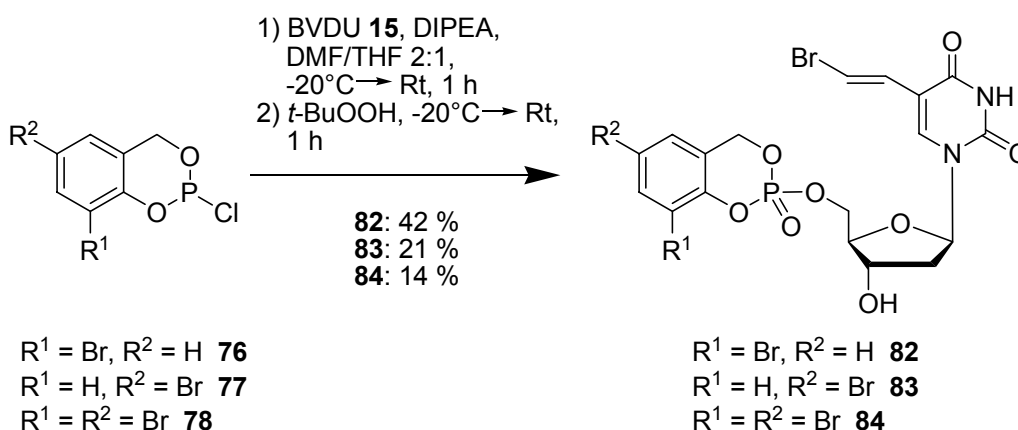


Abb. 43 Synthese der *cycloSal*-BVDU-Monophosphate **82-84**

Die neu synthetisierten *cycloSal*-Nucleotide wurden nach einem ebenfalls etablierten Verfahren chemischen Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer bei pH 7.3 und 37°C

unterzogen. Hierzu wurden 50 mM DMSO-Stammlösungen der Pronucleotide angesetzt und ein Teil dieser Stammlösungen mit DMSO/Wasser-Gemischen verdünnt. Die so erhaltenen Lösungen wurden mit einer Lösung des internen Standards AZT **1** versetzt und die Hydrolyse der Prodrugs schließlich durch die Zugabe des 50 mM Phosphatpuffers gestartet. Die finale Konzentration der *cycloSal*-Nucleotide betrug 0.94 mM, die der Puffersalze 24.8 mM. Die Kinetik-Lösungen wurden bei 37°C inkubiert, und es wurden ihnen zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, welche auf konzentrierte Essigsäure pipettiert wurden, um so die Hydrolyse zu stoppen. Anschließend wurden die einzelnen Proben HPLC-analytisch untersucht und für jede Probe das Verhältnis aus der Peakfläche des Phosphat-riesters zu der des internen Standards gebildet (normierte Integrationseinheiten; normierte IE). Diese Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Da die Konzentration des Wassers bzw. die der Hydroxid-Anionen als Reaktionspartner bei der Hydrolyse des Pronucleotids als konstant angesehen werden können, liegt eine Reaktion pseudo-erster Ordnung vor, die nach dem Geschwindigkeitsgesetz für Reaktionen erster Ordnung kinetisch ausgewertet werden kann. Es wurden daher exponentielle Ausgleichskurven durch die experimentellen Meßpunkte gelegt, aus denen sich gemäß der Formel

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ ermitteln ließen. Für jede Substanz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, deren Ergebnisse abschließend gemittelt wurden. Die Abbildung 44 (S. 42) zeigt exemplarisch die erhaltenen Kurven für 3-Brom-*cycloSal*-d4TMP **79**.

In der Abbildung 45 (S. 42) sind die gemittelten Hydrolyse-Halbwertszeiten für die 3-Brom- und 5-Brom-substituierten *cycloSal*-Nucleotide **79,80** bzw. **82,83** sowie die Daten für das am Aromaten unsubstituierte *cycloSal*-d4TMP **85**, 5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP **86**, das unsubstituierte *cycloSal*-BVDUMP **87** und 5-Chlor-*cycloSal*-BVDUMP **88** als bereits bekannte Referenzverbindungen angegeben. Die 3,5-Dibrom-substituierten Pronucleotide **81,84** waren so hydrolyselabil, daß bereits die Nullprobe der Hydrolyselösungen, die Probe also, die unmittelbar nach Ansetzen der Lösungen genommen wurde, kein Pronucleotid mehr enthielt. Für diese Verbindungen ließ sich daher keine exakte Hydrolyse-Halbwertszeit ermitteln.

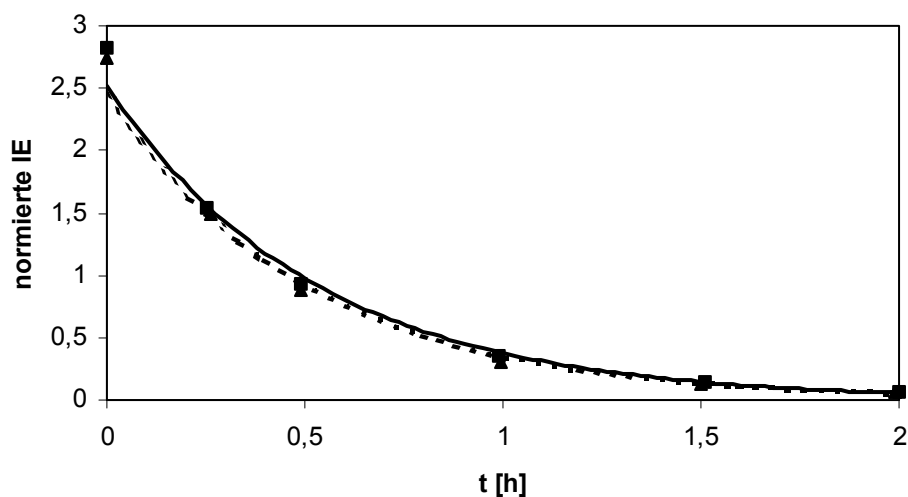


Abb. 44 Chemische Hydrolyse von 3-Brom-*cycloSal*-d4TMP **79** in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C (Doppelbestimmung)

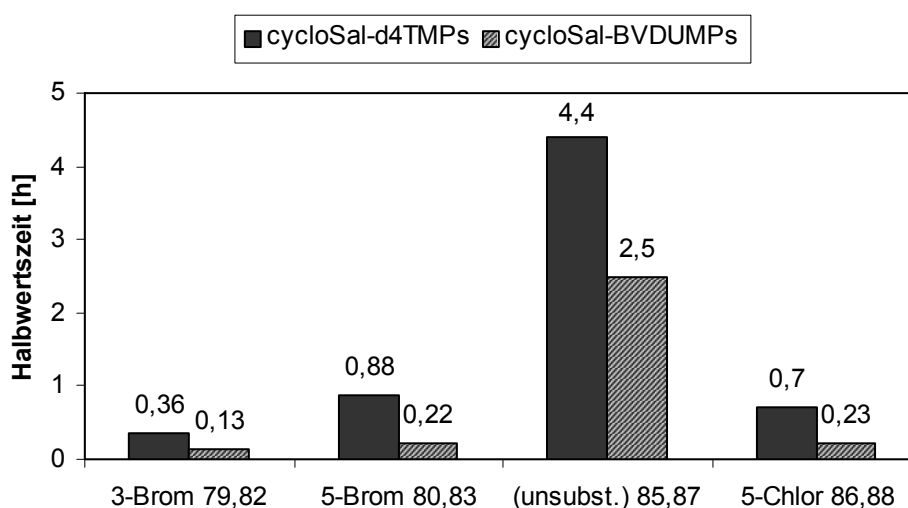


Abb. 45 Hydrolyse-Halbwertszeiten der bromierten *cycloSal*-Nucleotide **79,80** und **82,83** sowie der Referenzverbindungen **85-88** in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Der Abbildung 45 lässt sich eindeutig entnehmen, daß die bromierten Verbindungen **79,82** und **80,83** deutlich labiler waren als die am Aromaten unsubstituierten Prototypen **85,87**. Dies läßt sich natürlich auf eine Stabilisierung des bei der Hydrolyse primär gebildeten Phenolat-Anions durch die elektronenziehenden Brom-Substituenten zurückführen (vergl. Kapitel 2.2) und entspricht den Erwartungen. Die 5-Brom-substituierten Derivate **80,83** wiesen dabei Halbwertszeiten auf, die mit denen der entsprechenden Chlor-substituierten Verbindungen **86,88** praktisch identisch waren. Ferner fällt auf, daß die in der 3-Position bromierten Pronucleotide **79,82** labiler waren als ihre in 5-Position substituierten Regioisomere **80,83**.

Offensichtlich wirken sich also Substituenteneffekte in der 3-Position der *cycloSal*-Maske stärker auf das Hydrolyseverhalten der Phosphatriester aus als in der 5-Position. Aus den Vorarbeiten über *cycloSal*-BVDUMPs^[76,88] war bereits bekannt, daß diese Prodrugs generell schneller hydrolysiert werden als entsprechend am Aromaten substituierte *cycloSal*-d4TMPs, was auch hier wieder bestätigt werden konnte. Dieses Phänomen läßt sich durch die Anwesenheit der 3'-Hydroxygruppe im Glycon des Nucleosyl-Restes der *cycloSal*-BVDUMPs erklären. Diese könnte entweder durch ihre Polarität oder sogar durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen assistierenden Effekt bei der Hydrolyse der *cycloSal*-BVDUMPs ausüben, indem sie den Angriff des nucleophilen Hydroxid-Anions an die ihr benachbarte Phosphat-Einheit erleichtert.

Da die Ausbeuten bei der Synthese der bromierten *cycloSal*-Nucleotide **79-81** und **82-84** relativ deutlich schwankten und sich diese Phosphatriester als ziemlich bis sehr labil erwiesen, liegt die Vermutung nahe, daß ein Zusammenhang zwischen der Stabilität dieser Verbindungen (ausgedrückt durch ihre Hydrolyse-Halbwertszeit) und der Ausbeute bei ihrer Darstellung besteht. In der Abbildung 46 sind daher die Hydrolyse-Halbwertszeiten der Pronucleotide und die bei ihrer Synthese erzielten Ausbeuten vergleichend aufgetragen, wobei für die sehr labilen 3,5-Dibrom-*cycloSal*-NMPs **81,84** die Halbwertszeit „null Stunden“ gesetzt wurde.

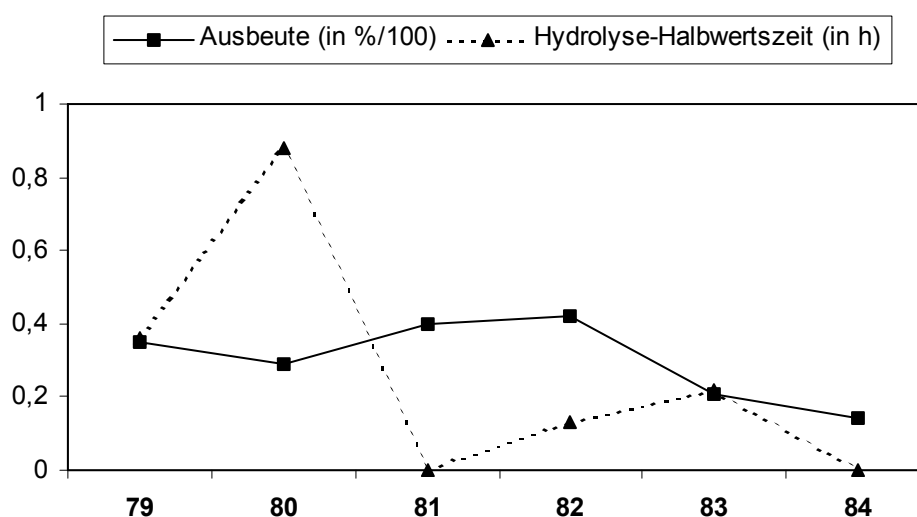


Abb. 46 Vergleich von chemischen Ausbeuten und Hydrolyse-Halbwertszeiten für die Verbindungen **79-84**

Aus der Auftragung in Abbildung 46 geht eindeutig hervor, daß ein genereller Zusammenhang zwischen chemischer Ausbeute und Stabilität der *cycloSal*-

Nucleotide **79-84** nicht besteht. So wurde beispielsweise für die sehr labile Verbindung **81** die in der Reihe der *cycloSal*-d4TMPs **79-81** höchste Ausbeute erzielt (40 %), während der stabilste dieser drei Phosphattriester (Verbindung **80**) mit der geringsten Ausbeute anfiel (29 %). Auch bei den *cycloSal*-BVDUMPs **82-84** fiel die labilere Verbindung **82** in höherer Ausbeute als **83** an (42 % gegenüber 21 %). Einzig die sehr geringe Ausbeute von 14 % für **84** könnte auf die hohe Labilität dieser Substanz zurückgeführt werden. Generell fällt jedoch auf, daß die mittleren Ausbeuten geringer sind als für andere *cycloSal*-Derivate dieser Nucleosid-Analoga üblich. So können für *cycloSal*-d4TMPs häufig Ausbeuten von 40-60 % erzielt werden, für *cycloSal*-BVDUMPs ergeben sich aufgrund der Gegenwart der freien 3'-Hydroxylgruppe meist etwas geringere Ausbeuten von etwa 30-40 %. Insgesamt erscheint es plausibler, einen Zusammenhang zwischen der Ausbeute und der Qualität beispielsweise des jeweils eingesetzten Saligenylchlorphosphits zu vermuten. So wurden für die 3-Brom-substituierten Derivate **79,82** bei beiden Synthesen recht gute Ausbeuten erzielt, während sich für beide Darstellungen der 5-Brom-substituierten Phosphattriester **80,83** mäßige Ausbeuten ergaben.

Die *cycloSal*-d4TMPs **79,80** wurden in Kooperation mit Prof. Dr. J. Balzarini, Universität Leuven, Belgien, antiviralen *in vitro*-Tests gegen HIV-1 und HIV-2 unterzogen. Die Verbindung **81** erschien für diese Untersuchungen zu labil. Die anti-HIV-Aktivitäten der Pronucleotide **79,80** sind in der Tabelle 3 wiedergegeben, wobei d4T **4** als Referenz ebenfalls getestet wurde.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [µM]		CC ₅₀ ^b [µM]	
	<u>CEM/0</u> HIV-1	HIV-2	<u>CEM/TK</u> HIV-2	<u>CEM/0</u>
3-Brom 79	0.24 ± 0.01	0.33 ± 0.11	14.0 ± 5.7	27.4 ± 6.8
5-Brom 80	0.14 ± 0.02	0.26 ± 0.01	15.0 ± 7.1	64.2 ± 1.6
d4T 4	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02	15.0 ± 7.1	55.8 ± 24.2

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 3 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **79,80** und von d4T **4**

Die antiviralen Aktivitäten von **79** und **80** waren also in Wiltyp-CEM-Zellen (CEM/0) sowohl gegen HIV-1 als auch gegen HIV-2 mit denen von d4T **4** vergleichbar. In

Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen (CEM/TK⁻) verliert d4T **4** naturgemäß deutlich an Aktivität, da in diesen Zellen das Enzym für die Phosphorylierung von d4T **4** zu d4TMP fehlt. Der gleiche Verlust an Aktivität war auch für **79** und **80** festzustellen, was darauf schließen läßt, daß diese Verbindungen nicht effizient intrazellulär d4TMP geliefert haben, also nicht effektiv den TK-Bypass vollzogen. Sie waren einfach zu labil und hydrolysierten wahrscheinlich schon vor der Diffusion in die Zellen im Kulturmedium zu d4TMP und dem jeweiligen Salicylalkohol-Derivat. Daß trotzdem Aktivität bei den Tests an CEM/0-Zellen gefunden wurde, läßt sich dadurch begründen, daß d4TMP im Kulturmedium durch unspezifische Phosphatasen zu d4T **4** dephosphoryliert wurde, so daß die Aktivität in den Wildtyp-Zellen auf d4T **4** zurückzuführen ist. Die Cytotoxizitäten der Verbindungen unterschieden sich im Rahmen der Meßfehler nicht signifikant, wenn es auch scheint, als wäre die Verbindung **79** etwas cytotoxischer als **80** und auch **4**.

Die entsprechenden *cycloSal*-BVDUMPs **82,83** werden gegenwärtig von Prof. Dr. P. Wutzler und Dr. A. Meerbach, Universität Jena, auf ihre *in vitro*-Aktivität gegen verschiedene Herpes-Viren getestet. Hierzu liegen jedoch noch keine Ergebnisse vor, wenn auch aufgrund der hohen Hydrolyse-Labilität der Verbindungen keine guten Daten zu erwarten sind.

Obwohl die Pronucleotide **79-81** und **82-84** für antivirale Anwendungen offensichtlich nicht geeignet sind, stellen sie gerade aufgrund ihrer Labilität dennoch potentiell nützliche Synthesebausteine dar, wenn elektrophile Phosphat-Donatoren benötigt werden wie beispielsweise bei der Synthese von Nucleosid-Monophosphaten (vergl. Kapitel **2.2**). Die bromierten *cycloSal*-BVDUMPs **82-84** könnten als synthetische Vorläufer bei der Darstellung von BVDU-Diphosphat (BVDUDP) durch nucleophilen Angriff eines Phosphat-Anions auf die Phosphat-Einheit von **82-84** unter Abspaltung der *cycloSal*-Maske dienen (Abb. 47, S. 46). Die Synthese von BVDUDP ist interessant, da BVDUDP in vielen Fällen noch nicht als intermediärer Metabolit des Wirkstoffes BVDU **15** nachgewiesen wurde und somit ein Interesse an einer effizienten Darstellung dieser Verbindung besteht, um eine authentische Referenz für die Analytik zu erhalten.

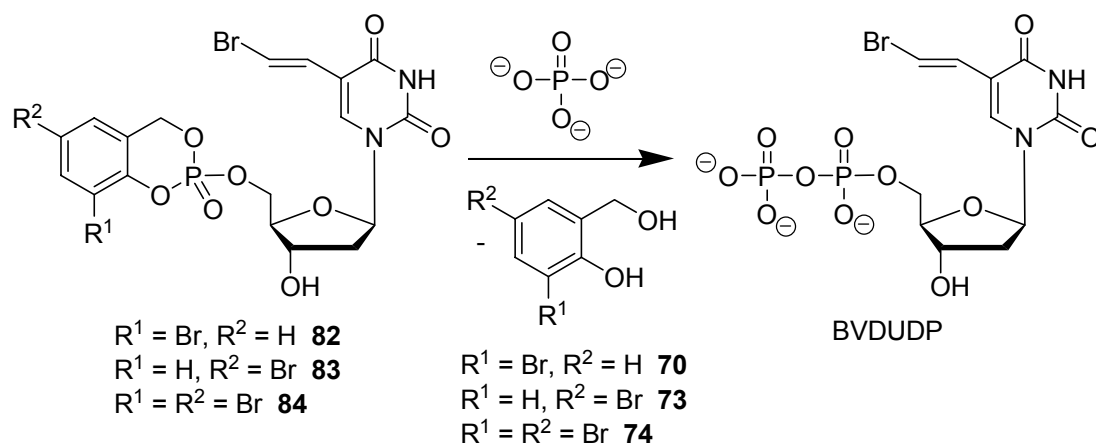


Abb. 47 Mögliche Verwendung der *cycloSal*-BVDUMPs **82-84** zur Synthese von BVDUDP

4.4 Bis-(*cycloSal*-Nucleotide)

4.4.1 Erläuterung des Konzeptes

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten^[88,111] wurden die Verbindungen 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **89** und 5-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **90** synthetisiert und charakterisiert (Abb. 48).

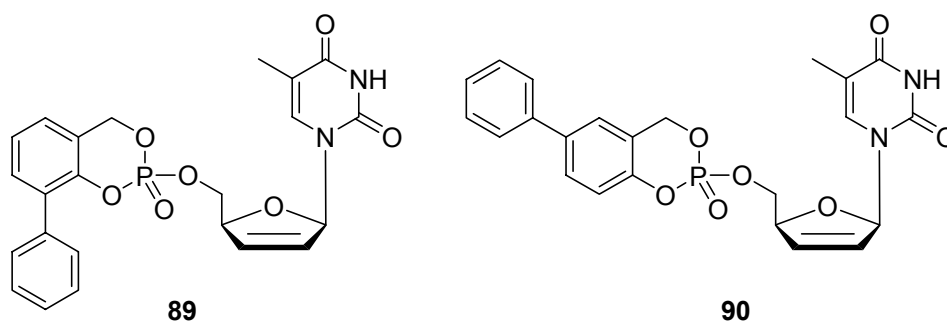


Abb. 48 Die Verbindungen 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **89** und 5-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **90**

Die Hydrolyse-Halbwertszeit von **89** betrug 5.1 h und war damit etwas höher als die der unsubstituierten Referenzverbindung *cycloSal*-d4TMP **85** (4.4 h), während **90** mit einer Halbwertszeit von 3.1 h labiler als **85** war. Als Resultat wies **89** einen vollen Erhalt der anti-HIV-2-Aktivität in TK-defizienten CEM-Zellen auf und vollzog somit den TK-Bypass, während **90** in diesen Experimenten gegenüber den Tests in Wildtyp-Zellen an Aktivität verlor. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde erwogen, den am Aromaten der *cycloSal*-Maske befindlichen zusätzlichen Phenyl-Ring in **89** mit

einer weiteren *cycloSal*-Einheit zu versehen, um so zu dimeren Strukturen zu gelangen (Abb. 49).

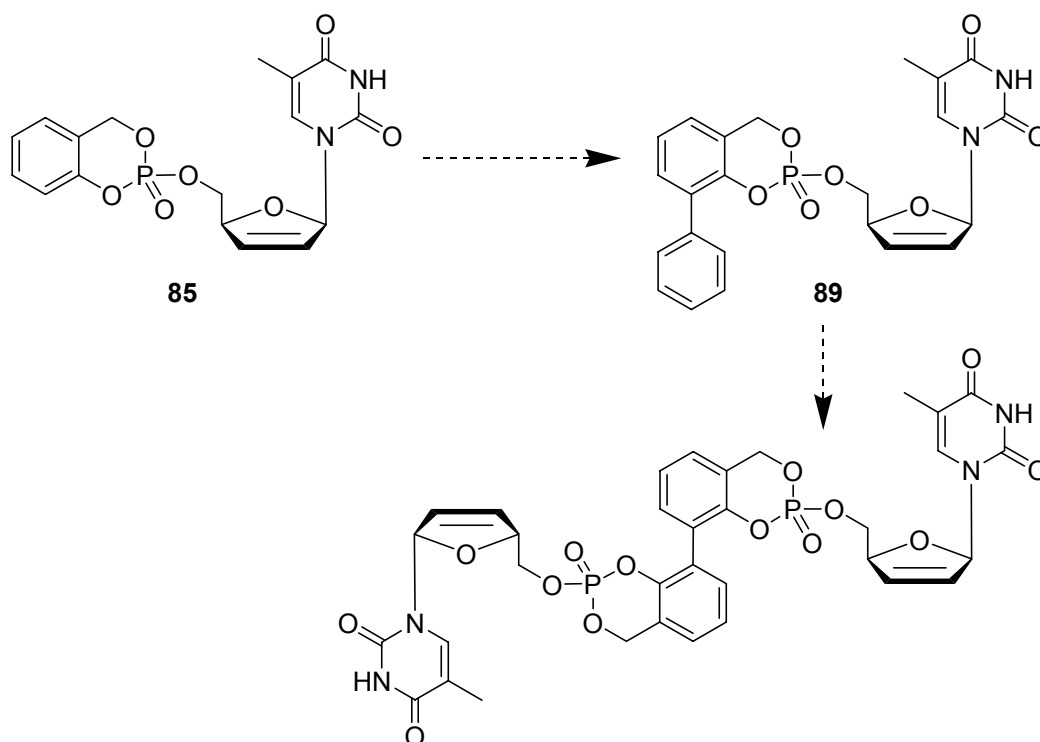


Abb. 49 Vom unsubstituierten *cycloSal*-d4TMP **85** zum Bis-(*cycloSal*-d4TMP)

Die auf diese Weise formal erhaltenen dimeren Strukturen sollen fortan als Bis-(*cycloSal*-Nucleotide), im spezifischen Fall als Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) bezeichnet werden. Mit der Benennung als Bis-(*cycloSal*-Nucleotide) soll dabei implizit gemeint sein, daß eine formale Verknüpfung von zwei *cycloSal*-Nucleotiden über die jeweilige 3-Position der *cycloSal*-Maske vorliegt, da der Sinn einer Verknüpfung von zwei *cycloSal*-Nucleotiden über die 5-Position aufgrund der für **90** erhaltenen Daten hinsichtlich der Hydrolyse-Stabilität bezweifelt werden muß. Das besondere an den Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden) ist das aus ihrer dimeren Struktur resultierende Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1 : 2, das eine weitere Verbesserung des für die bisherigen *cycloSal*-Nucleotide geltende Maske-Wirkstoff-Verhältnisses von 1 : 1 sowie ein absolutes Novum in der Pronucleotid-Chemie darstellt. Da es sich um eine vollkommen neue konzeptionelle Erweiterung des *cycloSal*-Ansatzes handelte, sollte diese zunächst nur auf das Nucleosid-Analogon d4T **4** angewendet werden, so daß es im Folgenden im Zusammenhang mit Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden) ausschließlich um Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) gehen wird. Es sollten die Verbindungen Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** und Bis-(5-methyl-*cycloSal*-d4TMP) **47** synthetisiert werden, wobei die

zusätzliche Methylgruppe in der 5-Position jeder *cycloSal*-Einheit von **47** potentiell positive Auswirkungen auf die Hydrolyse-Stabilität dieser Verbindung haben sollte (Abb. 50).

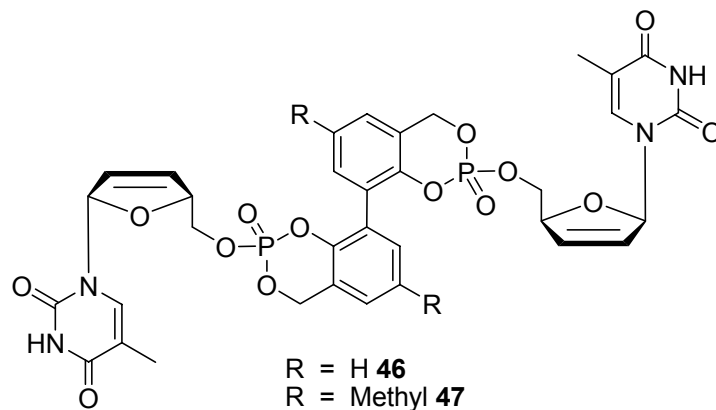


Abb. 50 Die Zielverbindungen **46,47**

Die theoretisch möglichen Hydrolysewege eines Bis-(*cycloSal*-Nucleotids) sind am Beispiel von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** in der Abbildung 51 illustriert.

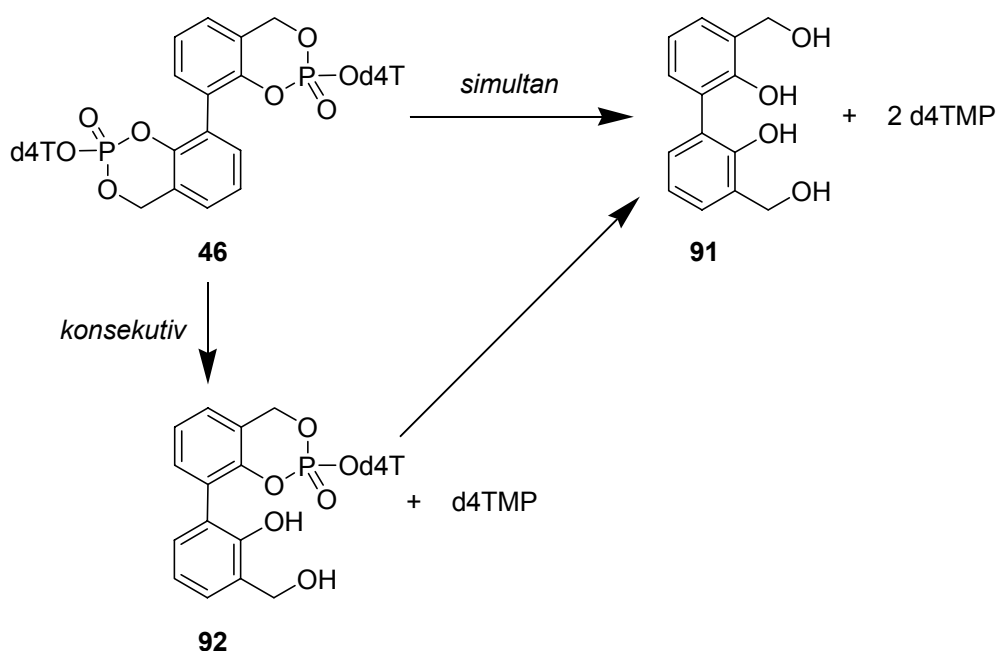


Abb. 51 Mögliche Hydrolysewege von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46**

Es ist also denkbar, daß **46** entweder simultan und damit direkt zum Alkohol **91** sowie zwei Äquivalenten d4TMP oder konsekutiv und damit zunächst zum Intermediat **92** und einem Äquivalent d4TMP hydrolysiert wird, bevor es dann ebenfalls zur Bildung von **91** und dem zweiten Äquivalent d4TMP aus **92** kommen

sollte. Um diese möglichen Hydrolysewege zu untersuchen, aber auch, um die Eigenschaften des potentiellen Hydrolyse-Intermediates **92** bestimmen zu können, sollte **92** ebenfalls synthetisiert werden (Abb. 52). Diese Verbindung soll nachfolgend als 3-(Saligen-3'-yl)-*cyclo*Sal-d4T-monophosphat (3-Sal-*cyclo*Sal-d4TMP) bezeichnet werden.

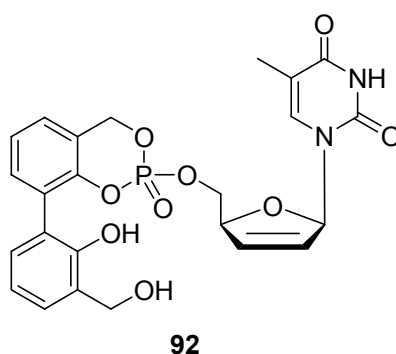


Abb. 52 Die Zielverbindung **92**

4.4.2 Synthesestrategien

Für die Darstellung von **46** und **47** bot es sich an, das bereits in Kapitel 4.2 vorgestellte Retrosyntheseschema für einfache *cyclo*Sal-Nucleotide auf die Synthese der Bis-(*cyclo*Sal-d4TMPs) zu übertragen (Abb. 53).

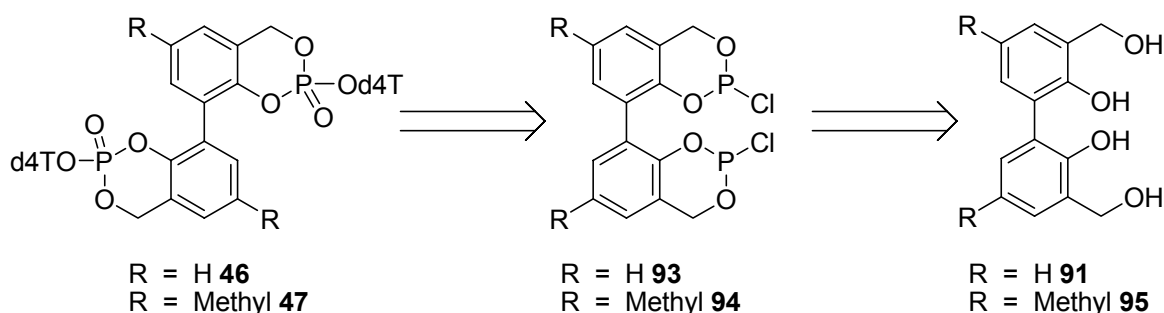


Abb. 53 Retrosyntheseschema zur Darstellung der Bis-(*cyclo*Sal-Nucleotide) **46,47**

Die Zielverbindungen **46,47** sollten also aus den Bis-(saligenylchlorphosphiten) **93,94** dargestellt werden, welche prinzipiell aus den Salicylalkohol-Derivaten 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91** bzw. 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-5,5'-dimethylbiphenyl-2,2'-diol **95** zugänglich sein sollten. Die wesentlichen Fragen waren dabei, ob eine Überführung von **91,95** in **93,94** unter den etablierten Standardbedingungen mit Phosphor(III)-chlorid und Pyridin als Base wirklich möglich ist und ob die

Umsetzung von **93,94** zu **46,47** in befriedigenden Ausbeuten erfolgen kann. Die erste synthetische Herausforderung bestand jedoch auch hier in der Darstellung der Salicylalkohol-Derivate **91,95**.

Für die Synthese der Referenzverbindung **92** erschien es sinnvoll, eine sauer spaltbare Schutzgruppe für die Hydroxylgruppen zu wählen, da die *cycloSal*-Modifikation eine signifikante Säurestabilität, aber Basenlabilität aufweist. Da die Isopropyliden-Schutzgruppe als Schutzgruppe für Salicylalkohol-Derivate bereits eingehend untersucht war (vergl. Kapitel **4.3**), lag ihre Verwendung in diesem Zusammenhang nahe. Die Verbindung 3-(Saligen-3'-yl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3-Sal-*cycloSal*-d4TMP) **92** sollte also durch Schutzgruppenabspaltung aus dem Vorläufer 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3-(Isopr-Sal)-*cycloSal*-d4TMP) **96** erhalten werden. Für die Darstellung von **96** bot sich wiederum die Anwendung des etablierten Syntheschemas an (vergl. Kapitel **4.2**), so daß **96** aus 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-saligenylchlorphosphit **97** und dieses schließlich aus dem Salicylalkohol-Derivat 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98** zugänglich sein sollte (Abb. 54).

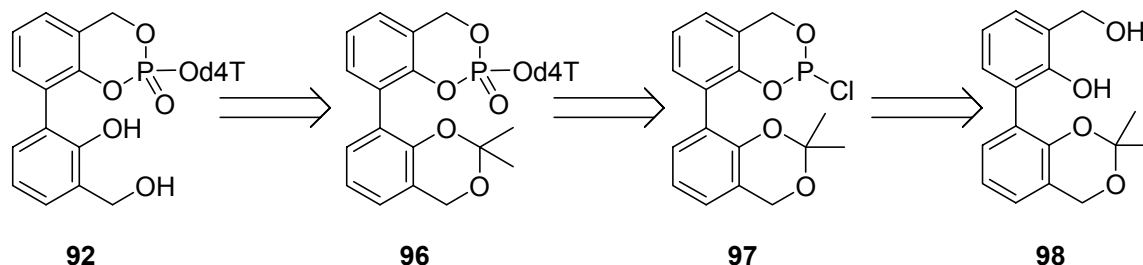


Abb. 54 Retrosyntheschema zur Darstellung der Referenzverbindung **92**

Auch hier bestand die synthetische Herausforderung somit zunächst in der Darstellung von **98**, wobei zunächst nicht sicher war, ob die Überführung von **98** in **97** unter Standardbedingungen problemlos verlaufen würde, da bei der Chlorphosphit-Synthese intermediär Chlorwasserstoff entsteht und **98** bzw. **97** eine säurelabile Schutzgruppe besaßen.

An dieser Stelle soll eine erneute Bemerkung zur Nomenklatur gemacht werden. Die von den IUPAC-Regeln abweichende Nomenklatur und Atombezeichnung der Salicylalkohol-Derivate war ja bereits eingeführt worden (vergl. Kapitel **4.2**). Die Tatsache, daß es bei den hier behandelten Salicylalkohol-Derivaten **91,95,98** um Biaryle handelt, könnte jedoch für Verwirrung sorgen. Diese Verbindungen sollen

daher nach der für Biphenyl-Derivate gängigen Nomenklatur, also als Derivate des 1,1'-Biphenyls bzw. des Biphenyl-2,2'-diols, benannt werden, wobei die 1- bzw. 1'-Position die Kohlenstoffatome der Aryl-Aryl-Bindungsachse bezeichnet. Dies führt zu einer Bezifferung der Atome, die von der zuvor getroffenen Festlegung für Salicylalkohol-Derivate abweicht.

4.4.3 Synthese des Salicylalkohol-Derivates 91

Da die Synthese des Aldehyds **99** ausgehend von kommerziell verfügbarem Biphenyl-2,2'-diol bekannt war^[112], lag es nahe, den Alkohol **91** durch Reduktion von **99** darzustellen (Abb. 55).

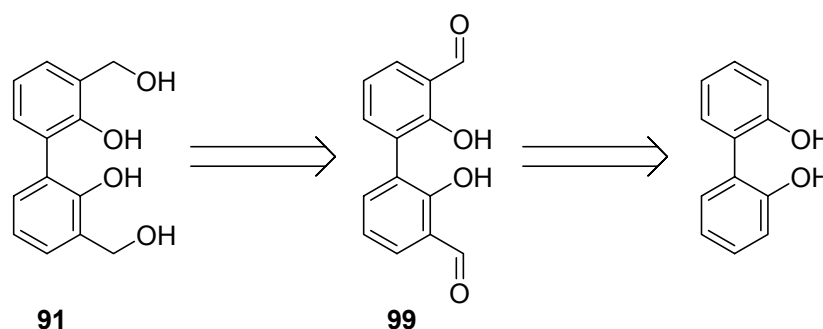


Abb. 55 Retrosyntheschema zur Darstellung von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**

In der Abbildung 56 (S. 52) ist die vollständige auf diesem Weg erfolgte Synthese von **91** dargestellt. Zunächst wurde Biphenyl-2,2'-diol unter Verwendung von MOM-Chlorid **51** (vergl. Kapitel 4.1.1) und Natriumhydrid als Base zweifach Methoxymethyl-(MOM)-geschützt. Das so erhaltene Bis-O-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **100** wurde anschließend zweifach in *ortho*-Position lithiiert, was durch die Metall-dirigierenden MOM-Gruppen problemlos erfolgen konnte, und schließlich durch Zugabe von DMF formyliert. Auf diese Weise fiel 3,3'-Bis-formyl-bis-O-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **101** an, wobei die Verbindung aufgrund der schwierigen chromatographischen Reinigung nicht vollständig rein erhalten werden konnte. Sie wurde daher noch verunreinigt für die nachfolgende saure Entschützung verwendet, und der gewünschte Aldehyd 3,3'-Bis-formyl-biphenyl-2,2'-diol **99** ließ sich wesentlich besser als die Vorstufe **101** von den Nebenprodukten abtrennen. Die anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid unter Standardbedingungen lieferte 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**.

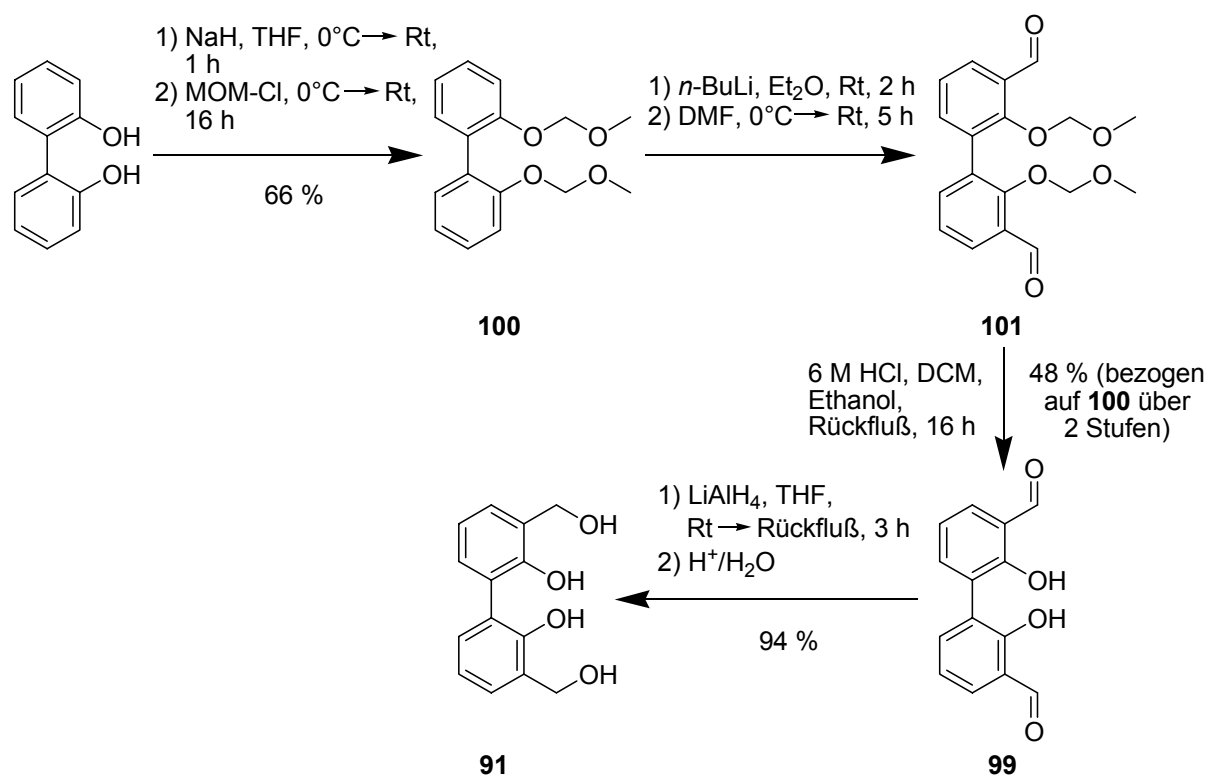


Abb. 56 Synthese des Salicylalkohol-Derivates **91** durch Reduktion des Aldehyds **99**

Bezüglich der erzielten Ausbeuten läßt sich anführen, daß die für die Darstellung von **100** erzielte Ausbeute von 66 % sogar noch etwas über der Literatur-Ausbeute von 54 %^[112] lag. Die ursprüngliche Synthese-Vorschrift war dabei kaum verändert worden, lediglich bei der chromatographischen Reinigung war ein anderes Laufmittel verwendet worden. Trotzdem verlief die Synthese nicht problemlos, da das Produkt **100** offenbar durch die Gegenwart der beiden MOM-Gruppen an Kieselgel ein starkes „Tailing“ zeigte, was die Chromatographie langwierig und schwierig machte. Auch war auffällig, daß die Ausbeute bei einer Durchführung der Reaktion in größerem Maßstab auf etwa 30 % abnahm, so daß die Reaktion sinnvollerweise nur in einem Maßstab von etwa 5.0 g (27 mmol) Biphenyl-2,2'-diol durchgeführt werden sollte. Die Schwierigkeiten bei der Chromatographie ließen sich auch für die Umsetzung von **100** zu **101** feststellen, hier war die chromatographische Trennung sogar so aufwendig, daß auf eine vollständige Reinigung der Substanz verzichtet werden mußte (Literatur-Ausbeute für diesen Schritt: 57 %^[112]). Der Umstand, daß sich **99** nach Abpaltung der beiden MOM-Gruppen wesentlich leichter chromatographisch abtrennen ließ, mag ebenfalls darauf hindeuten, daß in der Tat die MOM-Gruppen zu dem ungünstigen Elutionsverhalten von **100** und **101** an Kieselgel geführt hatten. Über zwei Stufen (Umsetzung von **100** zu **101** und dann zu

99) konnte eine Ausbeute von 48 % erzielt werden, während die Literatur-Ausbeute^[112] für die Reaktion von **101** zu **99** mit 68 % und die Ausbeute über die benannten zwei Stufen somit mit 39 % angegeben ist, so daß auch hier eine leichte Verbesserung festgestellt werden konnte. Insgesamt läßt sich jedoch anführen, daß sich die von Zhang et al. erarbeitete Synthese von **99** gut nachvollziehen ließ und sich lediglich die publizierten Laufmittel-Gemische für die chromatographischen Trennungen als nicht sinnvoll erwiesen. Die abschließende Reduktion zu **91** mit Lithiumaluminiumhydrid verlief problemlos und in nahezu quantitativer Ausbeute (94 %), so daß **91** ausgehend von Biphenyl-2,2'-diol in insgesamt vier Stufen und mit einer Gesamt-Ausbeute von 30 % dargestellt werden konnte.

Trotz dieser erfolgreichen Synthese von **91** ausgehend von Biphenyl-2,2'-diol muß festgestellt werden, daß die Darstellung dieser Substanz auf dem beschriebenen Weg nicht zuletzt aufgrund der aufwendigen chromatographischen Reinigungen nicht optimal war. Es wurde daher versucht, einen weiteren Syntheseweg zu etablieren, welcher von dem synthetischen Vorläufer 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** ausgehen sollte und der damit auf dem in Kapitel 4.3 vorgestellten neuen Synthesekonzept für Salicylalkohol-Derivate beruhte. Bereits Katz und Cram hatten beobachtet, daß bei einer als Kreuzkupplung intendierten Umsetzung eines bromierten Salicylalkoholisopropylidenacetals mit einem anderen Arylbromid unter Vermittlung von Eisen(III)-acetylacetonat primär ein in diesem Zusammenhang unerwünschtes Homokupplungsprodukt des geschützten Salicylalkohols entstand^[107]. Es lag daher nahe, ähnliche Synthesebedingungen für die Darstellung der zweifach Isopropyliden-geschützten Verbindung Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102** durch Homokupplung aus dem Vorläufer **65** zu wählen (Abb. 57).

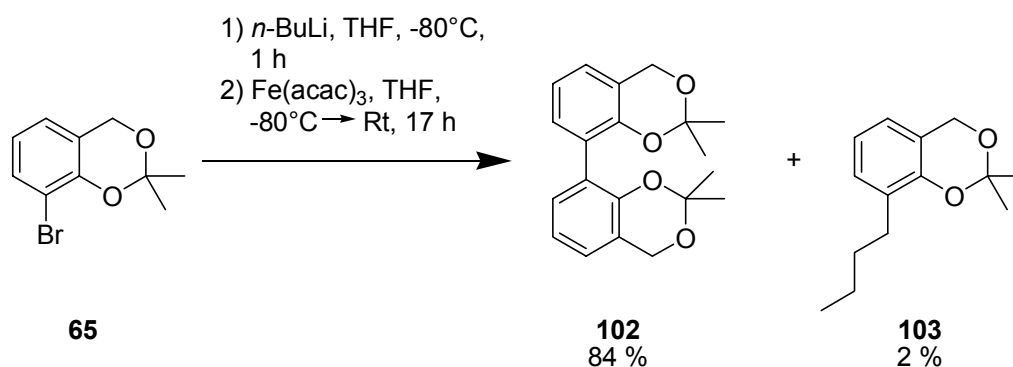


Abb. 57 Synthese von **102** durch Homokupplung des Vorläufers **65**

Zunächst wurde **65** bei tiefer Temperatur mit *n*-Butyllithium in THF durch Halogenlithium-Austausch lithiiert. Die so erhaltene Lösung der entsprechenden Aryllithium-Verbindung wurde, immer noch bei tiefer Temperatur, in eine Lösung von Eisen(III)-acetylacetonat in THF überführt und erst anschließend erwärmt. Die tiefe Temperatur war zuvor essentiell, um eine Zersetzung der außerordentlich labilen Aryllithium-Verbindung zu vermeiden. Die in organischen Solventien lösliche Eisen(III)-Verbindung diente bei dieser Reaktion nicht als Katalysator, sondern wurde stöchiometrisch eingesetzt, da sie zur entsprechenden Eisen(II)-Verbindung reduziert wurde, während die Aryllithium-Verbindung unter Ausbildung der Aryl-Aryl-Bindung formal oxidiert wurde. Ein genauer Mechanismus ist für diese Reaktion nicht bekannt, es läßt sich jedoch vermuten, daß ähnlich den Metall-vermittelten Kreuzkupplungsreaktionen eine Addition der Aryllithium-Verbindung an das elektrophile Eisen(III)-Zentrum stattfindet, der eine reduktive Eliminierung unter Bildung der Aryl-Aryl-Bindung und der Eisen(II)-Spezies folgt. Denkbar wäre jedoch auch ein radikalischer Mechanismus. Bei der Aufarbeitung der Reaktion war zu beachten, daß die organische Phase unbedingt mit Salzsäure gewaschen werden mußte. Dies war notwendig, um die Eisen-Komplexe vollständig zu zerstören, da sie die abschließende chromatographische Reinigung des Produkts massiv störten, bei der sie in beinahe jeder Fraktion zu finden waren. Die Verwendung der Salzsäure hatte auf die acetalischen Schutzgruppen keine Auswirkungen. Auf diese Weise konnte **102** schließlich in 84 % Ausbeute isoliert werden. Als Nebenprodukt fiel das Kreuzkupplungsprodukt 3-*n*-Butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **103**, welches offensichtlich durch Reaktion von überschüssigem *n*-Butyllithium mit **65** gebildet worden war, in 2 % Ausbeute an.

Da der letztlich darzustellende Alkohol **91** in größerer Menge benötigt wurde, mußte auch die Synthese von **102** in hinreichend großem Maßstab erfolgen. Bei ersten Versuchen, die Reaktion in größerem Maßstab durchzuführen, wurde festgestellt, daß die ursprünglich festgesetzte Reaktionszeit von zehn Minuten für den Lithiierungsschritt offensichtlich nicht mehr ausreichte, um die Lithiierung zu vervollständigen, da das erhaltene Rohprodukt stets noch signifikante Mengen des von **102** chromatographisch schwer abzutrennenden Edukts **65** enthielt. Es lag daher nahe, die Reaktionszeit für die Lithiierung zu verlängern, um diese Teilreaktion auch im größeren Maßstab möglichst quantitativ ablaufen zu lassen. Dabei ergab sich die Frage, ob die äußerst empfindliche Aryllithium-Verbindung eine längere

Reaktionszeit toleriert oder ob zumindest teilweise Zersetzung eintritt. Es wurden daher die folgenden Modellreaktionen untersucht: die Teilreaktion der Lithiierung wurde im kleinen Maßstab mit drei verschiedenen Reaktionszeiten (zehn Minuten, 30 Minuten, eine Stunde) durchgeführt und schließlich durch Zugabe von Deuteriumoxid abgebrochen (Abb. 58). Alle drei Reaktionen wurden aufgearbeitet und die so erhaltenen Rohprodukte $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch analysiert.

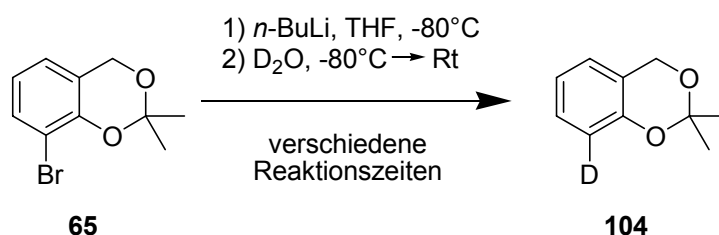


Abb. 58 Modellreaktionen zum Teilschritt der Lithiierung in der Synthese von **102**

Es stellte sich heraus, daß in allen drei Fällen das Produkt 3-Deuterosalicylalkohol-isopropylidenacetal **104** in guten Ausbeuten erhalten werden konnte (78 % für zehn Minuten Reaktionszeit, 77 % für 30 Minuten, 89 % für eine Stunde). Die Unterschiede in den Ausbeuten waren eher marginal und angesichts des kleinen Maßstabs der Reaktionen wahrscheinlich auf leichte Verluste bei der Aufarbeitung zurückzuführen. Es konnte also gefolgert werden, daß auch eine Reaktionszeit von einer Stunde für den Lithiierungsschritt problemlos möglich ist, so daß die Synthese von **102** im größeren Maßstab entsprechend durchgeführt wurde. Dies führte auch in der Tat dazu, daß das Edukt **65** in der Umsetzung von **65** zu **102** nicht mehr im Rohprodukt zu finden war, die Lithiierung also quantitativ erfolgt sein mußte.

Um den Alkohol **91** zu erhalten, war nunmehr noch die saure Entschützung von **102** notwendig. Da für die Modellreaktion der Entschützung von **66** zu **73** die Variante mit TFA in einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch das beste Ergebnis geliefert hatte (vergl. Kapitel 4.3.3), wurden diese Bedingungen zunächst auch für die Entschützung von **102** zu **91** erprobt (Abb. 59, S. 56). Diese Methode führte hier jedoch nicht zur Isolierung des gewünschten Produkts. Vielmehr waren die bei der chromatographischen Reinigung angefallenen produktthaltigen Fraktionen noch mit Nebenprodukten verunreinigt, es war also Zersetzung eingetreten.

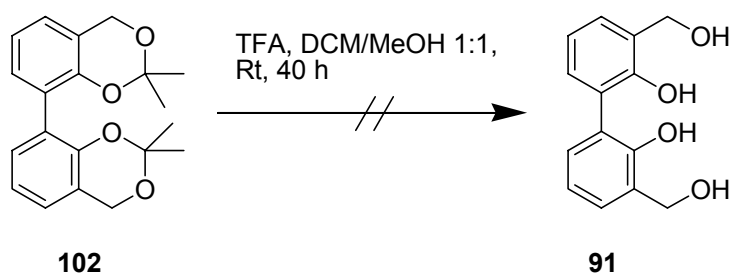


Abb. 59 Versuch der Synthese von **91** durch Entschützung von **102** mit TFA

Es wurde daher auf die alternative Methode der Schutzgruppen-Abspaltung mit saurem Ionentauscher zurückgegriffen. Es wurden dabei zunächst Testreaktionen im kleineren Maßstab durchgeführt, und die Bedingungen wurden variiert (Abb. 60).

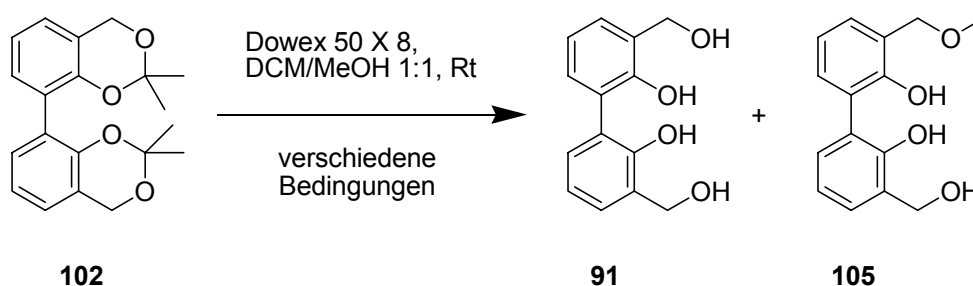


Abb. 60 Testreaktionen zur Synthese von **91** durch Entschützung von **102** mit saurem Ionentauscher

Zunächst wurden die bereits für die Modellreaktion der Entschützung von **66** zu **73** erarbeiteten Bedingungen angewendet (vergl. Kapitel 4.3.3). Diese wurden dann systematisch variiert. Die Ergebnisse sind nachfolgend in der Tabelle 4 aufgeführt.

Nr.	Bedingungen	Reaktionszeit	Ausbeute 91	Ausbeute 105
1	Standard ^a	46 h	38 %	60 %
2	weniger Ionentauscher	73 h	44 %	32 %
3	weniger Ionentauscher und weniger Methanol ^b	67 h	---- ^c	---- ^c
4	weniger Ionentauscher und weniger Lösungsmittel	45 h	43 %	24 %

^afür die Modellreaktion der Entschützung von **66** zu **73** verwendete Bedingungen

^bDichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v; ^cAnsatz verworfen

Tab. 4 Testreaktionen zur Entschützung von **102** mit saurem Ionentauscher

Die für die Entschützung von **66** zu **73** erarbeiteten Bedingungen hatten sich so ergeben, daß in Vorversuchen festgestellt werden konnte, daß zur effektiven Entschützung eines Salicylalkoholisopropylidenacetals relativ große Mengen des sauren Ionenauschers nötig waren (etwa 28 g pro mmol Acetal). Um die mechanische Durchmischung des Reaktionsansatzes zu gewährleisten, erforderte es eine entsprechende Lösungsmittelmenge (46 mL pro mmol Acetal). Unter Anwendung dieser nachfolgend als Standard definierten Bedingungen wurde **91** in 38 % Ausbeute erhalten (Reaktion 1). Allerdings fiel auch noch das offensichtlich durch saure Veretherung entstandene Nebenprodukt 3-(Methoxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **105** in 60 % Ausbeute an. Es ist davon auszugehen, daß **105** durch Weiterreaktion von **91** unter den gewählten Bedingungen entstanden sein mußte. Es war daher zu versuchen, die Weiterreaktion zu **105** durch Veränderung der Bedingungen zu unterdrücken. In der Tat führte eine Abmilderung der Reaktionsbedingungen durch Verringerung der Ionenauscher-Menge (Reaktion 2) zwar zu einer Verlängerung der Reaktionszeit, allerdings konnte die Ausbeute von **91** minimal gesteigert (44 %) und die von **105** signifikant verringert werden (32 %). Bei der Differenz der Ausbeuten zu 100 % handelte es sich primär um nicht vollständig umgesetztes Edukt **102**. Um die Nebenreaktion zu **105** noch weiter zurückzudrängen, wurde außerdem versucht, den Methanol-Anteil am Solvens zu verringern, weswegen Dichlormethan/Methanol 9 : 1 als Lösungsmittel erprobt wurde (Reaktion 3). Unter diesen Bedingungen war jedoch die Spaltung von **102** zu **91** laut der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung stark verlangsamt, während die Reaktion von **91** zu **105** offensichtlich immer noch sehr schnell erfolgte, da sich bei noch signifikant vorhandenen Edukt-Mengen deutlich mehr **105** als **91** gebildet hatte. Dieser Reaktionsansatz wurde daher verworfen. Die in Reaktion 2 gefundenen Bedingungen waren also zunächst die besten, noch zumal sich das nicht umgesetzte Edukt eventuell reisolieren lassen sollte. Allerdings war die Lösungsmittel-Menge immer noch sehr hoch, was bei einer Synthese im größeren Maßstab zu Schwierigkeiten geführt hätte. Eine Verringerung der Lösungsmittelmenge (Reaktion 4) führte prinzipiell zu ähnlichen Ergebnissen wie Reaktion 2. Insgesamt läßt sich festhalten, daß die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung bei diesen Synthesen sehr wichtig war. So war stets zu ermitteln, ob sich das Edukt **102** bereits zur Genüge (nicht vollständig) umgesetzt hatte, und ob noch

nicht zu viel Nebenprodukt **105** entstanden war. Ein rechtzeitiger Abbruch der Reaktion erwies sich als essentiell.

Es wurde nunmehr versucht, die in der Testreaktion 4 ermittelten Bedingungen auf eine Synthese im größeren Maßstab zu übertragen. Obwohl dies prinzipiell gelang, wurde eine deutlich geringere Ausbeute an **91** (28 %) erhalten (Abb. 61).

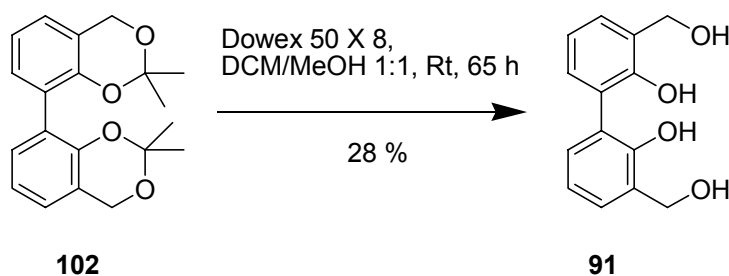


Abb. 61 Synthese von **91** durch Entschützung von **102** mit saurem Ionentauscher

Es ist durchaus plausibel, daß der Maßstab der Reaktion bei dieser Synthese eine Auswirkung hatte, da die eigentliche Reaktion naturgemäß an der Oberfläche des sauren Ionentauschers ablaufen muß, so daß Aspekte der mechanischen Durchmischung des Reaktionsansatzes eine Rolle spielen mögen. Auch ist zu bedenken, daß der vergrößerte Maßstab eine säulenchromatographische Reinigung des Produkts notwendig machte, während sich die Rohprodukte der Testansätze am Chromatotron trennen ließen. Aufgrund der recht hohen Polarität des Tetrols **91** könnte es dabei zu Verlusten gekommen sein.

Insgesamt war es damit gelungen, **91** auf einem dem neuen Synthesekonzept für Salicylalkohol-Derivate entsprechenden Weg darzustellen. Aufgrund der Probleme bei der Entschützung des Zwischenproduktes **102** betrug die Ausbeute über zwei Stufen ausgehend von **65** lediglich 24 %. Bezieht man die Notwendigkeit der Synthese von **65** ausgehend von kommerziell verfügbarem *ortho*-Bromphenol mit ein (vergl. Kapitel 4.3.2), so ergibt sich eine Gesamt-Ausbeute von 12 % über fünf Stufen. Die zuvor erläuterte Synthese ausgehend von Biphenyl-2,2'-diol erscheint hier überlegen, allerdings kann die Darstellung von **91** bei hinreichender Verfügbarkeit von **65** wesentlich schneller erfolgen, und die Verwendung des toxischen MOM-Chlorids **51** kann vermieden werden.

Es wurde auch versucht, das Salicylalkohol-Derivat **91** durch eine regioselektive Hydroxymethylierung nach Nagata zu erhalten (vergl. Kapitel 4.2). Hierfür wurde Biphenyl-2,2'-diol unter den für diese Reaktion üblichen Bedingungen bei etwas

erhöhter Reaktionszeit umgesetzt (Abb. 62). Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohprodukts aus der Synthese des Bis-Dioxaborins **106** wies jedoch keine produkttypischen Signale auf, so daß auf die nachfolgende Oxidation verzichtet wurde.

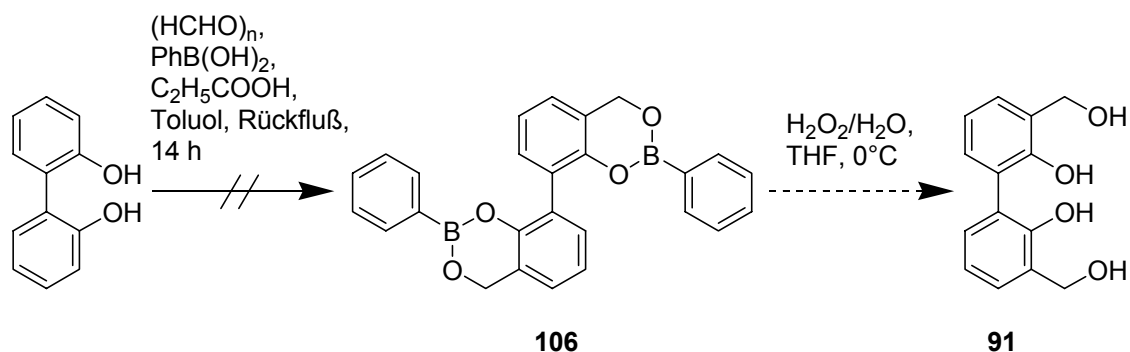


Abb. 62 Versuch der Synthese von **91** durch regioselektive Hydroxymethylierung nach Nagata

Wahrscheinlich hat der Umstand, daß im Biphenyl-2,2'-diol zwei Hydroxygruppen in Nachbarschaft vorhanden sind, die Reaktion gestört. Wenn man davon ausgeht, daß eine Kondensation der Phenylboronsäure mit der phenolischen Hydroxyfunktion die Reaktion einleitet, so ist im Falle des Biphenyl-2,2'-diols die Bildung eines Intermediates **107** denkbar, aus dem die weitere Aktivierung von *para*-Formaldehyd in unmittelbarer Nachbarschaft zur *ortho*-Position und damit letztlich die Bildung der Sechsringe in **106** unmöglich ist (Abb. 63).

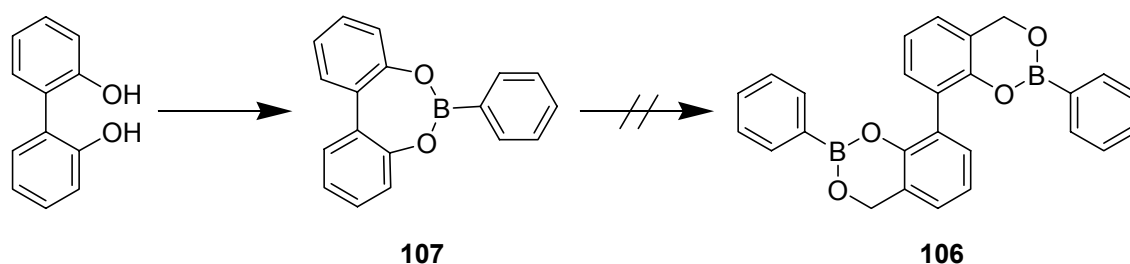


Abb. 63 Mögliche Bildung des Intermediates **107** beim Versuch einer regioselektiven Hydroxymethylierung nach Nagata von Biphenyl-2,2'-diol

Neben der Bildung einer dimeren Struktur wie **102** durch Homokupplung von **65** bietet sich auch die Anwendung einer Kreuzkupplungsmethode an, beispielsweise der für die Bildung von Aryl-Aryl-Bindungen bewährten Suzuki-Kupplung. Diese Strategie hätte den Vorteil, daß bei Verwendung eines anders geschützten Derivates von 3-Bromsalicylalkohol **70** mit zur Isopropyliden-Schutzgruppe orthogonalen Schutzgruppen (zum Beispiel Silyl- oder Estergruppen) als Kupplungspartner von **65**

ein direkter und einfacher Zugang nicht nur zu **91** (durch Abspaltung aller Schutzgruppen), sondern auch zum Salicylalkohol-Derivat **98** möglich sein sollte. Ein solcher Syntheseansatz würde jedoch zunächst die Überführung des Arylbromids **65** in eine Arylboronsäure oder einen Arylboronsäureester erfordern, da diese für die Suzuki-Kupplung notwendig wären (Abb. 64).

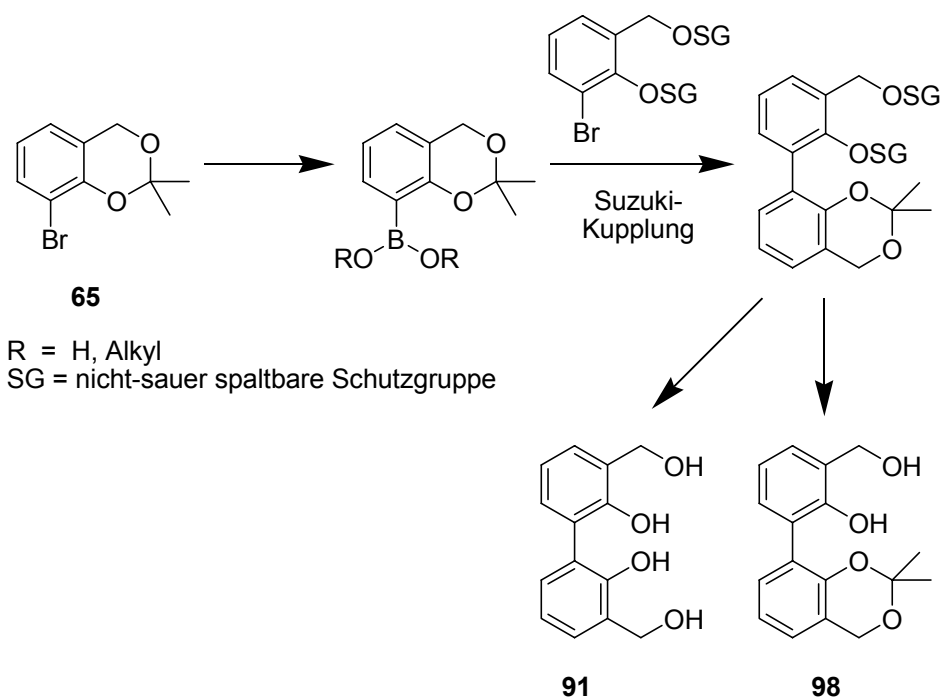


Abb. 64 Synthesestrategie für die Verwendung der Suzuki-Kupplung zur Darstellung von **91** und **98** aus **65**

Es wurde daher zunächst versucht, Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure **108** durch Lithiierung von **65** und anschließende Umsetzung mit Tris-(*n*-butyl)-borat **53** darzustellen (Abb. 65).

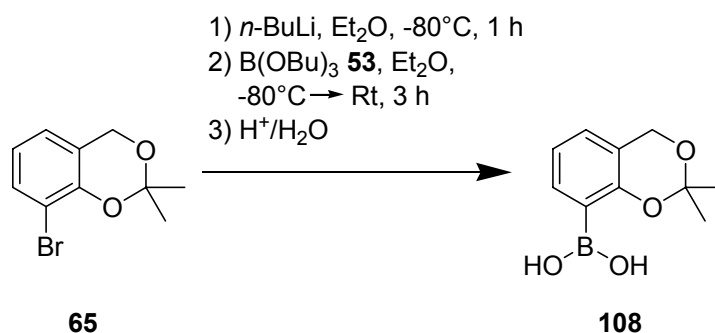


Abb. 65 Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure **108**

Nach der Zugabe von wäßriger Säure und anschließender Aufarbeitung wurde zunächst ein Öl erhalten, an dessen Rand sich farblose Kristalle abschieden, bei denen es sich laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum um das gewünschte Produkt **108** handelte. Die Menge reichte allerdings weder für eine weitere Charakterisierung noch für nachfolgende Umsetzungen aus. Da vermutet wurde, daß auch das verbliebene Öl noch Produkt enthielt, wurde auf verschiedene Arten versucht, den Rückstand zu reinigen: Das Auswaschen mit kaltem *n*-Pentan führte nicht zur vollständigen Entfernung der Nebenprodukte. Bei der Umkristallisation aus Wasser wurde die allmähliche Zersetzung des Produktes beobachtet. Wahrscheinlich kam es in der Siedehitze zur sauren Abspaltung der Schutzgruppe und dann zu Folgereaktionen. Ein anderes Lösungsmittelsystem zur Umkristallisation konnte nicht gefunden werden. Auch der Versuch einer Reinigung am Chromatotron mißlang.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Isolierung von **108** wurde versucht, statt dessen einen chromatographierbaren Arylboronsäureester aus **65** zu synthetisieren. Eine etablierte Methode hierfür ist die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung mit Bis-(pinacolato)-diboran^[113,114,115]. Es wurde daher das Arylbromid **65** mit Bis-(pinacolato)-diboran in Gegenwart von Kaliumacetat und dem Katalysator 1,1'-(Bis-diphenylphosphino)-ferrocenyl)-palladium(II)-chlorid ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$) umgesetzt. Das gewünschte Produkt Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-pinacolester **109** konnte dabei jedoch nicht isoliert werden (Abb. 66).

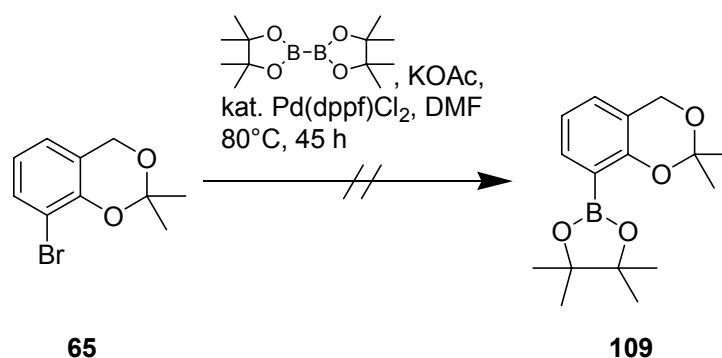


Abb. 66 Versuch der Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-pinacolester **109**

Es wurde daher noch eine andere Methode zur Darstellung von Arylboronsäureestern erprobt, die auf Arbeiten von Wong et al. zurückgeht^[116]. Bei diesen Reaktionen wird generell das Arylbromid in ein Grignard-Reagenz überführt, welches dann mit Trimethylborat umgesetzt wird. Anstatt nun jedoch wie bei der Arylboronsäure-Synthese das resultierende Arylboronat durch saure Aufarbeitung zu

zerstören, wird der Reaktionsansatz im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, in einem zweiphasigen Ethylenglycol/Toluol-Gemisch wieder aufgenommen und zur Reaktion gebracht. Hierbei soll es zu einer Umesterung des polaren Arylboronats kommen, so daß der resultierende unpolare Arylboronsäureethylenglycolester in die lipophilere Toluol-Phase übergeht. Diese muß dann nur noch abgetrennt und vom Lösungsmittel befreit werden. Es wurde versucht, dieses Syntheseprotokoll auf die Darstellung von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-ethylenglycolester **110** zu übertragen. Hierbei wurde die anfänglich benötigte carbanionische Spezies sowohl durch Lithiierung als auch alternativ durch Überführung von **65** in ein Grignard-Reagenz erzeugt, um zu untersuchen, ob das Gegenion des Arylboronats (Lithium oder Magnesium) einen Einfluß auf die Synthese beispielsweise aus Löslichkeitsgründen haben könnte. In beiden Fällen konnte jedoch das gewünschte Produkt **110** nicht isoliert werden (Abb. 67).

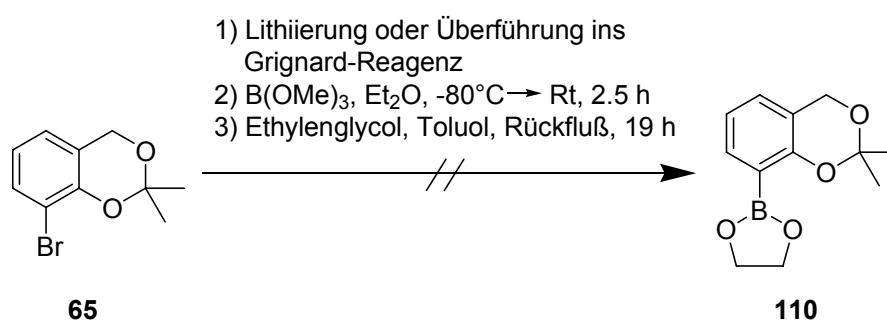


Abb. 67 Versuche zur Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-ethylenglycolester **110**

Da die Versuche sowohl zur Darstellung von **109** als auch von **110** erfolglos blieben, obwohl es sich bei den Reaktionen um etablierte Standardmethoden handelte, läßt sich vermuten, daß die Bildung dieser Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäureester eventuell thermodynamisch ungünstig ist, die entsprechenden Produkte also energiereich sind. Dies könnte möglicherweise auf die Nachbarschaft von zwei verhältnismäßig starren sauerstoffhaltigen Heterocyclen zurückzuführen sein. Eine sterische Hinderung, die die Zugänglichkeit zur 3-Position von **65**, der entsprechenden Aryllithium- oder der entsprechenden Grignard-Verbindung einschränkt, ist angesichts der erfolgreichen Synthese von **102** aus **65** durch eine Homokupplung in hoher Ausbeute wenig wahrscheinlich. Da sich somit aus **65** keine Arylboronsäure bzw. kein Arylboronsäureester in befriedigender Ausbeute erhalten ließ, konnte die in der Abbildung 64 (S. 60) dargelegte Synthesestrategie nicht weiter verfolgt werden.

4.4.4 Synthese des Salicylalkohol-Derivates **95**

Das Retrosyntheseschema für die Darstellung von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **95** ist in der Abbildung 68 gegeben.

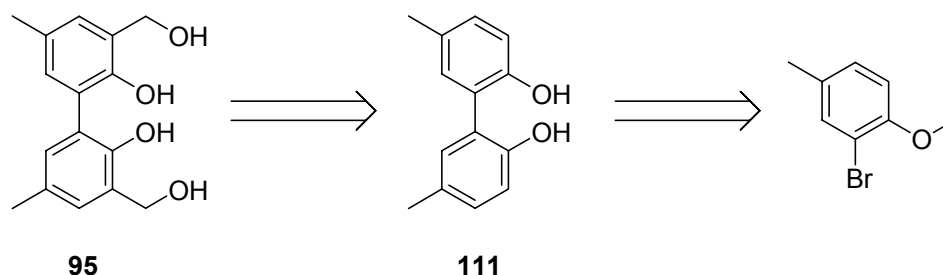


Abb. 68 Retrosyntheseschema zur Darstellung von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **95**

Aufgrund der Tatsache, daß die *para*-Positionen zu den phenolischen Hydroxygruppen in **95** bzw. der Vorstufe **111** durch Methylgruppen blockiert sind, gestaltet sich die Synthese von **95** im Vergleich zu der von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91** wesentlich einfacher, da so die bereits in Kapitel **4.2** vorgestellte einfache Hydroxymethylierung mit Formaldehyd in Gegenwart von Base möglich ist. Es sollte daher möglich sein, **95** durch eine entsprechende Umsetzung von 5,5'-Dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **111** zu erhalten. Die Synthese von **111** ausgehend von 2-Brom-4-methylanisol ist aus Arbeiten von Bell et al. bzw. Koenig et al. bekannt^[117,118].

Zunächst wurde 2-Brom-4-methylanisol unter Bedingungen, welchen denen zur Darstellung von **102** aus **65** ähnelten (vergl. Kapitel **4.4.3**), durch eine Homokupplung unter Beteiligung von Eisen(III)-acetylacetonat in 83 % Ausbeute zu 2,2'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-biphenyl **112** umgesetzt. Die Literatur-Ausbeute für diesen Schritt betrug 75 %^[117]. Während in der Original-Vorschrift eine destillative Reinigung des Produkts **112** angegeben ist, wurde hier chromatographiert. Anschließend wurde **112** durch eine Lewis-saure Etherspaltung mit Bortribromid in Dichlormethan in 63 % Ausbeute zum Phenol **111** entschützt (Abb. 69). Die Literatur-Ausbeute ist hierfür zwar mit 99 % angegeben^[118], allerdings wurde diese ohne Reinigung des Produkts erzielt, während hier ebenfalls eine chromatographische Reinigung erfolgte. Über die beiden Stufen zur Darstellung von **111** wurde somit eine Gesamt-Ausbeute von 52 % erhalten (Literatur: 74 %).

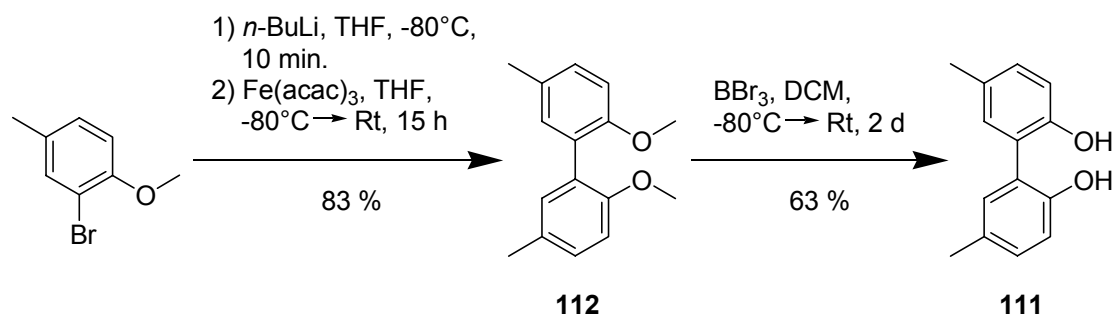


Abb. 69 Synthese von 5,5'-Dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **111**

Für die Hydroxymethylierung von **111** zum Salicylalkohol-Derivat **95** wurden zunächst milde Bedingungen, also 5.8 Äquiv. Formaldehyd und 2.3 Äquiv. Natriumhydroxid in Methanol bei Raumtemperatur gewählt. Auf diese Weise wurde im Wesentlichen das Edukt **111** reisoliert. Erst eine Verschärfung der Reaktionsbedingungen (Verwendung eines großen Überschusses Natriumhydroxid in wässriger Formaldehyd-Lösung als Solvens, Temperatur 40°C) führte dazu, daß das gewünschte Produkt **95** nach entsprechender Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung in 48 % Ausbeute isoliert werden konnte (Abb. 70). Die Gesamt-Ausbeute für die Darstellung von **95** über drei Stufen ausgehend von 2-Brom-4-methylanisol betrug somit 25 %.

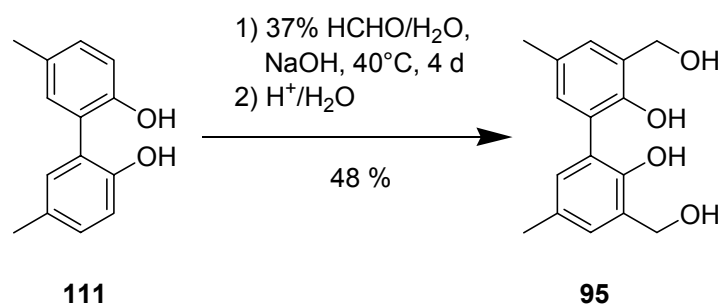


Abb. 70 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **95**

Auch hier bot es sich an, eine alternative Synthese von **95** durch Anwendung des neuen Synthesekonzeptes für Salicylalkohol-Derivate (vergl. Kapitel 4.3) zu erproben, die analog zu der Darstellung von **91** über **102**, die ausgehend vom synthetischen Vorläufer **65** durch Homokupplung und anschließende Entschützung erfolgt war (vergl. Kapitel 4.4.3), durchgeführt werden sollte. Dies erforderte jedoch zunächst die Synthese einer dem Acetal **65** analogen Verbindung, also die Darstellung des potentiellen synthetischen Vorläufers 3-Brom-5-methylsalicylalkohol-isopropylidenacetal **113** (Abb. 71).

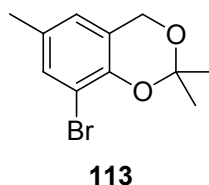


Abb. 71 Der potentielle synthetische Vorläufer **113**

Zur Synthese von **113** wäre zunächst die Darstellung des entsprechenden Alkohols 3-Brom-5-methylsalicylalkohol **114** erforderlich gewesen. Es wurde daher versucht, 2-Brom-4-methylphenol unter den bereits für die Synthese von **95** etablierten Bedingungen in einer Hydroxymethylierung umzusetzen (Abb. 72).

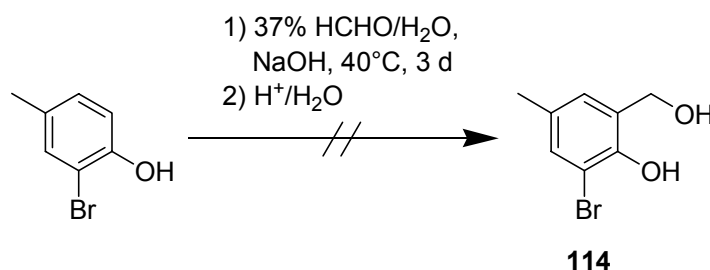


Abb. 72 Versuch der Synthese von 3-Brom-5-methylsalicylalkohol **114**

In der Tat deutete die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung darauf hin, daß sich das Edukt genügend umgesetzt und wahrscheinlich auch das Produkt **114** gebildet hatte. Nach der Aufarbeitung der Reaktion und einer säulenchromatographischen Reinigung konnte **114** jedoch nicht isoliert werden, da offensichtlich Zersetzung eingetreten war. Eventuell war das Salicylalkohol-Derivat **114** für eine Trennung an Kieselgel zu labil. Ähnliches war zuvor bereits für andere Salicylalkohol-Derivate beobachtet worden^[88]. Da die Darstellung von **114** somit nicht trivial erschien und bereits eine gut durchführbare Synthese für die Darstellung von **95** erarbeitet worden war, wurde diese Syntheseroute schließlich verworfen.

4.4.5 Umsetzung der Salicylalkohol-Derivate **91,95** zu den Bis-(*cyclo*Sal-Nucleotiden) **46,47**

Für die Umsetzung der Salicylalkohol-Derivate **91,95** zu den Bis-(*cyclo*Sal-Nucleotiden) **46,47** war es zunächst erforderlich zu überprüfen, ob die Standardbedingungen für die Synthese der Saligenylchlorphosphate aus den Salicylalkoholen (vergl. Kapitel **4.2** und **4.3**) auf die Biaryle **91,95** übertragbar waren. Ein potentielles

Problem stellte dabei die Nachbarschaft der phenolischen Hydroxylgruppen dar. Insgesamt sind beispielsweise bei der Umsetzung von **91** mit Phosphor(III)-chlorid die in der Abbildung 73 angegebenen Reaktionswege denkbar.

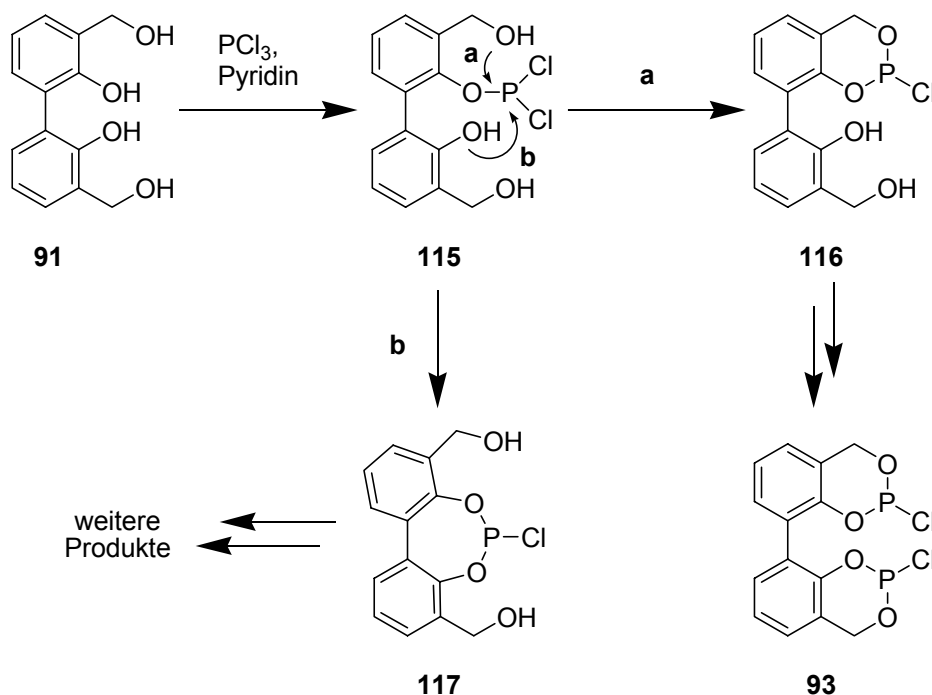


Abb. 73 Mögliche Reaktionswege bei der Umsetzung des Alkohols **91** mit Phosphor(III)-chlorid

Es ist anzunehmen, daß zunächst eine der im basischen Milieu reaktiveren phenolischen Hydroxylgruppen von **91** mit Phosphor(III)-chlorid reagiert, um so das Intermediat **115** zu bilden. Für die weitere Umsetzung von **115** sind dann zwei weitere Wege denkbar. Zum einen könnte es mit der benachbarten benzyliischen Hydroxylgruppe zum Ringschluß unter Ausbildung eines Sechsrings kommen (Weg **a**). Das resultierende Produkt **116** könnte dann nur noch durch erneute Reaktion mit Phosphor(III)-chlorid unter Ausbildung des zweiten Sechsrings zum gewünschten Produkt **93** reagieren. Kommt es jedoch auf der Stufe von **115** zum nucleophilen Angriff der zweiten phenolischen Hydroxylgruppe auf das Phosphor-Atom (Weg **b**), so ergibt sich die Bildung eines Siebenring-Systems. Das entsprechende Produkt **117** dürfte im basischen Reaktionsmilieu nicht stabil sein, da es neben einer Phosphor-Chlor-Bindung auch noch zwei weitere Hydroxylfunktionen besitzt. Es ist daher anzunehmen, daß **117** unter Bildung eines Produktgemisches weiterreagiert. Für den Verlauf der Reaktion gemäß Weg **a** spricht die höhere thermodynamische Stabilität eines Sechs- gegenüber einem Siebenring, während für

den Weg **b** die unter den erforderlichen basischen Reaktionsbedingungen höhere Reaktivität der phenolischen gegenüber der benzyllischen Hydroxylgruppe als potentiell förderlich anzuführen ist.

Um zu untersuchen, ob unter den für die Chlorphosphit-Synthese etablierten Bedingungen überhaupt die Ausbildung eines Siebenring-Systems wie bei **117** möglich ist, wurde zunächst eine Modellreaktion durchgeführt. Es wurde Biphenyl-2,2'-diol unter Standardbedingungen (Zutropfen von Pyridin, Diethylether als Solvens, Temperatur -20°C) mit Phosphor(III)-chlorid umgesetzt, um so potentiell das entsprechende Produkt **118** zu erhalten (Abb. 74). Zur Benennung von **118** soll, wie schon zuvor bei den Saligenylchlorphosphiten, auf den IUPAC-Namen verzichtet und nachfolgend der Trivialname Biphenylchlorphosphit verwendet werden.

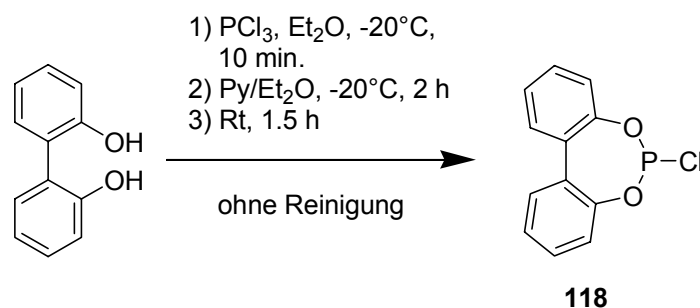


Abb. 74 Synthese von Biphenylchlorphosphit **118**

Auf eine Reinigung wurde auch hier in Analogie zur Synthese der Saligenylchlorphosphite angesichts der hohen Empfindlichkeit des Produkts verzichtet. Allerdings konnte die Verbindung **118** NMR-spektroskopisch eindeutig als Hauptbestandteil des erhaltenen Rohproduktes identifiziert werden. Die Bildung eines Siebenring-Systems aus einem Biphenyldiol-Derivat unter den genannten Bedingungen war also sehr wohl möglich. Die Synthese von **118** durch Umsetzung von Biphenyl-2,2'-diol mit Phosphor(III)-chlorid unter drastischeren Reaktionsbedingungen war unter anderem bereits von Anschütz und Marquardt berichtet worden^[119].

Angesichts dieses Resultats ergab sich die Frage, wie sich die Bildung des Siebenring-Produktes **117** und seiner Folgeprodukte bei der Reaktion des Alkohols **91** mit Phosphor(III)-chlorid vermeiden lassen könnte. Es erschien naheliegend, die Selektivität der Reaktion zugunsten des Sechsring-Produktes **116** und damit **93** durch eine Variation der Reaktionstemperatur verbessern zu können (vergl. Abb. 73, S. 66). Daher wurde **91** in drei Testreaktionen mit Phosphor(III)-chlorid und Pyridin umgesetzt, wobei die Temperaturen -20°C (eigentliche Standardbedingungen), -40°C

und -60°C betragen. Die einzelnen Rohprodukte wurden isoliert, und ihre ^{31}P -NMR-Spektren sind in der Abbildung 75 wiedergegeben.

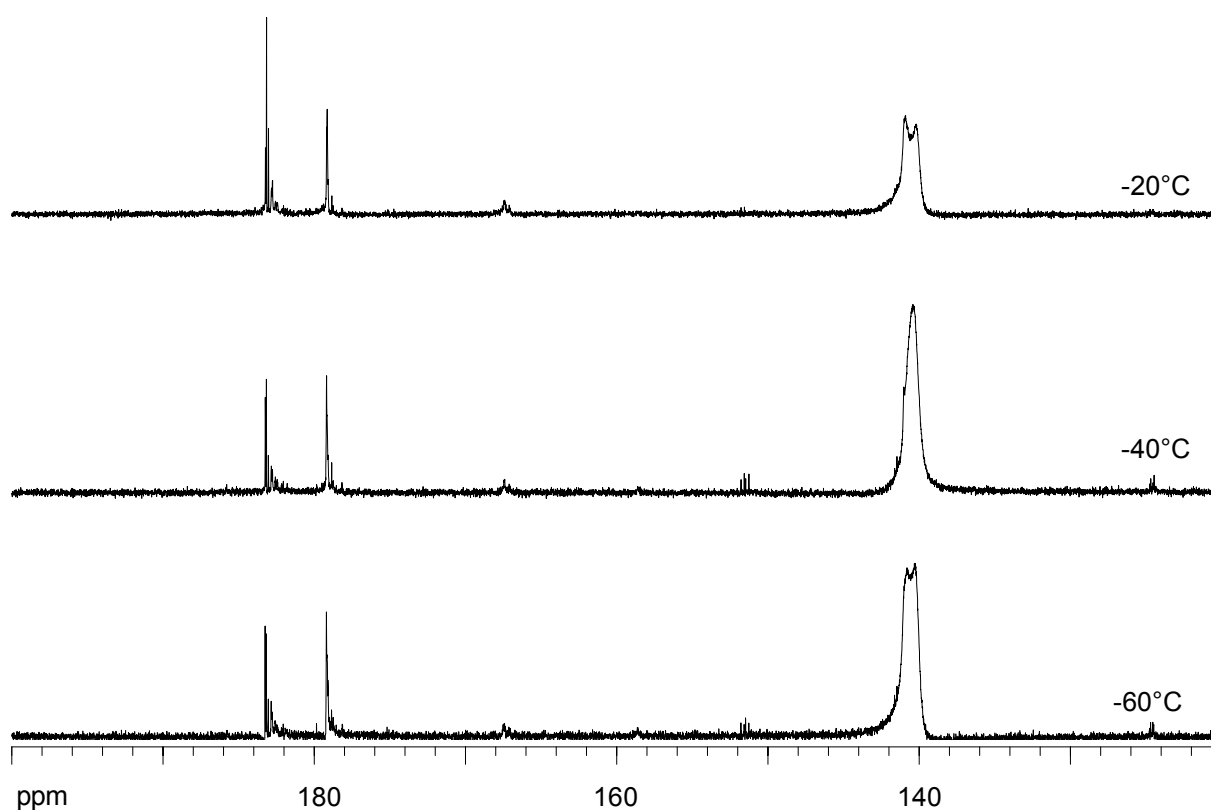


Abb. 75 ^{31}P -NMR-Spektren der Rohprodukte aus den bei verschiedenen Temperaturen durchgeführten Testreaktionen zur Synthese des Chlorphosphits **93**

Bei etwa 140 ppm ist in allen drei Fällen das Signal zu erkennen, welches dem gewünschten Produkt **93** zuzuordnen ist. Der Umstand, daß zum Teil zwei Linien erkennbar sind, ist darauf zurückzuführen, daß **93** als Gemisch von zwei Diastereomeren anfiel, von denen eines ein Enantiomerenpaar war (Konfiguration an den zwei Phosphor-Zentren: R_P/S_P bzw. R_P/R_P und S_P/S_P für das Enantiomerenpaar). Bei ungefähr 180 ppm sind mehrere Signale zu erkennen, die von Siebenring-Produkten vom Typ der Verbindung **117** stammen mußten, was sich anhand der chemischen Verschiebung und eines Vergleichs mit Literatur-Daten eindeutig ableiten läßt. Die zwei Haupt-Signale in diesem Bereich könnten eventuell auf **117** selber und ein Abbauprodukt schließen lassen, dies kann jedoch nicht näher bestimmt werden. Integriert man nun das Produkt-Signal bei etwa 140 ppm und den gesamten Signalbereich der Nebenprodukte um etwa 180 ppm, so ergeben sich die in der Tabelle 5 (S. 69) dargelegten Werte.

Temperatur	Verhältnis 93 : Sechsenring-Nebenprodukte [%]
-20°C	70 : 30
-40°C	87 : 13
-60°C	88 : 12

Tab. 5 Produktverhältnisse der drei Testreaktionen zur Synthese des Chlorphosphits **93** gemäß den ^{31}P -NMR-Spektren der Rohprodukte

Der Übergang von der Temperatur -20°C zu der Temperatur -40°C brachte also eine deutliche Verbesserung des Produktverhältnisses zugunsten des gewünschten Sechsenring-Produkts **93**, während die weitere Verringerung der Temperatur auf -60°C keine signifikanten Auswirkungen hatte. Daher erfolgte die Darstellung von Bis-(saligenylchlorphosphit) **93** im größeren Maßstab unter Abwandlung der Standardbedingungen für die Chlorphosphit-Synthese bei einer Temperatur von -40°C (Abb. 76).

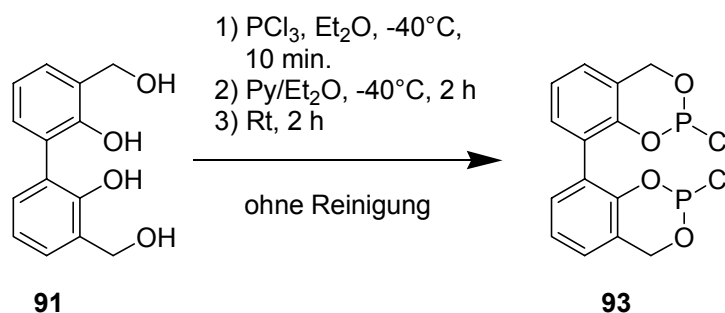


Abb. 76 Synthese von Bis-(saligenylchlorphosphit) **93**

Das so erhaltene Chlorphosphit **93** wurde anschließend als Rohprodukt unter den für die Darstellung von *cycloSal*-d4T-Monophosphaten etablierten Bedingungen (vergl. Kapitel 4.3.6) mit dem Nucleosid-Analogen d4T **4** zur Reaktion gebracht, um auf diese Weise Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** zu erhalten. Dabei wurden zwei Äquivalente von **93** (bei hypothetischer Reinheit) eingesetzt, obwohl diese Verbindung bereits zwei Chlorphosphit-Funktionalitäten besaß, folglich also wahrscheinlich auch ein Äquivalent von **93** ausreichend gewesen wäre. Zwar verlief die Reaktion wie von der Synthese einfacher *cycloSal*-d4T-Monophosphate bekannt, allerdings erwies sich die abschließende chromatographische Reinigung als äußerst schwierig, da viele Nebenprodukte abgetrennt werden mußten. Die Ausbeute war mit lediglich 8 % bezogen auf d4T **4** entsprechend gering (Abb. 77, S. 70). Allerdings ist hierbei zu

bedenken, daß bereits für die Synthesen einfacher *cycloSal*-d4T-Monophosphate mit der Chlorphosphit-Methode Ausbeuten von lediglich etwa 40 bis 60 % üblich sind, so daß für die Umsetzung von **93** zu **46**, bei der diese Reaktion ja zweifach erfolgen muß, bereits rechnerisch nur etwa eine Ausbeute von 15 bis 35 % zu erwarten gewesen wäre. Bezieht man mit ein, daß die Reinigung des Produkts erhebliche Schwierigkeiten bereitete und das eingesetzte Chlorphosphit **93** noch in nicht unerheblichem Maße verunreinigt war, so erscheint die erzielte Ausbeute durchaus realistisch.

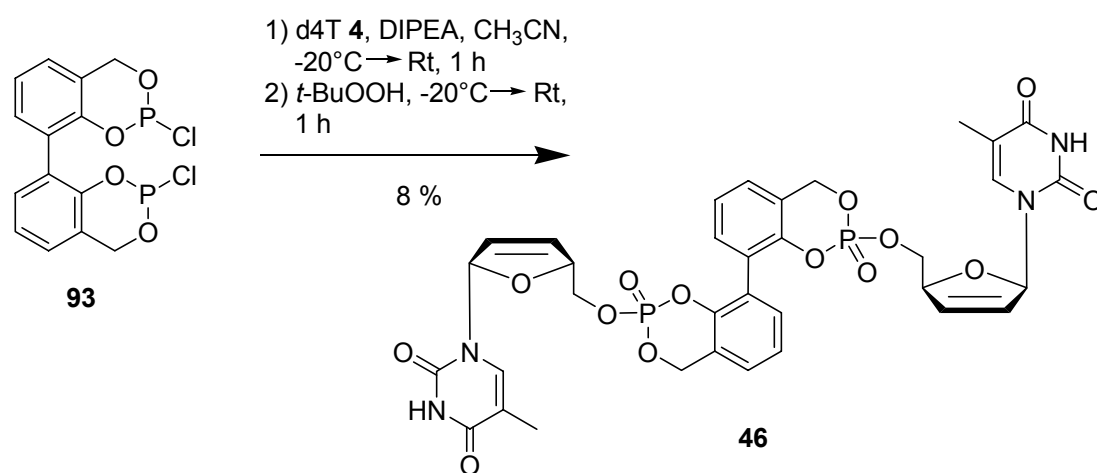


Abb. 77 Synthese von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** nach der Chlorphosphit-Methode

Es ist durchaus möglich, daß auch die relativ große Menge an Chlorphosphit-Äquivalenten im Reaktionsansatz (zwei Äquivalente **93**, was vier Äquivalenten eines herkömmlichen Saligenylchlorphosphits bei der Synthese einfacher *cycloSal*-d4TMPs entspräche) zu der geringen Ausbeute beigetragen hat. Aufgrund der Lewis-sauren Eigenschaften eines Chlorphosphits ist es denkbar, daß ein zu großer Überschuß dieser Substanz zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnte, noch zumal der Reaktionsansatz vor der chromatographischen Reinigung aufkonzentriert wird. Dann liegt das Chlorphosphit aufgrund der zuvor erfolgten Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid allerdings bereits als etwas unreaktiveres Phosphorchloridat vor.

Die Zielverbindung **46** fiel als Gemisch von drei Diastereomeren an. Die Stereochemie der Nucleosyl-Reste (Konfiguration an C1' und C4') war definiert, während an den beiden Phosphor-Zentren jeweils die *R_P*- oder die *S_P*-Konfiguration vorliegen konnte. Bei einfachen *cycloSal*-Nucleotiden führt dies zu Gemischen aus zwei Diastereomeren mit *R_P*- bzw. *S_P*-Konfiguration, für **46** aber waren die Kombinationen *R_P*/*R_P*, *R_P*/*S_P* und *S_P*/*S_P* möglich, wobei aus rein kombinatorischer Sicht das

Verhältnis der drei resultierenden Diastereomere 1.0 : 2.0 : 1.0 betragen sollte. Aus dem ^{31}P -NMR-Spektrum des isolierten Produkts wurde jedoch ein Diastereomerenverhältnis von 1.1 : 2.0 : 1.9 ermittelt. Es muß also entweder zu einer intrinsischen Diastereoselektivität bei der Umsetzung von **93** mit d4T **4** gekommen sein, oder aber das Diastereomerenverhältnis wurde durch teilweisen Verlust eines Diastereomers bei der Chromatographie verändert. In diesem Zusammenhang soll betont werden, daß bereits die Phosphor-Zentren in den Saligenylchlorphosphiten stereogen sind. Die Konfiguration der Phosphor-Zentren wird also bereits bei der Umsetzung des Salicylalkohol-Derivates mit Phosphor(III)-chlorid festgelegt, die nachfolgende Umsetzung zum Nucleotid verläuft dann vermutlich unter Inversion dieser Konfiguration (Inversion für die Reaktion des Chlorphosphits mit dem Nucleosid-Analogon, Retention für die Oxidation). Es ist im Übrigen weder angesichts der für **46** erhaltenen NMR-Spektren noch aufgrund der Struktur dieser Verbindung davon auszugehen, daß sie Atropisomere durch Einschränkung der Rotation um die Aryl-Aryl-Bindungsachse bilden könnte. Der Verzweigungsgrad der unmittelbar an der 2- bzw. 2'-Position des Biaryl-Systems befindlichen Substituenten ist hierfür einfach zu gering, und die sterisch anspruchsvollen Nucleosyl-Reste befinden sich in zu großer Entfernung von der Aryl-Aryl-Bindungsachse und weisen zu viele Freiheitsgrade auf, als daß sie eine solche permanente Einschränkung der Rotation bewirken könnten. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Arbeiten von Wolf und König zu axial chiralen Biphenylen verwiesen^[120,121]. Es wäre zwar denkbar, die Koaleszenztemperatur für das Phänomen einer axialen Chiralität bei **46** beispielsweise durch Tieftemperatur-NMR-Spektroskopie zu ermitteln, dies sollte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erfolgen.

Da die Ausbeute bei der Synthese von **46** nach der Chlorphosphit-Methode trotz allem unbefriedigend erschien, wurde vor der Darstellung von Bis-(5-methyl-*cycloSal*-d4TMP) **47** nach einer besseren Möglichkeit zur Überführung des Alkohols **91** in die Zielverbindung **46** gesucht. Hierbei bot sich die Verwendung von Phosphoramidit-Chemie an. Die Nützlichkeit von Phosphoramiditen zur Phosphitylierung von Hydroxylfunktionen ist aus der automatisierten festphasengestützten DNA-Synthese hinlänglich bekannt. Auch für die Synthese von *cycloSal*-Nucleotiden war die Anwendung von cyclischen *N,N*-Di-*iso*-propylaminophosphoramiditen bereits etabliert worden, wobei die entsprechenden Amidite durch Umsetzung der Saligenylchlorphosphite mit Di-*iso*-propylamin (DIPA) erhalten worden waren (Abb. 78)^[122].

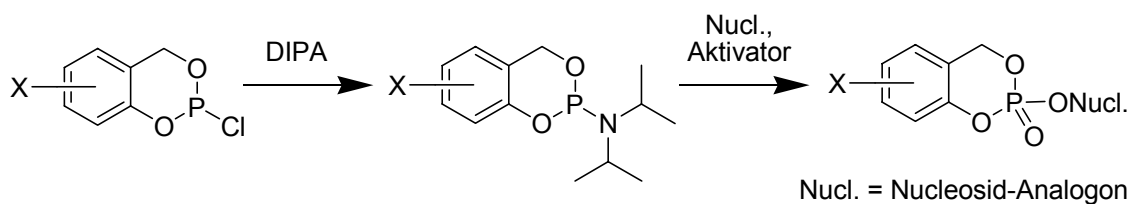


Abb. 78 Allgemeines Schema für die Synthese von *cycloSal*-Nucleotiden nach der Phosphoramidit-Methode

Für die Umsetzung zu den Saligenylphosphoramiditen waren die hochsiedenden Chlorphosphite zuvor durch Kugelrohrdestillation im Ölpumpenvakuum gereinigt worden, was die Methode auf niedermolekulare Saligenylchlorphosphite beschränkte. Für die abschließende Reaktion der Amidite zu den *cycloSal*-Nucleotiden war die Gegenwart eines schwach sauren Aktivators notwendig gewesen, wobei sich besonders Pyridinhydrochlorid als nützlich erwiesen hatte. Insgesamt waren mit der Phosphoramidit-Methode gerade bei der Synthese von *cycloSal*-d4T-Monophosphaten nach einer Optimierung der Bedingungen deutlich höhere Ausbeuten als bei Anwendung der Chlorphosphit-Methode erzielt worden, und die chromatographische Reinigung der Produkte war durch die geringere Anzahl an Nebenprodukten in vielen Fällen einfacher geworden.

Aufgrund der hohen Molmasse einer Verbindung wie **93** erschien eine Reinigung durch Kugelrohrdestillation aussichtslos, so daß sich im Zusammenhang mit einer möglichen Anwendung der Phosphoramidit-Methode auf die Darstellung von **46** die Frage stellte, ob Saligenylphosphoramidite auch aus den noch verunreinigten Saligenylchlorphosphiten synthetisierbar sind. Hierzu sollte in einer Modellreaktion das aus der Synthese von 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP (vergl. Kapitel 4.4.1) bekannte 3-Phenylsaligenylchlorphosphit **119**^[88,111] als verunreinigtes Rohprodukt mit DIPA zum Amidit umgesetzt werden. Dies machte zunächst die nochmalige Darstellung von **119** erforderlich. Aus 2-Hydroxybiphenyl wurde in einer regioselektiven Hydroxymethylierung nach Nagata über das Dioxaborin **120** der 3-Phenylsalicylalkohol **121** in einer Ausbeute von 61 % über zwei Stufen hergestellt, aus welchem die Synthese des Chlorphosphits **119** unter Standardbedingungen erfolgte (Abb. 79, S. 73). Es sei darauf hingewiesen, daß **121** in Abweichung von der ansonsten in dieser Arbeit verwendeten Benennung für Biaryle auch weiterhin als 3-Phenylsalicylalkohol bezeichnet werden soll, da dieser Name in den vorangegangenen Arbeiten etabliert worden war.

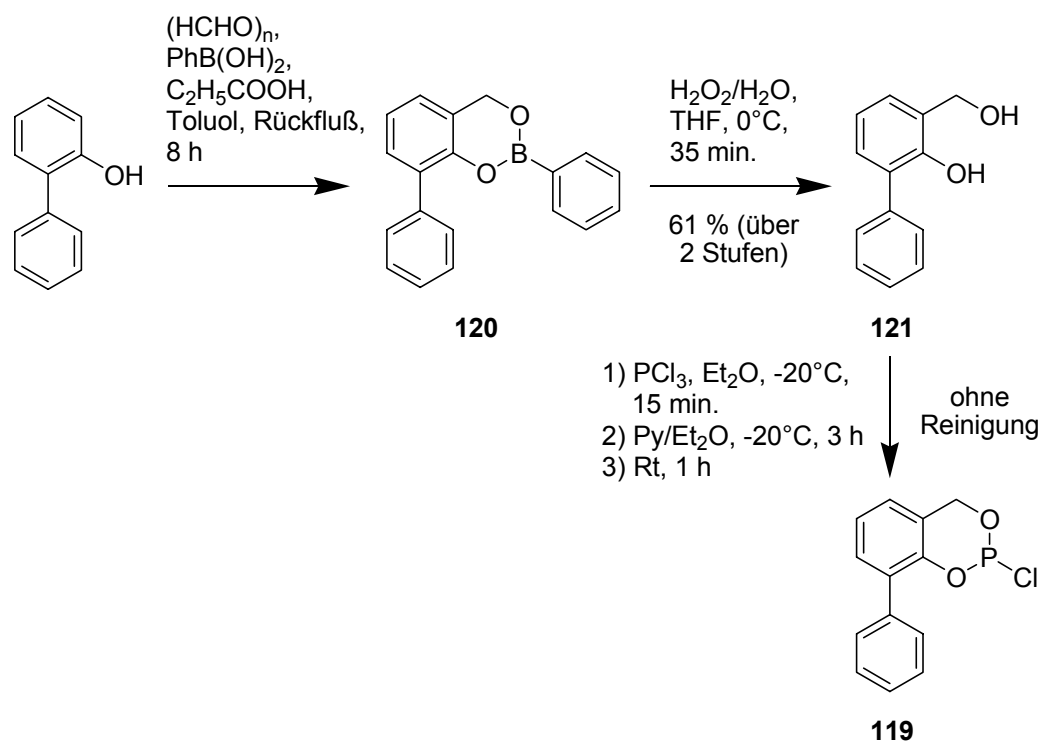


Abb. 79 Synthese von 3-Phenylsaligenylchlorphosphit **119**

Das so erhaltene noch verunreinigte Chlorphosphit **119** wurde nunmehr unter den für die Synthese der Saligenylphosphoramidite aus gereinigten Saligenylchlorphosphiten erarbeiteten Bedingungen mit DIPA in Diethylether umgesetzt, wobei DIPA sowohl als Nucleophil als auch als Base zum Abfangen des entstehenden Chlorwasserstoffs fungierte. Nach beendeter Reaktion wurde durch neutrales Aluminiumoxid filtriert, um die schwach sauren Salze komplett abzutrennen, welche das Amidit hätten aktivieren können. Das 3-Phenyl-saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphoramidit **122** konnte auf diese Weise jedoch nicht erhalten werden (Abb. 80).

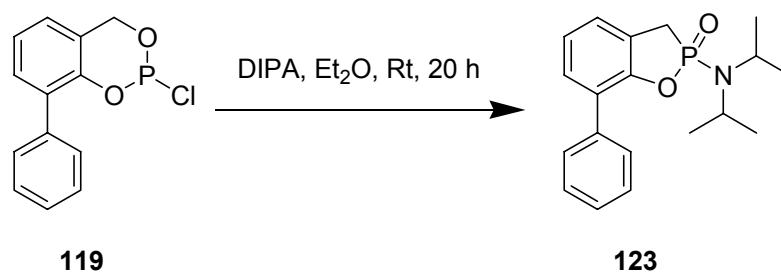


Abb. 80 Versuch der Synthese von 3-Phenylsaligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **122** (Modellreaktion)

Das unerwünschte Produkt **123** ist wahrscheinlich durch eine Arbusov-Michaelis-artige Umlagerung aus dem eigentlich gewünschten Amidit **122** entstanden. Die

Verbindung **123** erwies sich als luftstabil und konnte chromatographisch gereinigt werden. Eine Ausbeute lässt sich trotzdem nicht angeben, da **119** ja verunreinigt eingesetzt worden war. Eine solche Ring-kontraktive Umlagerung war zuvor bereits für den nach Umsetzung von Saligenylchlorphosphit mit d4T **4** erhaltenen Phosphitriester (noch vor der Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid) als Nebenreaktion nachgewiesen worden^[123]. Ein möglicher Mechanismus für die Entstehung von **123** ist in der Abbildung 81 gegeben.

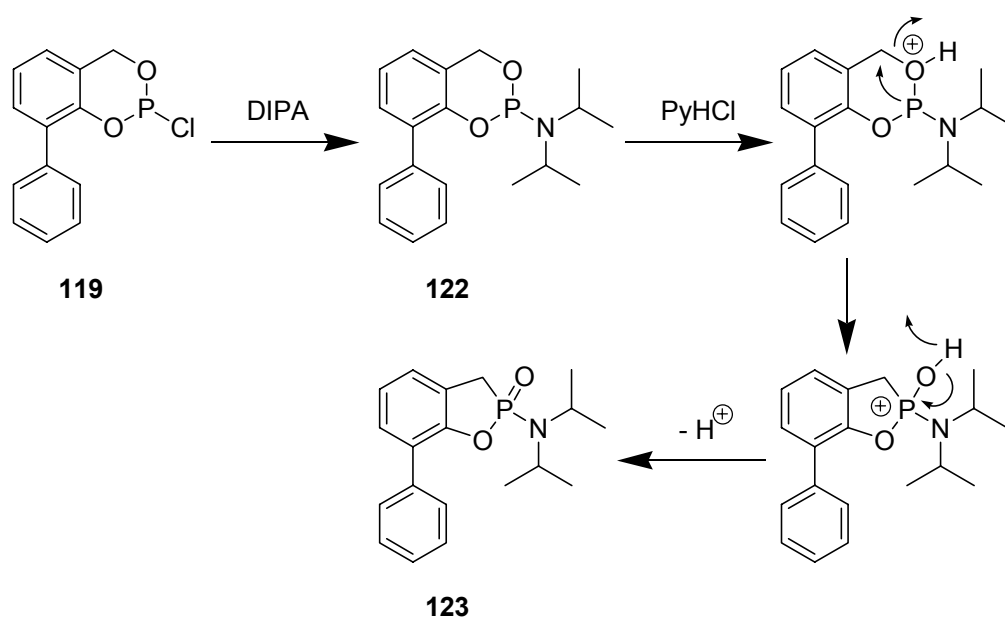


Abb. 81 Möglicher Mechanismus für die Entstehung des unerwünschten Produktes **123** bei der Umsetzung von 3-Phenylsaligenylchlorphosphit **119** mit DIPA

Nachdem das eigentlich zu synthetisierende Amidit **122** aus der Umsetzung von **119** mit DIPA entstanden war, wurde es wahrscheinlich durch noch aus der vorangegangenen Synthese von **119** als Verunreinigung vorhandenes Pyridinhydrochlorid aktiviert. Man sollte dabei eine Protonierung des basischen Stickstoff-Atoms vermuten, welche hier jedoch in Ermangelung eines geeigneten Nucleophils nicht zu einem Produkt führen würde. Es kommt daher wohl zur Protonierung des benzylichen Sauerstoffatoms, was aus jenem eine gute Austrittsgruppe macht. Dies ermöglicht den nucleophilen Angriff des Phosphor-Atoms mit seinem freien Elektronenpaar an das benzyliche Kohlenstoff-Atom. Die Hydroxylgruppe tritt aus, und es kommt zur Ringkontraktion. Nach Deprotonierung ergibt sich das stabile Produkt **123** und Pyridinhydrochlorid wird zurückgebildet, weswegen eine katalytische Menge dieser Verunreinigung zur quantitativen Umsetzung von **122** ausreicht.

Formal wird das Phosphor-Atom von Phosphor(III) zu Phosphor(V) oxidiert, während das benzyliche Kohlenstoffatom entsprechend reduziert wird.

Eine Verkürzung der Reaktionszeit von 20 Stunden auf drei Stunden, welche zu einem eventuellen Abfangen von **122** vor der Weiterreaktion hätte führen können, ergab keine Änderung im Ergebnis der Reaktion. Offensichtlich erfolgte die Umlagerung zu **123** ähnlich schnell, wenn nicht sogar schneller als die Bildung von **122**. Sie sollte sich jedoch vermeiden lassen, wenn es gelänge, die Abwesenheit des sauren Pyridinhydrochlorids im Rohprodukt des Saligenylchlorphosphits zu gewährleisten. Da die Abtrennung des Pyridinhydrochlorids durch Filtration niemals vollständig gelingen kann, bot es sich an, in der Synthese des Saligenylchlorphosphits Triethylamin statt Pyridin als Base zu verwenden. Der pK_s -Wert von Triethylaminhydrochlorid liegt mit 10.75 deutlich höher als der von Pyridinhydrochlorid ($pK_s = 5.23$), und daß ein Trialkylaminhydrochlorid die Synthese der Phosphoramidite nicht stört, ist angesichts der Entstehung von Di-*iso*-propylaminhydrochlorid bei der Reaktion offensichtlich. Der neue Syntheseansatz wurde zunächst in einer noch allgemeineren Modellreaktion, nämlich an der entsprechenden Umsetzung von Salicylalkohol und des unsubstituierten Saligenylchlorphosphits **124**, erprobt (Abb. 82).

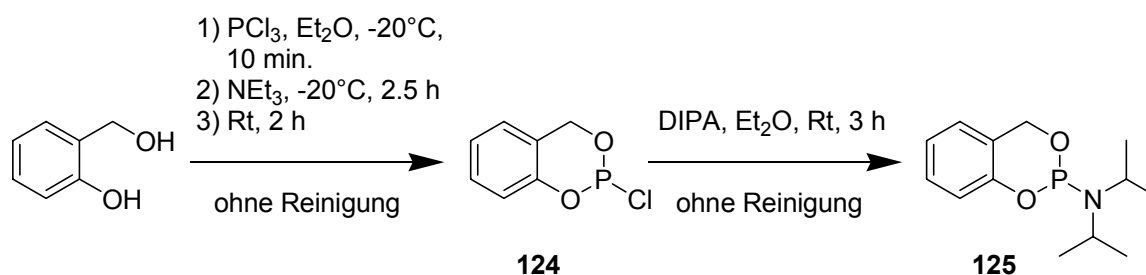


Abb. 82 Synthese von Saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **125** (Modellreaktion)

Zunächst wurde aus Salicylalkohol mit Phosphor(III)-chlorid unter Verwendung von Triethylamin statt Pyridin als Base das Saligenylchlorphosphit **124** dargestellt. Die Synthese verlief analog zu den ansonsten verwendeten Standardbedingungen, allerdings erwies sich die Filtration unter Inertgas zur Abtrennung des Triethylaminhydrochlorids aufgrund der klumpigen und klebrigen Konsistenz des Niederschlags als äußerst mühsam und langwierig. Auch mußte der Niederschlag mehrmals mit Diethylether gewaschen werden, um größere Verluste des Produkts zu vermeiden. Schließlich konnte **124** jedoch in noch verunreinigter Form, aber im Gegensatz zu

der bisherigen Synthesemethode frei von Pyridinhydrochlorid erhalten werden. Die anschließende Umsetzung zum Saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **125** mit DIPA in Diethylether verlief nunmehr problemlos, wobei auf die Reaktionszeit von drei Stunden zurückgegriffen wurde, die sich in der vorangegangenen Modellreaktion als offensichtlich ausreichend erwiesen hatte.

Es wurde nunmehr untersucht, ob mit dem so erhaltenen noch verunreinigten Saligenylphosphoramidit **125** erfolgreich ein *cyclo*Sal-Nucleotid synthetisiert werden konnte. Hierzu wurde **125** mit d4T **4** unter den etablierten Bedingungen (Pyridinhydrochlorid als Aktivator, Acetonitril als Solvens, Reaktionstemperatur 0°C) umgesetzt, wobei die Vollständigkeit der Reaktion dünnschichtchromatographisch überprüft wurde. Anschließend wurde der Phosphitriester wie üblich mit *tert*-Butylhydroperoxid zum Phosphatriester oxidiert, und nach chromatographischer Reinigung konnte das unsubstituierte *cyclo*Sal-d4TMP **85** in einer Ausbeute von 54 % erhalten werden (Abb. 83).

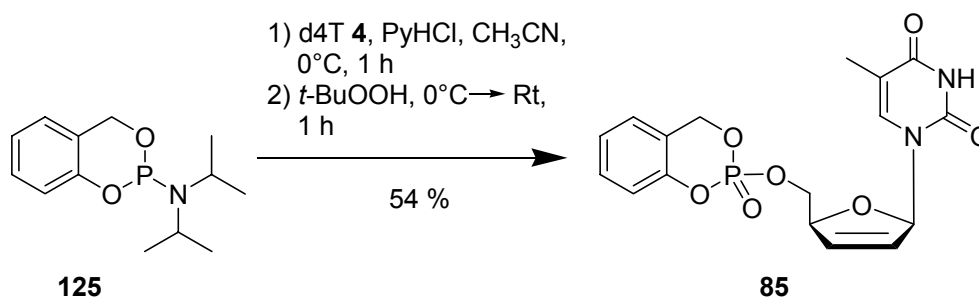


Abb. 83 Synthese von *cyclo*Sal-d4TMP **85** nach der Phosphoramidit-Methode (Modellreaktion)

Die auf diesem Weg erzielte Ausbeute an **85** war zwar nicht wesentlich besser als die üblicherweise mit der Chlorphosphit-Methode erhaltenen Ausbeuten, allerdings verlief die chromatographische Reinigung des Produkts aufgrund der geringeren Anzahl von Nebenprodukten ausgesprochen problemlos. Eine Anwendung der modifizierten Phosphoramidit-Methode auf die Synthese von Bis-(*cyclo*Sal-d4TMP) **46** erschien somit attraktiv, wenn auch der Ausbeute-Vorteil durch die Verwendung eines nicht gereinigten Saligenylchlorphosphits offensichtlich teilweise verloren geht.

Es wurde daher zunächst das Bis-(saligenylchlorphosphit) **93** aus dem Salicylalkohol-Derivat **91** in Analogie zur Modellreaktion (Synthese von **124**) durch Umsetzung mit Phosphor(III)-chlorid unter Pyridin-freien Bedingungen mit

Triethylamin als Base dargestellt. Für diese Synthese gelten prinzipiell die gleichen Bemerkungen bezüglich der Schwierigkeiten bei der Filtration wie bereits für die Darstellung von **124**. Nachdem **93** auf diesem Weg in noch verunreinigter Form erhalten werden konnte, erfolgte die Reaktion zum Bis-(saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphoramidit) **126** ebenfalls in Übereinstimmung mit der Modellreaktion, also der Darstellung von **125** (Abb. 84).

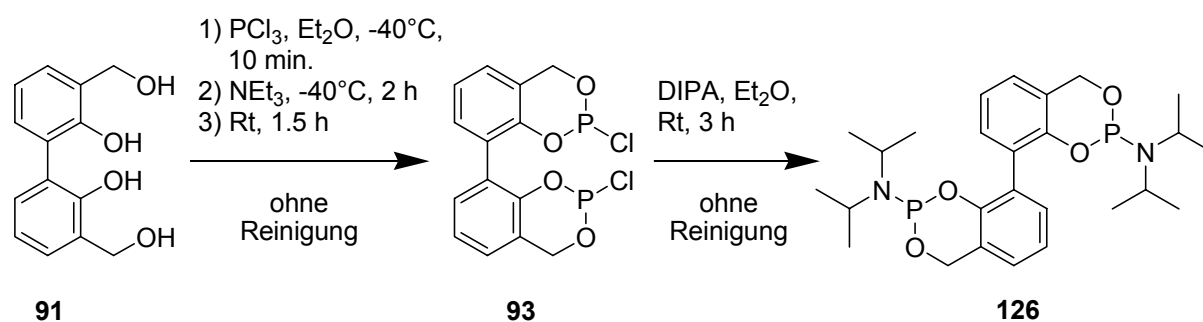


Abb. 84 Synthese von Bis-(saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit) **126** in Analogie zu der Modellreaktion (Synthese von Saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit **125**)

Das noch verunreinigte Produkt **126** konnte wie schon das Chlorphosphit **93** als Gemisch von zwei Diastereomeren erhalten werden, von denen eines ein Enantiomerenpaar war (Konfiguration an den zwei Phosphor-Zentren: R_P/S_P bzw. R_P/R_P und S_P/S_P für das Enantiomerenpaar). Im Gegensatz zu **93** waren jedoch im ^{31}P -NMR-Spektrum von **126** zwei klar getrennte Signale zu erkennen, so daß das Diastereomerenverhältnis durch Integration ermittelt werden konnte. Es betrug 0.7 : 1.0. Besonders hervorzuheben ist, daß das Produkt **126** nur noch ausgesprochen gering verunreinigt war. So waren beispielsweise die Siebenring-Nebenprodukte aus der Synthese von **93**, die ja immerhin 13 % des Rohproduktes dieses Chlorphosphits ausgemacht hatten, nicht mehr nachzuweisen, ohne daß sich nachvollziehen ließ, wie es zur Abtrennung dieser Spezies gekommen war.

Das Phosphoramidit **126** wurde nunmehr mit d4T **4** zur Reaktion gebracht, um so die Zielverbindung **46** unter Anwendung der Phosphoramidit-Methode zu erhalten. Auch hierbei wurde die Durchführung der Modellreaktion (Synthese von **85**) übernommen (Abb. 85, S. 78).

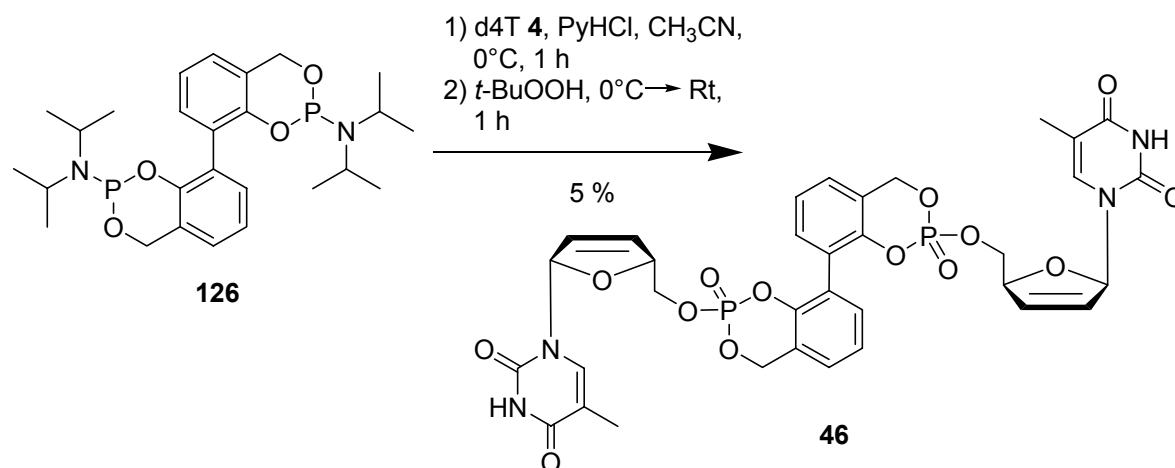


Abb. 85 Synthese von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** nach der Phosphoramidit-Methode unter Verwendung von Bis-(*saligenyl-N,N-di-iso-propylphosphoramidit*) **126**

Die Reaktion verlief gemäß der dünn-schichtchromatographischen Kontrolle gut, allerdings erwies sich die abschließende chromatographische Reinigung entgegen den Erwartungen als äußerst diffizil. Nach mehreren Trennungen am Chromatotron war das Produkt (ein Gemisch aus drei Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 2.0 : 2.0) noch mit *Di-iso-propylaminhydrochlorid* verunreinigt. Da **46** sich als recht polare Verbindung offenbarte, deren R_f -Wert in der Dünnschichtchromatographie beispielsweise nur wenig größer als der von d4T **4** war, mußte zur Elution des Produkts ein relativ großer Methanol-Anteil im Eluenten verwendet werden, so daß das verhältnismäßig lipophile Salz *Di-iso-propylaminhydrochlorid* coeluiert wurde. Die vollständige Abtrennung dieses Salzes gelang erst durch präparative RP-HPLC. Bei der HPLC-Reinigung gelang auch die teilweise Trennung der drei Diastereomere (Abb. 86).

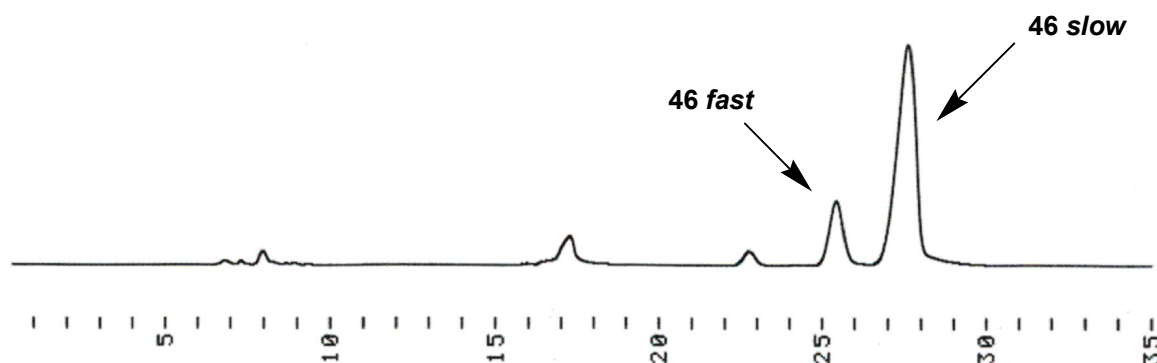


Abb. 86 Trennung des Rohproduktes von **46** mittels präparativer RP-HPLC

Im Folgenden sollen die getrennten Fraktionen entsprechend ihrem Elutionsverhalten bei der HPLC-Trennung mit **46 fast** und **46 slow** bezeichnet werden. Bei **46 fast** handelte es sich laut den NMR-Spektren dieser Fraktion um ein einzelnes Diastereomer, welches aufgrund seines geringen Anteils am Gesamtgemisch als das unterschüssige Diastereomer aus dem Rohprodukt identifiziert wurde. Die beiden überschüssigen Diastereomere, welche sich nicht weiter trennen ließen, bildeten laut den NMR-Spektren die Fraktion **46 slow** als Gemisch aus zwei Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 1.0. Addierte man die isolierten Mengen, so ergab sich eine Gesamtausbeute an **46** von nur 5 % nach HPLC-Trennung, was offensichtlich eine Folge der aufwendigen Reinigung des Produkts darstellte.

Um die Reinigung des mittels Phosphoramidit-Chemie dargestellten Bis-(*cycloSal-d4*TMPs) **46** zu erleichtern, mußte ein Weg gefunden werden, die Entstehung von Di-*iso*-propylaminhydrochlorid zu verhindern. Hierfür bot es sich an, anstelle des Bis-(saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphoramidits) **126** die entsprechende *N,N*-Diethylamino-Verbindung **127** darzustellen und für die Umsetzung zu **46** zu verwenden. Diethylphosphoramidite stellen ebenfalls etablierte Phosphitylierungsreagenzien dar, und bei ihrer Umsetzung mit Hydroxylgruppen unter Aktivierung mit Pyridinhydrochlorid sollte anstelle von Di-*iso*-propylaminhydrochlorid das hydrophilere Diethylaminhydrochlorid entstehen. Dieses sollte sich im vorliegenden Fall leichter von der recht polaren Verbindung **46** abtrennen lassen. Es wurde daher zunächst aus dem unter Verwendung von Triethylamin als Base synthetisierten Bis-(saligenylchlorphosphit) **93** durch Reaktion mit Diethylamin in Analogie zur Synthese von **126** das Bis-(saligenyl-*N,N*-diethylaminophosphoramidit) **127** dargestellt (Abb. 87).

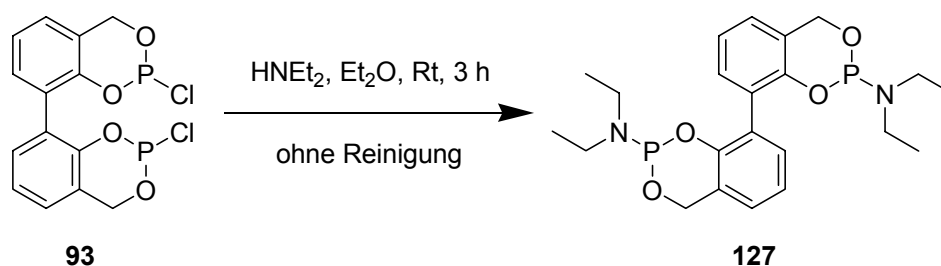


Abb. 87 Synthese von Bis-(saligenyl-*N,N*-diethylphosphoramidit) **127**

Das Produkt **127** wurde als Gemisch von zwei Diastereomeren erhalten, von denen eines ein Enantiomerenpaar war. Aus dem ³¹P-NMR-Spektrum wurde ein Diastereomerenverhältnis von 1.0 : 0.7 ermittelt, was offensichtlich deutlich von dem für **126**

ermittelten Verhältnis (0.7 : 1.0) abwich. Aufgrund des stereospezifischen und quantitativen Verlaufs der Umsetzung von **93** mit DIPA bzw. Diethylamin ist jedoch zu bezweifeln, daß dieser Teilschritt der Synthesesequenz unter Bevorzugung eines Diastereomers abgelaufen sein könnte. Die Diastereoselektivität ist daher bereits im ersten Syntheseschritt, also bei der Darstellung von **93** zu vermuten. Dies würde sich mit den ermittelten Diastereomerenverhältnissen von **126** und **127** vereinbaren lassen, wenn man annimmt, daß sich die Abfolge der Signale der Diastereomere im ^{31}P -NMR-Spektrum beim formalen Übergang von **126** zu **127** umkehrt, da die ermittelten Verhältnisse dann identisch wären. Spektroskopisch läßt sich diese Hypothese jedoch nicht sicher belegen, noch zumal für **93** keine ausreichende Separation der Signale der beiden Diastereomere in den ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren vorlag.

Die anschließende Umsetzung von **127** zu **46** wurde wie die entsprechende Reaktion mit dem Amidit **126** durchgeführt (Abb. 88).

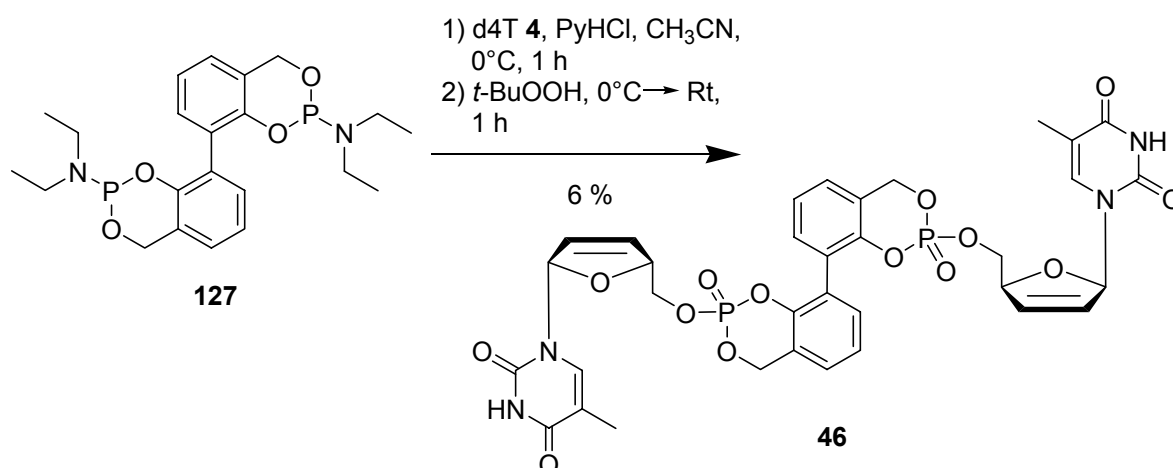


Abb. 88 Synthese von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** nach der Phosphoramidit-Methode unter Verwendung von Bis-(saligenyl-*N,N*-diethylphosphoramidit) **127**

Zwar ließ sich bei dieser Reaktion das entstandene Salz Diethylaminhydrochlorid problemlos abtrennen, jedoch war die chromatographische Reinigung ansonsten unverändert schwierig. Das Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** konnte schließlich in 6 % Ausbeute und mit einem den vorangegangenen Reaktionen ähnlichen Diastereomerenverhältnis (1.0 : 2.5 : 2.5) isoliert werden. Weder mit dem Amidit **126** noch mit **127** als Phosphitylierungsreagenz konnte somit eine Verbesserung der mit der Chlorphosphit-Methode erzielten Ausbeute (8 %) erreicht werden. Möglicherweise ließe sich die Ausbeute der Reaktion von **127** zu **46** durch eine weitere Modifikation

der Bedingungen, beispielsweise der verwendeten Äquivalente von **127**, noch etwas verbessern. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht. Ein Teil des erhaltenen Produktes **46** wurde auch hier mittels präparativer RP-HPLC in **46 fast** und **46 slow** getrennt, um ausreichend Substanz der teilweise getrennten Diastereomere für die nachfolgenden Untersuchungen zur Verfügung zu haben.

An dieser Stelle soll nochmals auf den stereochemischen Verlauf der Umsetzung des Alkohols **91** zum Chlorphosphit **93** und der Zielverbindung **46** eingegangen werden. Es wurde bereits begründet, warum in der Reaktion von **91** zu **93**, bei der die stereogenen Phosphor-Zentren gebildet wurden, eine leichte Diastereoselektivität zu vermuten ist, so daß angenommen werden kann, daß in diesem Syntheseschritt bereits das für die Phosphoramidite **126,127** nachgewiesene Diastereomerenverhältnis von 0.7 : 1.0 anfiel. Bedenkt man, daß es sich bei **93** um ein Gemisch von zwei Diastereomeren handelte, von denen eines ein Enantiomerenpaar war (Konfiguration an den zwei Phosphor-Zentren: R_P/S_P bzw. R_P/R_P und S_P/S_P für das Enantiomerenpaar), so läßt sich das prinzipiell in allen drei Synthesen von **46** gefundene Diastereomerenverhältnis von ungefähr 1 : 2 : 2 möglicherweise begründen. Das Enantiomerenpaar R_P/R_P und S_P/S_P wurde bei der Reaktion mit d4T **4** weiter desymmetrisiert, lieferte also zwei der drei Diastereomere von **46**. Wenn man nun annimmt, daß das Enantiomerenpaar das überschüssige Diastereomer von **93** darstellte, also das „like“-Produkt von **93** bevorzugt gebildet worden war, und daß ferner eines der beiden Enantiomere bevorzugt zu **46** umgesetzt wurde, so kann dies rein rechnerisch in dem ermittelten Diastereomerenverhältnis von 1 : 2 : 2 für **46** münden. Gleiches wäre jedoch auch möglich, wenn das „unlike“-Diastereomer von **93** (R_P/S_P -Konfiguration) einfach schlechter mit d4T **4** reagierte. Eine definitive Aussage läßt sich hierzu noch nicht treffen (vergl. Kapitel 4.4.7).

Da die Chlorphosphit-Methode trotz aller Versuche zur Anwendung von Phosphoramidit-Chemie für die Synthese von **46** die beste Ausbeute geliefert hatte, lag es nahe, diesen Ansatz auch für die Überführung des Salicylalkohol-Derivates **95** in das Bis-(5-methyl-cycloSal-d4TMP) **47** zu verwenden. Zunächst wurde daher **95** mit Phosphor(III)-chlorid und Pyridin als Base zur Reaktion gebracht, um so das Bis-(5-methylsaligenylchlorphosphit) **94** zu erhalten. Dabei wurde die Reaktion wie schon zuvor bei der Darstellung von Bis-(saligenylchlorphosphit) **93** aus dem Salicylalkohol-Derivat **91** bei -40°C durchgeführt, um auf diese Weise die Bildung von Siebenring-Nebenprodukten zu unterdrücken (Abb. 89, S. 82). Für die Stereochemie

des noch verunreinigten Produktes **94** gelten prinzipiell die gleichen Bemerkungen wie zuvor für **93**. Die spektroskopische Ermittlung des Diastereomenverhältnisses war nicht möglich.

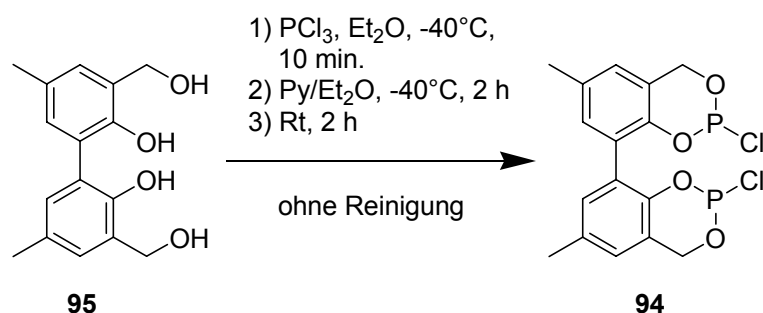


Abb. 89 Synthese von Bis-(5-methylsaligenylchlorphosphit) **94**

Für die anschließende Umsetzung von **94** zum Bis-(5-methyl-cycloSal-d4TMP) **47** wurden die für die Synthese von Bis-(cycloSal-d4TMP) **46** aus **93** verwendeten Bedingungen erheblich modifiziert. Da vermutet worden war, daß der große Chlorphosphit-Überschuß (2.0 Äquivalente **93** bei hypothetischer Reinheit) für die niedrige Ausbeute von **46** mitverantwortlich gewesen sein könnte, wurden nur etwa 0.8 Äquivalente von **95** (ebenfalls bei hypothetischer Reinheit) eingesetzt. Dabei wurde eine eventuell nicht vollständige Umsetzung von d4T **4** in Kauf genommen. Auch erfolgte die Zugabe von **94** zum Reaktionsansatz nicht in einer Portion, sondern in mehreren Portionen über einen Zeitraum von insgesamt sechs Stunden. Die abschließende Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid wurde auf die übliche Weise durchgeführt (Abb. 90).

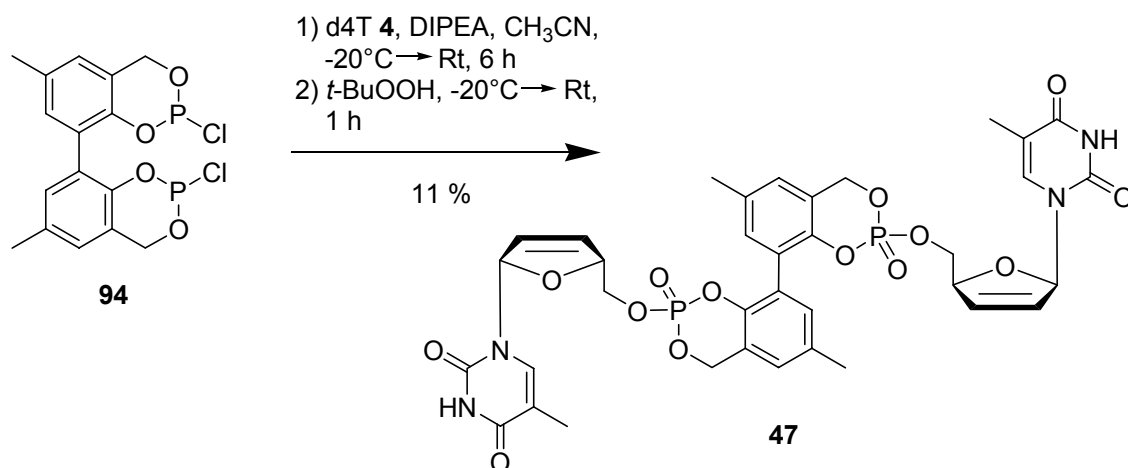


Abb. 90 Synthese von Bis-(5-methyl-cycloSal-d4TMP) **47**

Da die Umsetzung von d4T **4** im Phosphitylierungsschritt gemäß der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung in der Tat nicht vollständig gewesen war, und da auch das Bis-(*cycloSal*-Nucleotid) **47** sich wie schon zuvor **46** als ähnlich polar wie d4T **4** erwies, gestaltete sich die vollständige chromatographische Abtrennung des nicht umgesetzten d4T **4** schwierig. Trotzdem konnte das Produkt **47** schließlich in 11 % Ausbeute isoliert werden. Diese Ausbeute war nicht nur etwas höher als die für die Darstellung von **46** erzielte (8 %), durch den geringeren Chlorphosphit-Überschuß konnte auch eine größere Menge d4T **4** in der Reaktion eingesetzt werden, so daß die absolute Menge des isolierten Produkts **47** entsprechend hoch ausfiel (160 mg **47** aus 779 mg d4T **4**).

Das Bis-(5-methyl-*cycloSal*-d4TMP) **47** wurde gemäß den ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren nicht als Gemisch von drei, sondern lediglich von zwei Diastereomeren im Verhältnis 0.7 : 1.0 erhalten. Es wurde versucht, diese zwei Diastereomere in Analogie zu **46** mittels präparativer RP-HPLC zu trennen, was jedoch nicht gelang. Entweder war die Diastereoselektivität bei der Darstellung von **47** so ausgeprägt, daß das dem unterschüssigen Diastereomer von **46** entsprechende Isomer überhaupt nicht gebildet wurde (das Gemisch **47** würde dann stereochemisch **46 slow** entsprechen), oder aber dieses Diastereomer wurde bei der Reinigung am Chromatotron mit abgetrennt. Für die letztere Hypothese mag sprechen, daß entsprechend dem Elutionsverhalten von **46 fast** das unterschüssige Diastereomer polarer sein dürfte als die verbleibenden zwei Diastereomere. Es könnte daher eventuell zusammen mit dem nicht umgesetzten d4T **4** eluiert worden und somit im isolierten Produkt nicht mehr vorhanden gewesen sein. Dies ist natürlich zu bedenken, wenn man die für die Synthesen von **46** und **47** nach der Chlorphosphit-Methode erzielten Ausbeuten miteinander vergleicht.

4.4.6 Synthese der Referenzverbindung **92**

Für die Synthese der Referenzverbindung **92** galt es zunächst, das teilweise geschützte Salicylalkohol-Derivat **98** darzustellen (vergl. Kapitel 4.4.2). Da der mögliche Kreuzkupplungs-Ansatz zur Synthese von **98** gescheitert war (vergl. Kapitel 4.4.3), war es naheliegend, **98** durch eine einfache Isopropyliden-Schätzung des Salicylalkohol-Derivates **91** zu synthetisieren. Über die selektive einfache Isopropyliden-Schätzung eines symmetrischen Moleküls, das eigentlich zweifach mit

dieser Gruppe geschützt werden könnte, ist praktisch nichts bekannt. Es wurde daher zunächst versucht, **91** ähnlich wie die einfachen bromierten Salicylalkohol-Derivate **70,73,74** bei der Synthese der Acetale **65-67** unter Katalyse durch *para*-Toluolsulfonsäure mit 2,2'-Dimethoxypropan in einer Umacetalisierung reagieren zu lassen, wobei lediglich 1.1 Äquivalente 2,2'-Dimethoxypropan eingesetzt wurden. Als Lösungsmittel durfte natürlich nicht Aceton dienen, da dies vermutlich zu einer zweifachen Acetal-Bildung geführt hätte. Es wurden daher verschiedene inerte Solventien erprobt (Abb. 91).

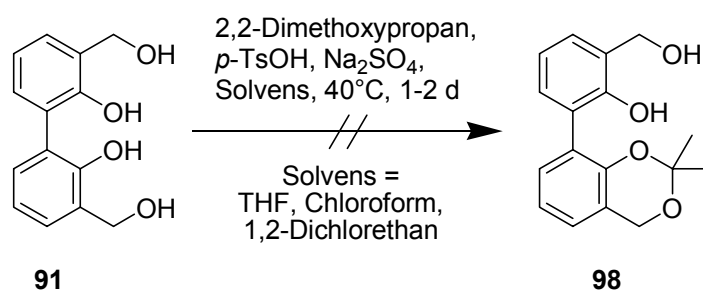


Abb. 91 Versuche zur Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98** durch direkte einfache Schützung von **91**

Für keines der drei verwendeten Lösungsmittel konnte das gewünschte Produkt **98** nach entsprechender Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung erhalten werden. Im Falle von THF und 1,2-Dichlorethan wurden untrennbare Produktgemische erhalten, für Chloroform als Solvens wurden gemäß dem ¹H-NMR-Spektrum offensichtlich Veretherungsprodukte erhalten, da technisches Chloroform mit etwa 4 % Ethanol stabilisiert ist. Dieser bildete mit **91** in Gegenwart von *para*-Toluolsulfonsäure wohl Ethylether, ähnlich wie bei der sauren Entschützung von **102** in einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch, bei der wesentliche Mengen des Methylethers **105** isoliert werden konnten (vergl. Kapitel 4.4.3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine direkte einfache Isopropyliden-Schützung von **91** nicht weiter versucht.

Das Erhalten von Produktgemischen für THF und 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel wurde so erklärt, daß durch die zwei freien benzylichen Hydroxylgruppen von **91**, die im sauren Milieu deutlich reaktiver als die phenolischen Hydroxylfunktionen sind, unter den gewählten Bedingungen zu viele Reaktionsmöglichkeiten für **91** existierten. Es mußte daher vor der Isopropyliden-Schützung zunächst eine der beiden benzylichen Hydroxylgruppen geschützt werden. Dies mußte möglichst selektiv

gegenüber der zweiten benzyllischen, aber auch gegenüber den beiden phenolischen Hydroxylfunktionen geschehen. Es bot sich daher eine sterisch anspruchsvolle, im sauren Milieu hinreichend stabile Schutzgruppe wie die *tert*-Butyldiphenylsilyl-(TBDPS)-Gruppe an. Die vollständige Schützung von Salicylalkohol-Derivaten mit dieser Gruppe war ja bereits in Kapitel 4.3.4 beschrieben worden. Für die selektive Schützung der benzyllischen gegenüber der phenolischen Hydroxylfunktion von Salicylalkohol-Derivaten mit Silylgruppen existieren Vorarbeiten von Sefkow und Kaatz^[124]. Die dort genannten Bedingungen (leichter Überschuß an TBDPS-Chlorid, Triethylamin als Base, Aktivierung des Silylchlorids mit *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP), Dichlormethan als Solvens) ließen sich jedoch nicht vollständig übertragen. Zum einen erschien ein Überschuß an TBDPS-Chlorid wenig sinnvoll, zum anderen war **91** in reinem Dichlormethan nur mäßig löslich, weswegen auf THF als Lösungsmittel ausgewichen wurde. Es wurden zunächst Vorversuche zur Synthese von 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **128** im kleineren Maßstab durchgeführt, um die im Sinne einer möglichst hohen Ausbeute an **128** besten Reaktionsbedingungen (Menge an TBDPS-Chlorid und DMAP) zu erarbeiten (Abb. 92).

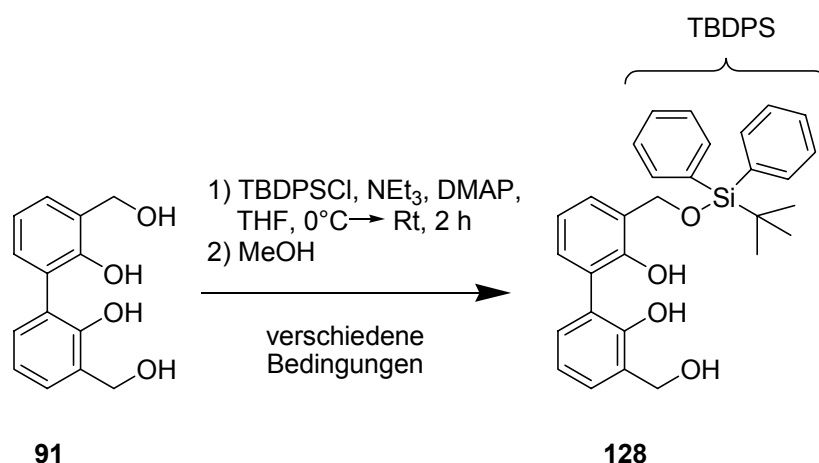


Abb. 92 Testreaktionen zur Synthese von 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **128**

Die nach Abbruch der Reaktion mit Methanol, Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung für die einzelnen Reaktionen erzielten Ausbeuten sind in der Tabelle 6 (S. 86) aufgeführt.

Nr.	Äquivalente TBDPS-Chlorid	Menge an DMAP	Ausbeute ^a
1	0.5	Spatelspitze	35 %
2	0.75	Spatelspitze	42 %
3	1.0	Spatelspitze	24 %
4	0.75	ohne	36 %

^abezogen auf 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**

Tab. 6 Testreaktionen zur Synthese von **128** durch selektive Silylierung von **91**

Bei den Reaktionen 1-3 wurde die Menge des eingesetzten TBDPS-Chlorids variiert, wobei sich 0.75 Äquivalente mit einer resultierenden Ausbeute von 42 % des Produktes **128** bezogen auf **91** als am günstigsten erwiesen (Reaktion 2). Reaktion 4 wurde analog zu Reaktion 2, aber ohne den Aktivator DMAP durchgeführt, was jedoch zu einer etwas schlechteren Ausbeute (36 %) führte.

Die ermittelten Reaktionsbedingungen wurden auf eine Synthese von **128** im größeren Maßstab angewendet. Dabei konnte nach säulenchromatographischer Reinigung nicht nur **128** in 53 % Ausbeute, welche somit sogar besser als die der Testreaktion war, erhalten werden, sondern es wurde auch noch das zweifach silylierte Nebenprodukt 3,3'-Bis-(*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **129** in 11 % Ausbeute isoliert (Abb. 93). Dieses könnte man bei Bedarf wahrscheinlich wieder zum Edukt **91** entschützen.

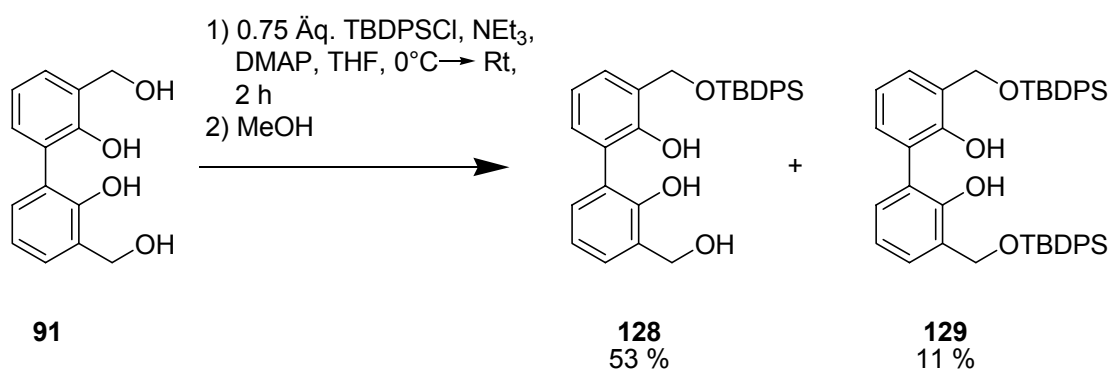


Abb. 93 Synthese von 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **128**

Die Verbindung **128** sollte nunmehr Isopropyliden-geschützt werden. Hierzu wurden die bereits für die Darstellung der Acetale **65-67** angewendeten Bedingungen genutzt

(vergl. Kapitel 4.3.2), wobei bei der Aufarbeitung natürlich auf das Waschen mit Natronlauge zur Entfernung des nicht umgesetzten Salicylalkohols verzichtet werden mußte, da auch das Produkt 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-*O*-isopropylidenacetal **130** noch eine phenolische Hydroxylgruppe besaß. Das Isopropylidenacetal **130** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 60 % Ausbeute erhalten werden (Abb. 94).

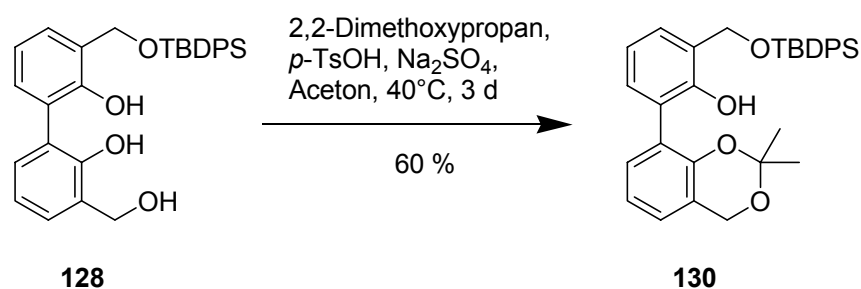


Abb. 94 Synthese von 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-*O*-isopropylidenacetal **130**

Da eine thermodynamische Reaktionskontrolle vorlag, wurde selektiv das thermodynamisch stabilere Sechsring-Produkt **130** und kein Siebenring-Produkt erhalten. Die Ausbeute war deutlich niedriger als die bei der Synthese der bromierten Salicylalkoholisopropylidenacetale **65-67**. Dies ist wahrscheinlich auf die unter den sauren Reaktionsbedingungen doch begrenzte Stabilität der TBDPS-Schutzgruppe zurückzuführen, die im Sinne einer sauren Silyletherspaltung abgespalten werden kann. Ohne Schutzgruppe an einer benzylichen Hydroxylfunktion kommt es zur vollständigen Isopropyliden-Schützung der Verbindung und somit zur Bildung von **102**. In der Tat wurde in Testansätzen festgestellt, daß die Stabilität der Silylgruppe entscheidend von der Konzentration der *para*-Toluolsulfonsäure und somit von der verwendeten Menge des Lösungsmittels abhing. Trotzdem ist davon auszugehen, daß die nur mäßige Ausbeute zum Teil auf die Bildung von **102** zurückzuführen war, auch wenn dieses Nebenprodukt nicht isoliert wurde.

Nach der Synthese von **130** mußte nur noch die Silyl-Schutzgruppe mit Fluorid abgespalten werden, um das gewünschte Salicylalkohol-Derivat **98** zu erhalten. Es kam dabei entscheidend auf die Wahl des richtigen Reagenzes an. Während sich mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF nur eine Ausbeute von 7 % an **98** ergab, konnte **98** durch Reaktion von **130** mit Ammoniumfluorid in Methanol, entsprechende Aufarbeitung und abschließende chromatographische Reinigung in 89 % Ausbeute

isoliert werden (Abb. 95). Die Gesamt-Ausbeute für die Darstellung von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98** ausgehend von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91** über drei Stufen betrug somit 28 %.

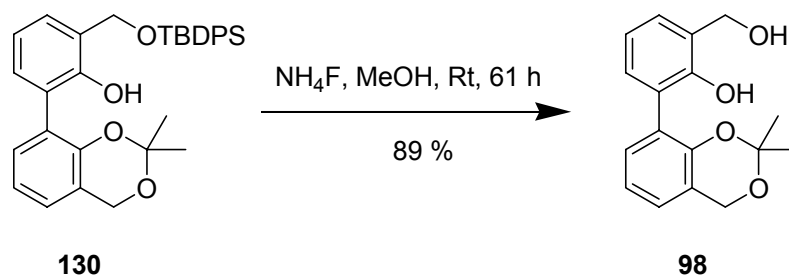


Abb. 95 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98** durch Entschützung von **130** mit Ammoniumfluorid

Das auf diese Weise erhaltene Salicylalkohol-Derivat **98** wurde nunmehr über das Saligenylchlorphosphit **97** zum in der Aryl-Einheit noch geschützten *cyclo*Sal-d4T-Monophosphat **96** umgesetzt (Abb. 96).

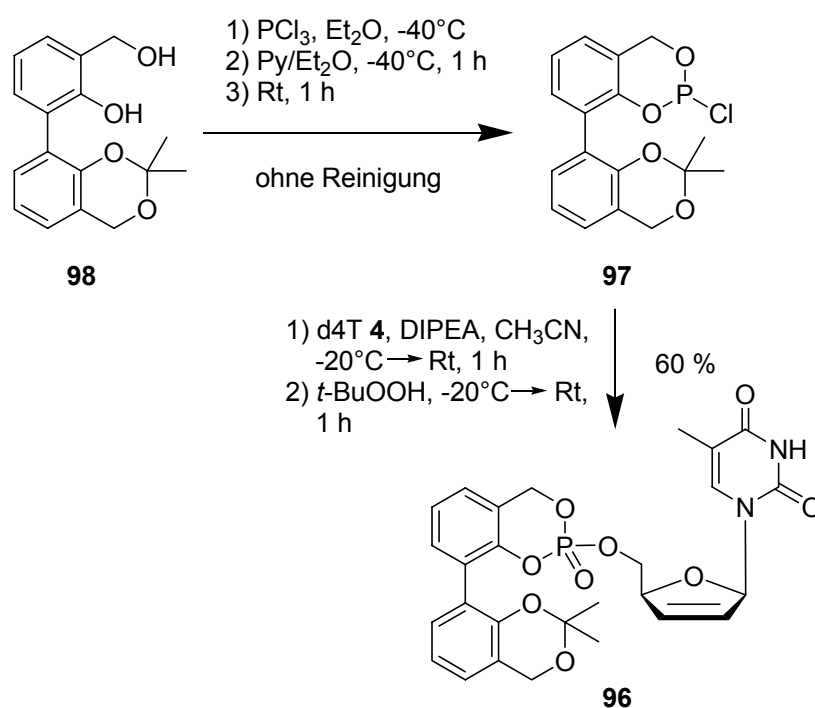


Abb. 96 Synthese von 3-(Isopr-Sal)-*cyclo*Sal-d4TMP **96**

Die etablierte Synthesevorschrift für die Anwendung der Chlorphosphit-Methode für die Darstellung von *cyclo*Sal-Nucleotiden wurde hierbei etwas abgewandelt. Bei der Darstellung des Chlorphosphits **97** wurde die Reaktionstemperatur auf -40°C abgesenkt und die Reaktionszeit verkürzt, um einer möglichen Spaltung der

Isopropyliden-Schutzgruppe durch den intermediär freiwerdenden Chlorwasserstoff vorzubeugen. Für die anschließende Reaktion zum *cycloSal*-Nucleotid **96** wurde bedacht, daß für die Synthese des Chlorphosphits **97** insgesamt, also ausgehend von *ortho*-Bromphenol als Ausgangsmaterial für das Salicylalkohol-Derivat **91** und somit auch für **98**, neun Stufen aufgewendet worden waren. Es erschien daher wenig sinnvoll, einen größeren Überschuß von **97** aufzuwenden, um die vollständige Umsetzung des gerade einmal in drei Stufen hergestellten d4T **4** zu gewährleisten, noch zumal mit einer Verringerung des Chlorphosphit-Überschusses bei der Synthese von **47** gute Erfahrungen gemacht worden waren. Daher wurde die Menge des eingesetzten Saligenylchlorphosphits **97** auf 1.2 Äquivalente (bei hypothetischer Reinheit) reduziert und auch entsprechend weniger DIPEA (1.5 Äquivalente) und *tert*-Butylhydroperoxid (3.0 Äquivalente) verwendet. Auf diese Weise wurde **96** nach chromatographischer Reinigung in der für solche Umsetzungen sehr guten Ausbeute von 60 % erhalten, was natürlich die Frage aufwirft, ob die für die Synthese der *cycloSal*-d4TMPs etablierten Synthesebedingungen nicht noch einmal systematisch überprüft werden müßten. Entsprechend des verringerten Überschusses von **97** konnte mehr d4T **4** eingesetzt werden, so daß eine angesichts der Stufenzahl (die Reaktion von **97** zu **96** war die zehnte konsekutive Stufe) sehr gute absolute Ausbeute (525 mg **96**) resultierte. Das *cycloSal*-d4TMP **96** fiel wie für die einfachen *cycloSal*-Nucleotide üblich als Gemisch von zwei Diastereomeren an (R_P/S_P), welche sich in diesem Fall mittels präparativer RP-HPLC in die reinen Diastereomere **96 fast** und **96 slow** trennen ließen (Abb. 97).

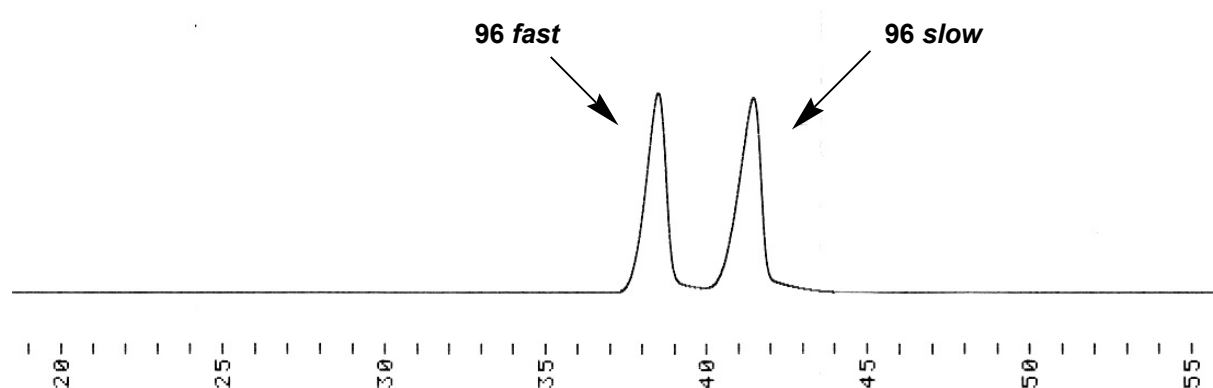


Abb. 97 Trennung der Diastereomere von **96** mittels präparativer RP-HPLC

Um die Referenzverbindung **92** zu erhalten, mußte nunmehr nur noch **96** sauer entschützt werden. Da die Diastereomere von **96** im präparativen Maßstab getrennt werden konnten, bot es sich an, diese abschließende Umsetzung mit den getrennten Diastereomeren durchzuführen, um auf diese Weise **92** diastereomerenrein zu erhalten. Um Irritationen zu vermeiden, soll nachfolgend das Produkt aus der Entschützung von **96 fast** mit **92 fast** und das aus der Entschützung von **96 slow** mit **92 slow** bezeichnet werden, ohne daß damit eine Aussage zu den relativen Retentionszeiten von **92 fast** und **92 slow** getroffen werden soll.

Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß die Entschützung von **96** mit saurem Ionentauscher besser verlief als mit TFA, wurde diese Entschützungsmethode angewendet (vergl. Kapitel 4.3.3). Um die Reaktionen verfolgen zu können, wurden den Ansätzen Proben entnommen, aufgearbeitet und mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nach Abbruch der Reaktionen wurden die Rohprodukte mittels präparativer RP-HPLC gereinigt, um so schließlich **92 fast** und **92 slow** diastereomerenrein in 54 bzw. 46 % Ausbeute erhalten zu können (Abb. 98).

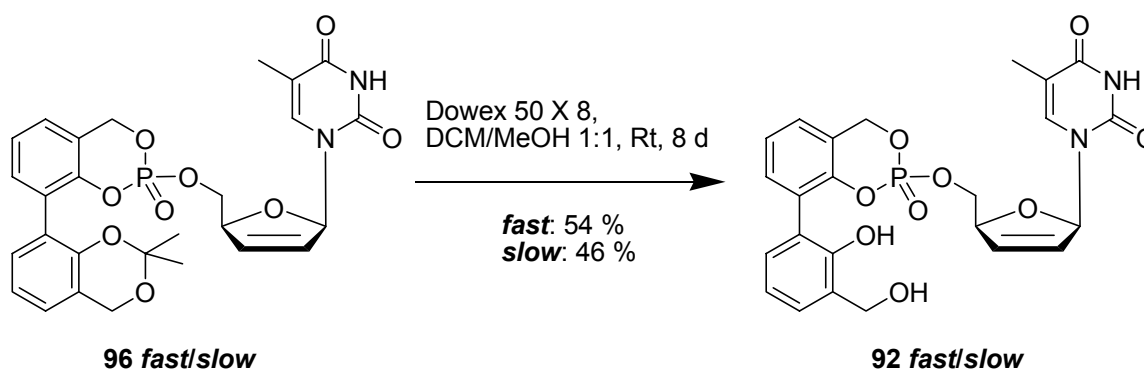


Abb. 98 Synthese von 3-Sal-cycloSal-d4TMP **92** in diastereomerenreiner Form

Daß die erzielten Ausbeuten bei der Entschützung lediglich befriedigend waren, ist damit zu begründen, daß sich nach einiger Zeit Nebenprodukte bildeten. Es ist zu vermuten, daß auch hier eine Methylierung wie bei der sauren Entschützung von **102** eine Rolle spielte (vergl. Kapitel 4.4.3), was allerdings aufgrund der relativ geringen Menge der Nebenprodukte nicht sicher geklärt werden konnte. Wegen der mit fortschreitender Reaktionsdauer zunehmenden Bildung dieser Nebenprodukte mußten die Reaktionen vor der vollständigen Umsetzung von **96 fast** bzw. **96 slow** abgebrochen werden, was die Ausbeute-Verluste erklärt. Da **96 slow** (bei Abbruch noch zu 22 % im Gemisch) darüber hinaus etwas langsamer als **96 fast** (14 %)

reagierte, ist es konsequent, daß die isolierte Ausbeute von **92 slow** etwas geringer als die von **92 fast** war. Neben der Bildung methylierter Nebenprodukte ist auch eine saure Spaltung der Phosphatriester-Funktion zum d4T-Monophosphat und zum Salicylalkohol-Derivat denkbar, allerdings konnte das sehr polare d4TMP mit der RP-Analytik nicht sicher detektiert werden.

4.4.7 Charakterisierung der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** und der Referenzverbindung **92**

Die synthetisierten Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47**, die Referenzverbindung **92** und auch das Syntheseintermediat **96** wurden zunächst wie schon für die bromierten *cycloSal*-Nucleotide **79-81** und **82-84** beschrieben (vergl. Kapitel **4.3.6**) chemischen Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer bei pH 7.3 und 37°C unterzogen. Die ermittelten Hydrolyse-Halbwertszeiten sind zusammen mit den Werten für die Vergleichsverbindungen *cycloSal*-d4TMP **85**, 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **89** und 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131** in der Abbildung 99 angegeben.

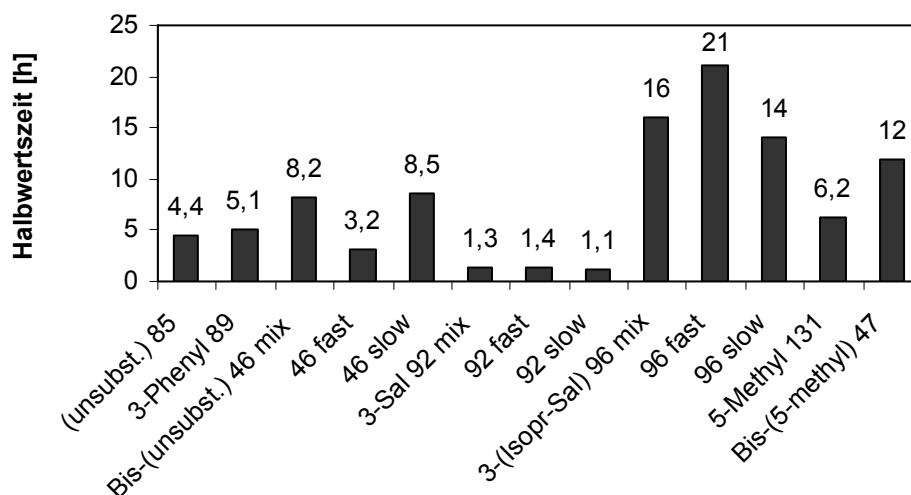


Abb. 99 Hydrolyse-Halbwertszeiten der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47**, der Referenzverbindung **92**, des Syntheseintermediates **96** sowie der Vergleichsverbindungen **85,89,131** in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Zunächst soll ein Vergleich der Diastereomergemische untereinander sowie mit den Vergleichsverbindungen erfolgen. Das am Aromaten nicht weiter substituierte Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** erwies sich mit einer Halbwertszeit von 8.2 Stunden als wesentlich stabiler als die Vergleichsverbindung 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **89** und

auch der unsubstituierte Prototyp **85**. Dem gegenüber war die Referenzverbindung 3-Sal-*cycloSal*-d4TMP **92** ($t_{1/2} = 1.3$ h) deutlich labiler als **89** und **85**, wobei der Wert für das Diastereomergemisch von **92** durch Mischen von gleichen Teilen der 50 mM Stammlösungen der getrennten Diastereomere erhalten worden war. Betrachtet man nun das in der Aryl-Einheit noch Isopropyliden-geschützte Syntheseintermediat 3-(Isopr-Sal)-*cycloSal*-d4TMP **96**, so ist eine massive Stabilisierung gegenüber **89** und **85**, aber auch gegenüber **92** festzustellen ($t_{1/2} = 16$ h). Alle diese Beobachtungen lassen sich durch sterische und Polaritätseffekte erklären. Der sterisch anspruchsvolle Nucleosyl-Rest in **46** erschwert wahrscheinlich den nucleophilen Angriff auf die Phosphat-Einheit, was eine Stabilisierung des Pronucleotids zur Folge hat. Ein solcher sterischer Effekt ist für die Isopropyliden-geschützte Verbindung **96**, die ja in unmittelbarer Nachbarschaft zur Phosphat-Einheit eine verzweigte Struktur besitzt, offensichtlich noch ausgeprägter. Fehlt die Isopropyliden-Schutzgruppe wie bei der Referenzverbindung **92**, so resultiert eine sehr polare Unterstruktur mit zwei freien Hydroxylgruppen in direkter Nachbarschaft zum Phosphat-Rest, und diese können durch einen assistierenden Effekt den Angriff des polaren Nucleophils fördern, was zur Labilisierung führt. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen für die *cycloSal*-BVDUMPs, bei denen auch eine freie Hydroxylgruppe, wenn auch am Glycon des Pronucleotids, eine Beschleunigung der Hydrolyse bewirkt (vergl. Kapitel 4.3.6). Daß das 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131** ($t_{1/2} = 6.2$ h) aufgrund des elektronenliefernden Effekts der Methylgruppe stabiler ist als **85** und daß dieser Stabilisierungseffekt geringer ausgeprägt ist als bei der 3-Methyl-Verbindung ($t_{1/2} = 17$ h, vergl. Kapitel 2.2), war bereits bekannt. Dementsprechend stimmte es auch mit den Erwartungen überein, daß das Bis-(5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP) **47** mit einer Halbwertszeit von zwölf Stunden stabiler als **46** war. Im Vergleich von **47** zum „Monomer“ **131** konnte eine ähnliche Stabilisierung des Bis-(*cycloSal*-Nucleotids) wie im Vergleich von **46** zum unsubstituierten Prototypen **85** festgestellt werden.

Es sollen nunmehr noch die Hydrolyse-Stabilitäten der getrennten Diastereomere miteinander verglichen werden. Während die zwei Diastereomere **92 fast** und **92 slow** der Referenzverbindung **92** praktisch identische Stabilitäten aufwiesen (**92 slow** war leicht labiler), ergab sich für die noch Isopropyliden-geschützte Verbindung **96** ein deutlicher Unterschied zwischen dem stabileren *fast*- und dem labileren *slow*-Isomer. Im Falle des Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46** konnten die drei

Diastereomere ja nicht vollständig getrennt werden (vergl. Kapitel 4.4.5), es läßt sich aber festhalten, daß sich das einzelne Diastereomer **46 fast** als ungefähr 2.5-fach labiler als das Gemisch aus zwei Diastereomeren **46 slow** erwies. Man kann also feststellen, daß die Unterschiede zwischen den Stabilitäten der Diastereomere umso gravierender ausfielen, je mehr sterische Effekte eine Rolle bei der Hydrolyse spielten.

Die geringe Stabilität der Referenzverbindung 3-Sal-*cycloSal*-d4TMP **92** gegenüber dem Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** hat potentiell Konsequenzen für den Hydrolysemechanismus von **46**. Selbst wenn man einen konsekutiven Hydrolyseverlauf für **46** annimmt (vergl. Kapitel 4.4.1), so dürfte **92** als Intermediat eigentlich nicht nachweisbar sein, da es deutlich schneller zerfällt als es gebildet wird. Um derartige Fragestellungen zu überprüfen, empfahl sich jedoch ein anderes etabliertes Verfahren für die Untersuchung der Hydrolyse von *cycloSal*-Nucleotiden, nämlich die ³¹P-NMR-Hydrolysestudien. Bei dieser Methode werden etwa 7 µmol des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids in einem Gemisch aus deuteriertem DMSO und einem phosphatfreien 50 mM Imidazol/Salzsäure-Puffer gelöst und bei Raumtemperatur (bei sehr stabilen Verbindungen auch bei 37°C) inkubiert. Unter diesen Bedingungen (Durchmischung nur durch Diffusion, hoher DMSO-Anteil) beträgt die Hydrolyse-Halbwertszeit Tage bis Wochen, so daß eine ³¹P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Reaktion problemlos möglich ist. Die einzelnen Hydrolyse-Produkte lassen sich durch ihre chemische Verschiebung leicht identifizieren. Eine solche Hydrolysestudie wurde zunächst für das Diastereomergemisch **46** durchgeführt, um die finalen Hydrolyseprodukte dieses Bis-(*cycloSal*-Nucleotids) zu ermitteln (Abb. 100, S. 94).

Das Edukt Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** als Gemisch aus drei Diastereomeren (repräsentiert durch drei Signale im ³¹P-NMR-Spektrum zu Beginn der Hydrolyse) wurde vollständig zu nur einem Phosphor-haltigen Produkt umgesetzt, welches aufgrund seiner chemischen Verschiebung (etwa 0.7 ppm) als d4T-Monophosphat (d4TMP) identifiziert werden konnte. Ein unerwünschter Phenylphosphatdiester, dessen chemische Verschiebung etwa -4 ppm beträgt, konnte nicht als Nebenprodukt nachgewiesen werden (vergl. Kapitel 2.2). Dies bedeutet, daß die Hydrolyse von **46** absolut selektiv zum gewünschten Produkt d4TMP verlief. Für den unsubstituierten Prototypen *cycloSal*-d4TMP **85** war 1 %, für 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **89** 3 % des unerwünschten Phenylphosphatdiesters als Anteil am Hydrolyseprodukt gefunden worden^[62].

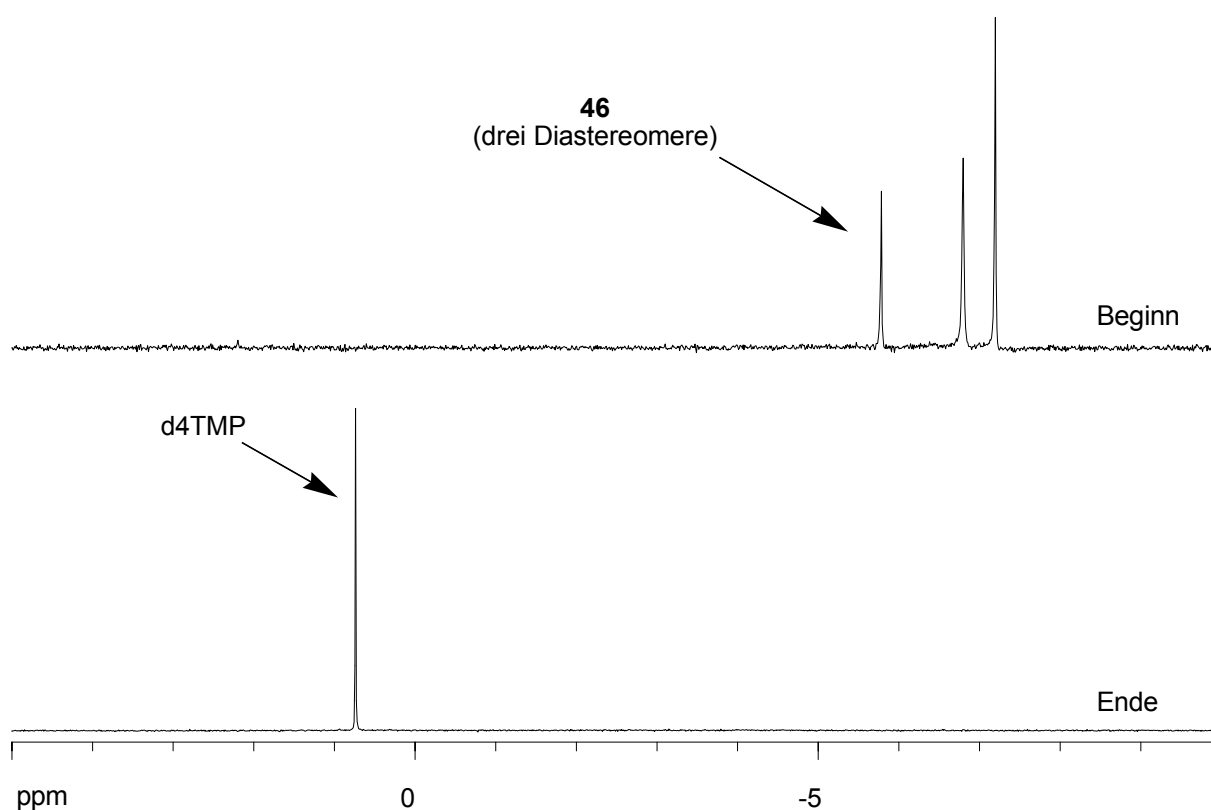


Abb. 100 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** (Diastereomerenmischung) in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Vor einer näheren Betrachtung der Hydrolyse der teilweise getrennten Diastereomere **46 fast** und **46 slow** von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** soll zunächst die Hydrolyse der Referenzverbindung 3-Sal-*cycloSal*-d4TMP **92** diskutiert werden. Die ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolysen der getrennten Diastereomere **92 fast** und **92 slow** ist in den Abbildungen 101 und 102 (S. 95) dargestellt.

Es ist eindeutig zu erkennen, daß sowohl **92 fast** als auch **92 slow** zunächst zwei Produkte ergaben, bei denen es sich zum einen um d4TMP, zum anderen um den auf dem erwünschten Hydrolyseweg auftretenden Benzylphosphatdiester bei einer Verschiebung von etwa 2 ppm handelte (vergl. Kapitel 2.2). Zum Ende der Hydrolyse war dieses Intermediat vollständig zerfallen, und d4TMP verblieb als einziges Hydrolyseprodukt. Auch für diese Verbindungen konnte der unerwünschte Phenylphosphatdiester als Nebenprodukt nicht gefunden werden, was jedoch angesichts der niedrigen Halbwertszeit von **92**, des schnellen Ablaufs der Hydrolyse auf dem erwünschten Weg also, nicht verwunderte. Es sei noch angemerkt, daß im Medium dieser Hydrolysestudie (Gemisch aus DMSO und Imidazol/Salzsäure-Puffer im Verhältnis 1 : 1) das Diastereomer **92 fast** stärker zu höherem Feld verschoben war als **92 slow** (Differenz etwa 0.75 ppm).

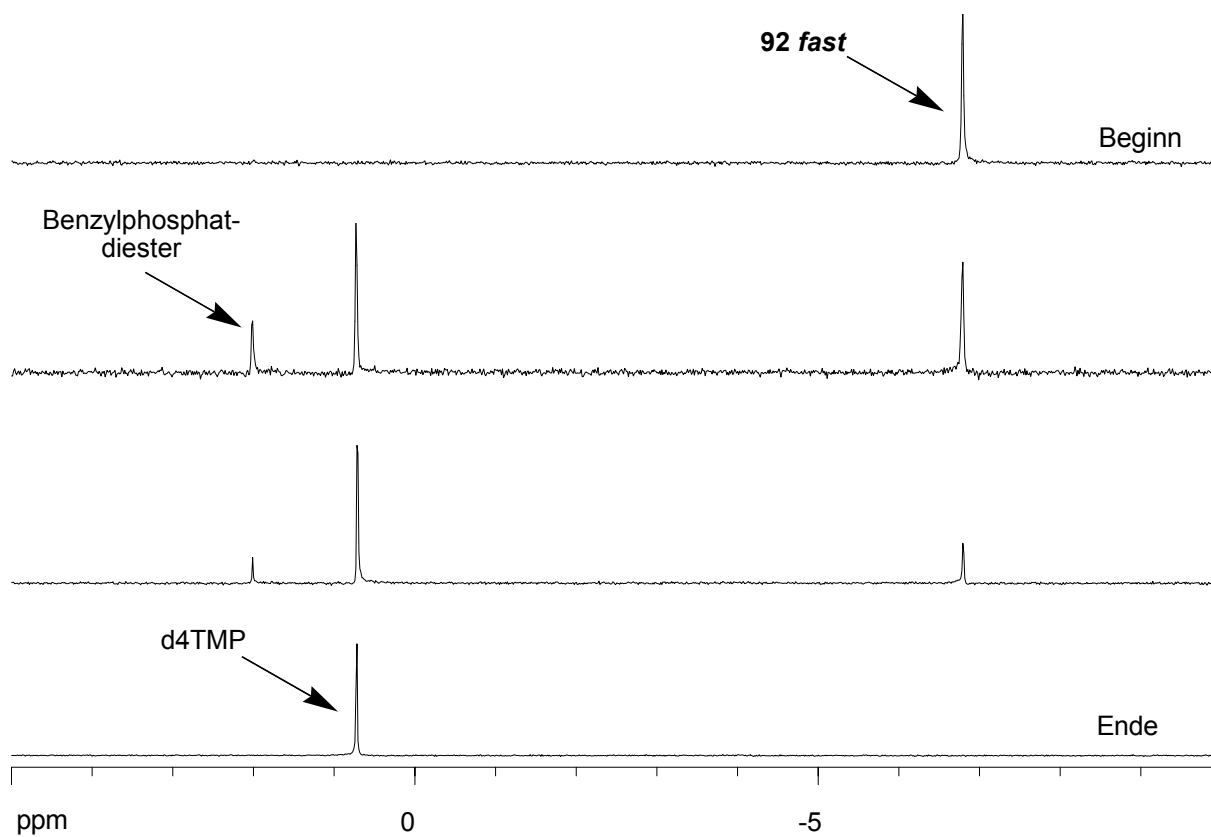


Abb. 101 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 3-Sal-cycloSal-d4TMP **92 fast** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

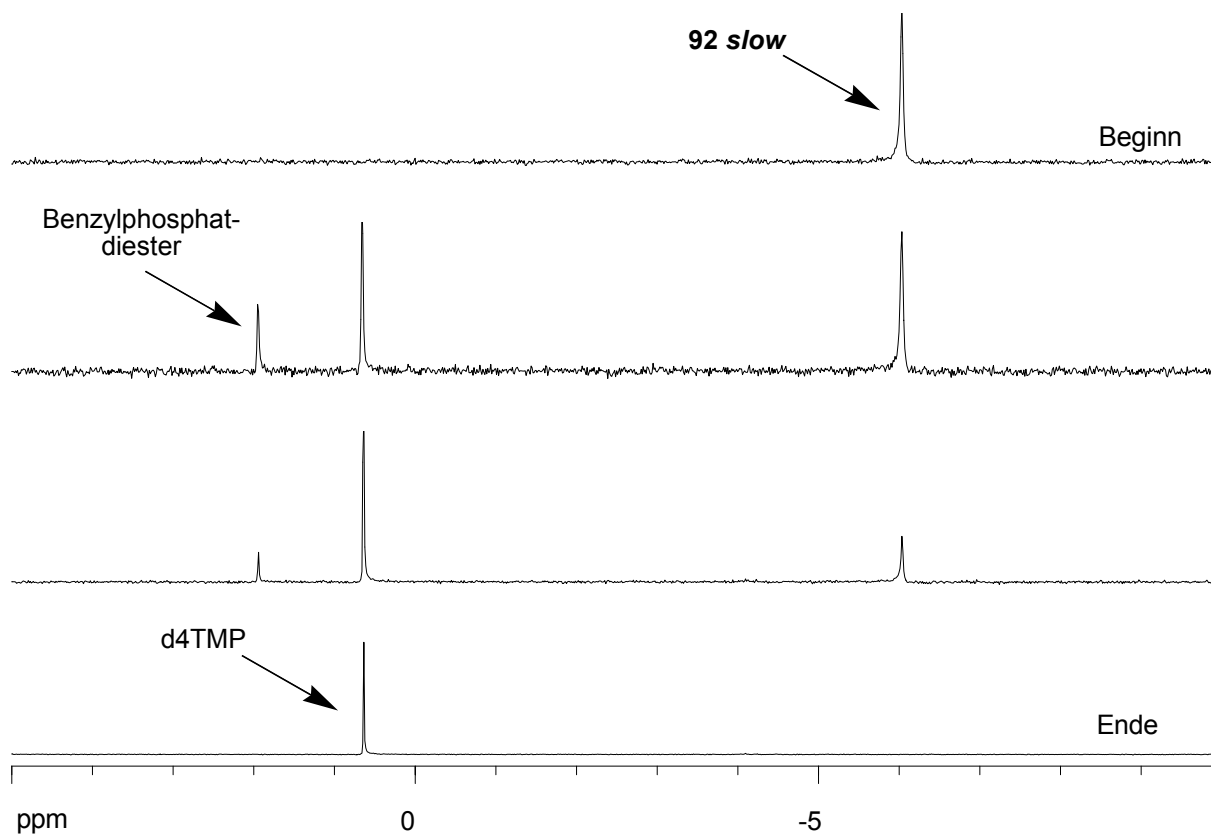


Abb. 102 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 3-Sal-cycloSal-d4TMP **92 slow** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Um die Diskussion der ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien von **46 fast** und **46 slow** zu erleichtern, ist in der Abbildung 103 und der Ausklapptafel I eine detaillierte Übersicht über die auf den denkbaren Hydrolysewegen von **46** auftretenden Intermediate und Produkte gegeben. In den Abbildungen 104 und 105 (S. 97) folgen dann die ^{31}P -NMR-Spektren für die Hydrolysen der teilweise getrennten Diastereomere von **46**.

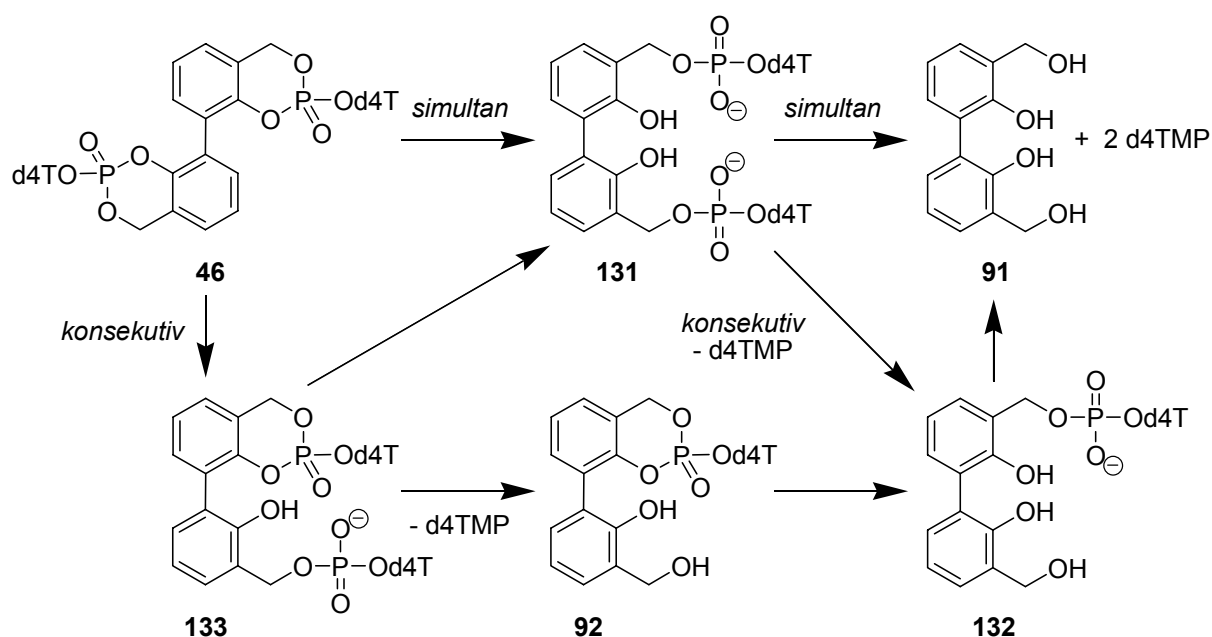


Abb. 103 Detaillierte Darstellung der möglichen Hydrolysewege von Bis-(cycloSal-d4TMP) **46** (siehe auch Ausklapptafel I)

Vermutet man eine simultane Hydrolyse (vergl. Kapitel 4.4.1), so ist die Entstehung eines Bis-(Benzylphosphatdiesters) **131** zu postulieren. Dieser wiederum kann seinerseits ebenso simultan oder konsekutiv zerfallen, was entweder die Bildung des Salicylalkohol-Derivates **91** sowie von zwei Äquivalenten d4TMP (für den simultanen Fall) oder aber des Benzylphosphatdiester-Intermediates **132** sowie eines Äquivalents d4TMP (für den konsekutiven Fall) zur Folge hätte. Das Intermediat **132** würde anschließend natürlich ebenso den Alkohol **91** und ein weiteres Äquivalent d4TMP liefern. Nimmt man hingegen für die Ausgangsverbindung **46** eine konsekutive Hydrolyse an, so ergibt dies zunächst den Benzylphosphatdiester **133**, welcher noch eine vollständige cycloSal-Unterstruktur besitzt. Ist die Hydrolyse dieser Unterstruktur schneller als die spontane C-O-Bindungsspaltung in der Benzyl-Position, so führt auch dieser Weg zum symmetrischen Intermediat **131**. Im umgekehrten Fall hingegen wird die als Referenz synthetisierte Verbindung **92** gebildet, welche nunmehr nur noch über den Benzylphosphatdiester **132** weiter zerfallen kann.

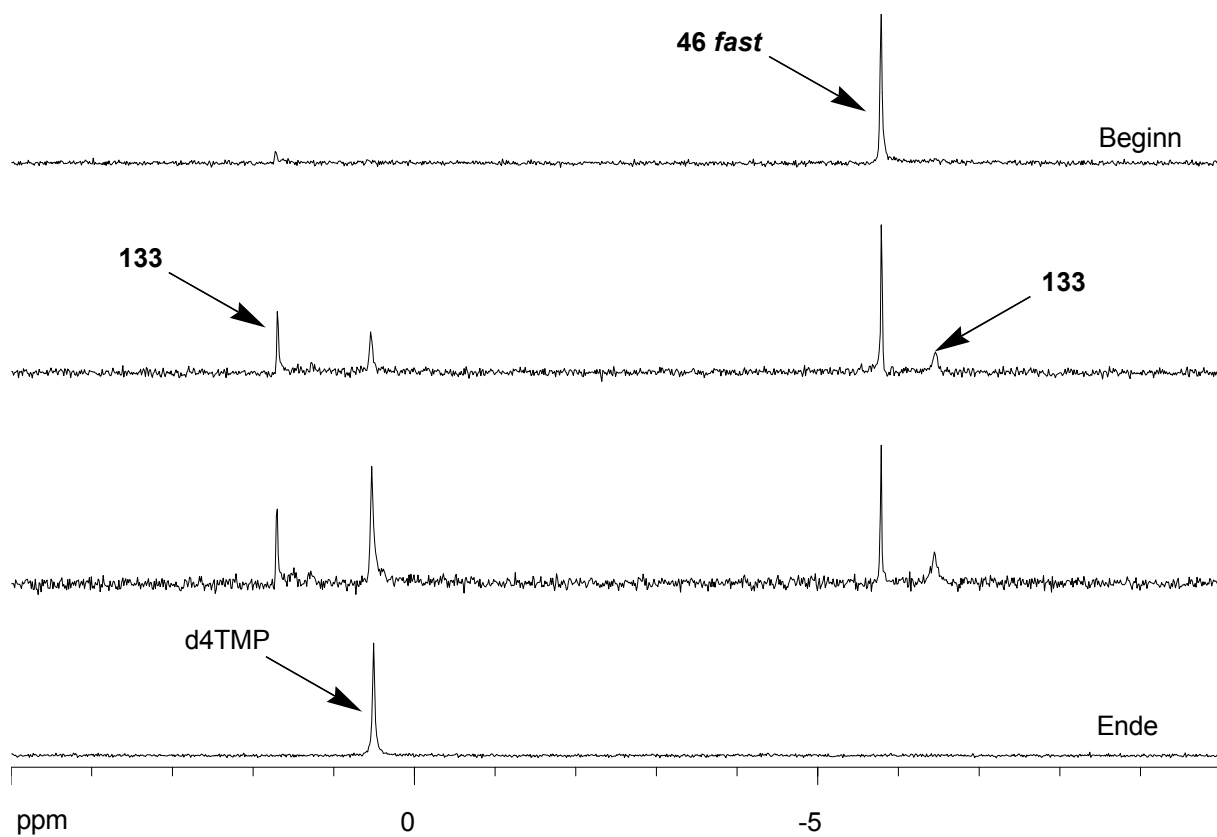


Abb. 104 ³¹P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von Bis-(cycloSal-d4TMP) **46 fast** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

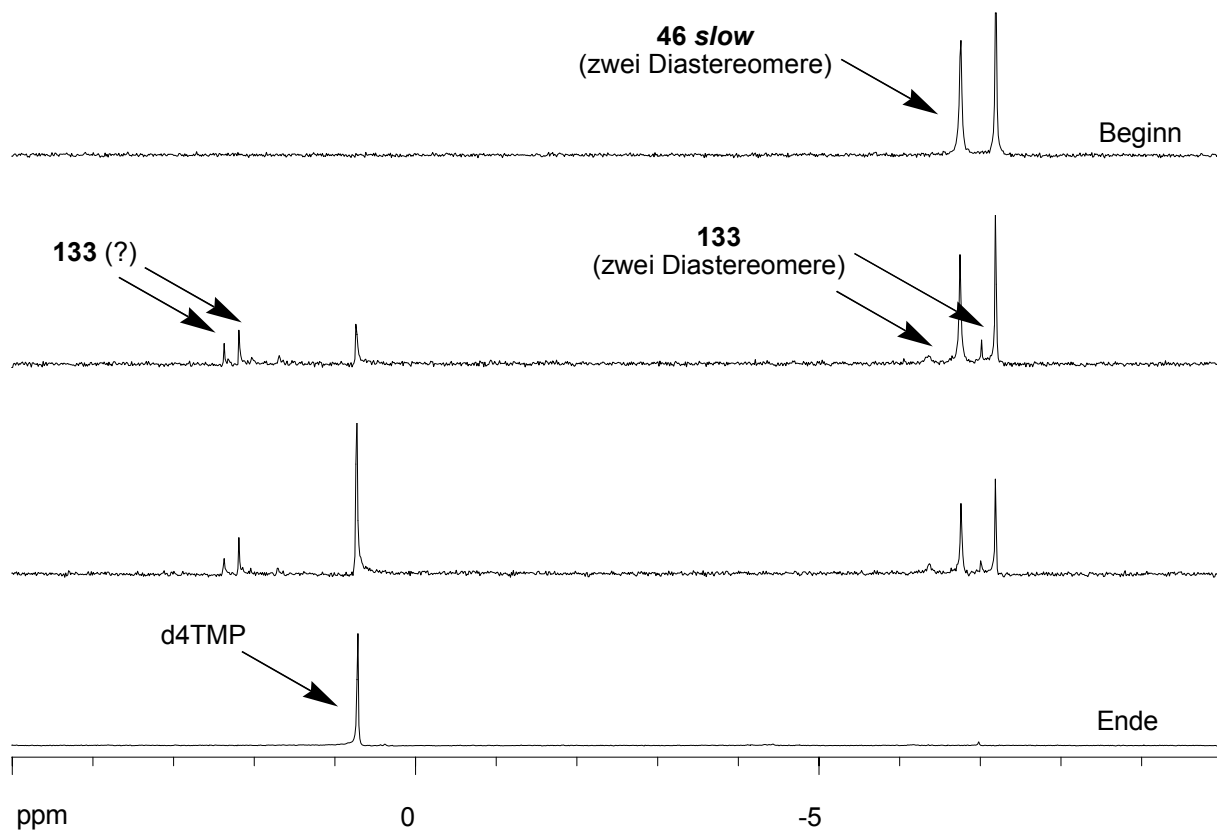


Abb. 105 ³¹P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von Bis-(cycloSal-d4TMP) **46 slow** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Im Falle der Hydrolyse des reinen Diastereomers **46 fast** traten ein weiterer Peak in dem für *cycloSal*-Nucleotide typischen Verschiebungsbereich von etwa 6 bis 9 ppm sowie, neben dem obligatorischen Peak von d4TMP, ein Signal im Bereich der Benzylphosphatdiester auf (Abb. 104, S. 97). Die chemische Verschiebung des einzelnen neu entstandenen Peaks bei etwa -6.4 ppm stimmte weder mit der Verschiebung von **92 fast** noch mit der von **92 slow** überein, so daß dieses Signal nicht der Referenzverbindung **92** zugeordnet werden konnte. Der Peak mußte somit von einem Diastereomer des Intermediates **133** stammen, was dadurch untermauert wurde, daß der Peak bei knapp 2 ppm, der dem zweiten Phosphoratom von **133** entsprechen mußte, im Rahmen der Meßgenauigkeit identische Integrale lieferte. Da nur ein Peak im für Benzylphosphatdiester typischen Bereich beobachtet worden war, konnte die Bildung von **131** und somit die Beschreibung des simultanen Hydrolysewegs ausgeschlossen werden, es sei denn, daß **131** und **133** identische chemische Verschiebungen aufwiesen. Dies ergibt für die Hydrolyse von **46 fast** das folgende Gesamtbild: Es kommt zunächst zu einem Angriff eines Hydroxid-Anions auf eine Phosphat-Einheit und somit zur konsekutiven Hydrolyse. Das resultierende Intermediat **133** zerfällt zu einem Äquivalent d4TMP und dem Zwischenprodukt **92**, dessen Bildung aufgrund seiner Labilität jedoch nicht nachgewiesen werden kann. Die Verbindung **92** zerfällt schließlich auf dem für *cycloSal*-Nucleotide bekannten Weg über **132** (welches als bezogen auf **133** labileres Folgeprodukt ebenfalls nicht detektierbar ist) zum Biaryl **91** und dem zweiten Äquivalent d4TMP.

Die Vermutungen über das bei der Hydrolyse von **46 fast** beobachtete Zwischenprodukt konnten bei der Untersuchung der Hydrolyse von **46 slow** belegt werden, da bei dieser zwei zusätzliche Signale im für *cycloSal*-Nucleotide typischen Verschiebungsbereich auftraten, von denen eines (welches dem bei der Hydrolyse von **46 fast** entstandenen entsprach) allerdings eher schwach war. Das zweite, stärker hochfeldverschobene Signal wies zum ersten Signal eine Verschiebungsdifferenz auf, die recht genau der von **92 fast** zu **92 slow** entsprach. Um zu überprüfen, ob es sich bei den neu entstandenen Signalen nicht doch um **92 fast** und **92 slow** handeln könnte, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, für das **46 slow** mit **92 fast** und **92 slow** gemischt und in Imidazol/Salzsäure-Puffer ³¹P-NMR-spektroskopisch untersucht wurde (Abb. 106, S. 99). Durch Vergleich mit einem ³¹P-NMR-Spektrum der Hydrolyse von **46 slow** läßt sich klar erkennen, daß die gebildeten Intermediate nicht **92 fast** und **92 slow** entsprechen konnten.

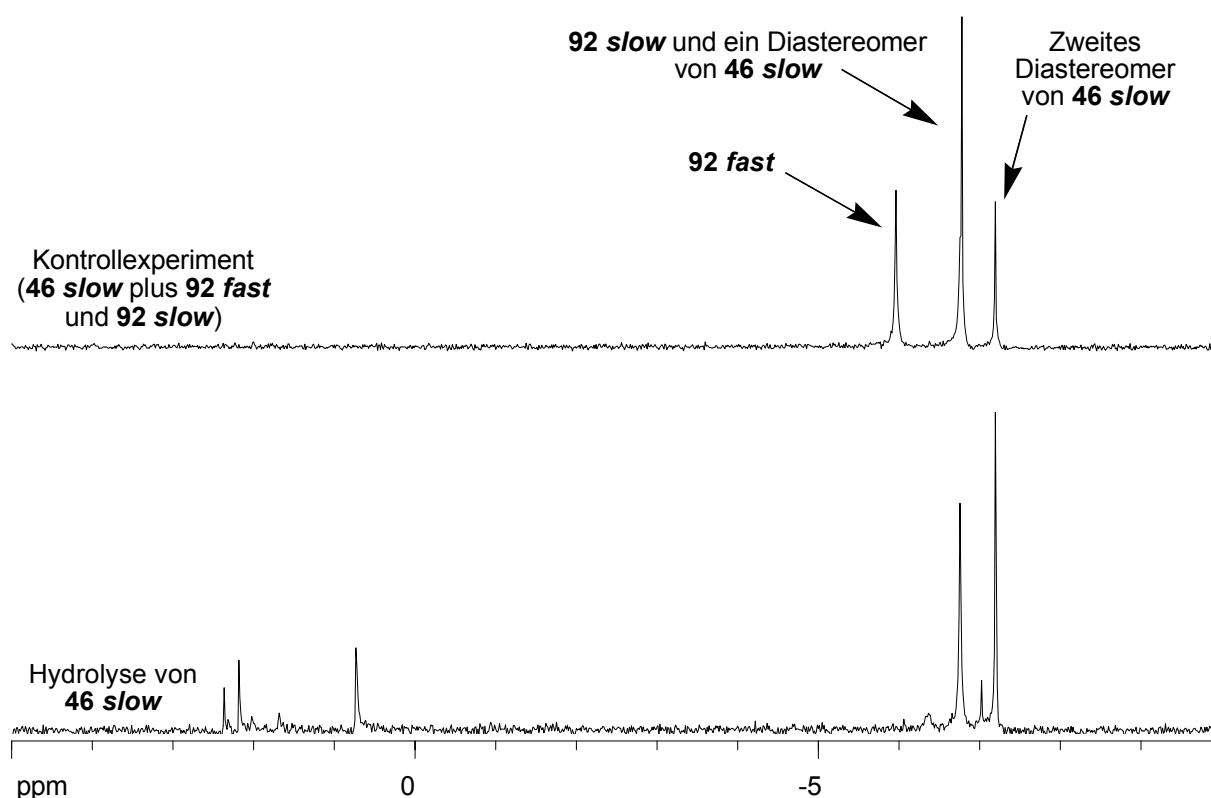


Abb. 106 Kontrollexperiment zur Auswertung der Hydrolyse von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46 slow** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Es konnte somit definitiv gefolgert werden, daß das beobachtete Intermediat bei der Hydrolyse von **46 fast** und **46 slow** **133** war. Aufgrund der geringen Signalintensität der Intermediate bei der Hydrolyse von **46 slow** läßt sich jedoch schlecht beurteilen, ob die Integrale der beiden Benzylphosphatdiester-Signale bei etwa 2 ppm zu denen der Signale bei 6 bis 7 ppm passen und damit beiden Diastereomeren von **133** zuzuordnen sind, oder ob diese eventuell nur einen Benzylphosphatdiester-Peak liefern und das zweite Benzylphosphatdiester-Signal von einem anderen Hydrolyse-Intermediat stammt. Hierbei wäre sogar eine Zuordnung eines der beiden Peaks zum Zwischenprodukt **131** denkbar, was die simultane Hydrolyse belegen würde. Insgesamt läßt sich jedoch festhalten, daß bei der Hydrolyse des einzelnen Diastereomers **46 fast** ausschließlich ein Diastereomer von **133** als Intermediat entstanden war, während die Hydrolyse des Diastereomergemisches **46 slow** ein Diastereomergemisch von **133** als Zwischenprodukt lieferte.

Die Erkenntnisse aus den Hydrolysestudien lassen sich zu einer zumindest vermuteten Zuordnung der Stereochemie zu den einzelnen Fraktionen von **46** nutzen. Hierzu mußte zunächst eine Zuordnung der absoluten Konfiguration am Phosphor-Atom von **92 fast** und **92 slow** versucht werden. Die beste Methode für die

Bestimmung einer stereochemischen Konfiguration ist zweifelsohne die Röntgenstrukturanalyse. Sie erfordert jedoch die Darstellung eines Einkristalls der jeweiligen Verbindung, was im Falle diastereomerenreiner *cycloSal*-Nucleotide bisher nicht gelungen war. Stattdessen war eine Methode eingeführt worden, welche zumindest die begründete Vermutung der jeweiligen absoluten Konfiguration am Phosphor-Atom erlaubt^[93]. Sie basiert auf der Anwendung der Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie.

Die Vergleichsverbindung 5-Chlor-*cycloSal*-(-)-menthyl-monophosphat **134** war zunächst als Diastereomeregemisch (R_P/S_P) synthetisiert worden. Die Diastereomere konnten dann mittels präparativer HPLC getrennt und anschließend kristallisiert werden. Die absolute Konfiguration am Phosphor-Atom konnte so mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Die in Methanol aufgenommenen CD-Spektren der getrennten Diastereomere sind in der Abbildung 107 wiedergegeben.

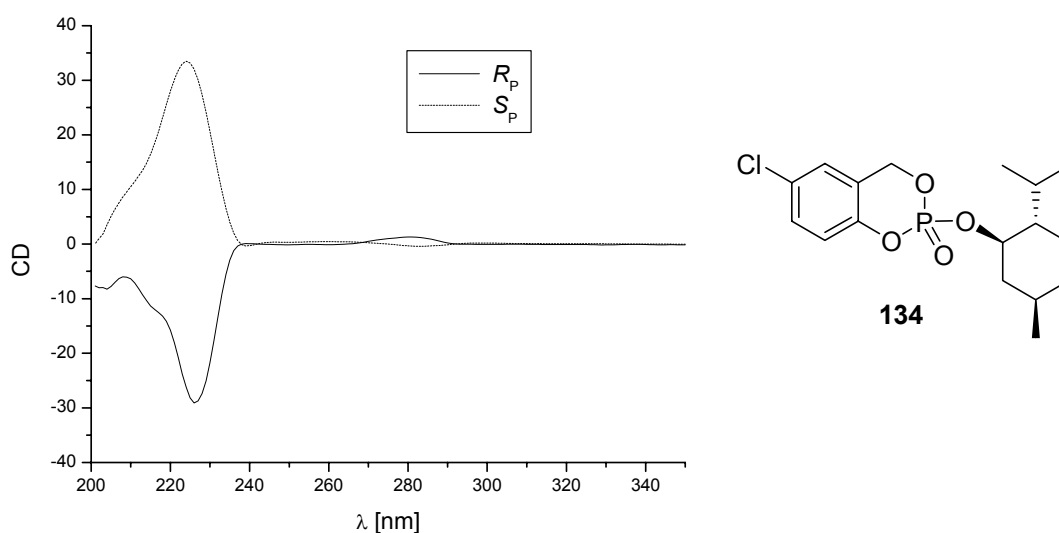


Abb. 107 CD-Spektren der getrennten Diastereomere der Vergleichsverbindung **134**

Für das R_P -Diastereomer von **134** ergab sich ein negativer Cotton-Effekt bei etwa 225 nm, während das S_P -Diastereomer dort einen positiven Cotton-Effekt aufwies. Diese entgegengesetzten Effekte wurden auf die unterschiedliche Stereochemie am Phosphat-Zentrum zurückgeführt. Es sollte daher prinzipiell möglich sein, die absolute Konfiguration am Phosphor-Atom getrennter Diastereomere von *cycloSal*-Nucleotiden mittels CD-Spektroskopie durch Vergleich mit den für **134** erhaltenen Spektren zumindest im Rahmen einer begründeten Vermutung zu bestimmen, wenn

schon die sichere Strukturbestimmung durch Einkristallstrukturanalyse nicht möglich ist.

Auch für die getrennten Diastereomere von 3-Sal-cycloSal-d4TMP **92** sowie der geschützten Vorstufe 3-(Isopr-Sal)-cycloSal-d4TMP **96** wurden CD-Spektren in Methanol aufgenommen, welche in den Abbildungen 108 und 109 dargestellt sind.

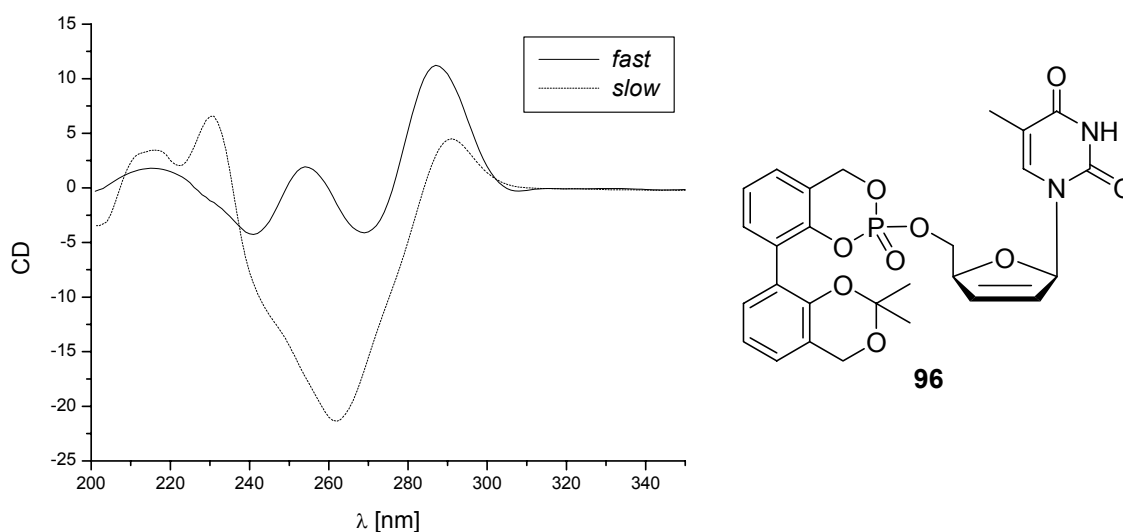


Abb. 108 CD-Spektren der getrennten Diastereomere von 3-(Isopr-Sal)-cycloSal-d4TMP **96**

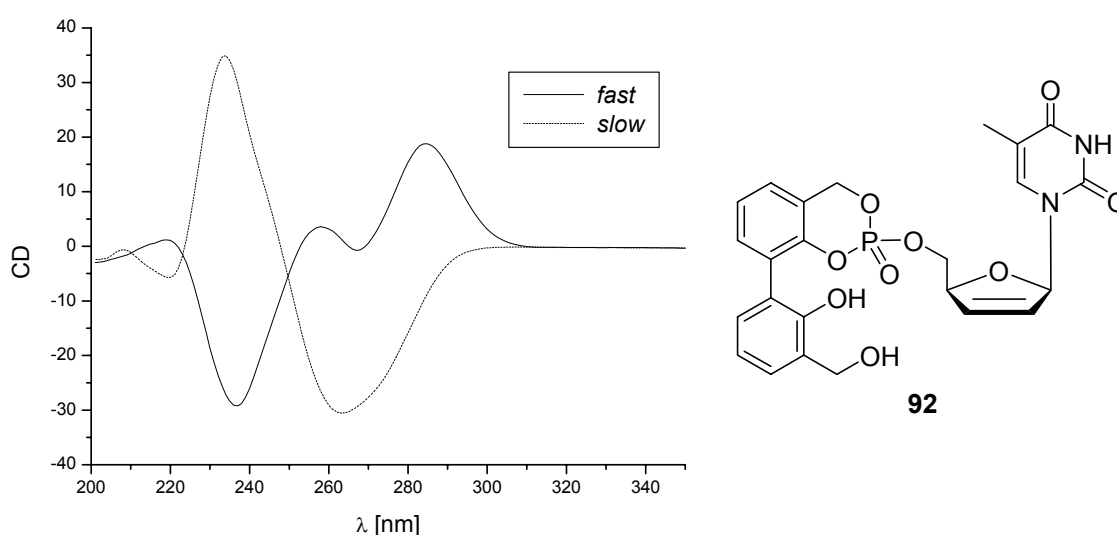


Abb. 109 CD-Spektren der getrennten Diastereomere von 3-Sal-cycloSal-d4TMP **92**

Für **96** waren die Ergebnisse zunächst nicht eindeutig. Zwar wies das *slow*-Diastereomer einen positiven Cotton-Effekt bei ungefähr 230 nm auf, der eine

Zuweisung der S_P -Konfiguration zu diesem Isomer nahegelegt. Der Effekt war aber eher schwach, und der entsprechende negative Cotton-Effekt des wahrscheinlich R_P -Konfiguration besitzenden *fast*-Diastereomers war deutlich in Richtung von 240 nm verschoben. In diesem Zusammenhang muß bedacht werden, daß der Circular-dichroismus ein Effekt des gesamten Moleküls ist, so daß einzelne Cotton-Effekte durch andere überlagert sein können. Im Gegensatz zu den CD-Spektren von **96** lieferten die Spektren von **92** ein eindeutiges Resultat, da sie deutlich ausgeprägte Cotton-Effekte bei etwas mehr als 230 nm aufwiesen (Abb. 109, S. 101). Letztendlich bestätigte sich die bereits für **96** vermutete Zuordnung, so daß **92 fast** die R_P - und **92 slow** die S_P -Konfiguration zugewiesen werden konnte.

Um diese Erkenntnisse auf die Hydrolysestudien von **46 fast** und **46 slow** übertragen zu können, wurde zunächst angenommen, daß das beobachtete Intermediat **133** zwar eine etwas stärkere Hochfeldverschiebung als die getrennten Isomere von **92** aufweisen mag, daß dieser Verschiebungsunterschied aber für beide Diastereomere von **133** näherungsweise gleich sein dürfte. Dies hat jedoch zur Folge, daß das stärker tieffeldverschobene Isomer von **133** stereochemisch **92 slow** entsprechen und somit S_P -Konfiguration besitzen müßte, während das hochfeldverschobene Isomer von **133** wie **92 fast** R_P -konfiguriert sein sollte. Da bei der Hydrolyse von **46 fast** nur das stärker tieffeldverschobene Diastereomer von **133**, also das Isomer mit der anzunehmenden S_P -Konfiguration, als Intermediat nachgewiesen werden konnte (vergl. Abb. 104, S. 97), ist die Folgerung, daß die Phosphat-Zentren des Diastereomers **46 fast** beide S_P -Konfiguration besaßen. Es handelte sich bei **46 fast** also offensichtlich um das S_P/S_P -Isomer. Die Möglichkeit einer R_P/S_P -Konfiguration kann praktisch ausgeschlossen werden, da das R_P -konfigurierte Zentrum dann selektiv vor dem S_P -Zentrum hätte hydrolysiert werden müssen, was wenig wahrscheinlich ist. Wenn jedoch **46 fast** das S_P/S_P -Isomer war, so mußte **46 slow** ein Gemisch aus dem R_P/S_P - und dem R_P/R_P -Isomer sein.

Die auf diese Weise erhaltene Zuordnung der absoluten Konfigurationen der Phosphor-Atome in **46 fast** und **46 slow** eröffnet die Möglichkeit, die zuvor bereits erläuterte Vermutung zur Entstehung des Diastereomerenverhältnisses von etwa 1 : 2 : 2 für Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** weiter zu untermauern. Da das Verhältnis des S_P/S_P - zum R_P/R_P -Isomer von **46** 1 : 2 betrug, diese Diastereomere jedoch durch Umsetzung des entsprechenden Enantiomerenpaares des Chlorphosphits **93** mit d4T **4** entstanden waren, mußte diese Umsetzung teilweise diastereoselektiv

verlaufen sein. Ferner läßt sich folgern, daß es sich bei eben diesem Enantiomerenpaar um das überschüssige Diastereomer von **93** gehandelt haben mußte, da andernfalls das ermittelte Diastereomerenverhältnis von **46** nicht hätte zustande kommen können (vergl. Kapitel 4.4.5). Die Stereochemie der Umsetzung des Salicylalkohol-Derivates **91** zum Bis-(*cyclo*Sal-Nucleotid) **46** kann somit als geklärt betrachtet werden. Eine zusammenfassende Betrachtung dieser stereochemischen Aspekte ist in der Abbildung 110 gegeben.

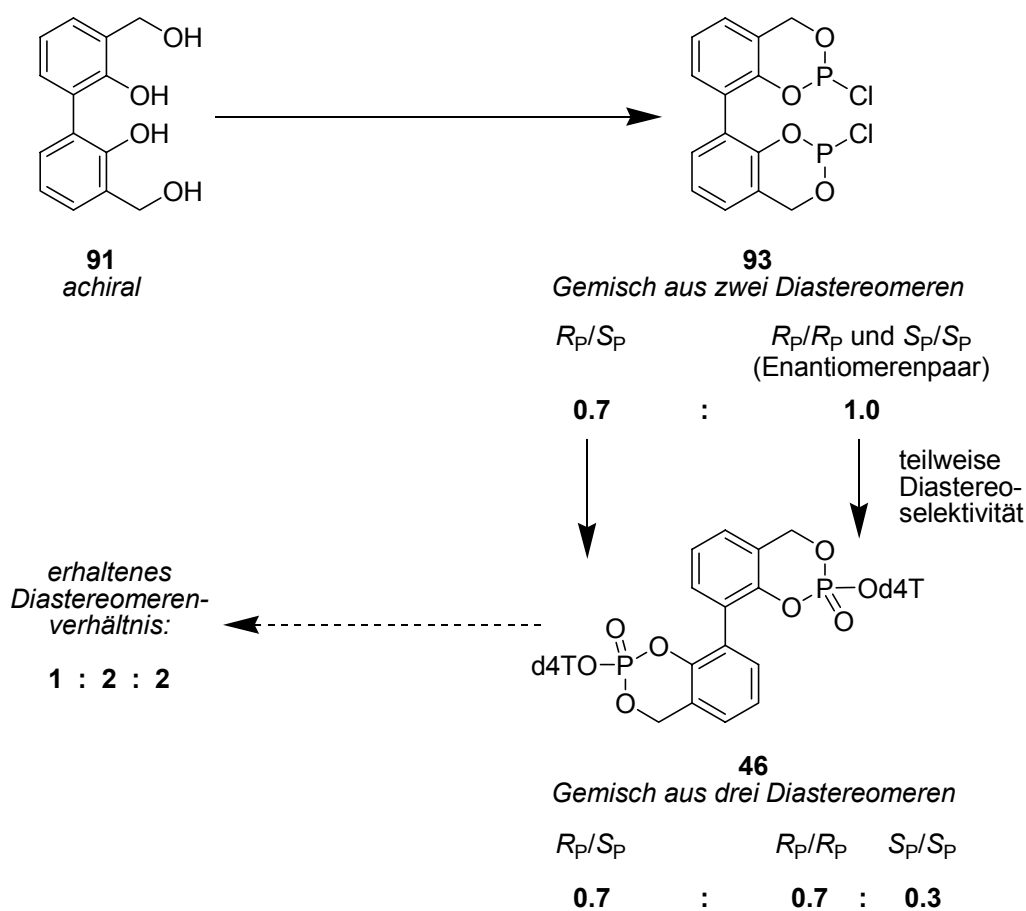


Abb. 110 Zusammenfassende Betrachtung der stereochemischen Aspekte bei der Umsetzung des Salicylalkohol-Derivates **91** zum Bis-(*cyclo*Sal-Nucleotid) **46**

Es soll nochmals betont werden, daß die Zuordnung der Stereochemie zu den einzelnen Fraktionen von **46** und alle sich daraus ableitenden Resultate lediglich begründete Vermutungen darstellen, die auf vielen Annahmen beruhen. Ein Beweis dieser Vermutungen ergibt sich aus den vorgestellten Daten nicht.

Auch das Bis-(5-methyl-*cyclo*Sal-d4TMP) **47** wurde einer ^{31}P -NMR-Hydrolysestudie unterzogen, und die erhaltenen Spektren sind in der Abbildung 111 (S. 104) dargestellt.

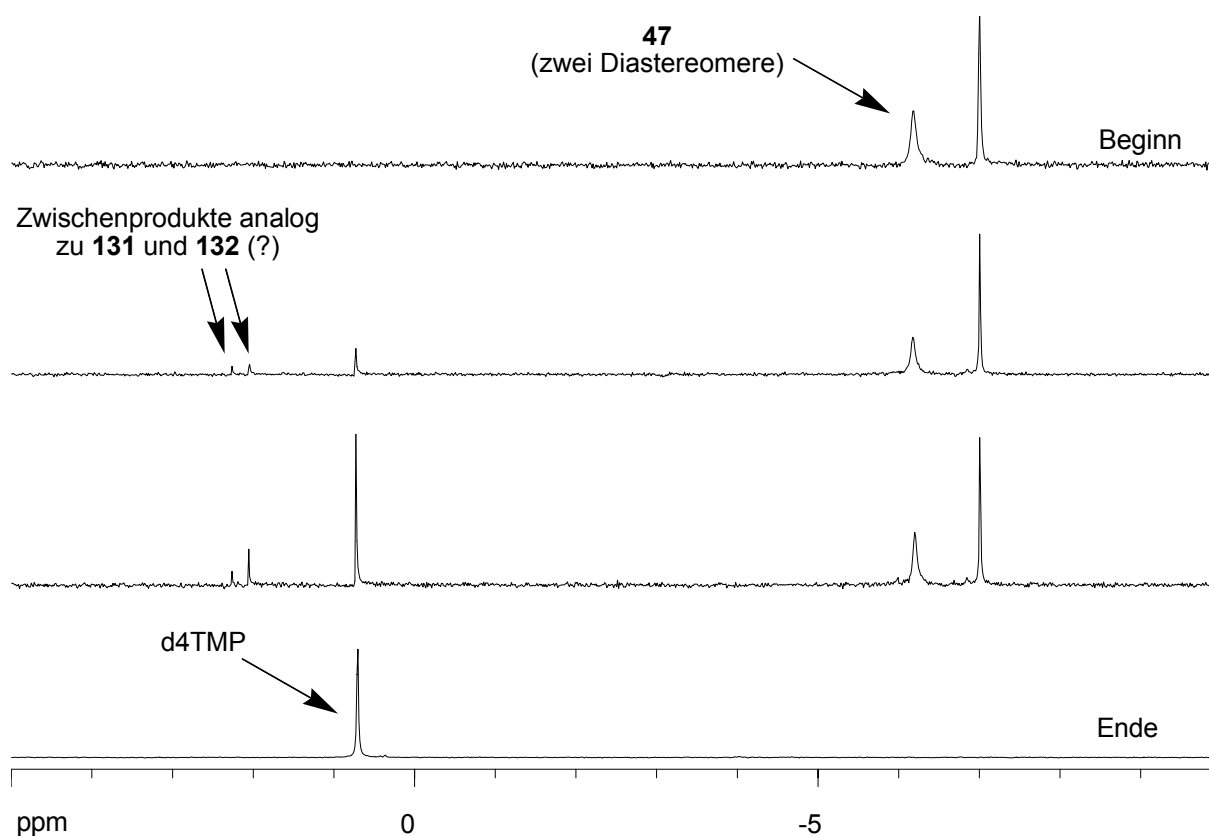


Abb. 111 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von Bis-(5-methyl-*cycloSal*-d4TMP) **47** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Für **47** war ja nur ein Gemisch aus zwei Diastereomeren erhalten worden (vergl. Kapitel 4.4.5), so daß zu Beginn auch nur zwei Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum vorlagen. Während der Hydrolyse traten keine zusätzlichen Signale im für *cycloSal*-Nucleotide typischen Verschiebungsbereich auf, so daß die Gegenwart von Intermediaten analog zu **92** und **133** (vergl. Abb. 103) ausgeschlossen werden kann. Im Bereich der Benzylphosphatdiester konnten zwei Signale gefunden werden, die somit von zu **131** und **132** analogen Zwischenprodukten stammen müßten. Dies bedeutet, daß es zwar einen Hinweis auf einen simultanen Hydrolyseverlauf, aber keinen gesicherten Nachweis eines konsekutiven Prozesses gab. Es ist jedoch auch möglich, daß das zu **133** analoge Intermediat für die Methyl-substituierte Verbindung **47** in Relation zu den anderen Intermediaten so labil war, daß ein Nachweis einfach nicht möglich war. In jedem Fall entstand jedoch auch hier d4TMP als einziges finales Hydrolyseprodukt, die Hydrolyse von **47** verlief also ebenso selektiv wie die von **46**.

Es soll an dieser Stelle betont werden, daß die aus den ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien gewonnenen Informationen nicht als Beweise für einen bestimmten Hydrolysemechanismus betrachtet werden dürfen, da die bloße Zuordnung von Signalen

aufgrund ihrer chemischen Verschiebung hierfür nicht ausreicht. Auch ist nur eines der Zwischenprodukte stabil und damit synthetisch zugänglich. Trotzdem können die erhaltenen Daten als wichtige Grundlage für weitere mechanistische Untersuchungen zur Hydrolyse von Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden) dienen. Direktere Beweise für die postulierten Mechanismen ließen sich beispielsweise durch eine massenspektrometrische Analyse der Hydrolysemischungen finden, wie sie bereits für die Benzylsubstituierten *cycloSal*-Nucleotide durchgeführt wurde^[125]. Derartige Experimente sollten jedoch nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit sein.

4.4.8 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** und der Referenzverbindung **92**

Auch die synthetisierten Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47**, die Referenzverbindung **92** und das Syntheseintermediat **96** wurden wie schon für die bromierten *cycloSal*-d4TMPs **79-81** beschrieben (vergl. Kapitel **4.3.6**) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Balzarini, Universität Leuven, Belgien, antiviralen *in vitro*-Tests gegen HIV-1 und HIV-2 unterzogen. Die erhaltenen Daten sind zusammen mit den Werten für die Vergleichsverbindungen *cycloSal*-d4TMP **85**, 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP **89** und 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131** sowie denen für das Nucleosid-Analogon d4T **4** in der Tabelle 7 (S. 106) angegeben. Es sei darauf hingewiesen, daß die für d4T **4** aufgeführten Daten etwas von den zuvor angegebenen abweichen, da diese aus einer anderen Testreihe stammten.

Zunächst fällt auf, daß die in den Wildtyp-CEM-Zellen erhaltenen Aktivitäten sowohl gegen HIV-1 als auch HIV-2 allesamt ungefähr denen von d4T **4** entsprachen. Dies gilt auch für die Bis-(*cycloSal*-Nucleotide) **46,47**, obwohl diese pro Molekül zwei Moleküle d4TMP freisetzen, was eigentlich zu einer verbesserten antiviralen Aktivität führen sollte. Möglicherweise war der durchgeführte Test, der wie alle Experimente mit biologischem Material einen erheblichen Meßfehler aufwies, zu ungenau, um einen solchen Effekt nachweisen zu können. Es kam letztendlich auf einen Vergleich der für die TK-defizienten CEM-Zellen erhaltenen antiviralen Aktivitäten mit denen für die Wildtyp-CEM-Zellen an, um eine Aussage über die Effizienz der Pronucleotide bezüglich des TK-Bypasses treffen zu können.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
		CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
Bis-(5-H) 46 mix	0.19 ± 0.05	0.27 ± 0.11	2.33 ± 0.58	27.8 ± 11.0
Bis-(5-H) 46 fast	0.25 ± 0.14	0.30 ± 0.09	3.33 ± 2.31	107 ± 13
Bis-(5-H) 46 slow	0.21 ± 0.17	0.22 ± 0.16	2.37 ± 1.48	90.7 ± 16.1
Bis-(5-Me) 47	0.37 ± 0.25	0.41 ± 0.19	1.60 ± 0.57	67.1 ± 7.1
3-Sal 92 fast	0.27 ± 0.13	0.50 ± 0.14	0.70 ± 0.14	69.4 ± 11.7
3-Sal 92 slow	0.34 ± 0.10	0.40 ± 0.00	1.50 ± 0.70	78.7 ± 6.2
3-Isopr-Sal 96 mix	0.35 ± 0.09	0.40 ± 0.00	1.07 ± 0.83	65.0 ± 6.7
3-Isopr-Sal 96 fast	0.36 ± 0.07	0.40 ± 0.00	0.55 ± 0.21	55.3 ± 23.0
3-Isopr-Sal 96 slow	0.50 ± 0.14	0.40 ± 0.00	3.0 ± 1.4	89.3 ± 11.7
(unsubst.) 85	0.15 ± 0.07	0.13 ± 0.06	0.30 ± 0.25	26.5 ± 22.4
3-Phenyl 89	0.13 ± 0.05	0.27 ± 0.13	0.28 ± 0.18	22.0 ± 5.0
5-Methyl 131	0.46 ± 0.24	0.46 ± 0.48	1.25 ± 0.90	37.9 ± 20.0
d4T 4	0.25 ± 0.00	0.19 ± 0.10	21.7 ± 10.4	105 ± 78

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 7 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47**, der *cycloSal*-d4TMPs **92,96** sowie der Vergleichsverbindungen **85,89,131** und d4T **4**

Das Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46** wies sowohl als Diastereomergemisch als auch in Form der teilweise getrennten Diastereomere **46 fast** und **46 slow** einen Verlust an Aktivität gegen HIV-2 in den CEM/TK⁻ im Vergleich zu den CEM/0-Zellen auf. Dies ist umso bemerkenswerter, als die Vergleichsverbindungen **85** und **89** beide einen praktisch vollen Erhalt der Aktivität für die TK-defizienten Zellen aufwiesen, obwohl sie hydrolyselabiler waren und somit eher zu einer extrazellulären Spaltung vor der Penetration der Zellmembran neigen sollten (vergl. Kapitel 4.4.7). Möglicherweise ist der ineffiziente TK-Bypass der Verbindung **46** auf ihre hohe Polarität oder aber auf ihr hohes Molekulargewicht zurückzuführen, beides Faktoren, welche die Membranpermeabilität potentiell einschränken können. Gleiches gilt auch für das 5-Methyl-

Derivat **47**, das ebenso einen Aktivitätsverlust in den TK-defizienten Zellen aufwies, obwohl es nicht nur deutlich hydrolysestabiler als **46**, sondern auch als die in den CEM/TK-Zellen ebenfalls leicht an Aktivität verlierende „monomere“ Vergleichsverbindung **131** war. Dies muß als Hinweis gewertet werden, daß eine unzureichende Zellaufnahme für beide Bis-(*cycloSal*-Nucleotide) vorgelegen hatte. Es kam daher zu erheblichen Teilen zur extrazellulären Hydrolyse, und das gebildete d4TMP wurde wie schon im Falle der bromierten *cycloSal*-d4TMPs **79-81** zu d4T **4** dephosphoryliert, was die für die Wildtyp-Zellen ermittelten Aktivitäten erklärt. Auf der anderen Seite muß auch bedacht werden, daß die Aktivitäten von **46** und **47** gegen HIV-2 in den CEM/TK-Zellen immer noch deutlich besser waren als die von d4T **4**, so daß der Versuch eines TK-Bypasses durch Applikation dieser Verbindungen nicht als vollkommen erfolglos bezeichnet werden kann.

Ein anderes Bild ergibt sich für die Referenzverbindung 3-*Sal-cycloSal*-d4TMP **92** und ihren synthetischen Vorläufer 3-(Isopr-*Sal*)-*cycloSal*-d4TMP **96**. Trotz seiner signifikanten Hydrolyselabilität (vergl. Kapitel **4.4.7**) wies das R_P -konfigurierte Diastereomer **92 fast** einen praktisch vollen Erhalt der Aktivität gegen HIV-2 in den TK-defizienten CEM-Zellen auf, und auch das noch etwas labilere S_P -Isomer **92 slow** verlor in diesen Zellen nur moderat an Aktivität. Dies ist erstaunlich, da das nur leicht labilere 5-Brom-*cycloSal*-d4TMP **80** einen vollständigen Aktivitätsverlust in den CEM/TK-Zellen erlitten hatte (vergl. Kapitel **4.3.6**). Es liegt somit beinahe die Vermutung nahe, daß für die Verbindung **92** noch andere Mechanismen der Zellaufnahme als nur die passive Membrandiffusion existieren könnten. Der Effekt der Konfiguration am Phosphat-Zentrum war für das Isopropyliden-geschützte Derivat **96** sogar noch ausgeprägter. Während das Diastereomergemisch von **96** in den TK-defizienten Zellen leicht an Aktivität verlor, wies das R_P -Isomer **96 fast** einen vollen Erhalt und das S_P -Isomer **96 slow** einen deutlichen Verlust an antiviraler Aktivität in diesem Zellsystem auf. Zwar war auch hier das R_P -Isomer das hydrolysestabilere, jedoch sollte das S_P -Isomer mit einer Hydrolyse-Halbwertszeit von 15 Stunden immer noch stabil genug für eine effiziente Zellaufnahme und somit für einen erfolgreichen TK-Bypass sein. Die Stereochemie scheint also eine über die Auswirkungen auf die Hydrolysestabilität hinausgehende Rolle zu besitzen. Hierbei ist zum Beispiel an eine unerwünschte intrazelluläre Interaktion mit einem Enzym (etwa durch irreversible Inhibition) zu denken, die die beobachtete Stereoselektivität

erklären und zu einem Absinken der intrazellulären freien Wirkstoff-Konzentration des entsprechenden Stereoisomers führen würde.

Zu den ermittelten Cytotoxizitäten ist anzuführen, daß praktisch alle getesteten Verbindungen eine etwas höhere Cytotoxizität als d4T **4** aufwiesen. Allerdings ist hierbei der erhebliche Meßfehler dieser Untersuchungen zu bedenken. So war etwa das Diastereomeregemisch **46** recht cytotoxisch, die in einer anderen Meßreihe untersuchten teilweise getrennten Diastereomere **46 fast** und **46 slow** hingegen besaßen beide deutlich höhere CC₅₀-Werte, was sich eigentlich widerspricht. Trotzdem scheint für die *cycloSal*-Nucleotide insgesamt eine allgemeine Tendenz zu einer im Vergleich zu d4T **4** leicht erhöhten Cytotoxizität zu bestehen, die angesichts der in früheren Arbeiten bereits erwiesenen untoxischen Wirkung von Salicylalkohol-Derivaten wohl kaum auf deren Freisetzung zurückzuführen ist. Vielmehr erscheint es plausibel, daß die Ursache der höheren Cytotoxizitäten in der zellulären Aufnahme phosphorylierter Verbindungen zu suchen ist. Eine Auswirkung der Konfiguration am Phosphat-Zentrum war für die Cytotoxizitäten im Gegensatz zu den antiviralen Aktivitäten nicht auszumachen.

4.5 Neue Arbeiten zum „lock-in“-Mechanismus von *cycloSal*-Nucleotiden

4.5.1 Erläuterung des Konzeptes

Die herkömmlichen *cycloSal*-Nucleotide, zu denen letztendlich auch die in Kapitel **4.4** vorgestellten Bis-(*cycloSal*-Nucleotide) **46,47** gehören, zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Spaltung zum Nucleosidmonophosphat ohne jede enzymatische Beteiligung erfolgt. Dies bedeutet jedoch auch, daß zwischen einer extra- und der eigentlich gewünschten intrazellulären Hydrolyse nicht differenziert wird, was potentiell zu einem Verlust an antiviraler Aktivität führen kann. Eine Möglichkeit, die selektive intrazelluläre Hydrolyse zu ermöglichen und trotzdem den im Vergleich zu anderen Pronucleotid-Systemen bestehenden Vorteil einer rein chemischen Freisetzung des Nucleotid-Analogons zu bewahren, besteht im sogenannten „lock-in“-Mechanismus. Bei dieser Erweiterung des *cycloSal*-Konzeptes wird das Pronucleotid am Aromaten mit einer über einen Alkyl-Linker verknüpften enzymatisch spaltbaren Gruppe versehen, wobei gewährleistet sein muß, daß die Konzentration des diese Gruppe spaltenden Enzyms intrazellulär deutlich höher als extrazellulär ist. Es erfolgt daher

nach der passiven Membrandiffusion und dem Eintritt in die Zelle die schnelle und praktisch selektive intrazelluläre Spaltung dieser Funktionalität, die zur Freisetzung einer polaren Gruppe führen muß. Die Folge dieser Reaktion ist, daß das nunmehr polare Pronucleotid keinen Efflux aus der Zelle mehr eingehen kann und das Nucleosidmonophosphat somit langsam intrazellulär durch chemische Hydrolyse der *cycloSal*-Modifikation auf dem bekannten Weg freigesetzt wird (Abb. 112).

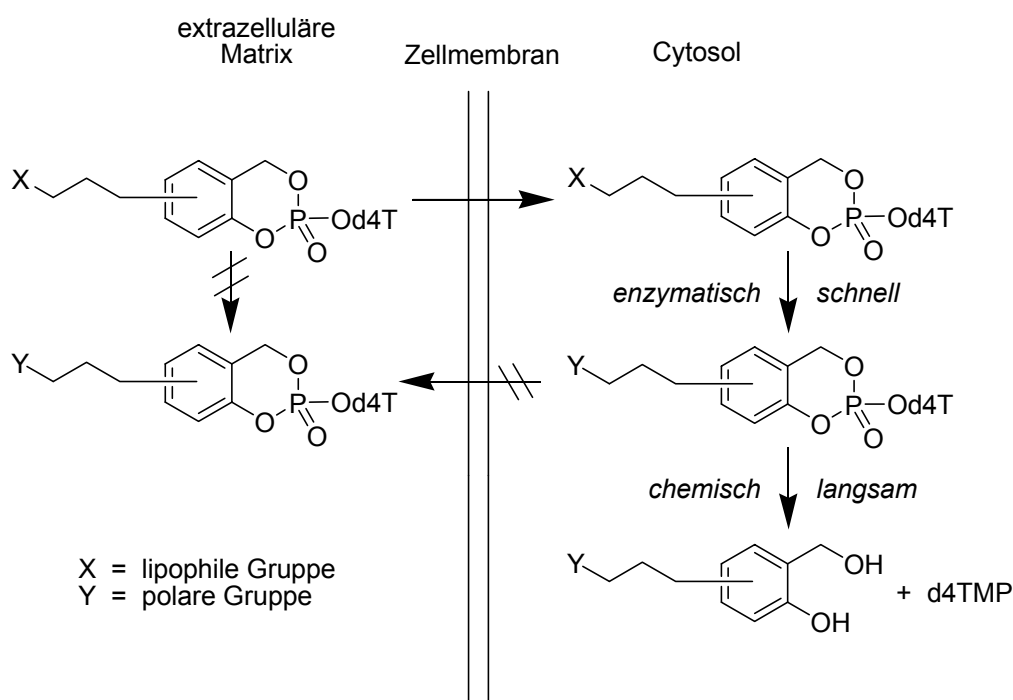


Abb. 112 Schematische Darstellung des „lock-in“-Mechanismus von *cycloSal*-Nucleotiden

4.5.2 Kenntnisstand

Für die in Kapitel 4.5.1 erwähnte mit der *cycloSal*-Einheit verknüpfte funktionelle Gruppe bietet sich eine Carbonsäureester-Funktion an, da sie potentiell durch das vermehrt intrazellulär vorkommende und aus anderen Pronucleotid-Systemen (vergl. Kapitel 2.1) bekannte unspezifische Enzym Carboxyesterase gespalten werden kann. Je nach Orientierung der Estergruppe erhält man als Spaltprodukt entweder einen Alkohol oder die noch polarere Carbonsäure, die bei physiologischen pH-Bedingungen deprotoniert als negativ geladenes Carboxylat vorliegt.

Einige der zunächst synthetisierten „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Derivate und ihre potentiellen enzymatischen Spaltprodukte sind in der Abbildung 113 (S. 110) dargestellt^[126,127].

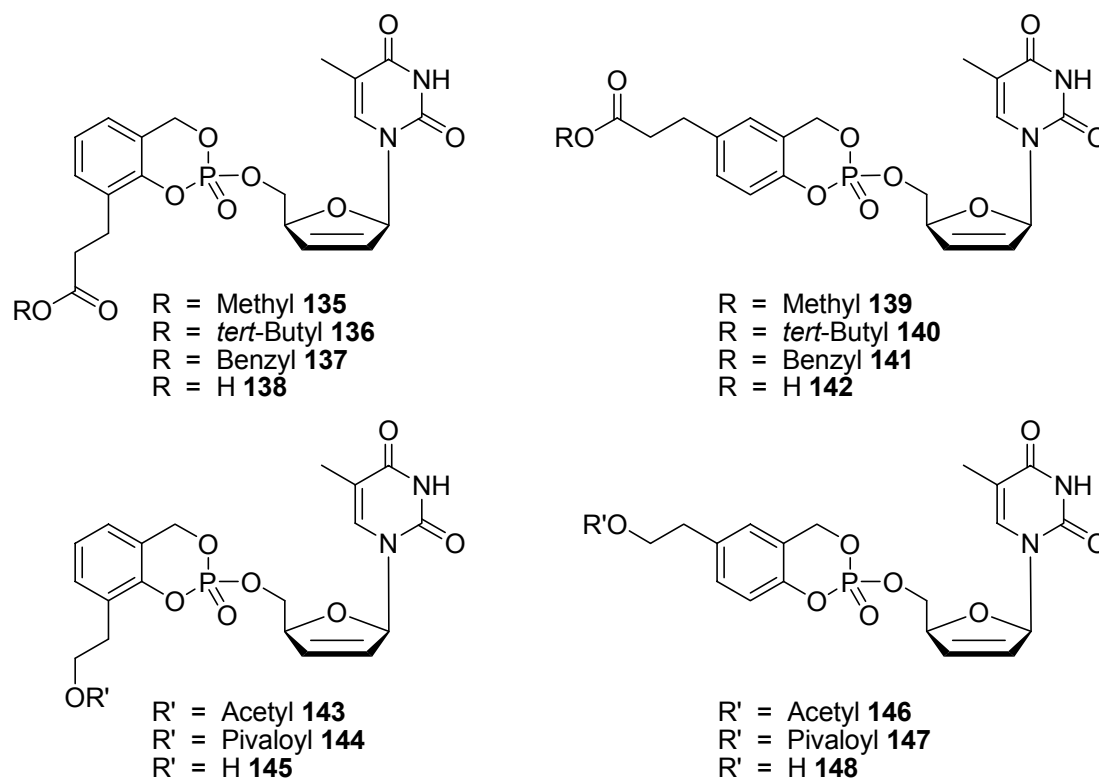


Abb. 113 Aus Vorarbeiten bekannte „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-Nucleotide und ihre potentiellen enzymatischen Spaltprodukte

Allen diesen Pronucleotiden, die die „lock-in“-Modifikation entweder in der 3- oder der 5-Position des Aromaten trugen, war ein Ethylen-Linker zwischen der Aryl-Einheit und der Estergruppe gemein, der die elektronenziehende Funktionalität elektronisch vom Aromaten separieren und somit die notwendige Hydrolysestabilität der Pronucleotide gewährleisten sollte. Die *cycloSal*-Carbonsäureester **135-137** sollten durch intrazelluläre Esterspaltung die Carbonsäure **138** liefern, ebenso wie ihre 5-substituierten Regioisomere **139-141** zur Freisetzung von **142** führen sollten. Die acylierten *cycloSal*-Alkohole **143,144** sollten intrazellulär den Alkohol **145** und ihre Isomere **146,147** entsprechend **148** ergeben. Für die neuen Derivate wurde auch ein eigenes Nomenklatur-System etabliert. So wurden beispielsweise **136** und **140** als 3-(*t*-Bu-Pr)-*cycloSal*-d4TMP bzw. 5-(*t*-Bu-Pr)-*cycloSal*-d4TMP bezeichnet, wobei die Abkürzung „Pr“ auf das Vorliegen einer Propionsäure-Substruktur hinweisen sollte. Die freien Säuren **138** und **142** erhielten die Namen 3-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP und 5-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP mit „Et“ als Kurzform für den Ethylen-Linker. Die neu synthetisierten *cycloSal*-Derivate wurden Hydrolysestudien in Phosphatpuffer und humanen CEM-Zell-extrakten unterzogen, wobei versucht wurde, eine enzymatische Spaltung der modifizierten Pronucleotide im zellulären Medium

nachzuweisen. Die *cycloSal*-Carbonsäureester **135-137** und **139-141** erwiesen sich jedoch durchweg als schlechte Substrate für Carboxyesterase, und die Spaltprodukte **138,142** konnten nicht detektiert werden. Einige der *cycloSal*-Alkohole **143,144** und **146,147** hingegen waren gute Substrate für das Enzym und wurden rasch zu den entsprechenden Alkoholen **145** bzw. **148** umgesetzt. Aus antiviralen *in vitro*-Tests gegen HIV-1 und HIV-2 konnte jedoch abgeleitet werden, daß die freien Alkohole **145,148** noch membrangängig waren und ihre intrazelluläre Freisetzung daher keinen „lock-in“-Effekt bewirken sollte. Die freien Carbonsäuren **138,142** hingegen erwiesen sich als nicht mehr membranpermeabel, sie wurden jedoch wie bereits erläutert aus keinem der Derivate **135-137** und **139-141** freigesetzt. Es erschien daher attraktiv, durch eine andere „Maskierung“ der Carboxylat-Funktion der freien Säuren **138,142** gute Substrate der Carboxyesterase darzustellen, die dann den „lock-in“-Mechanismus effizient vollführen sollten.

4.5.3 Zielverbindungen und Synthesestrategien

Die bereits im Zusammenhang mit Pronucleotiden vorgestellten POM- und POC-Modifikationen von Phosphatresten (vergl. Kapitel 2.1) wurden auch zur Maskierung von Carbonsäure-Funktionen in Prodrugs eingesetzt. So haben beispielsweise v. Daehne et al. Acyloxymethyl-Prodrugs von Ampicilin dargestellt^[128]. Der Vorteil der POM- und POC- wie auch der Acetoxymethyl-(AM)-Gruppen (einer Variante des POM-Konzeptes) liegt in ihren bekannt guten Substrateigenschaften gegenüber Carboxyesterase, so daß ihre Verwendung im Zusammenhang mit „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotiden nahelag. Es sollten daher zunächst die in der 5-Position des *cycloSal*-Systems substituierten Zielverbindungen **48-50** synthetisiert werden (Abb. 114).

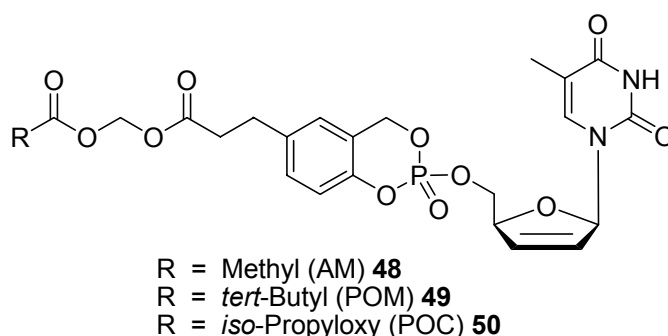


Abb. 114 Die Zielverbindungen **48-50**

In Anlehnung an die für „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-d4TMPs etablierte Nomenklatur sollen diese Pronucleotide nachfolgend als 5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **48**, 5-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **49** und 5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **50** bezeichnet werden. Ein Schema für den postulierten Weg zur intrazellulären Freisetzung der *cycloSal*-Carbonsäure **142** aus den Prodrugs **48-50** ist in der Abbildung 115 gegeben.

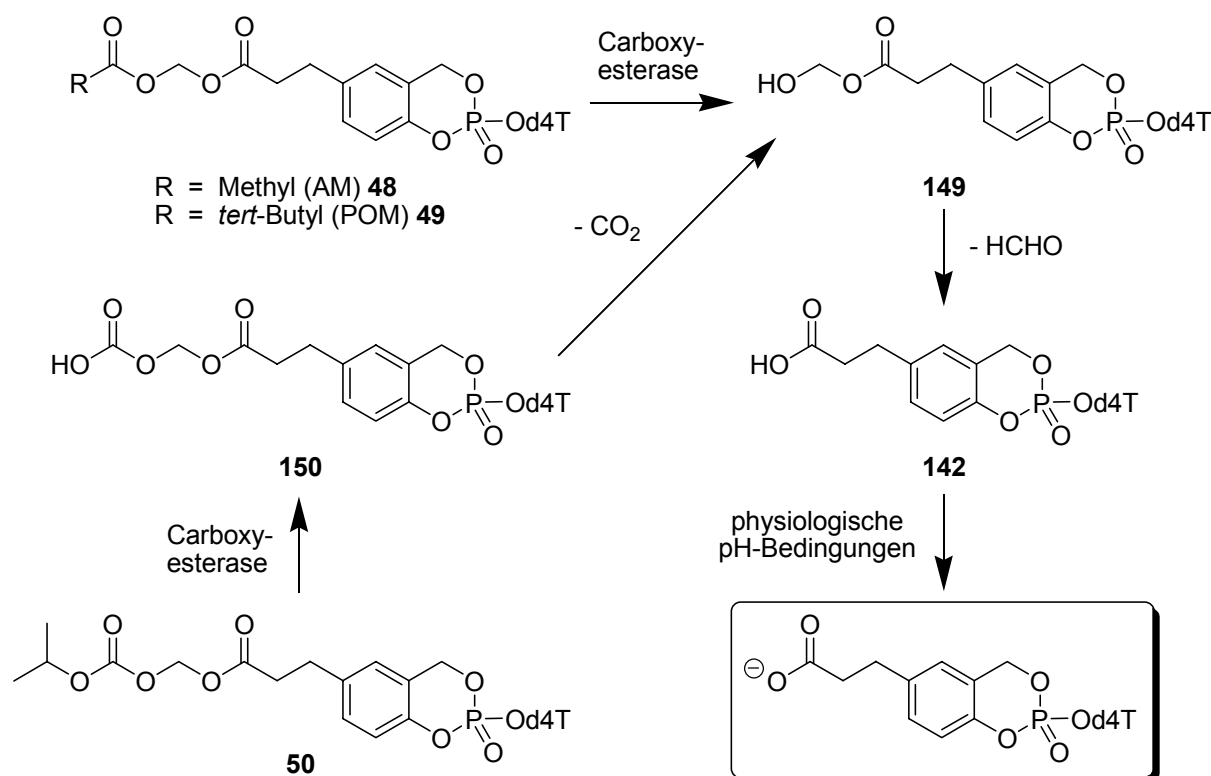


Abb. 115 Postulierter Weg zur Freisetzung der Carbonsäure **142** aus den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50**

Im Falle der AM- und POM-modifizierten Verbindungen **48,49** sollte es zunächst zu einer Carboxyesterase-vermittelten Spaltung des endständigen Esters kommen. Dieser liefert ein halbacetalisches Intermediat **149**, welches spontan unter Bildung von **142** und Formaldehyd zerfällt. Das POC-modifizierte Pronucleotid wird durch die Esterase-katalysierte Reaktion zunächst zum Kohlensäurehalbester **150** abgebaut, welcher unter Austritt von Kohlendioxid ebenfalls das Zwischenprodukt **149** ergibt. Aus diesem resultiert schließlich ebenfalls die Säure **142**, die bei physiologischen pH-Bedingungen deprotoniert vorliegt und daher den „lock-in“-Effekt bewirkt.

Da die Darstellung von Acyloxymethylestern üblicherweise durch Alkylierung der zu maskierenden Carbonsäure erfolgt, lag die Synthese von **48-50** durch Alkylierung der

freien Säure **142** nahe. Die Synthese von **142** ausgehend von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure war bereits bekannt^[126,127] (Abb. 116).

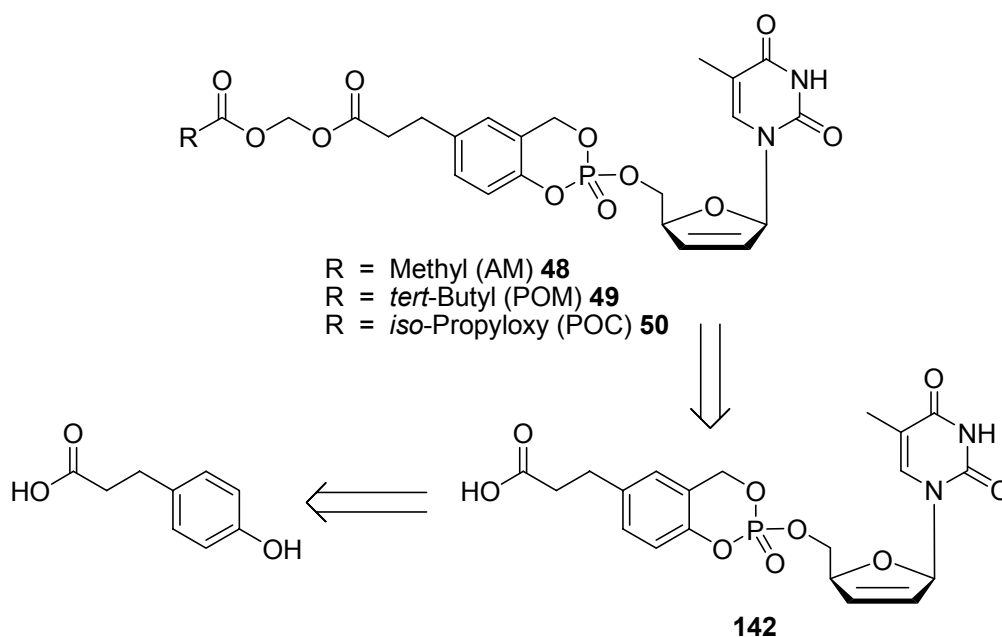


Abb. 116 Retrosyntheseschema zur Darstellung der Zielverbindungen **48-50**

4.5.4 Synthese der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50**

Die Synthese der freien Säure 5-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP **142** ausgehend von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure erfolgte auf dem bereits aus Vorarbeiten bekannten Weg^[126,127] mit moderaten Modifikationen (Abb. 117, S. 114). Diese Synthese basierte auf einer Schützung der Carbonsäure-Funktion als *tert*-Butylester, welcher im abschließenden Syntheseschritt unter sauren Bedingungen gespalten wurde.

Zunächst wurde 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure in einer Reaktion mit *tert*-Butanol und *N,N*-DMF-dineopentylacetal selektiv *tert*-butyliert, um so in 69 % Ausbeute den 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester **151** zu erhalten. Dieser wurde anschließend einer regioselektiven Hydroxymethylierung nach Nagata unterzogen, welche über das Dioxaborin **152** in einer Ausbeute von 51 % über zwei Stufen den 5-(*tert*-Butyloxycarbonyl)ethyl)-salicylalkohol **153** lieferte. Der Alkohol **153** konnte entgegen der in Vorarbeiten beschriebenen Durchführung durch Umkristallisation isoliert werden, wenn zuvor das Dioxaborin **152** chromatographisch gereinigt worden war. Erfolgte dies nicht und wurde **152** als Rohprodukt in der Oxidation eingesetzt, so störten die Verunreinigungen die Kristallisation von **153**.

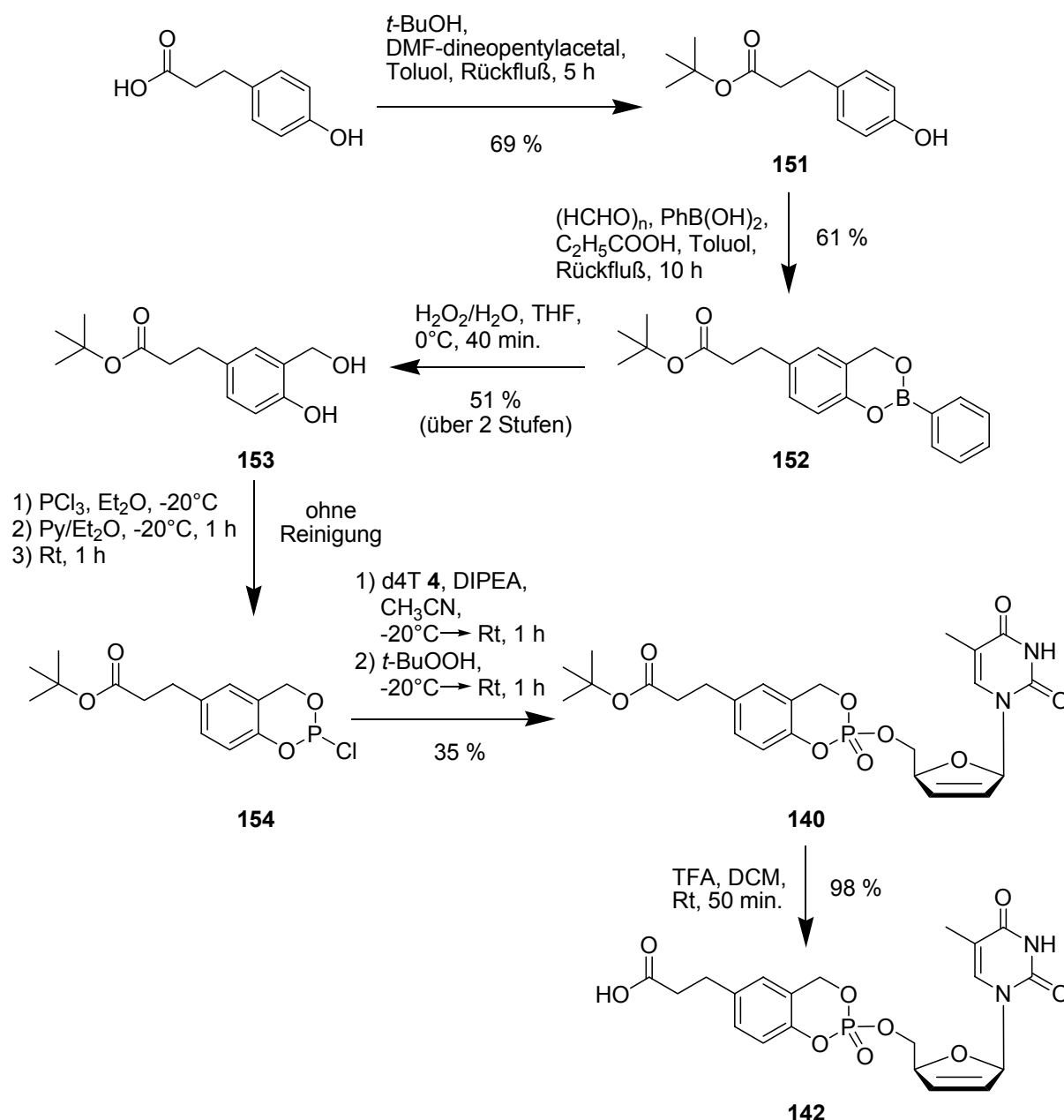


Abb. 117 Synthese von 5-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP **142**

Die anschließende Umsetzung von **153** zum 5-(*t*-Bu-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **140** erfolgte nach der etablierten Methode über das 5-(*tert*-Butyloxycarbonyl)ethyl-saligenylchlorphosphit **154**, wobei die mäßige Ausbeute von 35% für die Phosphatdiester-Synthese den für die Darstellung von „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotiden aus Vorarbeiten bekannten Ausbeuten entsprach. Die abschließende saure Spaltung des *tert*-Butylesters erforderte einen großen Überschuß an TFA und verlief nur bei einer Ansatzgröße bis etwa 120 mg **140** in fast quantitativen Ausbeuten (in den Vorarbeiten waren deutlich geringere Mengen **140** eingesetzt worden). Bei Ansätzen mit etwa 200 mg **140** wurden bereits teilweise Ausbeute-Verluste beobachtet. Auch

war darauf zu achten, daß bei der Reinigung von **142** am Chromatotron absolut aminfreie Platten verwendet wurden, da andernfalls die entsprechenden Salze von **142** isoliert wurden.

Nach der erfolgreichen Synthese der *cycloSal*-Carbonsäure **142** über sechs Stufen konnten die Versuche zur Alkylierung dieser Verbindung durchgeführt werden. Zur Darstellung von 5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **48** fand das kommerziell verfügbare Brommethylacetat als Alkylierungsreagenz Verwendung. Als nicht-nucleophile Base zum Abfangen des Bromwasserstoffs kam DIPEA zum Einsatz, und wegen seiner polaren, aber nicht-nucleophilen Eigenschaften wurde Acetonitril als Solvens gewählt. Nach dreistündiger Reaktion bei 10°C erschien der Umsatz befriedigend, so daß die Reaktion abgebrochen wurde und das gewünschte Produkt **48** nach chromatographischer Reinigung in 65 % Ausbeute erhalten werden konnte (Abb. 118). Es wurde versucht, das nicht umgesetzte Edukt **142** zu reisolieren, was jedoch aufgrund der schwierigen Abtrennung von den entstandenen Salzen nicht gelang.

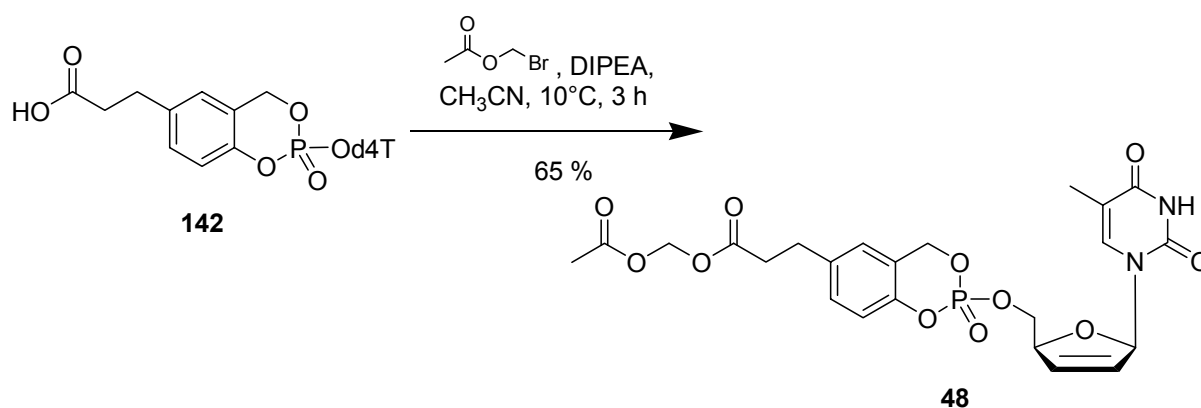


Abb. 118 Synthese von 5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **48**

Als weitaus schwieriger erwies sich die Darstellung von 5-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **49**. Da das zum Brommethylacetat analoge Alkylierungsreagenz Brommethylpivalat nicht kommerziell verfügbar und überaus umständlich herzustellen war, wurde zunächst versucht, das viel unreaktivere, aber kommerziell erhältliche Chlormethylpivalat durch eine Finkelstein-Reaktion zum Iodmethylpivalat zu aktivieren. Hierfür wurde sowohl durch Umsetzung von Chlormethylpivalat mit Natriumiodid in Aceton, in welchem das entstehende Natriumchlorid unlöslich war, das Alkyliodid vor der Umsetzung mit **142** frisch hergestellt als auch eine katalytische

Aktivierung des Alkylchlorids durch Zugabe von Natriumiodid zum Reaktionsgemisch erprobt (Abb. 119).

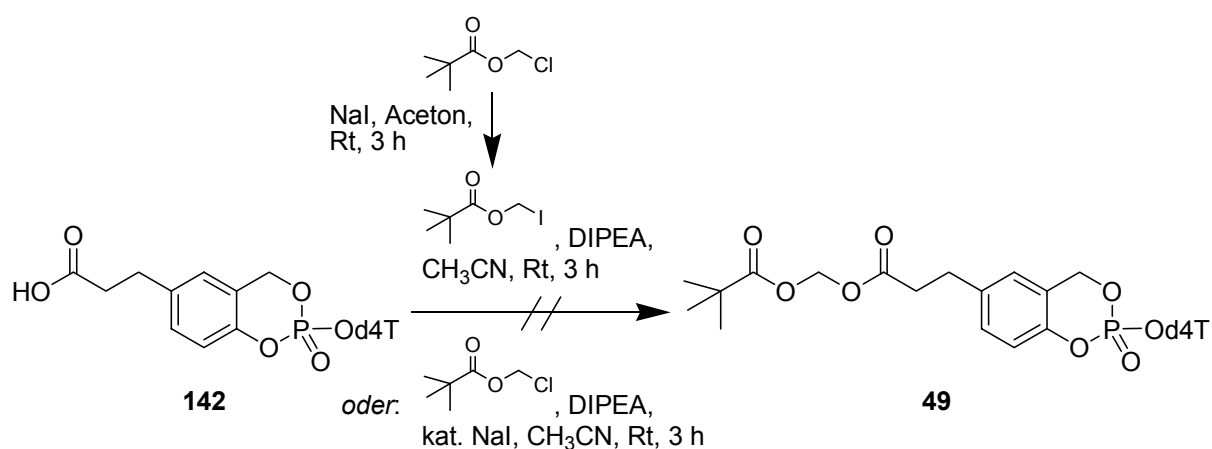


Abb. 119 Versuche zur Synthese von 5-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **49** durch Aktivierung von Chlormethylpivalat zum Iodmethylpivalat

In beiden Fällen führte die Anwesenheit von Natrium-Ionen (bei der separaten Herstellung von Iodmethylpivalat war eine vollständige Abtrennung der Natrium-Salze sehr schwierig) offensichtlich zur Bildung des in Acetonitril kaum löslichen Natrium-Salzes des Anions von **142**, welches sofort ausfiel. Die Folge war, daß das wenige im Solvens gelöste Edukt auf einen großen Überschuß an Iodmethylpivalat traf, was nicht nur zur Alkylierung der Carbonsäure-Funktion, sondern offensichtlich auch der Nucleobase Thymin führte. Es resultierten laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Produktgemische, welche sich als untrennbar erwiesen.

Ein Ausweg konnte gefunden werden, indem auf die Verwendung des unreaktiven Chlormethylpivalats zur Alkylierung zurückgegriffen wurde, um eine Alkylierung des Thymins als Nebenreaktion auszuschließen. Das Ergebnis waren eine lange Reaktionszeit und moderate Ausbeute (45 %), allerdings konnte auf diese Weise die Zielverbindung 5-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **49** erhalten werden (Abb. 120, S. 117).

Für die Darstellung von 5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **50** wurden zunächst analoge Reaktionsbedingungen wie für die der POM-modifizierte Verbindung **49**, also die Verwendung eines Alkylchlorids und Raumtemperatur, gewählt. Das hierfür benötigte *iso*-Propyloxycarbonyloxymethylchlorid (POC-Chlorid) läßt sich leicht durch Reaktion des kommerziell verfügbaren Chlormethylchloroformiats mit *iso*-Propanol erhalten und war aus Vorarbeiten noch verfügbar.

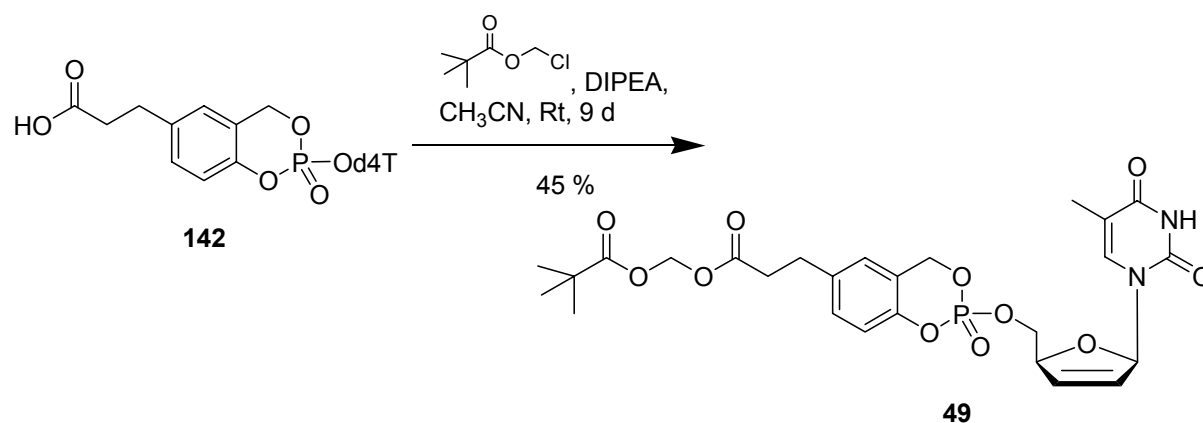


Abb. 120 Synthese von 5-(POM-Pr)-cycloSal-d4TMP **49** durch Verwendung von Chlormethylpivalat

Das POC-Chlorid erwies sich allerdings als noch weniger reaktiv als Chlormethylpivalat, so daß der Umsatz von **142** selbst nach 16 Tagen noch sehr gering war. Die Reaktionstemperatur wurde daher für weitere sieben Tage auf 50°C erhöht, was zu einem immerhin befriedigenden Umsatz und nach Aufarbeitung und Chromatographie zu einer Ausbeute von 47 % an **50** führte (Abb. 121).

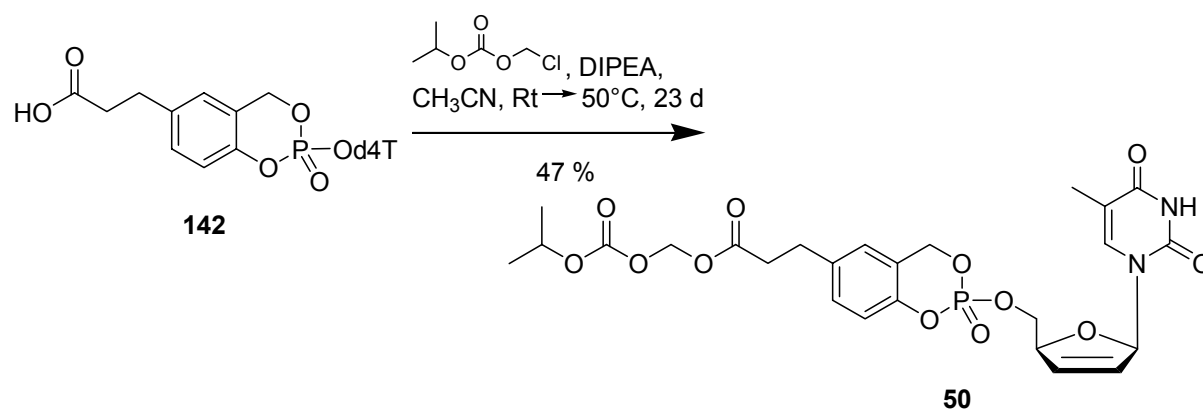


Abb. 121 Synthese von 5-(POC-Pr)-cycloSal-d4TMP **50**

Die Beobachtungen bei der Synthese der POC-modifizierten Verbindung **50** werfen die Frage auf, ob nicht für die Darstellung von **49** die Wahl von 50°C als Reaktionstemperatur sowie für die Synthese von **50** eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit zu einer Verbesserung der Ausbeute bei diesen Alkylierungsreaktionen führen könnte. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter überprüft. Für beide Reaktionen galt, wie schon für die Darstellung von **48**, daß eine Reisolierung des nicht umgesetzten Edukts **142** nicht möglich war, was einen möglichst quantitativen Umsatz in diesen Synthesen an Bedeutung gewinnen läßt.

Die Zielverbindungen **48-50** wurden allesamt als Gemische aus zwei Diastereomeren (R_P/S_P) erhalten. Eine Trennung dieser Diastereomergemische mittels präparativer RP-HPLC wurde aufgrund der geringen verfügbaren Substanzmengen nicht versucht.

4.5.5 Charakterisierung der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50**

Die synthetisierten „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** wurden zunächst den obligatorischen chemischen Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer bei pH 7.3 und 37°C unterzogen (vergl. Kapitel **4.3.6** und **4.4.7**). Die ermittelten Hydrolyse-Halbwertszeiten sind zusammen mit den Werten für die Vergleichsverbindungen *cycloSal*-d4TMP **85**, 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131** und 5-(Me-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **139** in der Abbildung 122 angegeben.

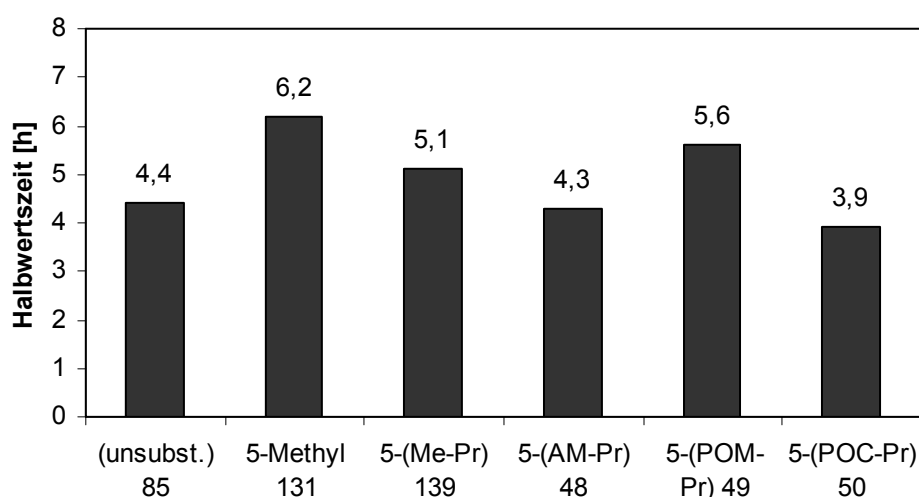


Abb. 122 Hydrolyse-Halbwertszeiten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** und der Vergleichsverbindungen **85,131,139** in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Zunächst fällt auf, daß alle „lock-in“-modifizierten Derivate hydrolyselabiler waren als die Vergleichsverbindung 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131**, was als Hinweis darauf gewertet werden kann, daß der Ethylen-Linker die Ester-Modifikation nicht vollständig elektronisch vom Aromaten isolierte, so daß der (-)I-Effekt der Carbonylgruppe den elektronenliefernden Effekt des Alkyl-Substituenten teilweise kompensierte. Da die Stabilisierung des 5-Methyl-Derivates **131** gegenüber dem unsubstituierten Prototyp **85** ohnehin nicht sehr groß ist, waren dementsprechend zwei der „lock-in“-modifizierten Pronucleotide sogar etwas labiler als **85**, nämlich die AM-substituierte

Verbindung **48** und das POC-Derivat **50**. Vergleicht man die „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs untereinander und mit dem bereits bekannten 5-(Me-Pr)-Derivat **139**, so ergeben sich immer noch recht deutliche Unterschiede bezüglich der Hydrolysestabilität. Da diese kaum von den elektronischen Unterschieden der einzelnen Ester- bzw. Acylal-Gruppen herrühren konnten, lag die Vermutung nahe, daß eventuell ein Solvations- oder Lipophilie-Effekt vorliegen könnte. Die Abbildung 123 gibt daher die mit dem Programm ChemDraw[®] im Inkrementverfahren berechneten logarithmischen Nernstschen Verteilungskoeffizienten (log P-Werte, bezogen auf ein *n*-Octanol/Wasser-Gemisch) für die Prodrugs **48-50** und **139** wieder.

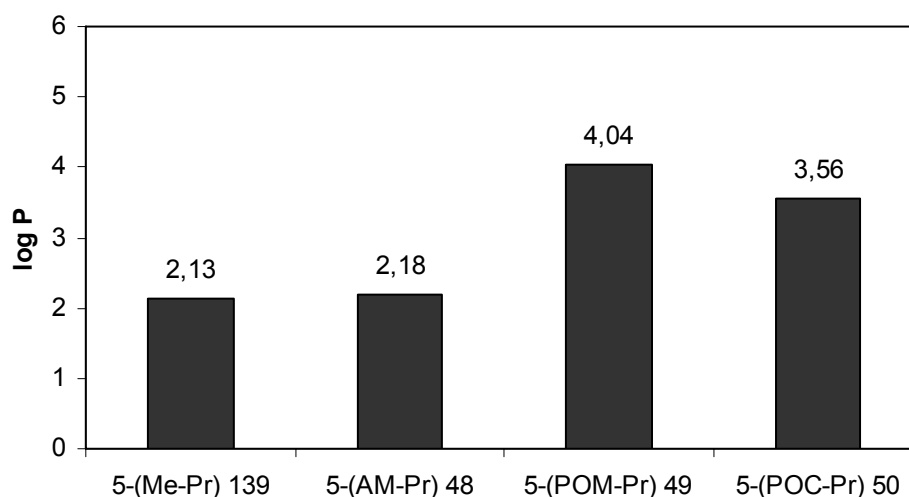


Abb. 123 Berechnete Nernstsche Verteilungskoeffizienten (log P-Werte, bezogen auf ein *n*-Octanol/Wasser-Gemisch) der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** und der Vergleichsverbindung **139**

Ein Vergleich der Abbildung 123 mit der Abbildung 122 (S. 118) ergibt, daß keine einfache Korrelation zwischen den Hydrolyse-Halbwertszeiten der genannten Verbindungen und ihren log P-Werten besteht, wenn auch die vergleichsweise hohe Stabilität von 5-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **49** ($t_{1/2} = 5.6$ h) mit der höchsten Lipophilie (log P = 4.04) einhergeht. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß der log P-Wert als artifizielle Größe nichts über Auswirkungen der Lipophilie einzelner Substrukturen auf die Solvation des Moleküls aussagt, was jedoch für die Hydrolyse der *cycloSal*-Nucleotide durchaus eine Rolle spielen mag.

Nach der Untersuchung der Stabilität der neuen „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** in wäßrigem Puffer war ihr Hydrolyseverhalten in humanen CEM/0-Zellextrakten von großer Bedeutung. Hierfür wurde auf ein etabliertes Verfahren

zurückgegriffen, bei dem der humane Extrakt (Zell-Lysate in Phosphatpuffer, pH 6.8) mit Magnesiumchlorid-Lösung versetzt und die Reaktion durch Zugabe einer 3 mM Lösung des jeweiligen Prodrugs in DMSO gestartet wurde. Um eine Kontamination des biologischen Mediums durch Probennahme zu vermeiden, wurde für jeden Meßwert eine eigene Reaktionslösung angesetzt. Die einzelnen bei 37°C durchgeführten Hydrolysen wurden durch Zugabe von Methanol gestoppt, das ausgefallene Protein durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Dabei wurde eine Variante der RP-HPLC-Analytik mit Tetrabutylammoniumhydroxid-Laufpuffer gewählt, bei der auch geladene Substanzen wie d4TMP oder das Anion der freien Säure **142** als Ionenpaare auf der Säule binden und daher detektiert werden können. Die Absolutwerte der Peakflächen der Phosphattriester wurden ermittelt und wie zuvor die normierten Integrationseinheiten bei den chemischen Hydrolysekinetiken (vergl. Kapitel **4.3.6** und **4.4.7**) gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Es ergaben sich Kurven pseudoerster Ordnung, aus denen mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms die Hydrolyse-Halbwertszeiten ermittelt werden konnten. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 124 dargestellt. Im Gegensatz zu den chemischen Kinetiken wurden wegen der begrenzten Verfügbarkeit der humanen Zellextrakte nur Einfachbestimmungen durchgeführt.

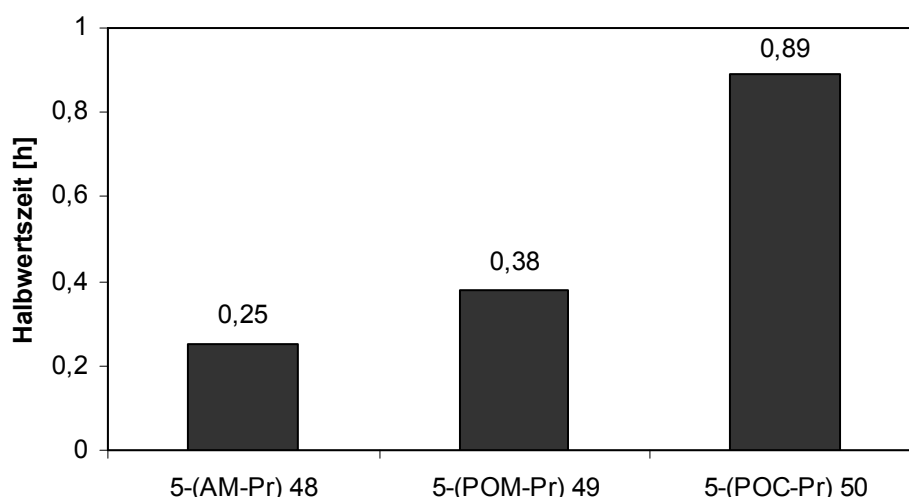


Abb. 124 Hydrolyse-Halbwertszeiten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** in humanen CEM/0-Zellextrakten bei 37°C

Für alle drei Zielverbindungen **48-50** ergab sich in den Zellextrakten eine deutliche Verkürzung der Hydrolyse-Halbwertszeit gegenüber den chemischen Kinetiken in

Phosphatpuffer. Am labilsten war die AM-modifizierte Verbindung **48** ($t_{1/2} = 0.25$ h) gefolgt vom POM-Derivat **49** ($t_{1/2} = 0.38$ h). Dies entsprach einer Beschleunigung um das 17-fache für **48** bzw. das 15-fache für **49** im Vergleich zu den chemischen Hydrolysen. Die höhere Stabilität der POM- gegenüber der AM-Gruppe in biologischen Systemen war bereits aus der Pronucleotid-Chemie bekannt. Das POC-Derivat **50** ($t_{1/2} = 0.89$ h) erwies sich als stabiler als die Acyloxymethylester **48** und **49** und wies nur eine vierfache Beschleunigung gegenüber der chemischen Kinetik auf. Ebenso wichtig wie die Beobachtung einer Beschleunigung des Abbaus der Phosphattriester war der Nachweis der freien Carbonsäure **142** als enzymatisches Produkt der Hydrolyse. Dieser Nachweis gelang für alle drei Zielverbindungen **48-50**, was aus den Chromatogrammen in der Abbildungen 125 klar ersichtlich ist (die Retentionszeit von **142** war aufgrund der Verfügbarkeit der authentischen Substanz bekannt).

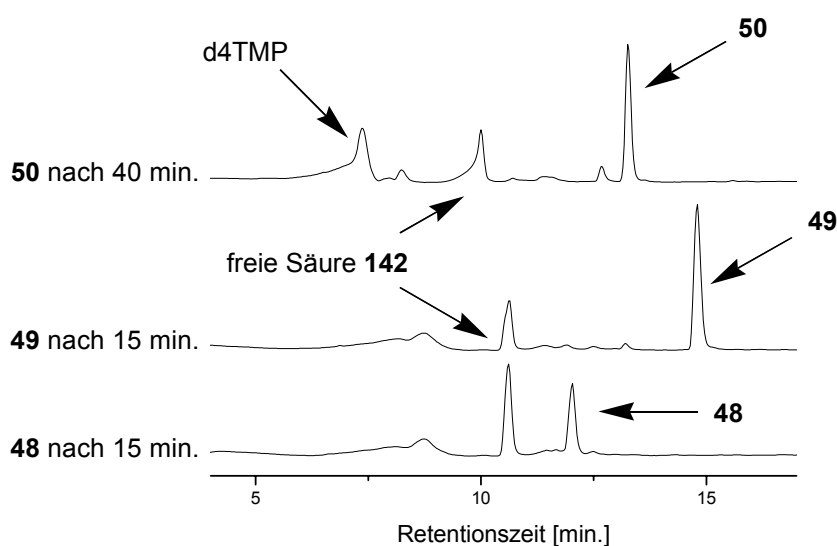


Abb. 125 Ausgewählte HPL-Chromatogramme für die Hydrolysen der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotide **48-50** in humanen CEM/0-Zellextrakten bei 37°C

Für die Acyloxymethylester **48,49**, besonders für das labilere AM-Derivat **48**, war bereits nach 15 Minuten Reaktionszeit eine deutliche Menge der freien *cycloSal*-Carbonsäure **142** nachweisbar. Für die POC-modifizierte Verbindung **50** war aufgrund ihrer offensichtlich schlechteren Substrateigenschaften gegenüber Carboxyesterase erst nach 40 Minuten Inkubation eine deutliche Menge von **142** gebildet, allerdings war zu dieser Zeit auch bereits eine erhebliche Menge d4TMP durch chemische Hydrolyse der *cycloSal*-Funktion freigesetzt worden. Die leichte

Verschiebung in der Retentionszeit von **142** gegenüber den Experimenten mit **48,49** war auf die Verwendung einer anderen Säule zurückzuführen. Aufgrund der ermittelten Daten sollten die Acyloxymethylester **48,49** den „lock-in“-Mechanismus wegen ihrer sehr schnellen intrazellulären Hydrolyse effizient durchlaufen können, was für das POC-Derivat **50** wegen der langsameren enzymatischen Spaltung nur eingeschränkt gilt.

Für ein effizientes Eintreten des „lock-in“-Effektes ist neben einer schnellen intrazellulären Spaltung auch die hinreichende extrazelluläre Stabilität der enzymatisch spaltbaren Funktion wichtig. Im Hinblick auf eine potentielle Applikation der neuen *cycloSal*-d4TMPs in der antiviralen Chemotherapie bedeutet dies eine ausreichende Stabilität in humanem Serum, für die antiviralen *in vitro*-Tests kommt es auf die entsprechende Stabilität im Kulturmedium an. Es wurden daher auch Hydrolysekinetiken in diesen Medien durchgeführt, wobei das Vorgehen grundsätzlich mit dem bei den Zellextrakt-Hydrolysen übereinstimmte. Für die Serum-Untersuchungen wurde wegen der hohen Viskosität und des großen Proteingehaltes von reinem Serum eine 5 %-ige Serumlösung in Phosphatpuffer (pH 6.8) als Medium eingesetzt, welche den Zellextrakt in der zuvor beschriebenen Durchführung als biologisches Medium ersetzte. Bei den Experimenten mit Kulturmedium wurde das unverdünnte RPMI 1640-Medium mit 10 % hitzedeaktiviertem fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS) verwendet, was dem bei den Zelltests benutzten Original-Medium entsprach. Die ermittelten Hydrolyse-Halbwertszeiten sind zusammen mit den Daten für einige Vergleichsverbindungen (*cycloSal*-d4TMP **85**, 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131**, 5-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP **142**) sowie den entsprechenden chemischen Hydrolysestabilitäten in Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) in der Abbildung 126 (S. 123) dargestellt.

Zunächst sollen die Hydrolyse-Halbwertszeiten in humanem Serum (5 %-ige Lösung in Phosphatpuffer) diskutiert werden. Liegt keine enzymatische Beteiligung an der Hydrolyse vor, so sollte man erwarten, daß die Pronucleotide im Serum ähnlich stabil wie in der chemischen Hydrolysekinetik sind, wenn nicht durch den niedrigeren pH-Wert des Puffers bei den Serum-Experimenten noch Stabilität gewonnen wird. Dies war für die Vergleichsverbindungen **85,131,142**, die allesamt keine enzymatisch spaltbaren Gruppen besaßen, auch der Fall. Für die Acyloxymethylester **48,49** schien zwar eine minimale Labilisierung vorzuliegen, allerdings muß hierbei der erhebliche Meßfehler der Kinetiken in biologischen Medien (Labilität des Mediums,

Pipettierfehler durch das Ansetzen separater Reaktionslösungen, kein interner Standard) bedacht werden. Für das POC-modifizierte Derivat **50** ergab sich eine leichte Stabilisierung im Vergleich zum enzymfreien Medium.

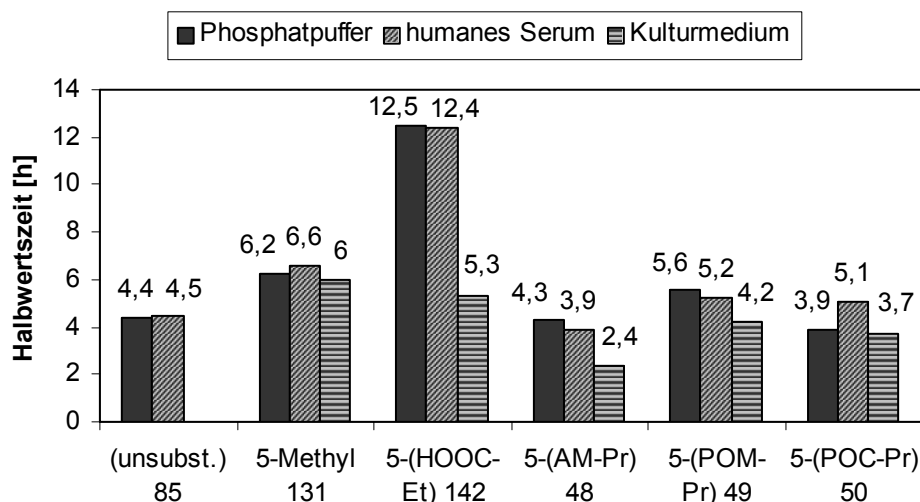


Abb. 126 Hydrolyse-Halbwertszeiten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** sowie einiger Vergleichsverbindungen in humanem Serum, Kulturmedium und Phosphatpuffer bei 37°C

Alle diese Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, daß eine schnelle enzymatische Spaltung der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs im verdünnten Serum nicht eintrat. Diese These wurde durch die erhaltenen HPL-Chromatogramme noch erhärtet, in denen, wenn überhaupt, nur minimale Mengen die freien Säure **142** zu detektieren waren (Abb. 127, S. 124).

Natürlich stellt sich die Frage, ob die Verdünnung des Serums zum Ausbleiben der enzymatischen Spaltung beigetragen hat. Hierbei ist allerdings zu bedenken, daß es sich bei den CEM/0-Zellextrakten ebenso um verdünnte Lösungen der zellulären Proteine in Phosphatpuffer gehandelt hat und trotzdem eine schnelle enzymatische Reaktion stattfand. Man kann somit eine hinreichende extrazelluläre Stabilität der enzymatisch spaltbaren Acylal-Gruppen von **48-50** postulieren, wenn auch die Situation in reinem Serum nicht exakt wiedergegeben werden kann.

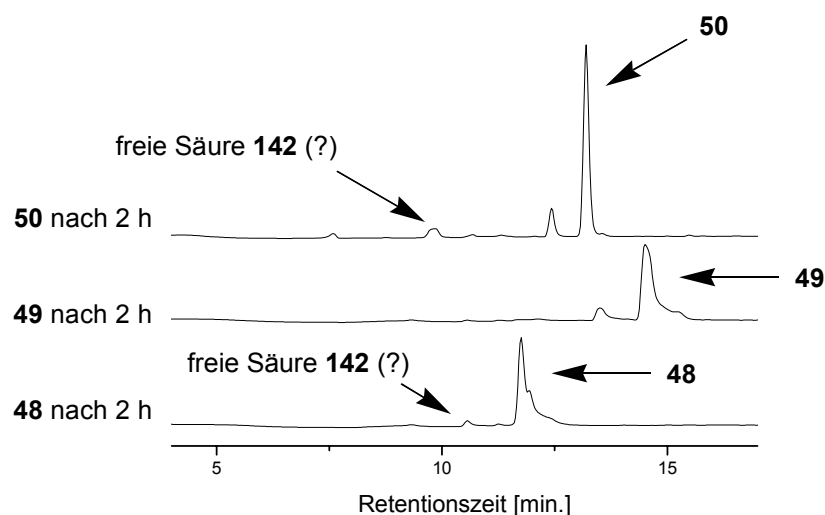


Abb. 127 Ausgewählte HPL-Chromatogramme für die Hydrolysen der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotide **48-50** in 5 %-igem humanem Serum in Phosphatpuffer, pH 6.8, 37°C

Im Folgenden soll auf die in der Abbildung 126 (S. 123) wiedergegebenen Hydrolysestabilitäten im Kulturmedium eingegangen werden. Grundsätzlich gilt auch für diese Experimente, daß bei ähnlichen Halbwertszeiten wie in den chemischen Kinetiken davon auszugehen ist, daß keine schnelle enzymatische Spaltung der Pronucleotide im Kulturmedium erfolgt. Allerdings betrug der pH-Wert des reinen RPMI-Mediums 7.5, der des mit FCS versetztem Mediums sogar 7.6, so daß eine leichte Beschleunigung der Hydrolyse gegenüber den Untersuchungen in Phosphatpuffer (pH 7.3) nicht unbedingt auf eine enzymatische Reaktion schließen läßt. Für die Vergleichsverbindungen *cycloSal*-d4TMP **85** und 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131** ergaben sich in der Tat ähnliche Stabilitäten wie in den chemischen Kinetiken. Für die freie Säure **142** ergab sich eine deutliche Beschleunigung der Hydrolyse, obwohl sie keine enzymatisch spaltbare Gruppe besaß. Hierbei ist zu bedenken, daß sich für die Kinetik von **142** in reinem Phosphatpuffer bereits in Vorarbeiten^[126,127] eine verglichen mit **131** außergewöhnlich hohe Stabilität ergeben hatte, die möglicherweise auf Solvatationseffekte an dem in Phosphatpuffer negativ geladenen Molekül zurückzuführen war. Beim Übergang zum RPMI-Medium können diese Effekte aufgrund des anderen Puffersystems (Hydrogencarbonat und Glutamin sind Hauptbestandteile von RPMI 1640) eventuell nicht mehr auftreten, so daß die der 5-Methyl-substituierten Verbindung **131** ähnliche Stabilität plausibel erscheint. Für die neuen „lock-in“-modifizierten Pronucleotide **48-50** ist beim Übergang vom Phosphat-

puffer zum Kulturmedium durchweg eine Beschleunigung der hydrolytischen Spaltung festzustellen, die für das AM-modifizierte Derivat **48** sehr deutlich (etwa 1.8-fach) und für die POM-Verbindung **49** immer noch signifikant (etwa 1.3-fach) ausfiel. Das POC-maskierte Derivat **50** wies im Kulturmedium im Rahmen des Meßfehlers eine der chemischen Kinetik vergleichbare Stabilität auf. Diese Reihung entsprach den in den Zellextrakt-Untersuchungen ermittelten Substrateigenschaften gegenüber Carboxyesterase, so daß auch hier auf die Bildung der freien Säure **142** zu prüfen war (Abb. 128).

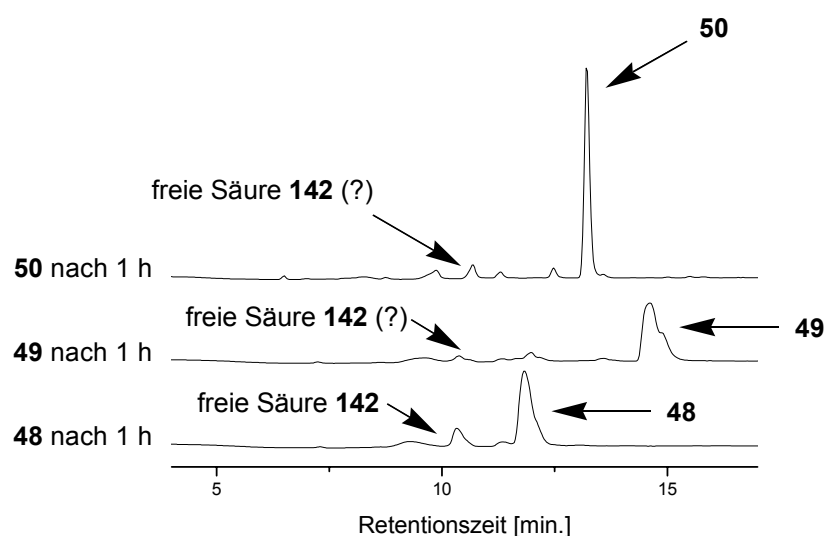


Abb. 128 Ausgewählte HPL-Chromatogramme für die Hydrolysen der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotide **48-50** in Kulturmedium bei 37°C

Während für die Hydrolyse der AM-modifizierten Verbindung **48** die Entstehung der freien Säure **142** in signifikanter Menge nachweisbar war, schienen für die POM- und POC-maskierten Derivate **49,50**, wenn überhaupt, nur Spuren dieses enzymatischen Spaltproduktes entstanden zu sein. Offensichtlich wird dem fötalen Kälberserum bei der Hitzedeaktivierung die Esterase-Aktivität nicht vollkommen genommen, so daß im Kulturmedium zumindest mit einer teilweisen Spaltung besonders von 5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **48** zu rechnen sein muß.

Um den Einfluß der Gegenwart des fötalen Kälberserums im Kulturmedium auf die Hydrolyseeigenschaften der Verbindungen näher zu untersuchen, wurden Zusatzexperimente durchgeführt, indem zusätzlich zu den Nullproben und Acht-Stunden-Werten der Kulturmedium-Hydrolysen auch entsprechende Proben mit reinem RPMI-Medium, also ohne FCS, angesetzt wurden. Durch Vergleich der Absolutwerte der

Peakflächen für die Acht-Stunden-Proben mit den Nullproben konnte der Verlust des Phosphattriester (mit und ohne FCS) ermittelt werden. Die entsprechenden Ergebnisse finden sich in der Abbildung 129.

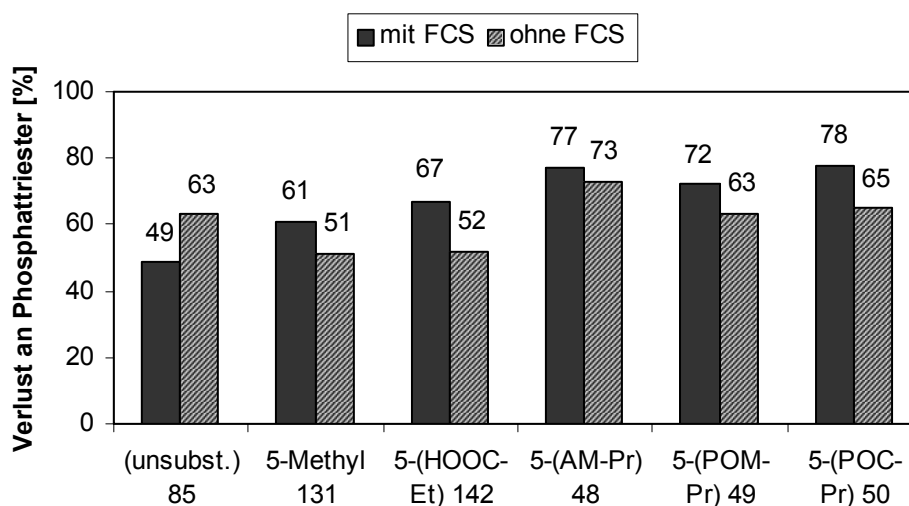


Abb. 129 Verlust an Phosphattriester für die „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-d4TMPs **48-50** und einige Vergleichsverbindungen nach 8 h Inkubation bei 37°C im Kulturmedium mit und ohne FCS

Zunächst sollen neben den Zielverbindungen **48-50** nur die Vergleichsverbindungen **131** und **142** diskutiert werden. Für diese Pronucleotide ergab sich ein einheitliches Bild, da die Hydrolyse im Kulturmedium mit FCS stets etwas schneller ablief als ohne FCS. Dies ist zunächst nicht weiter verwunderlich, da das FCS das Kulturmedium leicht alkalischer macht, was die chemische Hydrolyse der *cycloSal*-Maske etwas beschleunigen kann. Bemerkenswert ist, daß die Beschleunigung der Hydrolyse von **48** durch das FCS nur gering ausfiel, obwohl eine teilweise enzymatische Spaltung erwiesen war. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß **48** die labilste der untersuchten Verbindungen war, so daß nach achtstündiger Inkubation nur noch eine recht geringe Menge des Phosphattriester verblieb und der Meßfehler entsprechend groß wurde. Für die anderen „lock-in“-modifizierten Derivate **49,50**, deren enzymatische Spaltung im Kulturmedium ja fraglich blieb, konnte keine über das für die Referenzen **131** und **142** ermittelte Maß hinausgehende Beschleunigung durch das FCS festgestellt werden, wobei auch hier der Meßfehler zu bedenken ist.

Der unsubstituierte Prototyp *cycloSal*-d4TMP **85** stellte bei diesen Untersuchungen einen Sonderfall dar. Auch für diese Verbindung wurde versucht, eine vollständige Kinetik im Kulturmedium mit FCS zu erhalten, allerdings war dabei festzustellen, daß

die Hydrolyse nach einer recht schnellen Spaltung des Phosphatresters zu Beginn später (nach etwa drei Stunden) sehr langsam wurde, so daß sich auch keine Halbwertszeit nach erster Ordnung ermitteln ließ. Dies ist ein typischer Kurvenverlauf beim Vorliegen unspezifischer Proteinbindung, einem für alle Pharmaka potentiell wichtigen Phänomen. Zunächst kommt es zur Einstellung eines Gleichgewichts der in Lösung befindlichen Substanz mit der Protein-gebundenen Form und somit scheinbar zu einem schnellen Abbau der Verbindung. Anschließend fungiert das Protein als Depot, welches stets kleine Mengen der Substanz in Lösung freisetzt, so daß es die Hydrolyse des Pronucleotids stark verlangsamt. Dies erklärt auch die Verlangsamung der Hydrolyse von **85** in Gegenwart von FCS. Bei der Serum-Hydrolyse von **85** hatte sich ein ähnliches Bild ergeben, allerdings war die Ausprägung des Phänomens hier nicht so extrem, so daß sich zumindest eine formale Halbwertszeit bestimmen ließ.

Es wurde versucht, die unspezifische Proteinbindung der *cycloSal*-Nucleotide bei den Serum- und Kulturmedium-Hydrolysen näher zu untersuchen. Für die Kulturmedium-Experimente wurden hierfür lediglich die Nullwerte des reinen RPMI-Mediums mit denen für das FCS-haltige Medium verglichen, für die Serum-Kinetiken wurden zusätzliche Nullwerte mit reinem Phosphatpuffer ohne Serumgehalt bestimmt. Generell ergaben sich für die meisten Verbindungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der in Lösung befindlichen Pronucleotid-Menge beim Vergleich der proteinhaltigen mit den proteinfreien Medien. Dies gilt auch für die Kulturmedium-Kinetik des offensichtlich zur Proteinbindung neigenden *cycloSal*-d4TMPs **85**, so daß es fraglich erscheint, ob die beschriebenen Experimente tatsächlich dazu geeignet waren, das Phänomen der unspezifischen Proteinbindung sicher nachzuweisen. Dies mag zu einem daran liegen, daß auch die unspezifische Proteinbindung im Sinne einer Gleichgewichtseinstellung etwas Zeit benötigt, zum anderen ist aber auch die verwendete Methode zur Aufarbeitung der Proben in Frage zu stellen, da beim Fällen des Proteins mit Methanol stets etwas Protein-gebundene Substanz durch Methanol gelöst werden kann. Eine Beurteilung anhand des Kurvenverlaufs der Hydrolyse oder auch Biochromatographie-Experimente ohne Abtrennung des Proteins vor der Analytik erscheinen daher ratsamer.

Im Hinblick auf eine potentielle Anwendbarkeit der Pronucleotide **48-50** in der antiviralen Chemotherapie war auch eine Untersuchungen ihrer pH-Stabilitäten von Bedeutung, da eine saure Spaltung der acylalischen Seitenketten-Funktionalitäten

prinzipiell möglich sein sollte. Es wurde daher eine 5 mM Lösung der jeweiligen Substanz in DMSO mit einem Citrat/Salzsäure-Puffer (pH 2.0) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe HPLC-analytisch untersucht und mit einer entsprechenden Nullprobe verglichen. Die Experimente wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die „lock-in“-modifizierten Verbindungen **48-50** ergab sich ebenso wie für die nicht sauer spaltbare Referenz 5-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP **142** im Rahmen der Meßgenauigkeit ein praktisch voller Erhalt der eingesetzten Substanzmenge nach der dreißigminütigen Inkubation, und für keines der drei Pronucleotide **48-50** konnte die freie Säure **142** als Spaltprodukt nachgewiesen werden. Exemplarisch sei eines der Experimente für das 5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **50** in der Abbildung 130 dargestellt.

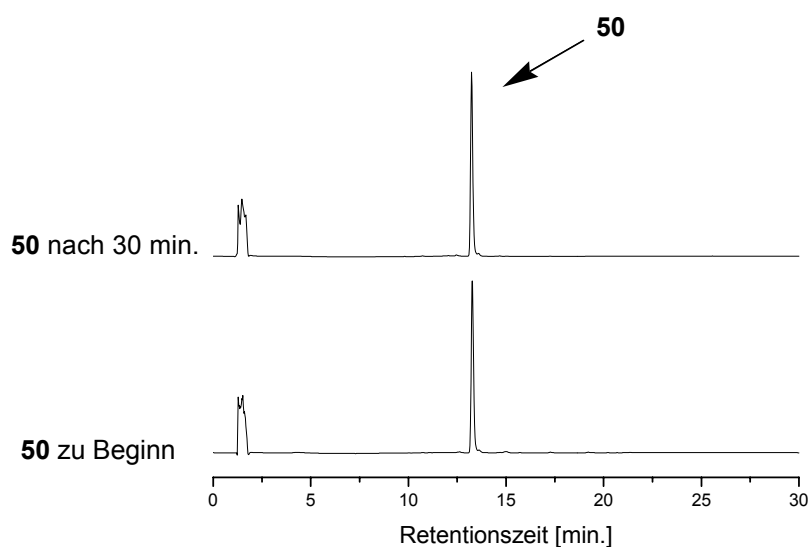


Abb. 130 HPL-Chromatogramme für die pH-Stabilitätsuntersuchung von 5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **50** in Citrat/Salzsäure-Puffer, pH 2.0, 37°C

Trotz der eingehenden Hydrolysestudien mit HPLC-analytischen Methoden war die Frage nach den finalen Produkten der chemischen Hydrolysen der Zielverbindungen **48-50** noch nicht eindeutig beantwortet. Es wurden daher analog zu den bereits in Kapitel 4.4.7 beschriebenen Experimenten ³¹P-NMR-Hydrolysestudien in Imidazol/Salzsäure-Puffer bei pH 7.3 an 5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **48** (als exemplarischem Vertreter der Acyloxymethylester **48,49**) und 5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **50** durchgeführt (Abb. 131 und 132, S. 129).

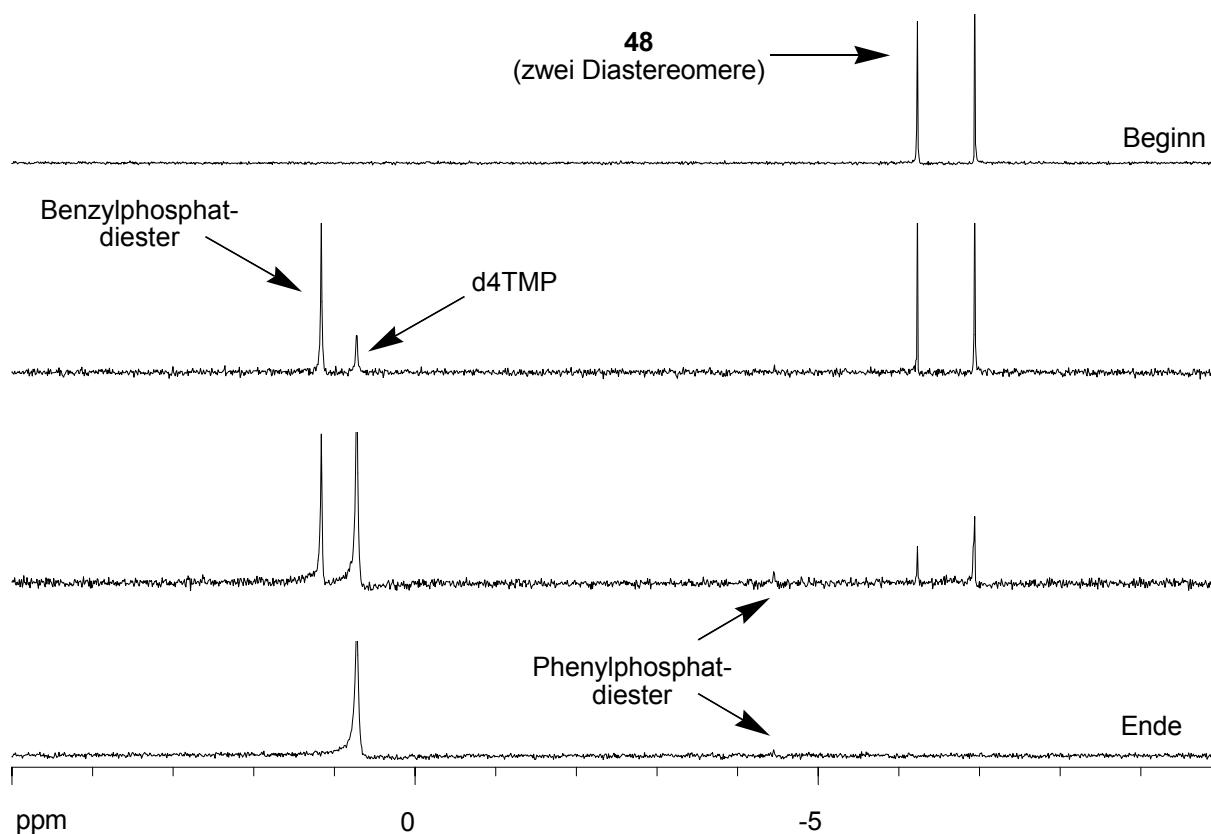


Abb. 131 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **48** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

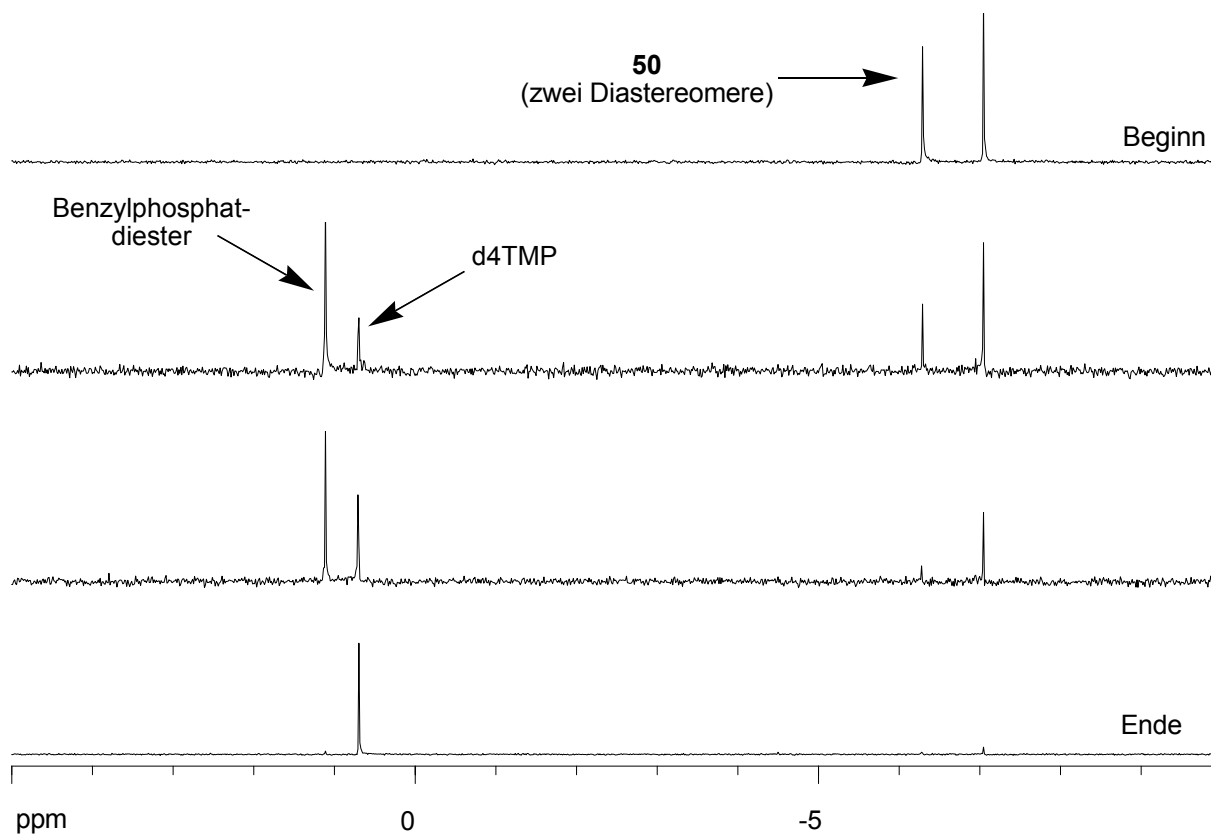


Abb. 132 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **50** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Für beide Verbindungen konnte eine Hydrolyse nach dem bekannten Mechanismus, also über einen intermediären Benzylphosphatdiester zum d4TMP (vergl. Kapitel 2.2), nachgewiesen werden. Im Falle des AM-maskierten Derivates **48** wurde darüber hinaus noch eine kleine Menge (2 %) des unerwünschten Phenylphosphatdiesters als Nebenprodukt am Ende der Hydrolyse gefunden. Für beide Pronucleotide galt, daß während der Hydrolyse keine zusätzlichen Signale im Bereich der *cycloSal*-Phosphatdiester auftraten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es nicht zur chemischen Spaltung der Acylal-Gruppen (AM- bzw. POC-Ester) in dem verwendeten Puffersystem kam. Die chemische Verschiebung der freien Säure **142** unterschied sich hinreichend von der von **48** und **50**, was eine Überlagerung und eine formale Addition der ^{31}P -NMR-Spektren von **48** und **142** klar belegen (Abb. 133).

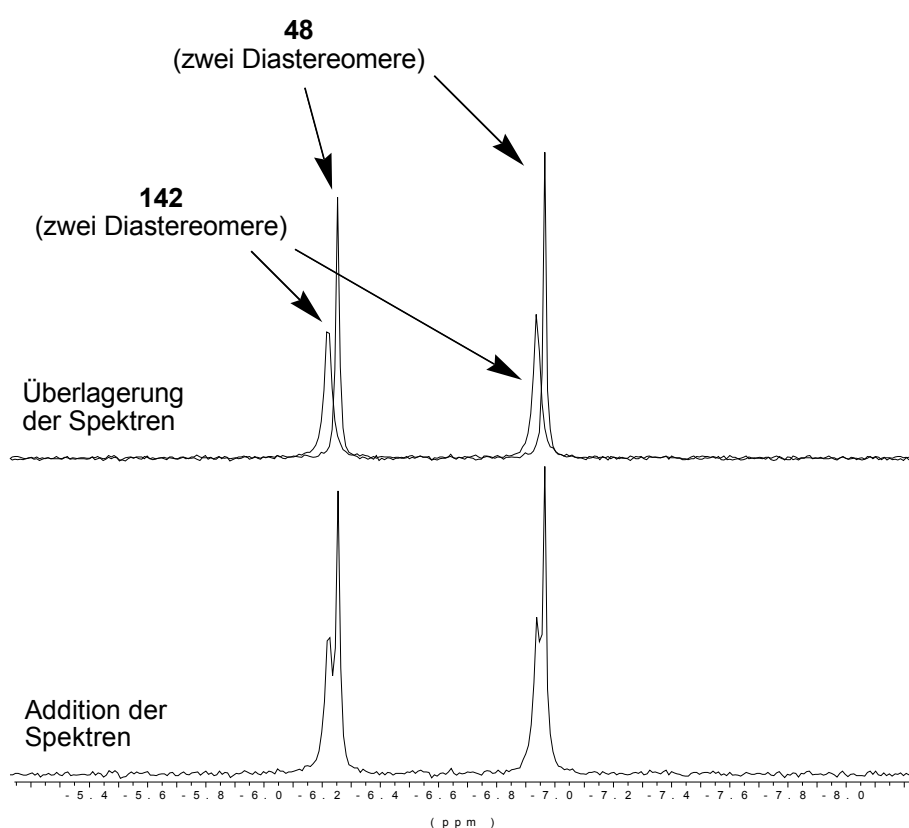


Abb. 133 Überlagerung und Addition der ^{31}P -NMR-Spektren von **48** und **142** unter den Bedingungen der ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien

4.5.6 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs 48-50

Die synthetisierten „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** wurden wie zuvor bereits die bromierten *cycloSal*-d4TMPs **79-81** und die Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** (vergl. Kapitel **4.3.6** und **4.4.8**) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Balzarini, Universität Leuven, Belgien, antiviralen *in vitro*-Tests gegen HIV-1 und HIV-2 unterzogen. Die erhaltenen Daten sind zusammen mit den Werten für die Vergleichsverbindung 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131** sowie denen für das Nucleosid-Analogon d4T **4** in der Tabelle 8 angegeben. Es sei darauf hingewiesen, daß auch in diesem Fall die für d4T **4** aufgeführten Daten etwas von den zuvor angegebenen abweichen, da diese Verbindung in jeder neuen Testreihe stets als Referenz getestet wird und es leichte Unterschiede zwischen den Testreihen geben kann.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [µM]		CC ₅₀ ^b [µM]	
	<u>CEM/0</u>		<u>CEM/TK⁻</u>	<u>CEM/0</u>
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
5-(AM-Pr) 48	0.20 ± 0.11	0.53 ± 0.39	25.0 ± 19.1	81.1 ± 1.4
5-(POM-Pr) 49	0.23 ± 0.04	0.33 ± 0.11	0.70 ± 0.08	23.8 ± 4.0
5-(POC-Pr) 50	0.26 ± 0.20	0.60 ± 0.00	1.73 ± 1.97	73.6 ± 12.0
5-Methyl 131	0.46 ± 0.24	0.46 ± 0.48	1.25 ± 0.90	37.9 ± 20.0
5-(HOOC-Et) 142	0.14 ± 0.10	0.80 ± 0.20	50.0 ± 30.0	73.6 ± 0.0
d4T 4	0.19 ± 0.13	0.48 ± 0.32	7.5 ± 6.1	112 ± 15

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 8 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** und der Vergleichsverbindungen **131,142** und d4T **4**

Auch für die Pronucleotide **48-50** ergaben sich in den CEM-Wildtyp-Zellen Aktivitäten, die mit denen von d4T **4** und auch der Referenzen **131** und **142** vergleichbar waren, was jedoch aufgrund der erfolgreichen hydrolytischen Freisetzung von d4TMP aus diesen Prodrugs und der daraus resultierenden Möglichkeit der extrazellulären Bildung von d4T **4** durch Dephosphorylierung von

d4TMP nicht verwunderlich war (vergl. Kapitel **4.3.6** und **4.4.8**). Eine Verbesserung der Aktivität in den Wildtyp-Zellen gegenüber der nicht „lock-in“-modifizierten Vergleichsverbindung **131** war jedoch nicht zu beobachten, obwohl zumindest das POM-Derivat **49** mit einer deutlichen extrazellulären Stabilität und einer schnellen intrazellulären enzymatischen Spaltung (vergl. Kapitel **4.5.5**) eigentlich den „lock-in“-Mechanismus effizient durchlaufen müßte. Das AM-Derivat **48** und die POC-maskierte Verbindung **50** wiesen demgegenüber mit ihrer erheblichen Labilität im Kulturmedium (**48**) bzw. ihrer langsameren intrazellulären Spaltung (**50**) deutliche Nachteile in ihrem Hydrolyseverhalten auf.

Entscheidend waren jedoch auch hier die anti-HIV-2-Aktivitäten in den TK-defizienten CEM-Zellen. Für das AM-Derivat **50** wurde in diesen Experimenten ein praktisch vollständiger Verlust der Aktivität aus den Wildtyp-Zelltests festgestellt, lediglich der „Hintergrundwert“ des in dieser Zelllinie eigentlich inaktiven d4T **4** wurde erreicht. Für das POC-modifizierte Pronucleotid **50** wurde ein leichter Verlust an Aktivität gegenüber den Wildtyp-Zelltests beobachtet (wenn auch der Meßfehler hierbei erheblich war), und das POM-Derivat **49** wies einen beinahe vollständigen Erhalt der antiviralen Aktivität beim Übergang von den Wildtyp-Zellen zu den Mutanten auf. Diese Reihung korrelierte mit den Stabilitäten von **48-50** im Kulturmedium. Die Verbindung **48** war die labilste in den Kulturmedium-Kinetiken gewesen und erlitt darüber hinaus eine teilweise enzymatische Spaltung der Acylal-Modifikation. Kommt es zur extrazellulären Freisetzung der Säure **142**, so liegt jedoch kein „lock-in“-sondern ein „lock-out“-Effekt vor, was den Aktivitätsverlust erklären mag. Die geringe Membranpermeabilität von **142** wird dabei, wie bereits in Kapitel **4.5.2** angedeutet, durch den massiven Aktivitätsverlust dieser Verbindung bei den Tests in den TK-defizienten-Zellen belegt. Die Derivate **49** und **50** waren stabiler und erfuhren praktisch keinen enzymatischen Abbau im Kulturmedium, was sich in besseren antiviralen Aktivitäten in den TK-defizienten Zellen niederschlug. Es bleibt jedoch fraglich, ob die *in vitro*-Zelltests die *in vivo*-Situation für die Pronucleotide **48-50** hierbei wirklich gut wiedergaben, da die Serumstabilitäten von **48-50** durchweg befriedigend waren. Ein Vergleich mit 5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **131**, welches ebenfalls leicht an Aktivität in den TK-defizienten Zellen einbüßte und im Kulturmedium sogar noch stabiler als das POM-Derivat war, zeigte, daß 5-Alkyl-substituierte *cycloSal*-d4TMPs offensichtlich generell keine hinreichende hydrolytische Stabilisierung der *cycloSal*-Maske besitzen, um den TK-Bypass wirklich

effizient bewirken zu können. Insgesamt läßt sich aber festhalten, daß die „lock-in“-modifizierte Verbindung mit dem besten Hydrolyseprofil (das POM-maskierte Derivat **49**) auch die besten antiviralen Aktivitäten aufwies.

Ein Vergleich der Cytotoxizitäten weist auf die prinzipielle Regel hin, daß die getesteten Pronucleotide umso cytotoxischer im Vergleich zu d4T **4** waren, je effizienter sie den TK-Bypass bewirkten, daß die Cytotoxizitäten also mit den antiviralen Aktivitäten in den CEM/TK-Zellen korrelierten. Dies erhärtet die bereits geäußerte Vermutung, daß der cytotoxische Effekt der Pronucleotide auf die intrazelluläre Freisetzung eines Nucleotid-Analogons zurückzuführen ist (vergl. Kapitel **4.4.8**).

4.5.7 Versuche zur Synthese der 3-substituierten Regioisomere von **48-50**

Um die antiviralen Eigenschaften der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** potentiell zu verbessern, schien eine Erhöhung der chemischen Hydrolysestabilität der *cycloSal*-Maske notwendig zu sein. Dies sollte zu einer besseren Zellaufnahme des intakten Prodrugs durch passive Membrandiffusion sowie einer erhöhten Differenz zwischen extrazellulärer (chemischer) und intrazellulärer (enzymatischer) Stabilität führen. Da bekannt war, daß Alkyl-Substituenten in der 3-Position der *cycloSal*-Maske einen größeren stabilisierenden Effekt als in der 5-Position besitzen, lag eine Synthese der 3-substituierten Regioisomere von **48-50** nahe. Die entsprechenden Zielverbindungen waren somit 3-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **155**, 3-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **156** und 3-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **157** (Abb. 134).

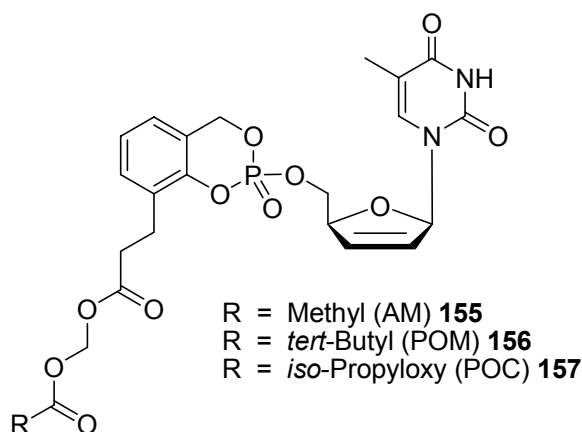


Abb. 134 Die Zielverbindungen **155-157**

Zur Darstellung von **155-157** wurde ein der Darstellung von **48-50** analoger Syntheseweg gewählt (vergl. Kapitel **4.5.3** und **4.5.4**). Es war also zunächst die freie Säure 3-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP **138** herzustellen, deren Synthese ausgehend von 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure wie schon die von **142** aus Vorarbeiten bekannt war^[126,127] (Abb. 135).

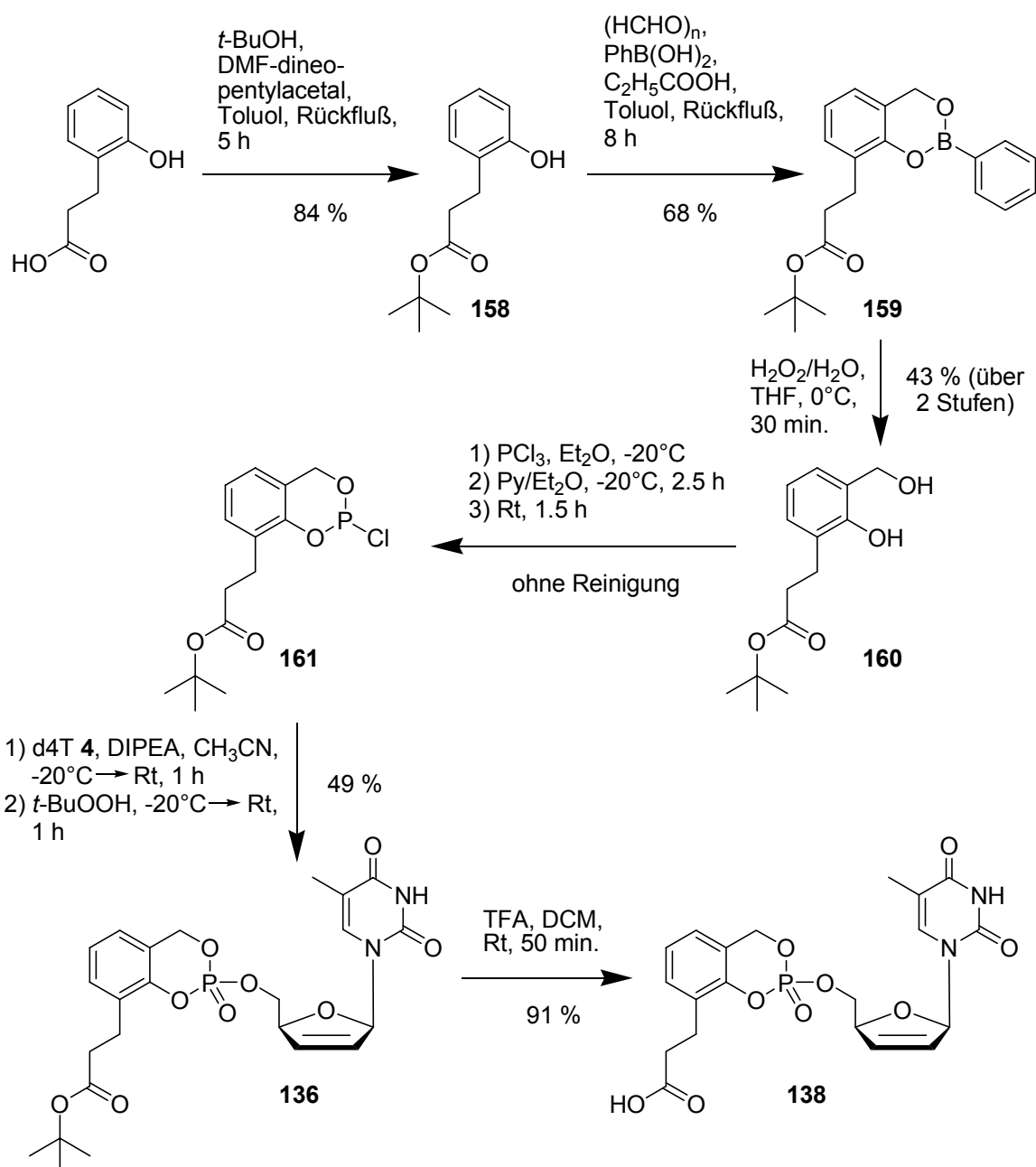


Abb. 135 Synthese von 3-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP **138**

Zunächst wurde durch selektive *tert*-Butylierung von 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester **158** in 84 % Ausbeute dargestellt. Es folgte eine regioselektive Hydroxymethylierung nach Nagata, die über

das Dioxaborin **159** in 43 % Ausbeute über zwei Stufen zum 3-(*tert*-Butyloxycarbonyl-ethyl)-salicylalkohol **160** führte. Im Gegensatz zu seinem Regioisomer **153** konnte **160** nicht durch Umkristallisation isoliert werden, sondern mußte recht aufwendig chromatographisch gereinigt werden. Die anschließende Anwendung der Chlorphosphit-Methode führte zu der Synthese von 3-(*tert*-Butyloxycarbonyl-ethyl)-saligenylchlorphosphit **161**, aus welchem wiederum die Darstellung von 3-(*t*-Bu-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **136** erfolgte. Die Ausbeute von 49 % für die Nucleotid-Synthese war dabei angesichts der durchschnittlich für die Synthesen „lock-in“-modifizierter *cycloSal*-Derivate erzielten Ausbeuten bemerkenswert gut. Die abschließende saure Entschützung des Esters **136** zur *cycloSal*-Carbonsäure **138** verlief mit 91 % in ähnlich hoher Ausbeute wie die Umsetzung von **140** zu **142**, allerdings wurden zum Teil auch Ansätze mit nur etwa 70 % Ausbeute durchgeführt.

Nach der erfolgreichen Darstellung von **138** über sechs Stufen wurde auch hier eine Alkylierung dieser Säure mit den bekannten Reagenzien versucht, um so die gewünschten Zielverbindungen **155-157** zu erhalten (vergl. Kapitel 4.5.4). Zunächst erfolgte der Versuch einer Synthese des AM-Derivates **155** durch Reaktion von **138** mit Brommethylacetat in Gegenwart von DIPEA analog zu der zuvor beschriebenen Darstellung des Regioisomers **48** aus **142** (Abb. 136).

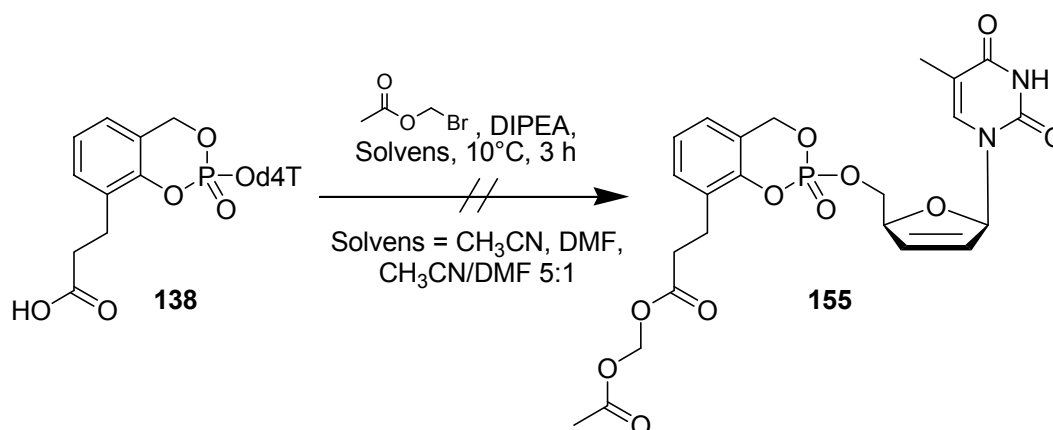


Abb. 136 Versuche zur Synthese von 3-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **155**

Die *cycloSal*-Carbonsäure **138** erwies sich in Acetonitril, welches sich als Solvens für die Alkylierungsreaktionen bei der Darstellung der 5-substituierten Isomere **48-50** bewährt hatte, als kaum löslich. Wenn mit einer Acetonitril-Suspension gearbeitet wurde, so traf der geringe gelöste Teil von **138** auf einen großen Überschuß an Brommethylacetat, und es kam zur Bildung eines Produktgemisches durch teilweise

Alkylierung der Nucleobase Thymin. In DMF, welches ebenso als Lösungsmittel für derartige Alkylierungen Verwendung findet, war die Säure **138** zwar gut löslich, allerdings verlief die Reaktion unselektiv, und es wurde wiederum ein Produktgemisch erhalten. Dies war auch der Fall, wenn ein Acetonitril/DMF-Gemisch eingesetzt wurde, in dem der DMF-Anteil nur zum Lösen des Eduktes **138** diente. Die analogen Beobachtungen galten für die Versuche zur Synthese des POM-Derivates **156** mit dem unreaktiveren Chlormethylpivalat (Abb. 137). Auf entsprechende Versuche zur Darstellung des POC-Derivates **157** wurde daher verzichtet.

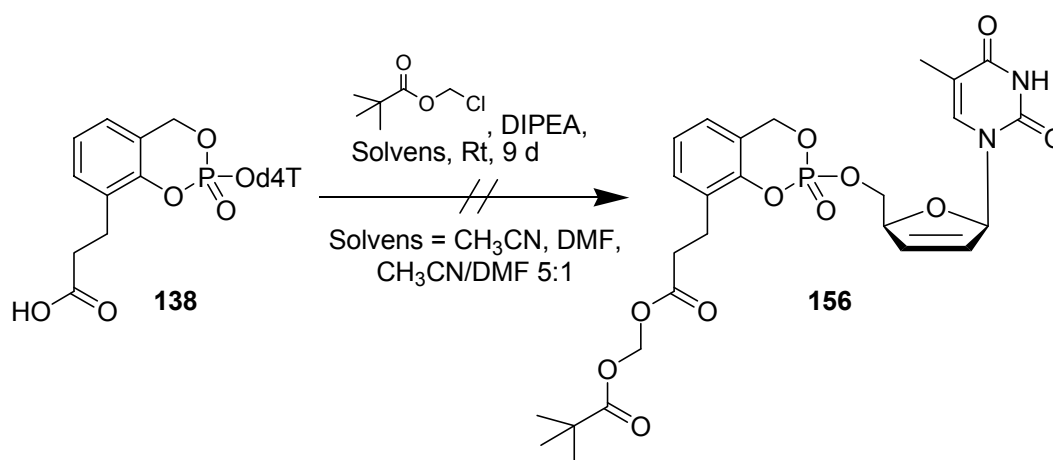


Abb. 137 Versuche zur Synthese von 3-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **156**

Andere geeignete Lösungsmittel für die Alkylierungsreaktionen zu finden war schwierig, da die Solventien zwar polar, aber auch nicht-nucleophil sein mußten, so daß alle Alkohole nicht in Frage kamen. Auf die Verwendung von DMSO wurde wegen dessen schwieriger Entfernung nach der Reaktion verzichtet, und in Aceton war die Säure **138** ebenfalls unlöslich. Einzig THF könnte zumindest als Cosolvens noch eine Alternative darstellen, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht wurde.

Die Schwierigkeiten bei der Alkylierung von **138** und damit bei der Synthese der Zielverbindungen **155-157** belegen, daß der gewählte Syntheseweg durchaus Nachteile aufweist, noch zumal bereits die Alkylierungsreaktionen bei der Darstellung von **48-50** nicht trivial waren. Es wäre daher von Vorteil, einen Syntheseweg zu entwickeln, bei dem die AM-, POM- und POC-Modifikationen eher, beispielsweise auf der Stufe der Salicylalkohole, eingeführt werden können. Dies würde auch die Möglichkeit eröffnen, andere Nucleosid-Analoga als d4T **4** mit den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Masken zu versehen. Da viele Nucleosid-Analoga nucleophile

Gruppen aufweisen (beispielsweise die 3'-Hydroxyfunktion bei BVDU **15**), wäre die Synthese entsprechender Pronucleotide durch Alkylierung im letzten Syntheseschritt nicht möglich.

4.6 Interaktion von Cholinesterasen mit *cycloSal*-Nucleotiden

4.6.1 Kenntnisstand

Die in vielen Spezies vorkommenden Cholinesterasen gehören zur Klasse der Serin-Hydrolasen. Beim Menschen unterscheidet man zwischen der hochspezifischen Acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) und der unspezifischeren Butyrylcholinesterase (Serumcholinesterase, BChE, E.C. 3.1.1.8)^[129]. Beide Enzyme hydrolysieren Acetylcholin zu Essigsäure und Cholin (Abb. 138).

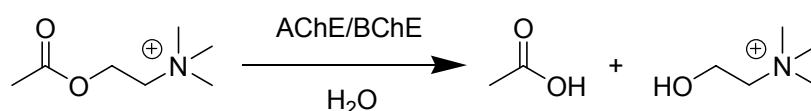


Abb. 138 Cholinesterase-katalysierte Hydrolyse von Acetylcholin

Die Acetylcholinesterase ist ein physiologisch essentiell wichtiges Enzym aus der Nervenreizleitung. Die Stimulation der synaptischen Vesikel führt zur Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Die Bindung von Acetylcholin an den entsprechenden Rezeptor in der postsynaptischen Membran induziert eine Konformationsänderung dieses Proteins, die zur Ausbildung eines ionenpermeablen Kanals in der Membran und somit zur Induktion eines Nervenimpulses im entsprechenden Neuron führt. Die Aufgabe der AChE besteht darin, Acetylcholin zu hydrolysieren und dadurch die Neurostimulation zu beenden. Diese Aufgabe erfordert eine hohe Wechselzahl (25000 s^{-1}) und einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert nahe dem diffusionskontrollierten Optimum ($2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Der katalytische Mechanismus der AChE steht in Analogie zu dem der Serin-Proteasen. Er bedient sich einer katalytischen Triade aus einem hochreaktiven Serin-Rest sowie einem benachbarten Histidin- und einem Glutamat-Rest^[129,130]. Die AChE war und ist Gegenstand zahlreicher röntgenkristallographischer Strukturuntersuchungen. So gelang beispielsweise Sussman et al. 1988 die affinitätschromatographische Reinigung und die

nachfolgende Kristallisation von AChE aus *Torpedo californica*^[131]. Es folgte im Jahre 1991 die röntgenographische Strukturaufklärung des Enzyms^[132].

Die BChE ist im Gegensatz zur AChE ein Leber- und Plasmaenzym. Ihre genaue physiologische Bedeutung ist noch unklar, da kein spezifisches Substrat bekannt ist. Es wird vermutet, daß dieses Enzym eine Rolle bei der Detoxifikation des Körpers durch die Hydrolyse von Estern spielt. So konnten Zhan et al. den Reaktionsmechanismus für die Hydrolyse von Kokain durch BChE aufklären^[133]. Nachdem für die dreidimensionale Struktur der BChE zunächst nur Homologie-Modelle auf der Basis der AChE-Strukturen existierten, gibt es seit 2003 auch eine Röntgenstruktur der BChE^[134].

Es ist ein seit langem bekanntes und unter anderem auch militärisch genutztes Faktum, daß verschiedene Organophosphate starke Inhibitoren der AChE sind. Das wohl bekannteste Beispiel ist das Nervengift Di-*iso*-propylfluorophosphat (DFP) **162**, welches in einer Additions-Eliminierungssequenz mit dem hochreaktiven Serin-Rest im aktiven Zentrum der AChE reagiert und ein kovalentes Addukt bildet (*suicide inhibition*). Die Verbindungen Tabun **163**, Sarin **164**, Parathion **165** und Malathion **166** stellen weitere prominente irreversible AChE-Inhibitoren dar^[129] (Abb. 139). Für die Inhibition der Cholinesterasen durch Organophosphate konnte eine quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt werden^[135]. Neuere Arbeiten zur Inhibition der AChE umfassen unter anderem die Untersuchung des kovalenten Adduktes mittels MALDI-TOF-MS nach vorangegangenem Trypsin-Verdau des inhibierten Enzyms^[136]. Von sehr großem Interesse ist die Entwicklung und Untersuchung reversibel agierender Inhibitoren der AChE zur Therapie von *Morbus Alzheimer*^[137,138,139,140].

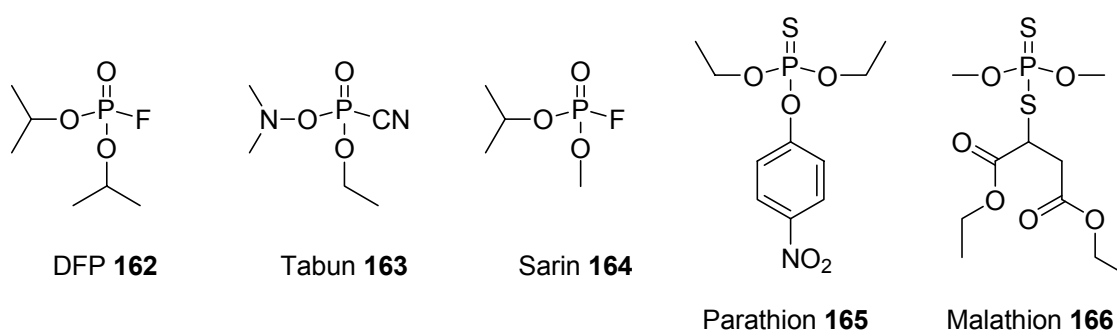


Abb. 139 Strukturen einiger AChE-Inhibitoren

Da die *cycloSal*-Nucleotide reaktive Organophosphate darstellen, sind auch sie potentielle Inhibitoren der AChE. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß das strukturell eng verwandte Insektizid Salithion **167** in den Insekten-Organismen zum Salioxon **168**, einem starken AChE-Inhibitor, metabolisiert wird^[141,142] (Abb. 140).

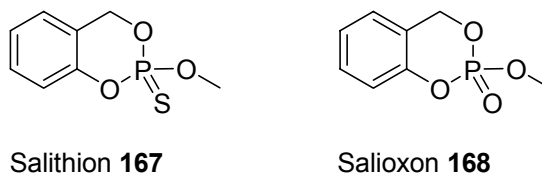


Abb. 140 Strukturformeln von Salithion **167** und Salioxon **168**

In eigenen Vorarbeiten^[88] konnten zwei verschiedene Assays zur Untersuchung der Inhibitor-Aktivität von *cycloSal*-Nucleotiden gegenüber Cholinesterasen etabliert werden. Als Enzymquelle wurde humanes Blutserum verwendet, wobei durch Verwendung eines selektiven BChE-Inhibitors bewiesen werden konnte, daß die im Serum vorliegende Cholinesterase-Aktivität ausschließlich von BChE stammte. Bei den Untersuchungen mit Blutserum wurde festgestellt, daß *cycloSal*-Nucleotide in der Tat als irreversible Inhibitoren der BChE fungieren können, wobei die Inhibitor-Aktivität allerdings im Sinne einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung stark von der Struktur der Prodrugs abhing. Ob diese inhibitorischen Eigenschaften auch gegenüber der physiologisch bedeutenden AChE auftreten, konnte nicht geklärt werden. Balzarini konnte durch enzymkinetische Experimente den kompetitiven Charakter der BChE-Inhibition nachweisen, so daß die Bindung der Inhibitoren im aktiven Zentrum des Enzyms belegt war. Es wurde daher ein Mechanismus für die irreversible Inhibition postuliert (Abb. 141, S. 140). Es ist anzunehmen, daß der reaktive Serin-Rest der katalytischen Triade von BChE das Phosphat-Zentrum des *cycloSal*-Nucleotids nucleophil angreift und es zur Bildung des Benzylphosphatresters **169** kommt. Dieser fragmentiert nach dem bekannten Mechanismus in der Benzyl-Position und liefert auf diese Weise das Salicylalkohol-Derivat und ein Nucleosyl-Protein-Konjugat **170**, das keine katalytische Aktivität mehr besitzt. Der letzte Reaktionsschritt ist dem „Aging“ bei der irreversiblen Cholinesterase-Inhibition durch Organophosphate analog.

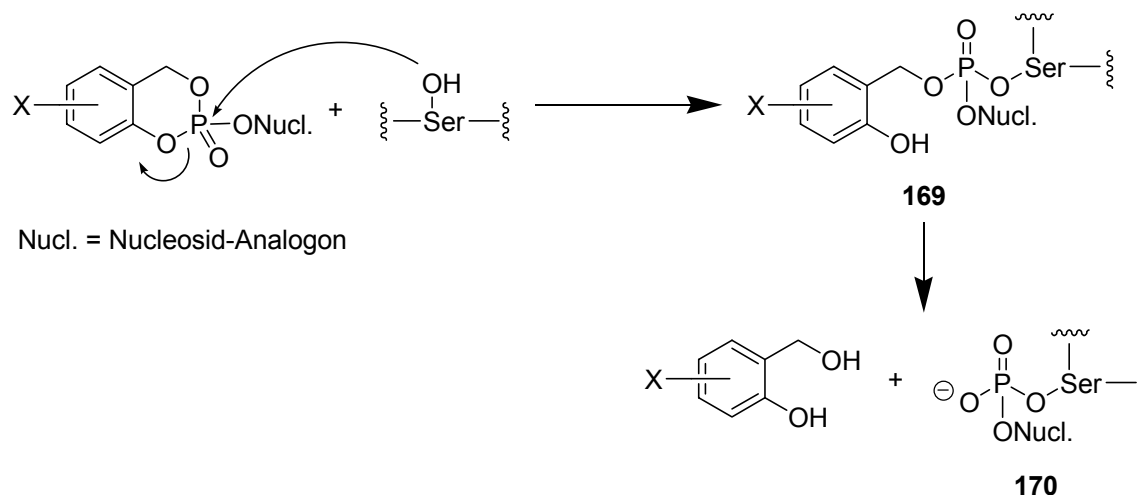


Abb. 141 Postulierter Mechanismus für die irreversible Inhibition von BChE durch *cycloSal*-Nucleotide

4.6.2 Methodik des Cholinesterase-Assays

Wie bereits erwähnt, wurden im Rahmen eigener Vorarbeiten^[88] zwei Methoden für einen Cholinesterase-Assay mit *cycloSal*-Nucleotiden und humanem Blutserum als Quelle für BChE-Aktivität etabliert, die jedoch auf demselben Prinzip beruhen. In beiden Fällen wurde die Cholinesterase-Aktivität dadurch gemessen, daß dem schwach alkalisch gepufferten Medium (Phosphatpuffer, pH 7.8) *m*-Nitrophenol als Indikator zugesetzt wurde, welches bei diesen pH-Bedingungen teilweise deprotoniert als gelbes *m*-Nitrophenolat (Absorptionsmaximum bei $\lambda = 420$ nm) vorlag. Durch die enzymatische Hydrolyse von Acetylcholin wurde Essigsäure freigesetzt, die ein Ansäuern des Mediums und damit eine Abnahme der Phenolat-Konzentration bewirkte. Diese Abnahme und damit das Fortschreiten der enzymatischen Reaktion war photometrisch zu verfolgen. Die Gegenwart eines Inhibitors verlangsamte die Reaktion und damit die Extinktionsabnahme bzw. brachte sie aufgrund des irreversiblen Charakters der Inhibition sogar zum Erliegen. Dieses Verfahren stammt aus der klinischen Chemie und geht auf Arbeiten von Rappaport et al. zurück^[143] (Abb. 142, S. 141). In der ersten Variante des Cholinesterase-Assays, die auf den Original-Arbeiten von Rappaport et al. beruhte, wurde das Blutserum zunächst für 30 Minuten mit einer DMSO-Lösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids inkubiert. Das so behandelte Serum wurde anschließend in der enzymatischen Reaktion als Quelle für BChE-Aktivität benutzt. Nach einer definierten Reaktionszeit (30 Minuten bei 25°C) wurde die Extinktion ermittelt und der erhaltene

Wert von einem Blindwert mit hitzedeaktiviertem Serum abgezogen, bei welchem keine Reaktion stattfinden konnte. Aus dieser Extinktionsdifferenz konnte über eine zuvor aufgestellte Kalibrationskurve die BChE-Aktivität in Rappaport-Einheiten pro mL Serum (Rappaport Units, RU/mL) bestimmt werden. Eine RU ist definitionsgemäß die Cholinesterase-Aktivität, die die Freisetzung von 1 μmol Essigsäure aus Acetylcholin in 30 Minuten bei 25°C und pH 7.8 bewirkt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem für unbehandeltes Serum ermittelten Aktivitätswert ins Verhältnis gesetzt, so daß sich formal die prozentuale nach Inkubation mit dem *cycloSal*-Nucleotid verbliebene BChE-Aktivität ergab. Aus der Durchführung von Mehrfachbestimmungen konnten Standardabweichungen für die einzelnen Aktivitätsmessungen und über das Fehlerfortpflanzungsgesetz somit auch für die prozentual verbliebene Enzym-Aktivität erhalten werden.

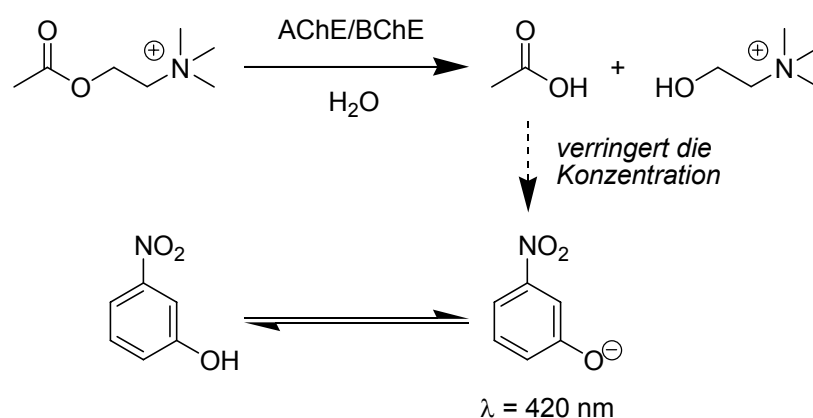


Abb. 142 Prinzip des Cholinesterase-Assays

Im Gegensatz zur Rappaport-Variante des Cholinesterase-Assays beruhte die auf Vorarbeiten von Balzarini basierende Variante auf einer photometrischen Verfolgung der enzymatischen Reaktion in Gegenwart des jeweiligen potentiellen Inhibitors. Hierfür wurden verschieden konzentrierte Lösungen der *cycloSal*-Nucleotide in DMSO eingesetzt, um so finale Inhibitor-Konzentrationen zwischen 0.1 und 50 μM einzustellen, wobei natürlich nur die dem Inhibitor-Potential der zu untersuchenden Verbindung entsprechenden Konzentrationen in den enzymatischen Reaktionen verwendet wurden. Konzentrationen über 50 μM wurden nicht mehr untersucht, da derartig schwache Inhibitor-Effekte nicht mehr relevant schienen. Die Abnahme der Extinktion wurde für Reaktionszeiten von fünf und 15 Minuten ermittelt. Diese Extinktionsabnahmen wurden für beide Reaktionszeiten gegen die Inhibitor-

Konzentration aufgetragen, und nach Regression des pseudolinearen Bereiches konnte auf Basis der mit reinem Serum erzielten Extinktionsabnahmen der jeweilige IC_{50} -Wert (Inhibitor-Konzentration, die eine Abnahme der Enzym-Aktivität um 50 % bewirkt) berechnet werden (vergl. hierzu die Vorarbeiten^[88]). Für beide Varianten des Cholinesterase-Assays wurden nur *cycloSal*-Nucleotide mit einer Hydrolyse-Halbwertszeit (Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C) von mindestens einer Stunde verwendet, da andernfalls eine zu schnelle Hydrolyse des potentiellen Inhibitors im schwach basischen Milieu der Testlösung (pH 7.8) befürchtet wurde.

Für die nachfolgenden Arbeiten bestand die Frage, welcher der beiden Methoden zur Durchführung des Cholinesterase-Assays der Vorzug gegeben werden sollte. Daher wurden zunächst 28 verschiedene *cycloSal*-Nucleotide nach beiden Varianten des Assays auf ihr Inhibitor-Potential gegenüber BChE geprüft. Generell ließ sich dabei feststellen, daß die Reihung des inhibitorischen Potentials der Pronucleotide durch beide Methoden, von kleinen Abweichungen abgesehen, korrekt wiedergegeben wurde, daß also starke, mittlere und schwache Inhibitoren unabhängig von der eingesetzten Assay-Variante auch als solche identifiziert werden konnten. Eine vergleichende Auflistung der aus dem BChE-Assay erhaltenen Meßwerte nach beiden Verfahren ist für die entsprechenden Verbindungen im Anhang I dieser Arbeit gegeben. Da die Ergebnisse beider Testverfahren offensichtlich übereinstimmten, wurde willkürlich entschieden, für nachfolgende Untersuchungen den Assay nach Balzarini einzusetzen, da dieser nicht nur schneller durchzuführen war, sondern auch die für die Angabe von Inhibitor-Aktivitäten üblichen IC_{50} -Werte lieferte.

4.6.3 Cholinesterase-Assay mit verschiedenen Quellen von Cholinesterase-Aktivität

Da die Methodik des Cholinesterase-Assays etabliert worden und außerdem die Möglichkeit einer Inhibition durch *cycloSal*-Nucleotide anhand von BChE erwiesen war, bestand zunächst die Frage, ob auch die physiologisch bedeutende AChE durch *cycloSal*-Nucleotide inhibiert werden kann. Um dies zu untersuchen, wurde der Cholinesterase-Assay mit einer AChE-Lösung anstelle des humanen Serums durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die kommerziell verfügbare gereinigte AChE aus *electrophorus electricus* verwendet. Da AChE wesentlich empfindlicher als BChE ist und in Lösung zur thermischen Denaturierung neigt, mußte die AChE-Lösung

(10 Units/mL) für die Dauer der Tests bei 0°C gelagert und durch Auftauen und Verdünnen einer Stammlösung für jede Testreihe frisch angesetzt werden. Für die einzelne enzymatische Reaktion erwies sich eine Enzym-Menge von einer Unit als günstig, da die so erhaltene Cholinesterase-Aktivität ungefähr der des humanen Blutserums entsprach. Als potentielle Inhibitoren dienten 32 verschiedene *cycloSal*-Nucleotide, wobei auf hinreichende strukturelle Varianz (Substitutionsmuster des Aromaten, Strukturen von Glycon und Nucleobase) geachtet wurde und auch einige sehr starke BChE-Inhibitoren Verwendung fanden. Eine vollständige Liste dieser Verbindungen ist im Anhang II gegeben. Es konnte festgestellt werden, daß keines der untersuchten Pronucleotide eine inhibitorische Wirkung gegenüber der AChE aus *electrophorus electricus* aufwies.

Um die Vermutung, daß es sich bei den *cycloSal*-Nucleotiden generell um Nicht-Inhibitoren der AChE handeln könnte, zu erhärten, wurden weitere Experimente mit der ebenfalls kommerziell verfügbaren, aber weitaus teureren gereinigten humanen AChE durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten analog zu den zuvor beschriebenen Tests mit der AChE aus *electrophorus electricus*, und als potentielle Inhibitoren wurden 17 verschiedene *cycloSal*-Nucleotide verwendet (eine vollständige Liste befindet sich im Anhang III). Auch für die humane AChE konnte nachgewiesen werden, daß keines der Pronucleotide eine Inhibitor-Wirkung zeigte. Es kann also in der Tat davon ausgegangen werden, daß *cycloSal*-Nucleotide generell keine AChE-Inhibitoren sind. Hierfür ist wahrscheinlich das Verhindern einer Bindung im aktiven Zentrum durch den sterisch anspruchsvollen Nucleosyl-Rest verantwortlich, wie ein Vergleich mit dem als starken AChE-Inhibitor bekannten Salioxon **168** (vergl. Kapitel **4.6.1**), welches lediglich eine Methylgruppe anstelle der Nucleosyl-Einheit aufweist, belegt.

Nach den Untersuchungen mit AChE aus verschiedenen Organismen bestand noch die Notwendigkeit eines Nachweises, daß es sich bei der für humanes Serum gefundenen Verringerung der Cholinesterase-Aktivität durch *cycloSal*-Nucleotide tatsächlich um eine Inhibition der humanen BChE handelte. Dieser Nachweis war zuvor durch die Verwendung eines selektiven BChE-Inhibitors im Cholinesterase-Assay nur indirekt erbracht worden. Es wurden daher Referenzexperimente mit geringter humaner BChE, welche ebenfalls kommerziell verfügbar ist, durchgeführt. Zwar besaß die gereinigte BChE nicht die thermische Labilität der AChE, allerdings bestand aufgrund der unterschiedlichen Substrateigenschaften gegenüber Acetyl-

cholinchlorid das Problem, die Konzentration der als „Serum-Ersatz“ für den Assay dienenden BChE-Lösung richtig zu wählen. Nach einigen Vorversuchen wurde ermittelt, daß eine Konzentration von 4 Units/mL für die BChE-Lösung zu einer dem Serum vergleichbaren Cholinesterase-Aktivität führte, wobei natürlich davon ausgegangen werden mußte, daß die Unit-Angabe der verwendeten Enzym-Charge korrekt war. Für jede einzelne Enzymreaktion wurde dementsprechend eine absolute Menge von 0.4 Units BChE eingesetzt, was verwunderlich war, da dies bedeuten würde, daß BChE Acetylcholinchlorid als Substrat besser umsetzen müßte als AChE, von der eine Unit pro Reaktion verwendet worden war. Es muß daher angenommen werden, daß die Unit-Angabe der verwendeten BChE-Charge nicht stimmte. Als Inhibitoren kamen acht verschiedene *cycloSal*-Nucleotide zum Einsatz. Hierbei war zunächst die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung nicht von Bedeutung, sondern lediglich die Übereinstimmung der IC_{50} -Werte aus den Serum-Experimenten mit denen aus den Tests mit gereinigter humaner BChE. Auf die verwendeten Pronucleotide sollen daher an dieser Stelle auch nicht näher eingegangen werden. Die erhaltenen Daten sind in der Tabelle 9 (S. 145) wiedergegeben, und in der Tat konnte eine angesichts des bei enzymkinetischen Untersuchungen vorliegenden Meßfehlers erstaunliche Übereinstimmung der IC_{50} -Werte festgestellt werden. Es kann somit als erwiesen angesehen werden, daß die in humanem Serum beobachtete Abnahme der Cholinesterase-Aktivität in der Tat auf die Inhibition der BChE zurückzuführen ist. Da eine Inhibition von AChE nicht nachgewiesen werden konnte, sollen sich die weiteren Untersuchungen auf die BChE-Inhibition konzentrieren. Dabei ist humanes Serum eine offensichtlich legitime Quelle für BChE-Aktivität. Obwohl sich vermuten läßt, daß die Inhibition von BChE bei einer potentiellen therapeutischen Applikation der *cycloSal*-Nucleotide nicht so gravierende Auswirkungen haben dürfte wie eine AChE-Hemmung, stellt sie doch einen unerwünschten Effekt dar. Selbst wenn der BChE tatsächlich keine wichtige physiologische Rolle zukommen sollte, führt der irreversible Charakter der Inhibition doch in jedem Fall zu einer Abnahme der Konzentration des freien Wirkstoffes. Neben der Erarbeitung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die BChE-Inhibition war daher auch die Entwicklung von Wegen zur Vermeidung dieses unerwünschten Effekts durch strukturelle Variation der *cycloSal*-Nucleotide von Bedeutung.

<i>cycloSal</i> -NMP		humanes Serum		gereinigte humane BChE	
Subst. ^a	Nucl. ^b	IC ₅₀ [μ M] ^c		IC ₅₀ [μ M] ^c	
		5 min.	15 min.	5 min.	15 min.
(unsubst.)	d4T	0.77	0.26	0.61	0.28
3-Me	d4T	1.2	0.71	3.4	0.81
3,5-Di-Me	d4T	46	9.6	23	7.0
3,5-Bis- <i>t</i> -Bu	d4T	> 50	> 50	> 50	> 50
6-Cl-7-ECM ^d	d4T	> 50	22	> 50	18
3-Me	BVDU	> 50	36	33	13
3-Ph <i>fast</i>	BVDU	> 50	> 50	> 50	> 50
3-Ph <i>slow</i>	BVDU	3.7	2.8	2.0	0.66

^aSubstitutionsmuster der *cycloSal*-Einheit; ^bNucleosyl-Rest; ^cIC₅₀-Werte für 5 bzw. 15 min. Reaktionszeit; ^dECM = Ethoxycarbonylmethyl

Tab. 9 Für einige *cycloSal*-NMPs erhaltene IC₅₀-Werte bei Durchführung des Cholinesterase-Assays mit humanem Serum und mit gereinigter humaner BChE

4.6.4 Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die Inhibition von BChE durch *cycloSal*-Nucleotide

Für die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung der BChE-Inhibition wurde zwischen strukturellen Einflüssen der *cycloSal*-Einheit und solchen des Nucleosyl-Restes unterschieden. Zunächst sollen letztere behandelt werden.

4.6.4.1 Einflüsse des Nucleosyl-Restes

Zur Untersuchung der strukturellen Einflüsse des Nucleosyl-Restes wurden verschiedene 3-Methyl-*cycloSal*-NMPs im Cholinesterase-Assay mit humanem Serum untersucht, da wegen ihrer guten biologischen Aktivitäten eine große Zahl dieser Derivate aus vorangegangenen Arbeiten zur Verfügung stand. Einige der Verbindungen waren jedoch auch zu synthetisieren.

Um den Einfluß der vier Nucleobasen auf die Inhibitor-Aktivität der *cycloSal*-Nucleotide zu erarbeiten, sollen zunächst die 3-Methyl-*cycloSal*-Derivate der

natürlichen Desoxyribonucleoside betrachtet werden, die natürlich keine antivirale Aktivität besitzen können. Während 3-Methyl-*cycloSal*-dTMP **171** bereits aus Vorarbeiten zur Verfügung stand, mußten 3-Methyl-*cycloSal*-dAMP **172** und 3-Methyl-*cycloSal*-dGMP **173** durch Umsetzung von 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174** mit dem jeweiligen Nucleosid und anschließende Oxidation erhalten werden. Das Chlorphosphit **174** ergab sich wiederum aus 3-Methylsalicylalkohol **175**, der durch Reduktion von 3-Methylsalicylsäure mit Lithiumaluminiumhydrid erhalten worden war. Das 3-Methyl-*cycloSal*-dCMP **176** war so nicht zugänglich (Abb. 143).

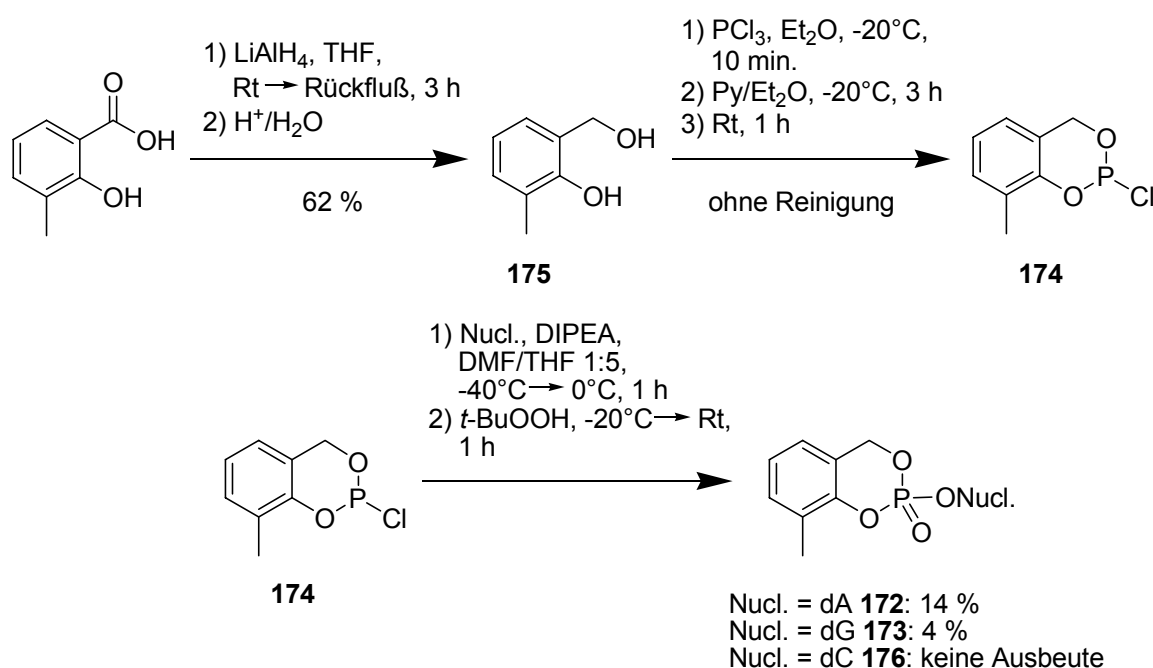


Abb. 143 Synthese von 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174** und der 3-Methyl-*cycloSal*-NMPs **172**, **173** sowie Versuch der direkten Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-dCMP **176**

Wegen der hohen Polarität der Nucleoside mußte in einem DMF/THF-Gemisch gearbeitet werden. Trotzdem erwiesen sich die Nucleoside 2'-Desoxyguanosin (dG) und 2'-Desoxycytidin (dC) **9** als kaum löslich, was zur Folge hatte, daß die gelöste Menge stets auf einen großen Überschuß des Chlorphosphits traf, so daß Nebenreaktionen an der 3'-Hydroxylgruppe des Glycons und der exocyclischen Aminogruppe der Nucleobasen trotz der Verringerung der Reaktionstemperatur auf -40°C bis 0°C unvermeidbar waren. Die Folge war, daß das dG-Derivat **173** in nur 4 % Ausbeute und das dC-Derivat **176** überhaupt nicht isoliert werden konnte. Für die Umsetzung des besser löslichen 2'-Desoxyadenosins (dA) bestand ein Reinigungsproblem des Produktes **172**, so daß zu dessen Isolierung auf präparative

RP-HPLC zurückgegriffen werden mußte. Die Folge war auch hier eine niedrige Ausbeute von 14 %.

Die Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-dCMP **176** gelang schließlich durch Anwendung von Schutzgruppen-Chemie. Zunächst wurde dC **9** (bzw. das entsprechende Hydrochlorid) durch „transient protection“ in Analogie zu den Arbeiten von Pannecouque et al.^[144] und Wada et al.^[145] an der exocyclischen Aminogruppe der Nucleobase Dimethoxytrityl-(DMTr)-geschützt (Ausbeute 90 %). Das so erhaltene *N*-(Dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin **177** konnte nach dem bekannten Verfahren unter Anwendungen der Bedingungen für die *cycloSal*-BVDUMP-Synthese (vergl. Kapitel 4.3.6) zum 3-Methyl-*cycloSal*-*N*-DMTr-dCMP **178** umgesetzt werden (Ausbeute der Nucleotid-Synthese 16 %). Die anschließende saure Entschützung von **178** mit TFA lieferte die gewünschte Verbindung **176**, wenn auch als TFA-Salz, in 87 % Ausbeute (Abb. 144). Das Vorliegen als Trifluoracetat sollte die Verwendung von **176** im Cholinesterase-Assay nicht beeinträchtigen, da dort in einem gepufferten System gearbeitet wird und sich somit der dem pH-Wert entsprechende Protonierungsgrad der exocyclischen Aminogruppe einstellt.

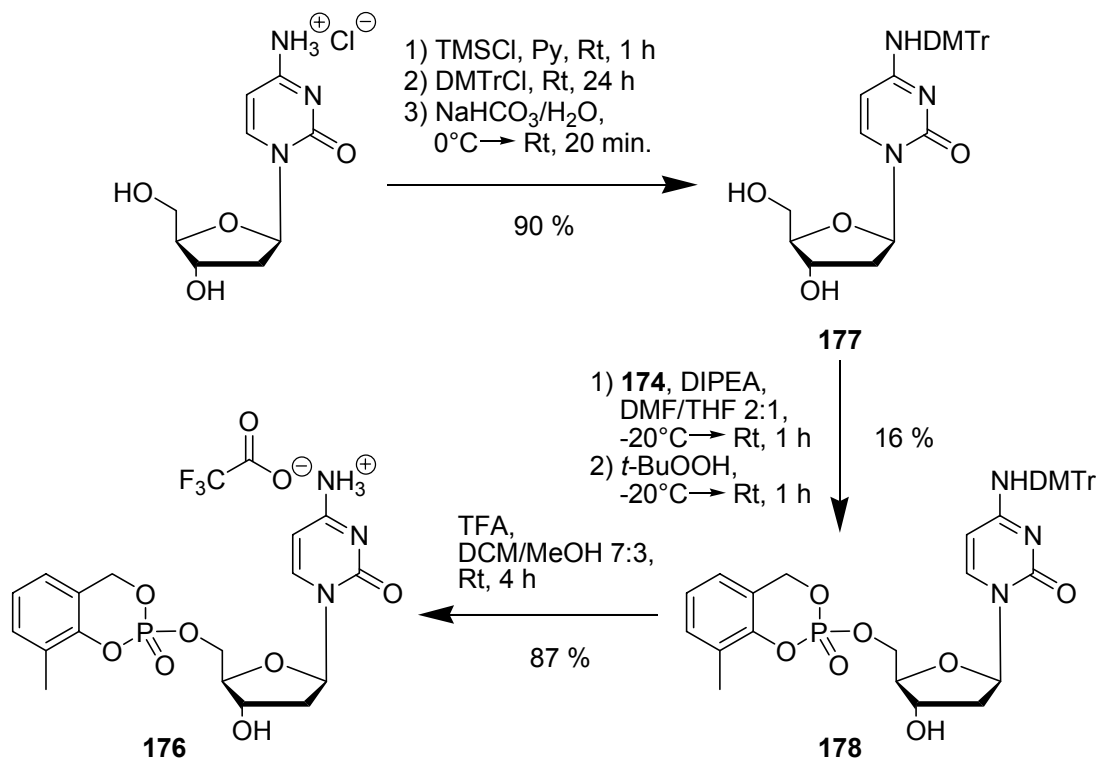


Abb. 144 Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-dCMP **176** unter Anwendung von Schutzgruppen-Chemie

Zusätzlich zu den 3-Methyl-*cycloSal*-Derivaten der natürlichen 2'-Desoxyribonucleoside sollten auch die entsprechenden 3-Methyl-*cycloSal*-2',3'-didesoxyribonucleotide untersucht werden. Von ihnen lagen aus Vorarbeiten 3-Methyl-*cycloSal*-ddAMP **179** und 3-Methyl-*cycloSal*-ddCMP **180** vor^[146]. Die Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-ddTMP **181** erfolgte durch Umsetzung von ddT **57** (Darstellung vergl. Kapitel 4.1.4) mit 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174** unter den Bedingungen der *cycloSal*-BVDUMP-Synthese (Ausbeute 22 %), während für die Darstellung von 3-Methyl-*cycloSal*-ddGMP **182** aus dem kommerziell verfügbaren 2',3'-Didesoxyguanosin (ddG) die Methodik der Synthese des ddA-Derivates **179** übertragen wurde (Ausbeute 26 %, Abb. 145).

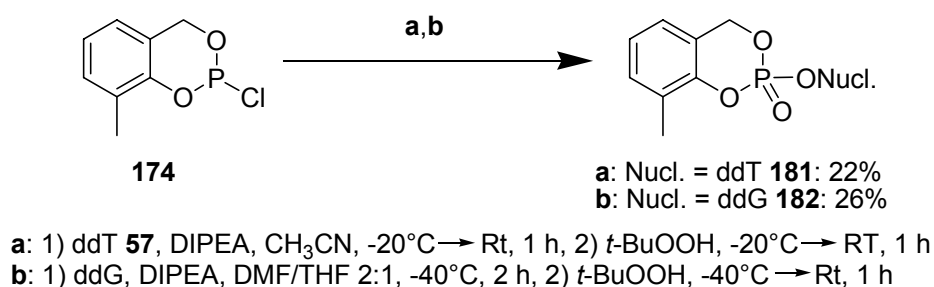


Abb. 145 Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-ddTMP **181** und 3-Methyl-*cycloSal*-ddGMP **182**

Die Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **171-173,176** und **179-182** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum) sind in der Abbildung 146 (S. 149) dargestellt. Zunächst fällt auf, daß die *cycloSal*-2',3'-Didesoxynucleotide durchweg die deutlich stärkeren Inhibitoren als die entsprechenden 2'-Desoxynucleotide waren. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine sterische Repulsion der 3'-Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms zurückzuführen. Die stärkste Inhibition wurde für die Nucleobasen Thymin und Adenin gefunden, gefolgt von Guanin. Die Cytosin-Derivate **176,180** waren die schwächsten Inhibitoren. Die Nucleobase hatte also einen erheblichen Einfluß auf die Bindung des Pronucleotids im aktiven Zentrum der BChE.

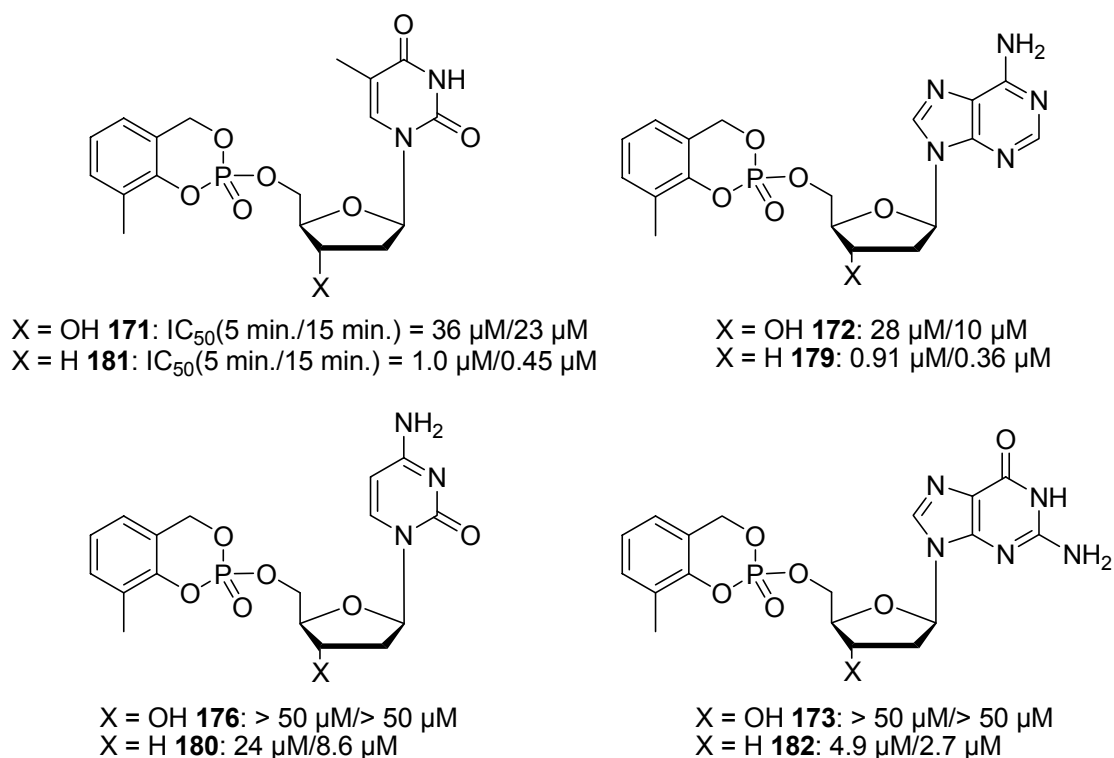


Abb. 146 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **171-173,176** und **179-182** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Von dem erstmals synthetisierten 3-Methyl-*cycloSal*-ddGMP **182** wurden im Rahmen der Kooperation mit der Universität Leuven die antiviralen *in vitro*-Aktivitäten im Vergleich zum Nucleosid-Analogen ddG bestimmt. Die Aktivität des Pronucleotids **182** gegen HIV-1 in CEM-Wildtyp-Zellen war gegenüber ddG etwas höher, die gegen HIV-2 war ähnlich. Die Tests in den TK-defizienten Zellen waren hier kein Kriterium, da ddG dieses Enzym nicht zur metabolischen Aktivierung benötigt. Die Cytotoxizität des Prodrugs **182** war minimal höher als die von ddG (Tab. 10).

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]		CC ₅₀ ^b [μM]	
	<u>CEM/0</u> HIV-1	HIV-2	<u>CEM/TK</u> HIV-2	<u>CEM/0</u>
3-Methyl 182	0.38 ± 0.23	0.46 ± 0.22	0.38 ± 0.23	188 ± 13
ddG	1.03 ± 0.85	0.77 ± 0.47	0.40 ± 0.00	247 ± 4

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 10 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten von 3-Methyl-*cycloSal*-ddGMP **182** und ddG

Nach der Bestimmung des Einflusses der vier natürlichen Nucleobasen auf die Inhibitor-Aktivität der *cycloSal*-Nucleotide gegenüber humaner BChE erfolgten Untersuchungen mit Derivaten, die modifizierte Nucleobasen besaßen. Zunächst sollen hierbei die Pyrimidin-Nucleotide diskutiert werden (Abb. 147).

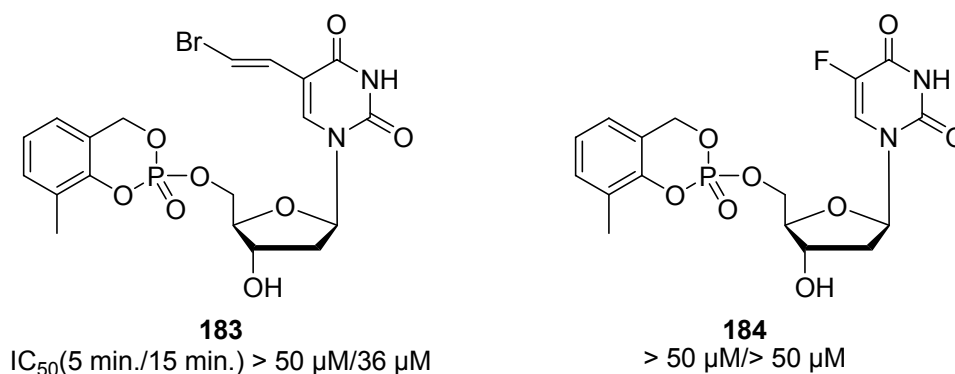


Abb. 147 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **183**, **184** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Während das 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP **183** mit seiner sterisch anspruchsvollen Bromvinyl-Gruppe an der Nucleobase verglichen mit dem dT-Derivat **171** (Abb. 146, S. 149) zwar der schwächere Inhibitor war, aber zumindest noch einen schwachen inhibitorischen Effekt besaß, erwies sich das anti-tumor-aktive 3-Methyl-*cycloSal*-FdUMP **184** (FdU = 5-Fluor-2'-desoxyuridin) als Nicht-Inhibitor der BChE. Dies zeigt, daß bereits kleine strukturelle Veränderungen an der Nucleobase deutliche Auswirkungen auf die BChE-Inhibition haben können. Obwohl **183** und **184** bereits aus Vorarbeiten bekannt waren^[76,93], wurde **184** nochmals synthetisiert (Abb. 148).

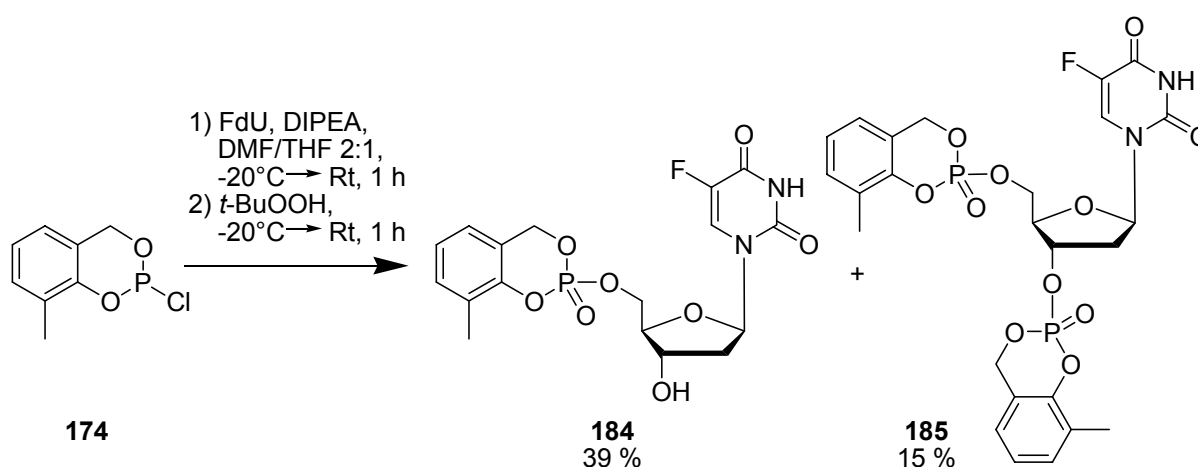


Abb. 148 Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-FdUMP **184**

Neben dem gewünschten Pronucleotid **184** (39 % Ausbeute) konnte auch das unerwünschte zweifach phosphorylierte Nebenprodukt **185** in 15 % Ausbeute isoliert werden .

Auch für Basen-modifizierte *cycloSal*-Purin-Nucleotide ergaben sich Unterschiede in der Inhibitor-Aktivität gegenüber BChE (Abb. 149).

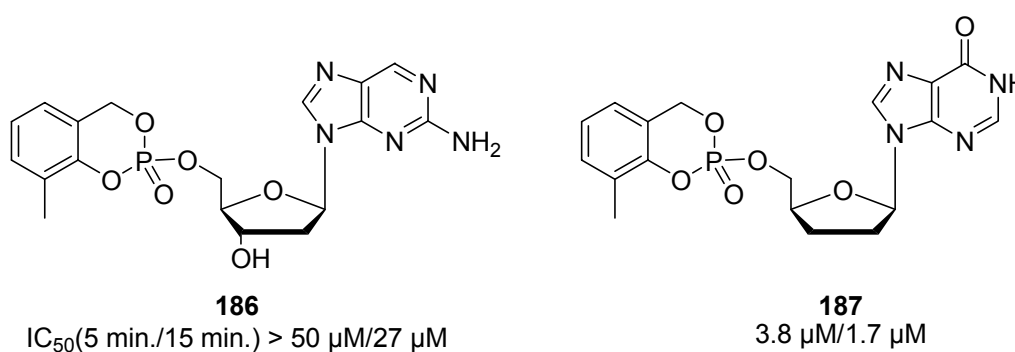


Abb. 149 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **186**, **187** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

3-Methyl-*cycloSal*-iso-dAMP **186** war mit dem dA-Derivat **172** und dem dG-Derivat **173** zu vergleichen, 3-Methyl-*cycloSal*-ddIMP **187** (mit der im Nucleosid-Metabolismus auftretenden Base Hypoxanthin) hingegen mit den entsprechenden Didesoxynucleotiden **179** und **182** (Abb. 146, S. 149). Die Position der exocyclischen Aminogruppe (**186** im Vergleich zu **172**) hatte deutliche Auswirkungen, ebenso wurde der repulsive Effekt der Carbonylgruppe in der 6-Position verglichen mit einer Aminogruppe an dieser Stelle (**186** bzw. **187** im Vergleich zu **173** bzw. **179**) deutlich. Das Pronucleotid **186** war zuvor durch Umsetzung von *iso*-dA **58** (Darstellung vergl. Kapitel 4.1.5) mit 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174** in Analogie zur Synthese der strukturell ähnlichen Verbindungen **172** und **173** erhalten worden. Auch für dieses Derivat ergaben sich Probleme bei der Reinigung, so daß auf präparative RP-HPLC zurückgegriffen werden mußte, was eine Ausbeute von nur 12 % zur Folge hatte (Abb. 150, S. 152). Ein Interesse an der Darstellung dieses *cycloSal*-Nucleotids bestand nicht nur im Zusammenhang mit der Verwendung im Cholinesterase-Assay, sondern auch aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften der Nucleobase, die zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten eröffnen.

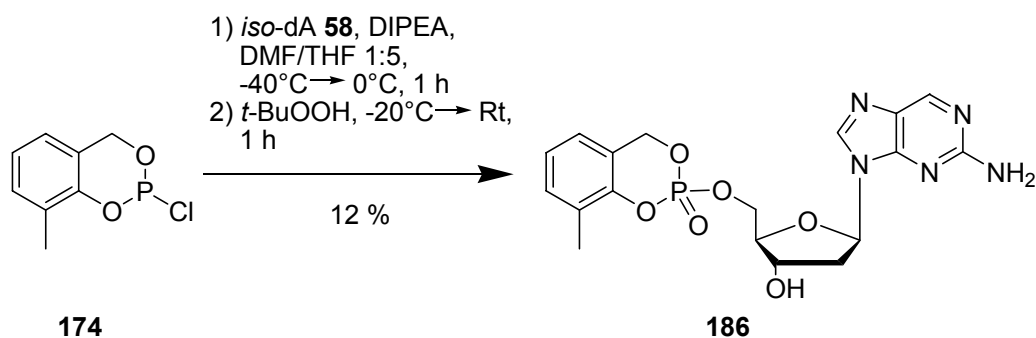


Abb. 150 Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-*iso*-dAMP **186**

Im Folgenden soll nun auf Auswirkungen der Glycon-Struktur auf die Inhibitor-Aktivität gegenüber BChE eingegangen werden, wobei zunächst Variationen in der 3'-Position behandelt werden sollen (Abb. 151).

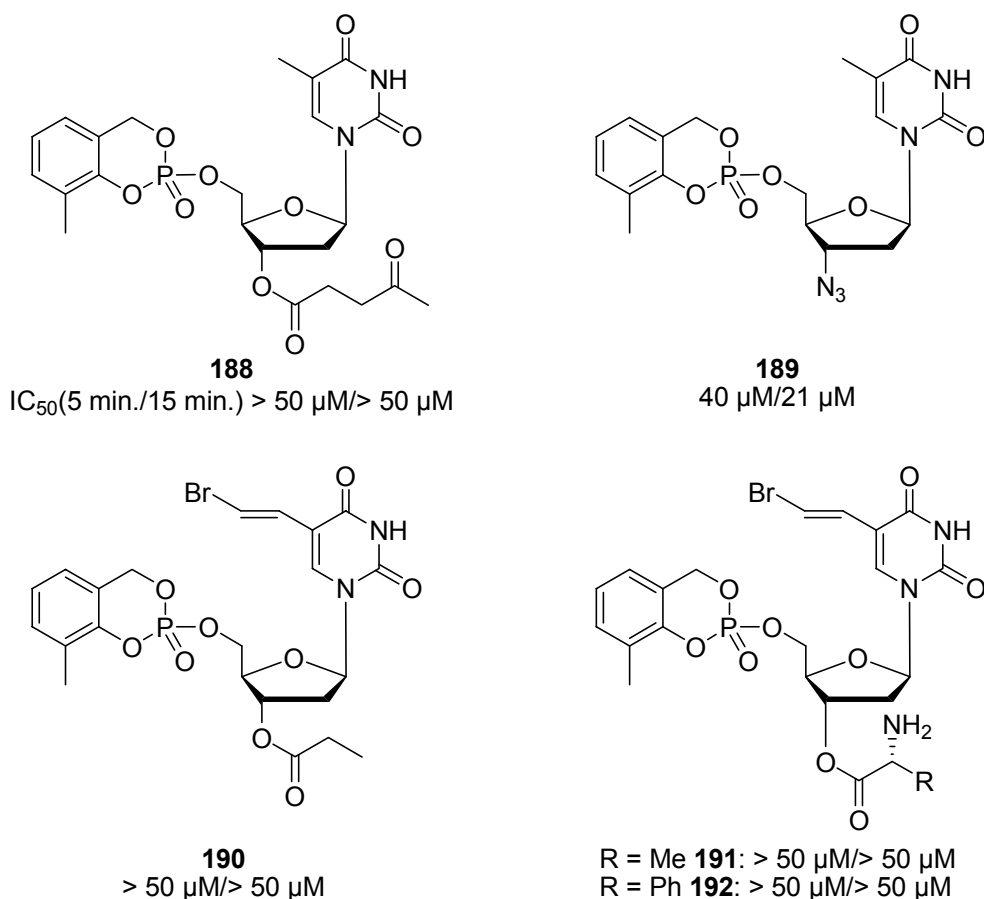


Abb. 151 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **188-192** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

War schon das 3-Methyl-*cycloSal*-dTMP **171** (Abb. 146, S. 149) verglichen mit dem didesoxygenierten Derivat **181** kein sehr starker BChE-Inhibitor mehr, so führte eine Veresterung der 3'-Hydroxylgruppe wie beim 3-Methyl-*cycloSal*-3'-O-levulinyl-

dTMP **188** zum vollständigen Verlust der Inhibitor-Aktivität zumindest im untersuchten Konzentrations-Bereich. 3-Methyl-*cycloSal*-AZTMP **189** wies ähnlich schwache Inhibitor-Eigenschaften wie das dT-Derivat **171** auf. Ähnliches läßt sich für die 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMPs anführen. War das 3'-Hydroxyl-freie Pronucleotid **183** (Abb. 147, S. 150) zumindest noch ein sehr schwacher BChE-Inhibitor, so war auch dieses inhibitorische Potential bei der acylierten Verbindung **190** wie auch bei den D-Aminoacylierten Prodrugs **191,192** nicht mehr zu beobachten. Es läßt sich also festhalten, daß sterisch anspruchsvolle Substituenten in der 3'-Position des Glycons der *cycloSal*-Nucleotide die BChE-Inhibition unterbinden. 3-Methyl-*cycloSal*-3'-O-levulinyldTMP **188** war zuvor für diese Untersuchungen analog zur Synthesevorschrift für *cycloSal*-d4TMPs in 33 % Ausbeute dargestellt worden (Abb. 152).

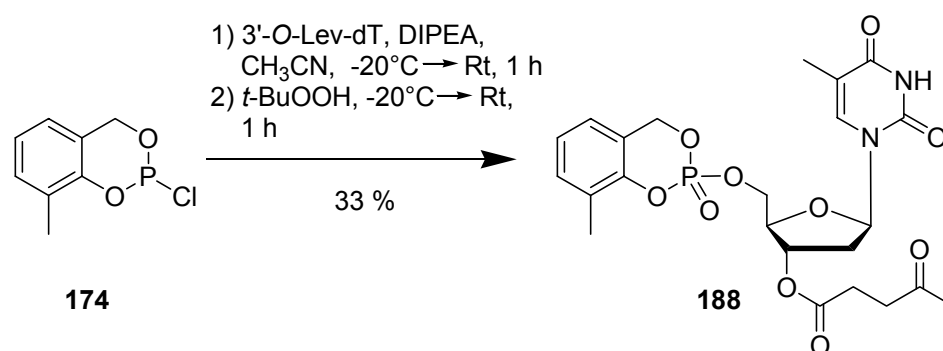


Abb. 152 Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-3'-O-Lev-dTMP **188**

Auswirkungen von Variationen in der 2'-Position des Glycons der Pronucleotide ließen sich durch Vergleich einiger *cycloSal*-Adenosinmonophosphate bestimmen (Abb. 153).

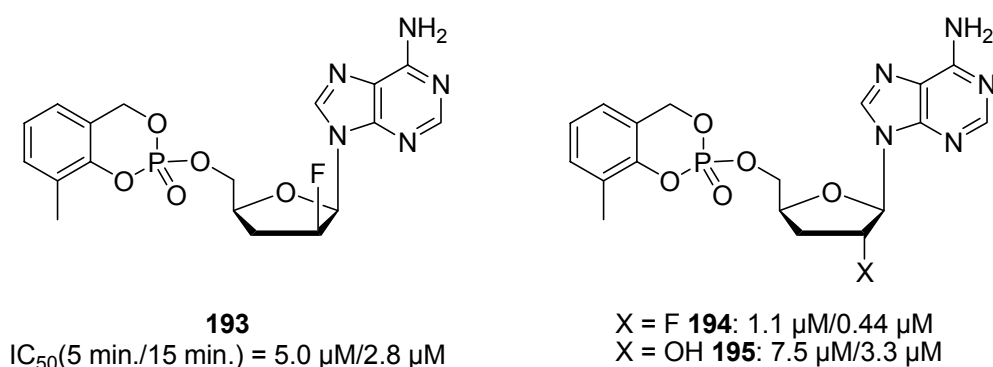


Abb. 153 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **193-195** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Während die 2'-fluorierte *ara*-konfigurierte Verbindung **193** ein etwa fünffach schwächerer Inhibitor als das ddA-Derivat **179** (Abb. 146, S. 149) war, wies das *ribo*-konfigurierte Pronucleotid **194** ein ähnliches inhibitorisches Potential wie **179** auf. 3-Methyl-*cycloSal*-Cordycepin-monophosphat **195** mit einer Hydroxylgruppe in der 2'-Position inhibierte BChE zwar etwa achtfach schwächer als **179**, aber auch dreibis vierfach stärker als das 3'-hydroxylierte Regioisomer **172**. Substituenten in der 2'-Position des Glycons können also auch zu repulsiven Effekten führen, allerdings sind diese nicht so ausgeprägt wie bei den 3'-substituierten Derivaten.

Von Bedeutung war auch ein Vergleich zwischen *cycloSal*-Nucleotiden mit dd-(2',3'-Dideoxy)- und d4-(2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydro)-Glyconstruktur, da beide Varianten häufige Strukturmuster von Nucleosid-Analoga darstellen. Für 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **196**, 3-Methyl-*cycloSal*-d4AMP **197** und 3-Methyl-*cycloSal*-d4IMP **198** gilt jedoch, daß sie im Rahmen der Meßfehler des Assays ähnliche Inhibitor-Aktivitäten wie ihre dd-Analoga **181,179** (Abb. 146, S. 149) und **187** (Abb. 149, S. 151) aufwiesen (Abb. 154).

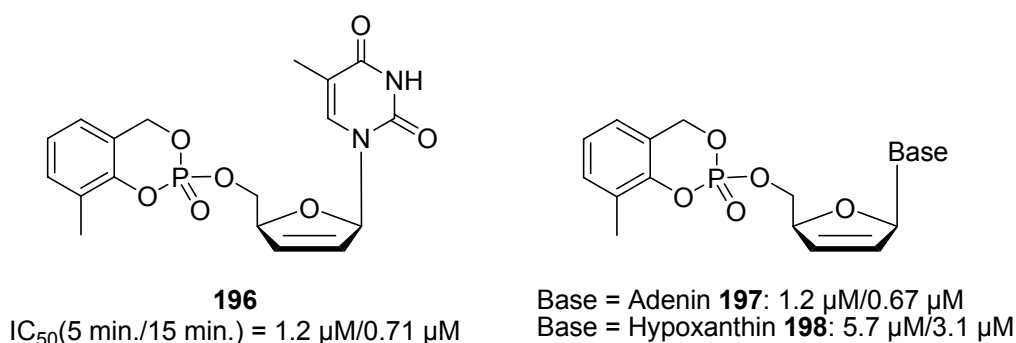


Abb. 154 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **196-198** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Neben den cyclischen wurden auch acyclische Glyconstrukturen untersucht, da acyclische Nucleosid-Analoga gerade in der Behandlung von Infektionen mit DNA-Viren häufig eingesetzt werden (vergl. Kapitel 1). Generell läßt sich festhalten, daß die untersuchten Derivate, also sowohl 3-Methyl-*cycloSal*-Acyclovir-(ACV)-monophosphat **199** als auch die Ganciclovir-(GCV)- und Penciclovir-(PCV)-Derivate **200,201** sowie ihre Thymin-Analoga **202,203**, ähnliche Inhibitor-Aktivitäten gegenüber BChE wie ihre cyclischen Stammverbindungen 3-Methyl-*cycloSal*-dGMP **173** bzw. -dTMP **171** (Abb. 146, S. 149) besaßen (Abb. 155). Es war also keineswegs so,

daß die Einführung flexibler Gerüste die Bindungsaffinität der *cycloSal*-Nucleotide gegenüber dem Enzym und damit ihre inhibitorische Potenz erhöht hätte.

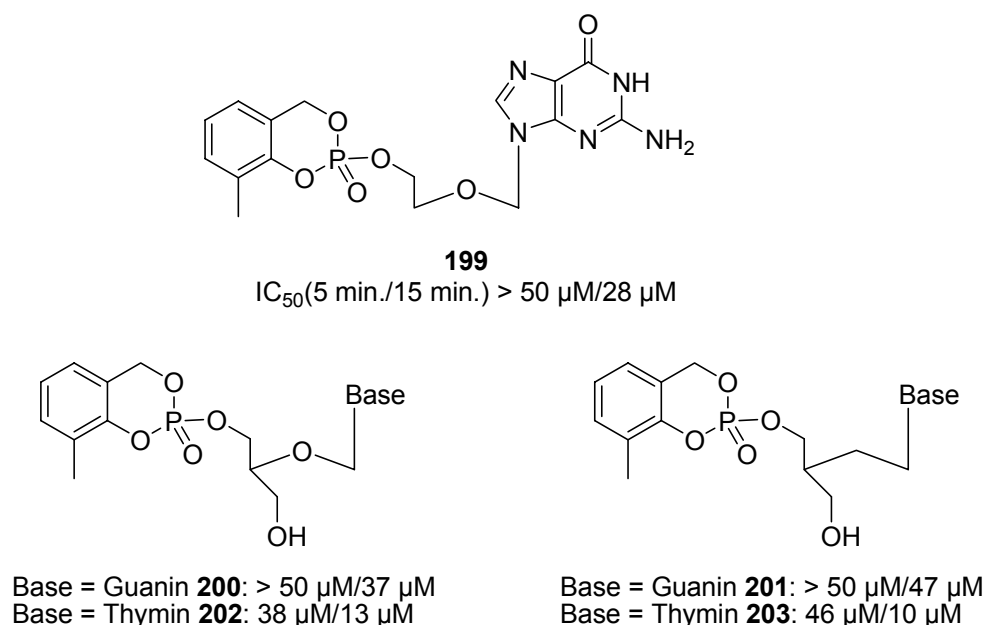


Abb. 155 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **199-203** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Bemerkenswert war auch, daß der formale Austausch des aminationalen Sauerstoffatoms gegen eine Methyleneinheit kaum einen Effekt hatte, tendenziell sogar eher zur Abnahme der inhibitorischen Aktivität führte. Das cyclische 3-Methyl-*cycloSal*-carba-dTMP **204** (Abb. 156) war ebenfalls ein etwas schwächerer Inhibitor als die nicht carbocyclische dT-Stammverbindung **171** (Abb. 146, S. 149). Auch der Übergang zu carbocyclischen Strukturen bringt konformationelle Flexibilität in das Glycon eines Nucleosids, wenn auch nicht so massiv wie die Einführung acyclischer Systeme.

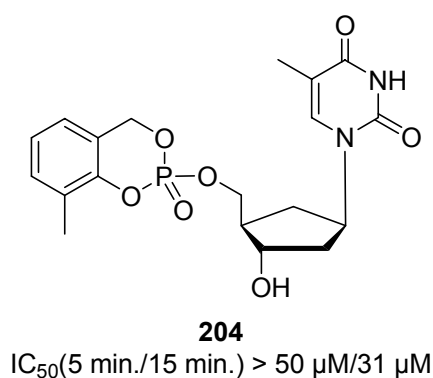


Abb. 156 Inhibitor-Aktivität von 3-Methyl-*cycloSal*-carba-dTMP **204** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

4.6.4.2 Einflüsse der *cycloSal*-Einheit

Um die Einflüsse der *cycloSal*-Unterstruktur auf die Inhibitor-Aktivität der Pronucleotide gegenüber BChE zu untersuchen, wurden verschiedene *cycloSal*-d4TMPs verglichen, da für das Nucleosid-Analogon d4T **4** die meisten Derivate vorlagen. Zunächst soll der Einfluß von Methyl-Substituenten in der 3- und 5-Position des Aromaten betrachtet werden (Abb. 157).

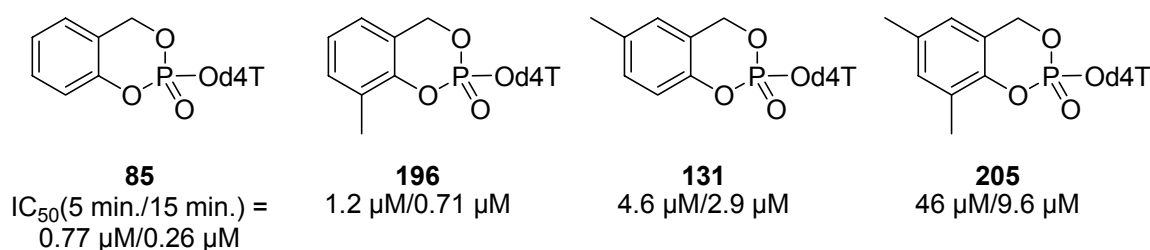


Abb. 157 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **85,131,196,205** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Der am Aromaten unsubstituierte Prototyp **85** erwies sich als starker BChE-Inhibitor. Bereits die Einführung eines Methyl-Substituenten verringerte diese Inhibitor-Aktivität, wobei der Effekt für die 5-Methyl-Verbindung **131** deutlicher war als für das 3-Methyl-Derivat **196**. Besonders ausgeprägt war die Abnahme der inhibitorischen Potenz für das 3,5-Dimethyl-*cycloSal*-d4TMP **205**, welches gegenüber **85** eine 37- bis 60-fach geringere Inhibition bewirkte. Für diesen Effekt könnten sterische Faktoren verantwortlich sein, allerdings könnte auch die für die Methyl-substituierten Derivate geringere Elektrophilie des Phosphat-Zentrums eine Rolle spielen, da dies zu einer Verlangsamung der Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym beiträgt.

Bereits aus Vorarbeiten^[88] bekannt war die Tatsache, daß die Einführung von Phenyl- statt Methyl-Substituenten am *cycloSal*-System wie auch die Benzo-Anellierung des Aromaten nicht zu einer wesentlichen Verringerung der Inhibitor-Aktivität führen (Abb. 158, S. 157). Während das 5-Phenyl-Derivat **90** noch eine leichte Verringerung der inhibitorischen Potenz verglichen mit dem unsubstituierten Prototypen **85** und ähnliche IC₅₀-Werte wie das 5-Methyl-Derivat **131** (Abb. 157) aufwies, war die 3-Phenyl-Verbindung **89** sogar ein stärkerer Inhibitor als **85**. Gleiches galt für die Benzo[a]- und Benzo[b]-anellierten *cycloSal*-d4TMPs **206,207**, während das Benzo[c]-Derivat **208** wiederum mit dem 5-Phenyl-substituierten Prodrug **90** vergleichbar war. Die teilweise Verstärkung der Inhibitor-Aktivität durch

aromatische Substituenten wurde auf attraktive Wechselwirkungen im lipophilen und aromatenreichen aktiven Zentrum der BChE zurückgeführt.

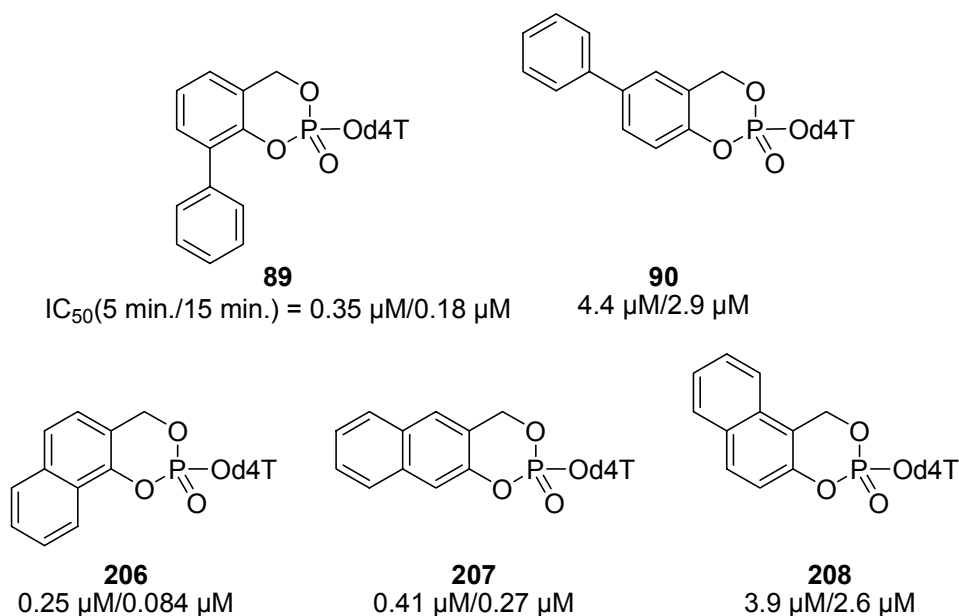
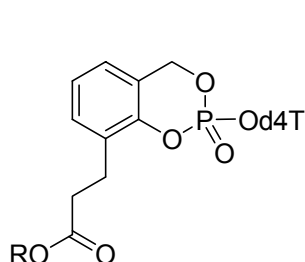


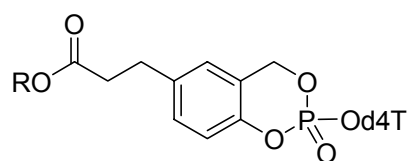
Abb. 158 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **89,90** und **206-208** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Um zu untersuchen, was ein Übergang von einfachen Methyl-Substituenten zu längeren, funktionalisierten Ketten bezüglich der Interaktion mit BChE bewirkt, wurden auch einige der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs, darunter die im Rahmen dieser Arbeit erstmals synthetisierten Derivate **48-50** (vergl. Kapitel 4.5), als potentielle Inhibitoren im Cholinesterase-Assay eingesetzt (Abb. 159, S. 158). Die 3-substituierten Ester **135-137** wiesen durchweg ähnliche Inhibitor-Aktivitäten wie das 3-Methyl-Derivat **196** (Abb. 157, S. 156) auf, wobei die Alkohol-Komponente der Ester-Funktion keine Rolle spielte. Die entsprechenden 5-substituierten Regioisomere **139-141** waren allesamt schwächere Inhibitoren. Während die Alkylester **139,140** noch mit der 5-Methyl-substituierten Referenz **131** (Abb. 157, S. 156) vergleichbare IC_{50} -Werte besaßen, inhibierte der Benzylester **141** gegenüber **131** etwa zwei- bis fünffach schwächer. Anhand eines Vergleiches von **143** mit **135** konnte geschlossen werden, daß die Orientierung der Estergruppe keinen massiven Einfluß hatte. Bemerkenswert war jedoch, daß das Levulinyngeschützte Syntheserintermediat **210** ein deutlich schwächerer BChE-Inhibitor als alle anderen 3-substituierten Ester war. Die neu synthetisierten Derivate **48-50**, die sehr lange

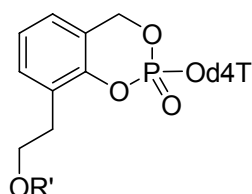
Seitenketten besaßen, waren ähnlich starke Inhibitoren wie die entsprechenden einfachen Alkylester **139,140**.



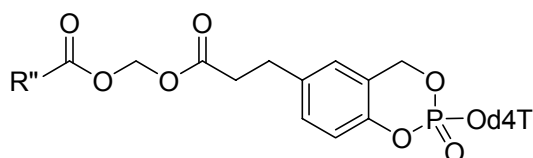
R = Methyl **135**: IC₅₀(5 min./15 min.) = 2.7 μM/0.75 μM
 R = *tert*-Butyl **136**: 3.4 μM/0.77 μM
 R = Benzyl **137**: 2.8 μM/0.78 μM
 R = H **138**: > 50 μM/34 μM



R = Methyl **139**: 8.8 μM/3.8 μM
 R = *tert*-Butyl **140**: 4.4 μM/2.2 μM
 R = Benzyl **141**: 22 μM/6.7 μM
 R = H **142**: > 50 μM/> 50 μM



R' = Acetyl **143**: 1.1 μM/0.62 μM
 R' = Levulinyl **209**: 21 μM/8.4 μM
 R' = H **145**: 3.8 μM/2.2 μM



R'' = Methyl (AM) **48**: 8.5 μM/4.1 μM
 R'' = *tert*-Butyl (POM) **49**: 5.9 μM/2.7 μM
 R'' = *iso*-Propyloxy (POC) **50**: 5.5 μM/3.3 μM

Abb. 159 Inhibitor-Aktivitäten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **135-143,145,209** und der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Derivate **48-50** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Insgesamt läßt sich also festhalten, daß durch die Gegenwart Ester-funktionalisierter Seitenketten in der *cycloSal*-Untereinheit bis auf zwei Ausnahmen (die Verbindungen **141,209**) keine ausreichende sterische Repulsion erzeugt wurde, um eine Bindung der *cycloSal*-Nucleotide im aktiven Zentrum der BChE zu verhindern, wofür wahrscheinlich die hohe konformationelle Flexibilität der Alkylketten verantwortlich war. Betrachtet man hingegen die freien Carbonsäuren **138,142**, so fällt auf, daß die inhibitorische Potenz für diese unter den pH-Bedingungen des Assays als Carboxylat vorliegenden Derivate praktisch vollständig verloren ging. Dieser Effekt mußte in der Tat auf die negative Ladung der Carboxylate zurückzuführen sein, da die bloße Anwesenheit einer polaren Gruppe am Ende der Seitenkette nicht zu einem signifikanten Verlust an Inhibitor-Aktivität führte, was ein Vergleich mit dem Hydroxyl-freien Pronucleotid **145** klar zeigt.

Im Gegensatz zu den Seitenketten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs konnte die Präsenz einer Verzweigung in der Benzyl-Position sehr wohl zu der

angeführten sterischen Repulsion führen. Dies wird dadurch belegt, daß der Inhibitor-Effekt der *cycloSal*-d4TMPs mit steigendem sterischen Anspruch des Benzyl-Substituenten deutlich abnimmt. Hierzu sei auf einen Vergleich der 6-Chlor-substituierten Derivate **210-213**, den Verlust der Inhibitor-Aktivität für **214** und die Reihung der inhibitorischen Potenz bei den chlorierte Benzyl-Substituenten besitzenden Pronucleotiden **215-217** verwiesen (Abb. 160). Auf das nachteilige Hydrolyseverhalten einiger dieser Verbindungen wurde bereits eingegangen (vergl. Kapitel 2.2).

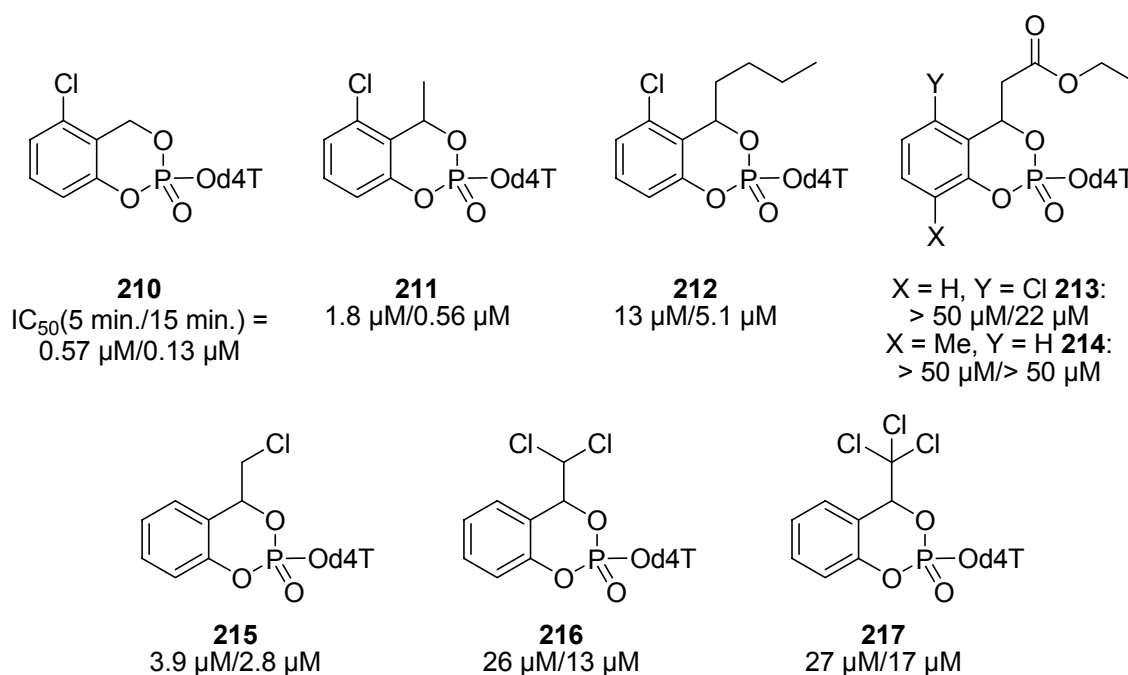


Abb. 160 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **210-217** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Daß die Position der *cycloSal*-Einheit im Pronucleotid nicht ohne Bedeutung ist, zeigte der Umstand, daß für die Verbindung **218**, einem Regioisomer von 3-Methyl-*cycloSal*-dTMP **171**, welches den 3-Methyl-*cycloSal*-Rest an der 3'-Hydroxylgruppe des Glycons trug, die Inhibitor-Aktivität gegenüber BChE vollständig verloren ging. Dies trat auch ein, wenn man formal das phenolische Sauerstoffatom des unsubstituierten Prototypen **85**, eines starken BChE-Inhibitors, gegen Stickstoff austauschte, um so das *cycloAminobenzyl*-(*cycloAmb*)-d4TMP **219** zu erhalten (Abb. 161). Der Verlust der inhibitorischen Potenz für **219** gegenüber **85** wurde mit der deutlich geringeren Elektrophilie des Phosphat-Zentrums von **219** begründet, die auch in der sehr hohen Hydrolyse-Stabilität dieses Derivates ihren Ausdruck fand^[93].

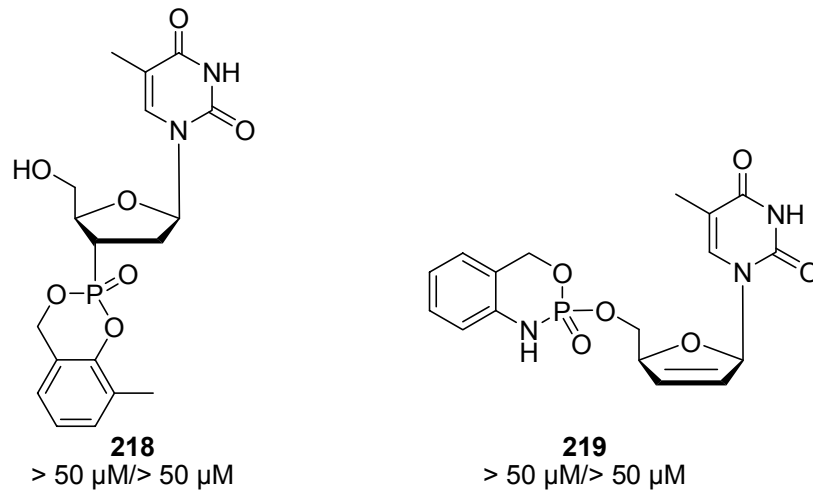


Abb. 161 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **218,219** gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

4.6.5 Mechanistische Aspekte der BChE-Inhibition durch *cycloSal*-Nucleotide

Wenn man die Erkenntnisse aus der Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die BChE-Inhibition durch *cycloSal*-Nucleotide zusammenfasst, so ergibt sich ein Postulat für den mechanistischen Verlauf dieses Vorganges (Abb. 162).

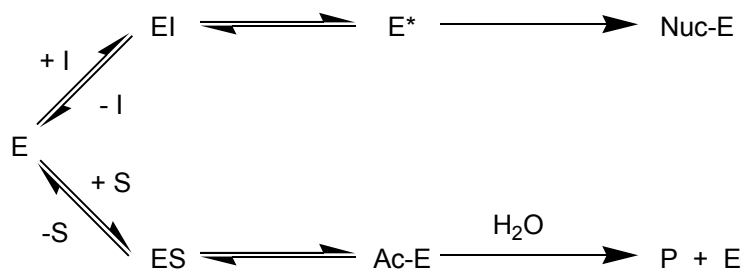


Abb. 162 Schematische Darstellung der irreversiblen Inhibition von BChE durch *cycloSal*-Nucleotide

Der Inhibitor konkurriert mit dem Substrat Acetylcholin um die Bindung im aktiven Zentrum, so daß es entweder zur Ausbildung eines Enzym-Substrat-(ES)- oder eines Enzym-Inhibitor-(EI)-Komplexes kommt. Der ES-Komplex gibt zunächst das am Serin-Rest der katalytischen Triade acetylierte Enzym (Ac-E), dessen Hydrolyse zum Produkt (P) Essigsäure und dem freien Enzym (E) führt. Der EI-Komplex hingegen kann genauso wie der ES-Komplex auch unter Freisetzung des Enzyms wieder zerfallen, oder aber es kommt zum nucleophilen Angriff des Serin-Restes auf das Phosphat-Zentrum des *cycloSal*-Nucleotids, der im Zwischenprodukt E* (entspricht **169** in der Abb. 141, S. 140) mündet. Dieses Intermediat kann entweder die

Rückreaktion zum EI-Komplex eingehen, oder aber es kommt zur irreversiblen Reaktion zum kovalent Nucleotidyl-modifizierten Enzym (Nuc-E, entspricht **170** in der Abb. 141, S. 140).

Für die Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum des Enzyms sind sicherlich attraktive und repulsive Wechselwirkungen sowie sterische Faktoren entscheidend. Ob ein gebundener Inhibitor jedoch tatsächlich schnell die Reaktion mit dem Serin-Rest der katalytischen Triade eingeht, dürfte entscheidend von seiner Reaktivität, also seiner Elektrophilie abhängen. Diese lässt sich für die *cycloSal*-Nucleotide näherungsweise anhand ihrer Hydrolyse-Halbwertszeit quantifizieren, die letztlich die Elektrophilie der Verbindung gegenüber dem Nucleophil Wasser wiedergibt.

Für die Methyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **131,196,205** (Abb. 157, S. 156) war eine Verringerung der inhibitorischen Potenz gegenüber BChE im Vergleich zum unsubstituierten Prototypen gefunden worden, wobei besonders das 3,5-Dimethyl-Derivat **205** deutlich an Inhibitor-Aktivität verloren hatte. An diesem Beispiel lässt sich das Wechselspiel aus sterischen und reaktivitätsbedingten Faktoren für die BChE-Inhibition sehr gut untersuchen. Ersetzt man formal eine der Methylgruppen von **205** durch eine zwar ähnlich große, aber elektronenziehende Gruppe, so erhält man ein Derivat mit ähnlichem sterischen Anspruch, aber erhöhter Reaktivität. Die Untersuchung solcher Pronucleotide im Cholinesterase-Assay kann dann einen Einblick in die Einflüsse der sterischen Faktoren und der Reaktivität für den beobachteten Gesamt-Effekt liefern. Um die für den BChE-Assay notwendige Hydrolyse-Stabilität der *cycloSal*-Prodrugs zu gewährleisten, bot es sich dabei an, die elektronenziehende Gruppe in der 5-Position des Aromaten zu platzieren, da die elektronischen Effekte in der 5-Position des *cycloSal*-Systems stets schwächer ausfallen als die in der 3-Position. Es waren somit 3-Methyl-5-brom-*cycloSal*-d4TMP **220** sowie 3-Methyl-5-brom-*cycloSal*-BVDUMP **221** darzustellen (Abb. 163).

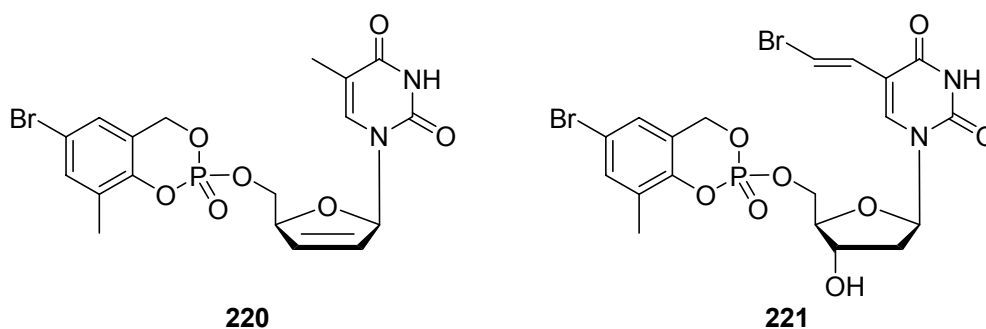


Abb. 163 Die Zielverbindungen **220,221**

Zur Synthese von **220** und **221** war zunächst die Darstellung des entsprechenden Salicylalkohol-Derivates 3-Methyl-5-bromsalicylalkohol **222** erforderlich. Ein Ansatz zur Synthese von **222** war die Hydroxymethylierung von 4-Brom-2-methylphenol **223**. Die Darstellung von **223** war von Carreno et al. durch regioselektive Bromierung von *o*-Kresol mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) beschrieben worden^[147]. Es wurde versucht, diese Reaktion nachzuvollziehen, was jedoch nicht gelang (Abb. 164). Statt des gewünschten Produktes **223** wurde laut dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes ein Gemisch von 3-Brom-2-methylphenol oder 6-Brom-2-methylphenol mit nicht umgesetztem *o*-Kresol im Verhältnis 1.7 : 1.0 erhalten.

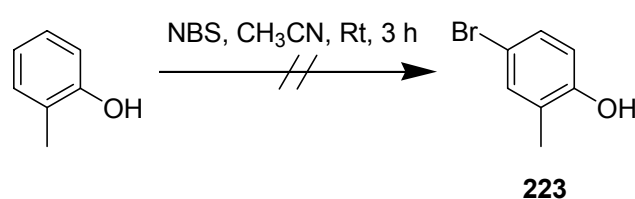


Abb. 164 Versuch der Synthese von 4-Brom-2-methylphenol **223**

Da die Synthese des Salicylalkohols **222** auch durch Reduktion der entsprechenden Carbonsäure möglich sein sollte, wurde anschließend die Darstellung von 3-Methyl-5-bromsalicylsäure **224** durch Bromierung von 3-Methylsalicylsäure versucht (Abb. 165). Es konnte jedoch kein vollständiger Umsatz des Eduktes erzielt werden, was auf dessen schlechte Löslichkeit in Chloroform zurückgeführt wurde, so daß ein nicht trennbares Gemisch aus zwei Carbonsäuren erhalten wurde.

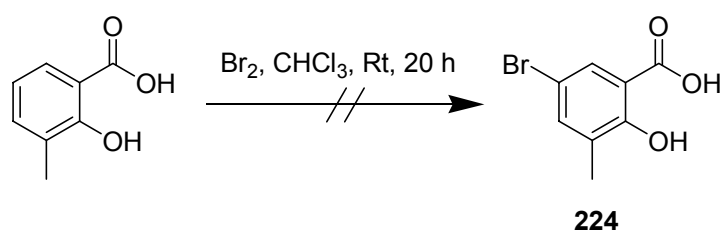


Abb. 165 Versuch der Synthese von 3-Methyl-5-bromsalicylsäure **224**

Aus diesem Grund wurde die 3-Methylsalicylsäure zunächst zum 3-Methylsalicylsäuremethylester **225** umgesetzt, der in Chloroform sehr gut löslich war. Für die Veresterung wie auch für die anschließende Bromierung zum 3-Methyl-5-bromsalicylsäuremethylester **226** konnten hohe Ausbeuten erzielt werden (86 bzw. 83 %). Dies galt auch für die Reduktion des Esters **226** zum Salicylalkohol-Derivat **222**, welches

in 91 % Ausbeute und somit in insgesamt 65 % über drei Stufen erhalten wurde. Die abschließende Anwendung der Chlorphosphit-Methodik lieferte über das 3-Methyl-5-bromsaligenylchlorphosphit **227** die *cycloSal*-NMPs **220** und **221** in Ausbeuten von 25 bzw. 33 % für die Nucleotid-Synthese (Abb. 166).

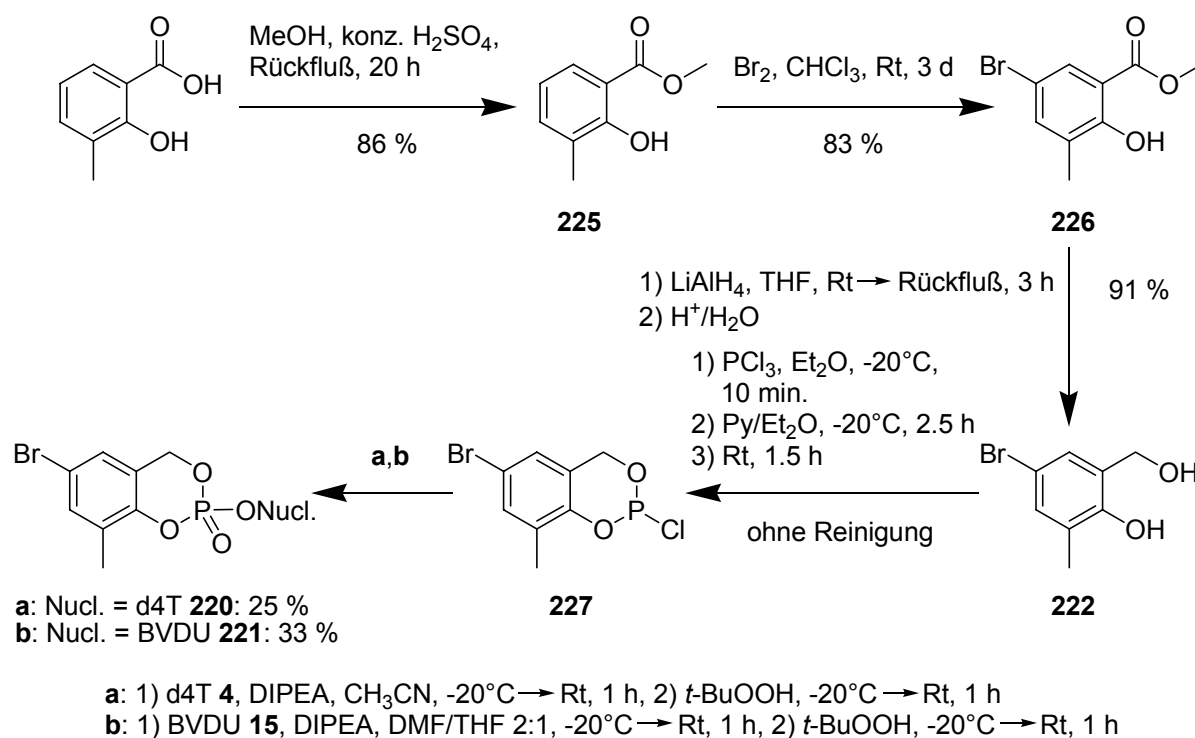


Abb. 166 Synthese der 3-Methyl-5-brom-*cycloSal*-NMPs **220,221**

Die Hydrolyse-Halbwertszeiten der neu synthetisierten Pronucleotide **220,221** in Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) sind zusammen mit den Daten für einige Vergleichsverbindungen in der Abbildung 167 (S. 164) gegeben. Wie schon zuvor beobachtet (vergl. Kapitel 4.3.6 und die Vergleichsverbindungen in der Abbildung 167), war auch hier das *cycloSal*-BVDUMP **221** hydrolyselabiler als das entsprechend substituierte d4T-Derivat **220**. Für beide Nucleosid-Analoga ergab sich eine identische Reihung der Stabilitäten der Pronucleotide. Die 3-Methyl-5-brom-substituierten Derivate **220,221** waren zwar wie erwartet stabiler als die 5-Brom-Verbindungen **80,83** und labiler als 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **196** bzw. 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP **228**. Offensichtlich war der elektronenziehende Effekt des Brom-Substituenten in der 5-Position jedoch auch stärker als der elektronenliefernde Effekt der Methylgruppe in 3-Stellung, denn **220** und **221** waren beide deutlich labiler als ihre unsubstituierten Prototypen **85** und **87**.

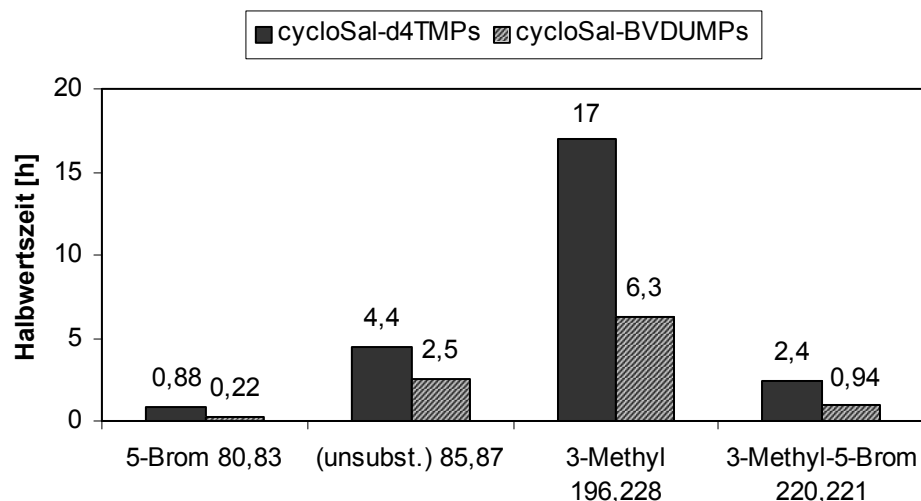


Abb. 167 Hydrolyse-Halbwertszeiten der *cycloSal*-Nucleotide **220,221** und einiger Vergleichsverbindungen in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Die Ergebnisse des BChE-Assays für die neu synthetisierten *cycloSal*-Prodrugs **220,221** sind zusammen mit den Werten einiger zum Teil bereits diskutierter Verbindungen in der Abbildung 168 dargestellt.

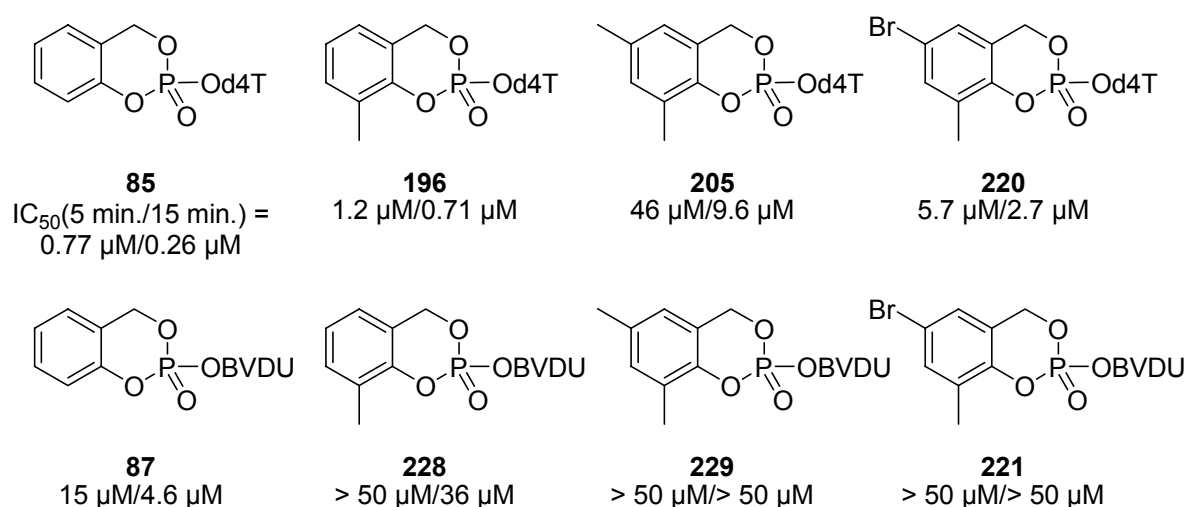


Abb. 168 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-Nucleotide **220,221** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

In der Reihe der *cycloSal*-d4TMPs war das 3-Methyl-5-Brom-Derivat **220** der schwächere Inhibitor gegenüber der 3-Methyl-Verbindung **196** und dem unsubstituierten Prototypen **85**, obwohl die Hydrolyse-Halbwertszeit von **220** geringer, seine Elektrophilie also höher als die der beiden Referenzverbindungen war. Dies konnte nur auf eine sterische Repulsion im aktiven Zentrum der BChE schließen lassen. Andererseits inhibierte **220** das Enzym trotz vergleichbarer

sterischer Verhältnisse deutlich stärker als das 3,5-Dimethyl-Derivat **205**, was wiederum nur durch einen Reaktivitäts-Effekt erklärbar war. Eine ähnliche Reihung ergab sich für die *cycloSal*-BVDUMPs. Während der unsubstituierte Prototyp **87** noch recht deutliche BChE-Inhibition bewirkte und die 3-Methyl-Verbindung **228** nur noch ein sehr schwacher Inhibitor war, inhibierten sowohl das 3,5-Dimethyl-Derivat **229** als auch die neu synthetisierte Verbindung **221** das Enzym im untersuchten Konzentrationsbereich nicht mehr. Insgesamt kann somit das Zusammenwirken von sterischen Effekten und Reaktivität bei der BChE-Inhibition durch *cycloSal*-Nucleotide als erwiesen angesehen werden.

Für das 3-Methyl-5-brom-*cycloSal*-d4TMP **220** wurden im Rahmen der Kooperation mit der Universität Leuven antivirale *in vitro*-Tests durchgeführt, deren Ergebnisse zusammen mit den Daten für *cycloSal*-d4TMP **85** und d4T **4** in der Tabelle 11 wiedergegeben sind. In dieser Testreihe wies das neu synthetisierte Pronucleotid **220** genau wie die etwas hydrolysestabilere Referenz **85** einen praktisch vollen Erhalt der antiviralen Aktivität gegen HIV-2 in den TK-defizienten Zellen verglichen mit den Tests in Wildtyp-CEM-Zellen auf, bewirkte also einen effizienten TK-Bypass. Möglicherweise war die größere Hydrolyse-Labilität von **220** durch die höhere Lipophilie und eine sich daraus ergebende verbesserte Membrangängigkeit der Verbindung kompensiert worden. Auch für das Pronucleotid **220** ging die erfolgreiche intrazelluläre Freisetzung von d4TMP mit einer im Vergleich zu d4T **4** leicht erhöhten Cytotoxizität einher.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	HIV-1	HIV-2	CEM/TK ⁻ HIV-2	CEM/0
3-Me-5-Br 220	0.24 ± 0.01	0.35 ± 0.22	0.60 ± 0.20	22.9 ± 9.5
(unsubst.) 85	0.15 ± 0.07	0.13 ± 0.06	0.30 ± 0.25	26.5 ± 22.4
d4T 4	0.25 ± 0.00	0.19 ± 0.10	21.7 ± 10.4	105 ± 78

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 11 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten von 3-Methyl-5-brom-*cycloSal*-d4TMP **220**, der Vergleichsverbindung **85** und von d4T **4**

Es bestand nunmehr noch die Frage, welche Rolle eigentlich dem irreversiblen Charakter der Reaktion, also letztlich dem letzten Teilschritt des Inhibitions-Vorganges gemäß der Darstellung in der Abbildung 162 (S. 160), zukommt. Hierfür wurden zwei Pronucleotide synthetisiert, die in ihrer Struktur zwar den *cycloSal*-Prodrugs ähnelten, die aber keinen zur Nucleotid-Freisetzung führenden C-O-Bindungsbruch im letzten Schritt der Hydrolyse eingehen konnten (Abb. 169).

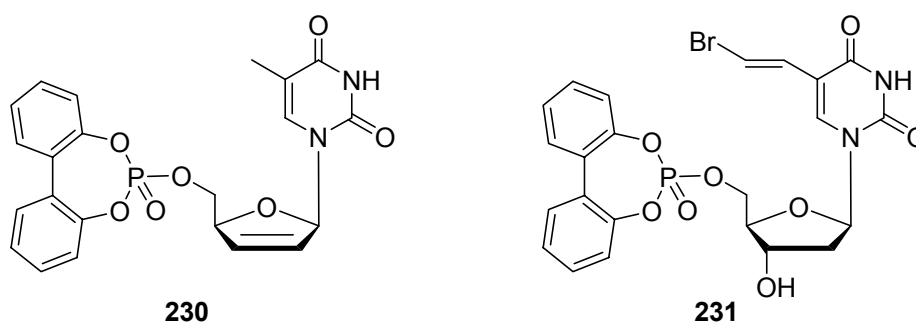
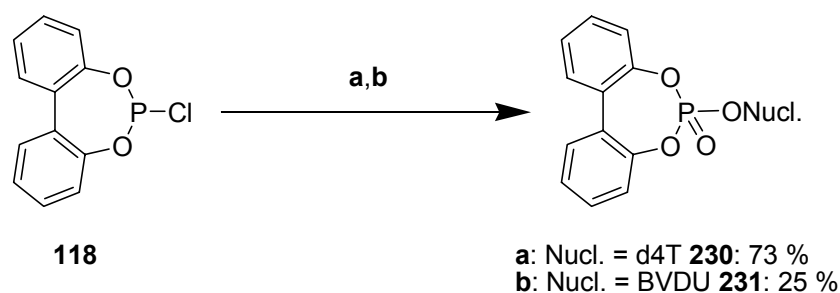


Abb. 169 Die Zielverbindungen **230,231**

Die Verbindungen **230** und **231** sollen nachfolgend in Analogie zu den *cycloSal*-NMPs als *cycloBiphenyl*-(*cycloBiphen*)-NMPs bezeichnet werden. Ihre Synthese erfolgte durch Umsetzung des im Zusammenhang mit der Darstellung von Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden) vorgestellten Biphenylchlorphosphits **118** (vergl. Kapitel 4.4.5) mit den Nucleosid-Analoga unter den Bedingungen der Synthese der entsprechenden *cycloSal*-Nucleotide. Während die BVDU-Verbindung **231** lediglich in 25 % Ausbeute isoliert werden konnte, gelang die Synthese des d4T-Derivates **230** in einer sehr guten Ausbeute von 73 % (Abb. 170). Im Gegensatz zu den *cycloSal*-Nucleotiden war das Phosphor-Zentrum der *cycloBiphen*-Nucleotide nicht stereogen, so daß keine Diastereomerenmische erhalten wurden.



a: 1) d4T **4**, DIPEA, CH₃CN, -20°C → Rt, 1 h, 2) *t*-BuOOH, -20°C → Rt, 1 h
b: 1) BVDU **15**, DIPEA, DMF/THF 2:1, -20°C → Rt, 1 h, 2) *t*-BuOOH, -20°C → Rt, 1 h

Abb. 170 Synthese der *cycloBiphen*-NMPs **230,231**

Die Hydrolysekinetiken in wässrigem Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) ergaben für **231** ($t_{1/2} = 6.4$ h) eine mit der entsprechenden 3-Methyl-Verbindung **228** ($t_{1/2} = 6.3$ h) vergleichbare Hydrolyse-Halbwertszeit, während sich **230** ($t_{1/2} = 27$ h) als außerordentlich stabil erwies. Dies war bemerkenswert, da man eigentlich erwarten sollte, daß die Ringspannung des Siebenring-Systems der *cyclo*Biphen-Nucleotide verglichen mit den Sechsringen der *cyclo*Sal-Derivate zu einer erhöhten Hydrolyse-Labilität führen müßte. Wichtiger als die Hydrolysestabilitäten war in diesem Zusammenhang jedoch der Nachweis, daß **230** und **231** tatsächlich nicht zu den Nucleotiden hydrolysierten, sondern daß die Hydrolyse im Gegensatz zur Spaltung der *cyclo*Sal-Prodrugs auf der Stufe der Phenylphosphatdiester zum Erliegen kam. Dieser Nachweis konnte mit Hilfe von ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien geführt werden, die auch nach einer Reaktionszeit von einem Monat keine Anzeichen für die Freisetzung von d4TMP bzw. BVDUMP aus **230** bzw. **231** lieferten (Abb. 171).

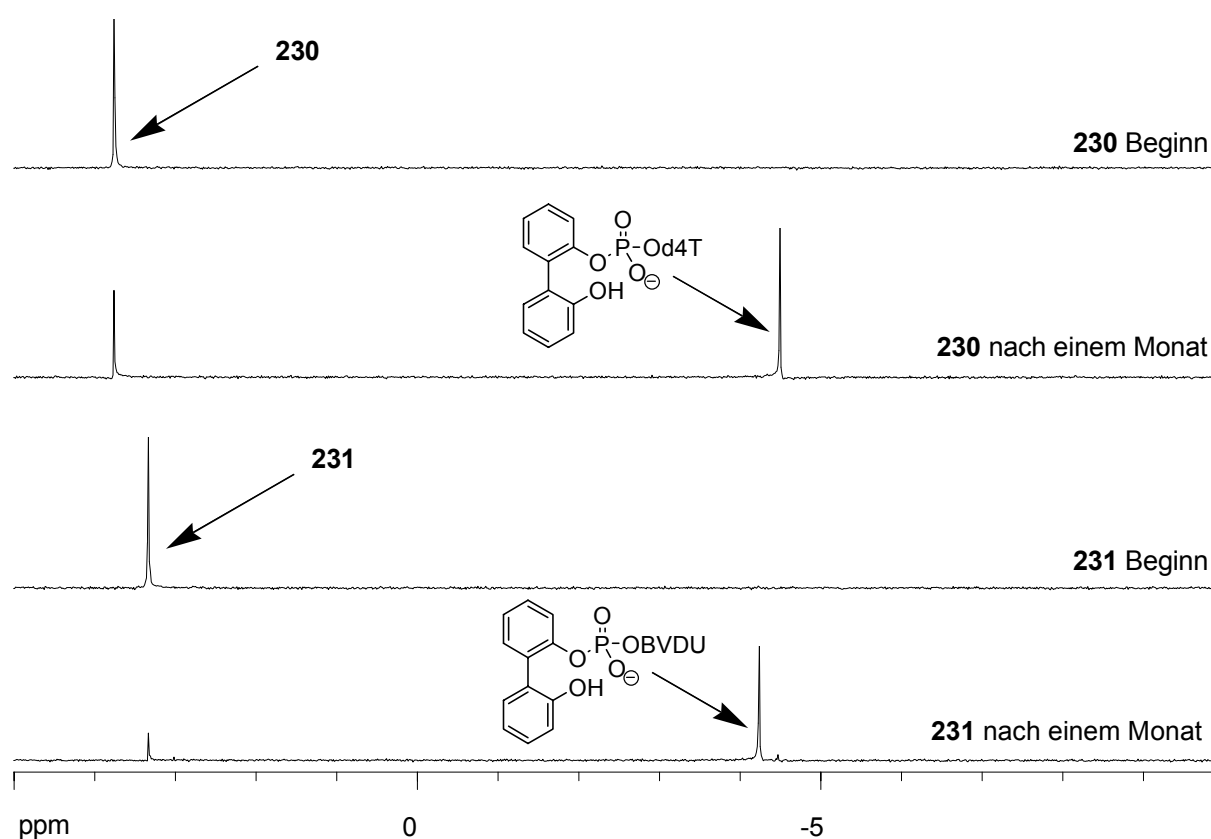


Abb. 171 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von *cyclo*Biphen-d4TMP **230** und *cyclo*Biphen-BVDUMP **231** in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3

Wie bereits beschrieben, waren die Phenyl-substituierten und Benzo-anellierten *cyclo*Sal-d4TMPs als starke BChE-Inhibitoren bekannt (vergl. Kapitel 4.6.4.2). Gleiches galt grundsätzlich auch für die entsprechenden BVDU-Derivate, von denen

jedoch lediglich 3-Phenyl-*cycloSal*-BVDUMP **232** und Benzo[*a*]-*cycloSal*-BVDUMP **233** hinreichend stabil für den BChE-Assay waren. Die anellierte Verbindung **233** erwies sich sogar als ein weitaus stärkerer Inhibitor als das unsubstituierte *cycloSal*-BVDUMP **87** (Abb. 168, S. 164) und war in seiner inhibitorischen Potenz mit einigen *cycloSal*-d4TMPs vergleichbar. Dies belegte, daß aromatenreiche Maskenstrukturen die Bindung der Pronucleotide im aktiven Zentrum der BChE deutlich begünstigten. Trotz ihrer aromatischen Maske, die strukturell den 3-Phenyl-substituierten *cycloSal*-NMPs ähnelte, zeigten die *cycloBiphen*-Pronucleotide **230,231** im Gegensatz zu den genannten Phenyl-substituierten bzw. Benzoanellierten *cycloSal*-Derivaten zumindest im beobachteten Konzentrationsbereich keine BChE-Inhibitor-Aktivität. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß der dem „Aging“ ähnliche spontane C-O-Bindungsbruch in der Benzyl-Position der *cycloSal*-Prodrugs essentiell für den beobachteten inhibitorischen Effekt gegenüber humaner BChE ist, da er der Inhibition den irreversiblen Charakter verleiht. Bleibt dieser Bindungsbruch wie bei **230** und **231** aus, so ist ein drastischer Verlust an inhibitorischer Potenz die Folge. Die IC_{50} -Werte der diskutierten Pronucleotide sind in der Abbildung 172 zusammengestellt.

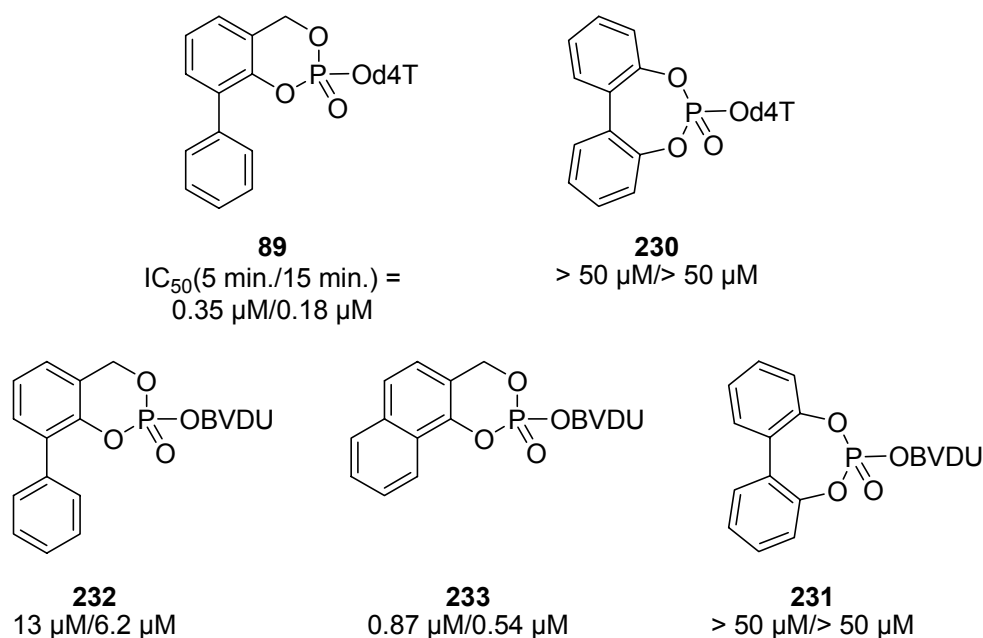


Abb. 172 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloBiphen*-Nucleotide **230,231** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Das *cyclo*Biphen-d4TMP **230** wurde im Rahmen der Kooperation mit der Universität Leuven antiviralen *in vitro*-Tests gegen HIV-1 und HIV-2 unterzogen (Tab. 12).

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	<u>CEM/0</u>		<u>CEM/TK⁻</u>	<u>CEM/0</u>
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
<i>cyclo</i> Biphen 230	1.05 ± 0.49	1.00 ± 0.00	≥ 50	150 ± 54
d4T 4	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02	15.0 ± 7.1	55.8 ± 24.2

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 12 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten von *cyclo*Biphen-d4TMP **230** und von d4T **4**

Der vollständige Verlust an Aktivität gegen HIV-2 beim Übergang von Wildtyp- zu TK-defizienten CEM-Zellen wies auf die aufgrund des Hydrolyseverhaltens erwartete mangelhafte Eignung von **230** als Pronucleotid hin. Dies korrelierte mit der vergleichsweise geringen Cytotoxizität der Verbindung. Bemerkenswert war jedoch, daß in den Tests an Wildtyp-CEM-Zellen nennenswerte Aktivität sowohl gegen HIV-1 als auch gegen HIV-2 festzustellen war. Da **230** hydrolytisch kein d4TMP freisetzte, konnte dies nur auf eine im Kulturmedium vorliegende Phosphodiesterase-Aktivität zurückzuführen sein, die die Bildung von d4T **4** ermöglichte.

4.6.6 Wege zur Vermeidung der BChE-Inhibition durch *cyclo*Sal-Nucleotide

Es wurden zwei Ansätze zur Vermeidung der unerwünschten Inhibition von humaner BChE durch *cyclo*Sal-Nucleotide verfolgt.

4.6.6.1 Der stereochemische Ansatz

Die *cyclo*Sal-Nucleotide wurden aus den Synthesen stets als Gemisch von zwei Diastereomeren (*R_P*/*S_P*) erhalten, welche sich in einigen Fällen mittels präparativer HPLC trennen ließen. Die Vermutung lag nahe, daß sich die Diastereomere bezüglich ihrer inhibitorischen Potenz gegenüber BChE unterscheiden könnten, da nur eine der beiden Konfigurationen am Phosphat-Zentrum die Substituenten in eine Anordnung bringen sollte, die die Möglichkeit der irreversiblen Inhibition eröffnet. Die

Ergebnisse des Cholinesterase-Assays mit einigen diastereomerenreinen *cycloSal*-NMPs sind in der Tabelle 13 wiedergegeben, wobei erneut auf die den RP-HPLC-Retentionszeiten entsprechenden Bezeichnungen „fast“ und „slow“ zurückgegriffen werden soll.

<i>cycloSal</i> -Nucleotid	IC ₅₀ ^a	<i>fast</i>		<i>slow</i>		
		IC ₅₀ ^b	EC ₅₀ ^c	IC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	EC ₅₀ ^c
3-(Isopr-Sal)-d4TMP 96	> 50	> 50	0.55	3.6	2.5	3.0
3-Sal-d4TMP 92	> 50	47	0.70	0.79	0.38	1.5
3-(Me-Pr)-d4TMP 135	0.49	0.27	1.93	> 50	> 50	0.08
3-(Ac-Et)-d4TMP 143	0.59	0.27	0.35	> 50	> 50	0.06
3- <i>t</i> -Bu-BVDUMP 234	> 50	> 50	-----	> 50	> 50	-----
3-Ph-BVDUMP 232	> 50	> 50	-----	3.7	2.8	-----
3-Me-FdU 184	> 50	> 50	-----	> 50	> 50	-----
3-Me-GCV 200	> 50	> 50	-----	23	4.7	-----

^aIC₅₀-Wert in μM gegenüber humaner BChE (Serum) bei 5 min. Reaktionszeit; ^bIC₅₀-Wert in μM gegenüber humaner BChE (Serum) bei 15 min. Reaktionszeit; ^cantivirale Aktivität: EC₅₀-Wert in μM gegen HIV-2 in CEM/TK-Zellen

Tab. 13 Inhibitor-Aktivitäten einiger diastereomerenreiner *cycloSal*-Nucleotide gegenüber humaner BChE im Vergleich zu ihren anti-HIV-Aktivitäten

Es ergab sich eindeutig, daß stets eines der Diastereomere kein BChE-Inhibitor war, während die gesamte inhibitorische Potenz auf das andere Diastereomer zurückzuführen war. Lediglich im Falle von 3-Sal-*cycloSal*-d4TMP **92** wurde für das *fast*-Isomer eine minimale Inhibitor-Aktivität gefunden, die jedoch wohl auf einer geringen Verunreinigung der *fast*-Fraktion mit dem stark inhibierenden *slow*-Isomer beruhte. Für 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **234**, welches nachfolgend in Kapitel 4.6.6.2 ausführlicher diskutiert werden wird, und 3-Methyl-*cycloSal*-FdUMP **184** war die Inhibitor-Aktivität gegenüber BChE generell so gering, daß für beide Stereoisomere kein IC₅₀-Wert ermittelt wurde. Auffällig war auch, daß für die diastereomerenreinen *cycloSal*-d4TMPs das nicht inhibierende Isomer stets die bessere anti-HIV-Aktivität aufwies, wobei wegen der besseren Selektivität des Testsystems die anti-HIV-2-Daten in TK-defizienten CEM-Zellen betrachtet wurden.

Die Diastereoemerentrennung von **96** mittels präparativer RP-HPLC und die nachfolgende diastereomerenreine Darstellung von **92** waren bereits in Kapitel 4.4.6 beschrieben worden. Die Pronucleotide **135** und **143** sowie **200** lagen aus anderen Arbeiten getrennt vor. Die Darstellung und Diastereoemerentrennung von **232** und **184** war aus Vorarbeiten bekannt^[88,93], wobei die Synthese und HPLC-Trennung für **184** erneut durchgeführt werden mußte (vergl. auch Kapitel 4.6.4.1). Neu war die Trennung der Diastereomere von 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **234** (vergl. Kapitel 4.6.6.2).

Abschließend blieb die Frage nach der Zuordnung der Stereochemie. Es war kaum anzunehmen, daß für einige Verbindungen das R_P - und für andere das S_P -Diastereomer die inhibitorische Potenz ausmachte. Eher schien es wahrscheinlich, daß die Abfolge der Retentionszeiten beider Isomere bei der HPLC-Trennung variierte, so daß mal das *fast*- und mal das *slow*-Isomer die R_P -Konfiguration besaß. In diesem Zusammenhang wurde erneut auf die Methode der Zuweisung der absoluten Konfiguration am Phosphor-Atom der *cycloSal*-Nucleotide mittels CD-Spektroskopie zurückgegriffen (vergl. Kapitel 4.4.7). Für 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **234** versagte die Methode, da beide Diastereomere sehr ähnliche CD-Spektren besaßen (Abb. 173).

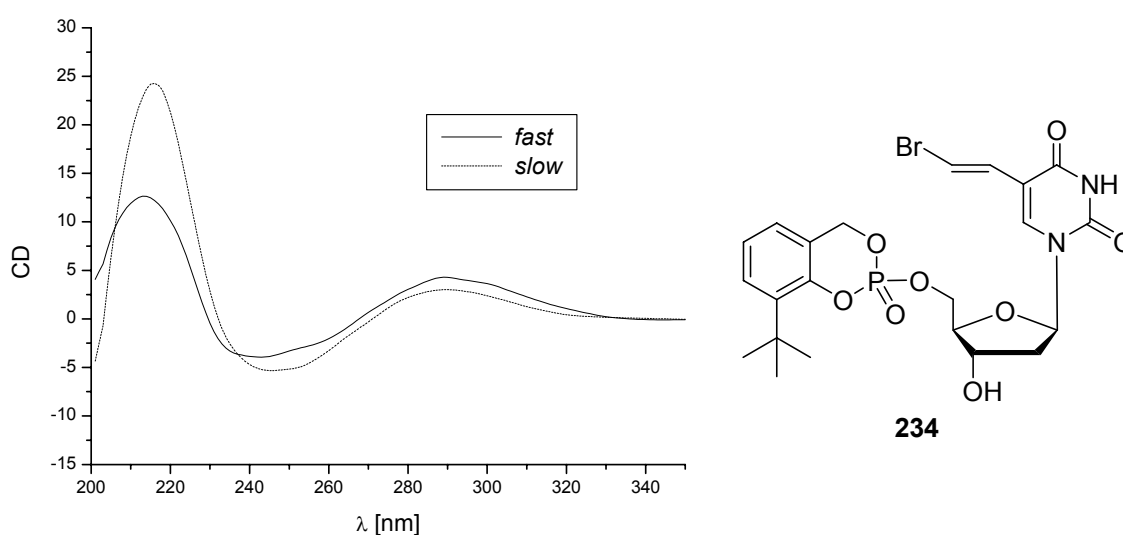


Abb. 173 CD-Spektren der getrennten Diastereomere von 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **234**

Im Falle von 3-Phenyl-*cycloSal*-BVDUMP **232** wies der negative Cotton-Effekt des *fast*-Isomers bei etwa 220 nm auf die R_P - und der entsprechende positive Effekt des *slow*-Isomers auf die S_P -Konfiguration hin (Abb. 174). Das Ergebnis für 3-Methyl-*cycloSal*-FdUMP **184** war wegen der geringen Intensität des Cotton-Effektes bei knapp 230 nm nicht eindeutig, wenn auch die Zuweisung der R_P -Konfiguration zum *slow*-Isomer vermutet werden konnte (Abb. 175). Es war bereits bekannt, daß **92 fast** und **96 fast** die R_P -Konfiguration besaßen (vergl. Kapitel 4.4.7).

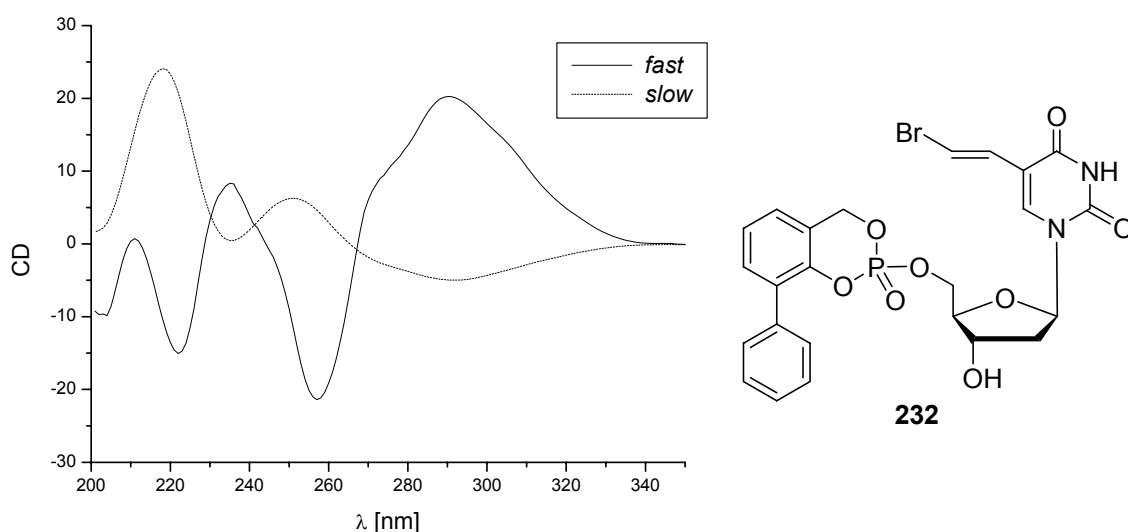


Abb. 174 CD-Spektren der getrennten Diastereomere von 3-Phenyl-*cycloSal*-BVDUMP **232**

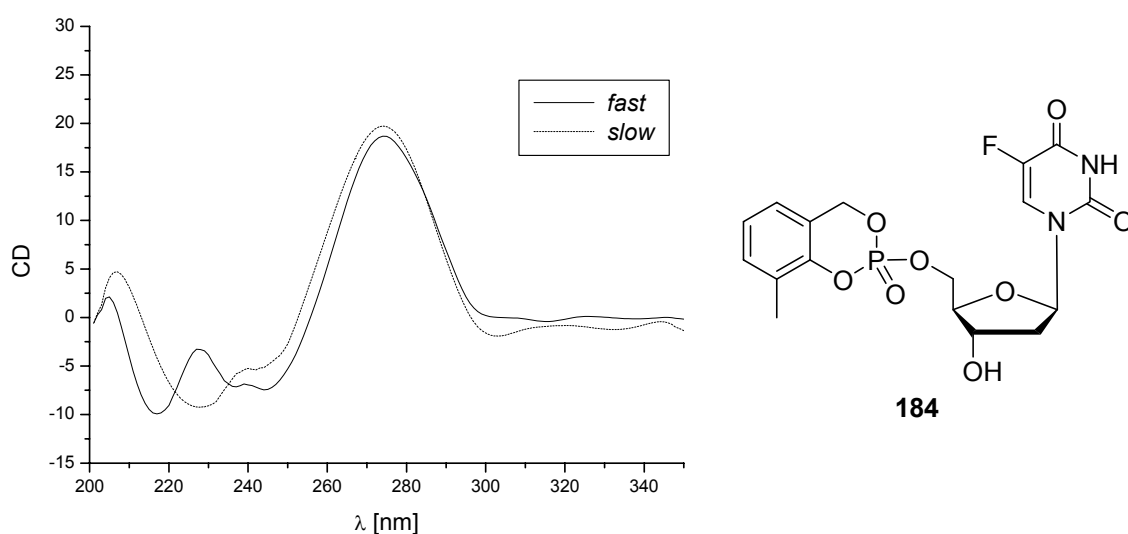


Abb. 175 CD-Spektren der getrennten Diastereomere von 3-Methyl-*cycloSal*-FdUMP **184**

Insgesamt läßt sich also festhalten, daß die Diastereomere ohne Inhibitor-Aktivität gegenüber humaner BChE und mit der besseren antiviralen Aktivität offensichtlich *R_P*-Konfiguration besaßen. Die Trennung der Diastereomerengemische der *cycloSal*-Nucleotide stellt damit eine attraktive Möglichkeit dar, die potentielle Problematik der BChE-Inhibition zu umgehen. Außerdem eröffnet der BChE-Assay eine alternative Methode zur Zuordnung der absoluten Konfiguration am Phosphat-Zentrum, sofern nicht beide Diastereomere Nicht-Inhibitoren der BChE sind. Es ist jedoch zu bedenken, daß sich nicht in allen Fällen die Diastereomerengemische mittels präparativer RP-HPLC trennen lassen, so daß es galt, noch einen weiteren Ansatz zur Vermeidung der BChE-Inhibition durch *cycloSal*-Nucleotide zu entwickeln.

4.6.6.2 Der sterische Ansatz

Es wurde vermutet, daß die Einführung sterisch anspruchsvoller Substituenten in der Aryl-Einheit der *cycloSal*-Nucleotide eine sterische Repulsion bei der Bindung im aktiven Zentrum der BChE und somit eine Abschwächung oder Vermeidung der BChE-Inhibition bewirken sollte. Diese These beruhte auf der Beobachtung einer Abnahme der inhibitorischen Potenz durch die Gegenwart von Methylgruppen in der Aryl-Einheit von *cycloSal*-d4TMPs (vergl. Kapitel 4.6.4.2). Sollte sich dieser sterische Ansatz bewahrheiten, so schien die Konzeption einer *cycloSal*-Maske, die generell zur Unterdrückung der BChE-Inhibition führt, prinzipiell möglich.

Der beschriebene sterische Ansatz zur Vermeidung der BChE-Inhibition hatte zur Synthese der Phenyl-substituierten und Benzo-anellierten *cycloSal*-NMPs geführt, die jedoch zum Teil sogar eine gegenüber den unsubstituierten *cycloSal*-NMPs gesteigerte inhibitorische Potenz besaßen (vergl. Kapitel 4.6.4.2 und 4.6.5). Andererseits hatte sich ergeben, daß eine 3,5-Disubstitution in der Aryl-Einheit aus zumindest teilweise sterischen Gründen zu einer verringerten Inhibitor-Aktivität führte. So war 3,5-Dimethyl-*cycloSal*-d4TMP **205** nur noch ein schwacher BChE-Inhibitor, während 3,5-Dimethyl-*cycloSal*-BVDUMP **229** praktisch keine Inhibitor-Aktivität mehr besaß (vergl. Kapitel 4.6.4.2 und 4.6.5). Es stellte sich daher zunächst die Frage, ob 3,5-Diphenyl-substituierte *cycloSal*-NMPs eventuell ebenfalls verringerte BChE-Inhibitor-Aktivität besitzen könnten, so daß die Zielverbindungen 3,5-Diphenyl-*cycloSal*-d4TMP **235** und 3,5-Diphenyl-*cycloSal*-BVDUMP **236** zu synthetisieren waren (Abb. 176, S. 174).

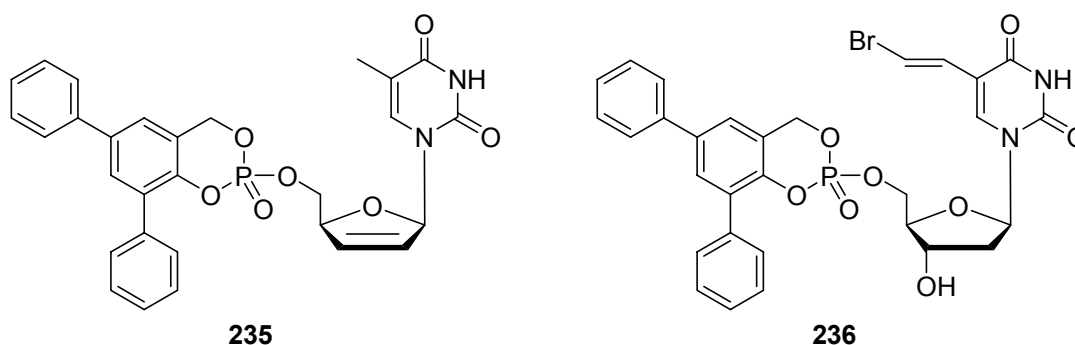


Abb. 176 Die Zielverbindungen **235,236**

Für die Darstellung des zur Synthese von **235** und **236** benötigten Salicylalkohol-Derivates wurde das neue Synthesekonzept für Salicylalkohole (vergl. Kapitel **4.3**) angewendet. Der synthetische Vorläufer 3,5-Dibromsalicylalkoholisopropylidenacetal **67** wurde in einer doppelten Suzuki-Kupplung mit Phenylboronsäureanhydrid **54** unter wässrig-basischen Bedingungen mit Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) als Katalysator in 68 % Ausbeute zum 3,5-Diphenylsalicylalkoholisopropylidenacetal **237** umgesetzt (Abb. 177), wobei die Reinigung des Produktes nach Chromatographie letztlich durch Umkristallisation gelang. Bei **237** handelte es sich formal um ein disubstituiertes *meta*-Terphenyl.

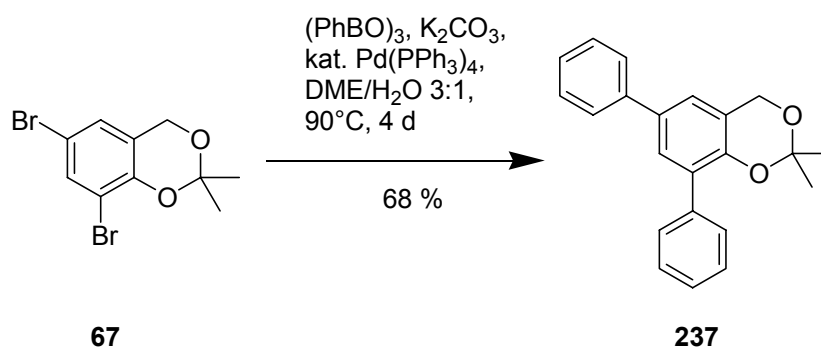


Abb. 177 Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkoholisopropylidenacetal **237**

Bei den Versuchen zur sauren Entschützung des Acetals **237** wurde festgestellt, daß sowohl die Methode mit TFA als auch die mit saurem Ionentauscher befriedigende Ergebnisse lieferte, wobei die TFA-Entschützung zu einer etwas höheren Ausbeute von 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238** führte (Abb. 178, S. 175).

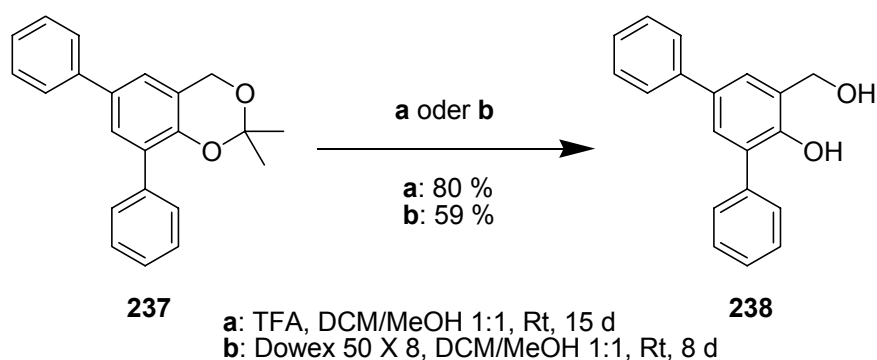


Abb. 178 Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238**

Die anschließende Umsetzung des Salicylalkohol-Derivates **238** zum 3,5-Diphenylsaligenylchlorphosphit **239** und schließlich zu den *cycloSal*-Nucleotiden **235,236** erfolgte unter den etablierten Standardbedingungen (Abb. 179).

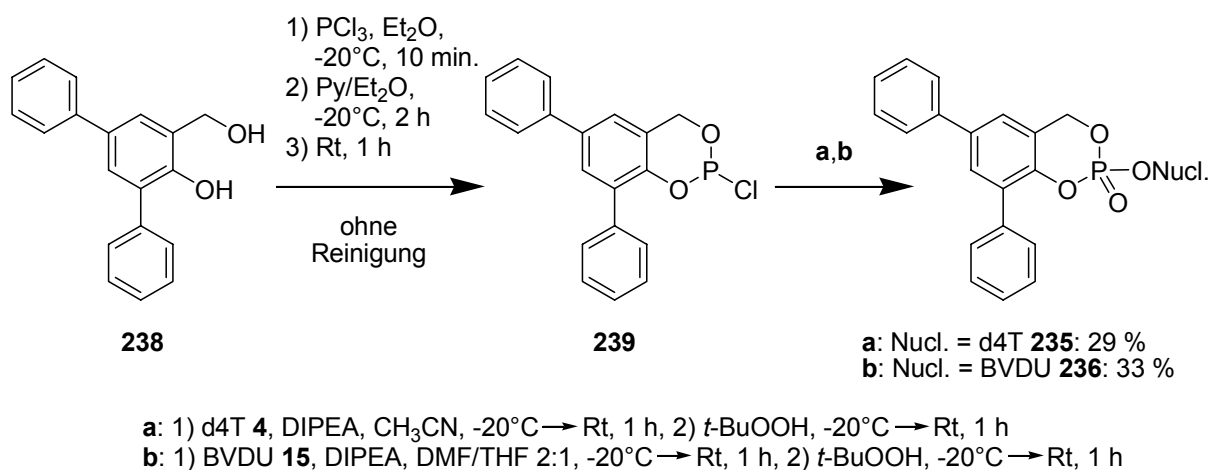


Abb. 179 Synthese der 3,5-Diphenyl-*cycloSal*-NMPs **235,236**

Es wurden noch zwei Versuche zur Vereinfachung der Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238** vorgenommen, dessen Darstellung unter Einbeziehung der notwendigen Synthese des acetalischen Vorläufers **67** immerhin fünf konsekutive Stufen beansprucht hatte. Zum einen wurde versucht, den 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75** als Vorstufe von **67** der Suzuki-Kupplung zu unterziehen, so daß es für die Darstellung von **238** noch einer Reduktion bedurfte hätte. Des Weiteren wurde auch der ungeschützte 3,5-Dibromsalicylalkohol **74** direkt in der Suzuki-Kupplung eingesetzt. In beiden Fällen konnte das jeweils gewünschte Produkt (3,5-Diphenylsalicylsäuremethylester **240** bzw. 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238**) nicht erhalten werden (Abb. 180, S. 176). Bei der Umsetzung von **75** erscheint eine basische Verseifung des Carbonsäureesters als Grund für das Versagen der Reaktion

denkbar. Dies ließe sich wahrscheinlich durch eine nicht-wässrige Variante der Suzuki-Kupplung umgehen, was jedoch nicht weiter verfolgt wurde. Für die Umsetzung des Salicylalkohols **74** läßt sich anführen, daß eine Schützung der Salicylalkohol-Funktion für die Durchführung der Reaktion offensichtlich unumgänglich ist. Möglicherweise stört die Salicylalkohol-Funktion durch Komplexierung des Palladiums die Reaktion. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß Suzuki-Kupplungen an ungeschützten Salicylaldehyden sehr wohl möglich sind^[148].

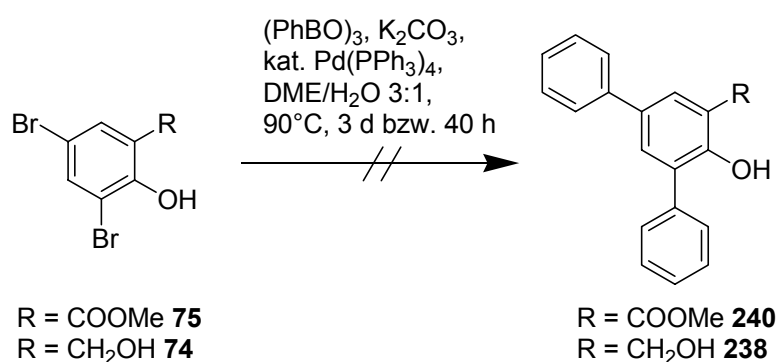


Abb. 180 Versuche zur Synthese von 3,5-Diphenylsalicylsäuremethylester **240** bzw. 3,5-Diphenylsalicylalkohl **238** durch direkte Suzuki-Kupplung von **75** bzw. **74**

In der Abbildung 181 sind die Hydrolyse-Halbwertszeiten der 3,5-Diphenyl-substituierten *cycloSal*-NMPs **235,236** in Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) im Vergleich zu einigen teilweise bereits diskutierten Referenzverbindungen gegeben.

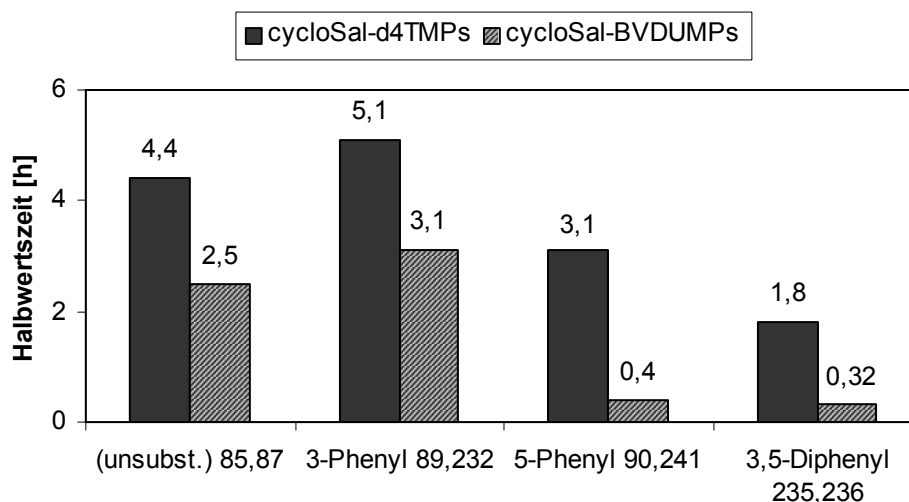


Abb. 181 Hydrolyse-Halbwertszeiten der *cycloSal*-Nucleotide **235,236** und einiger Vergleichsverbindungen in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Der leicht stabilisierende Effekt des 3-Phenyl-Substituenten (in **89** und **232**) war durch sterische oder Lipophilie-Faktoren erklärt worden, während die Labilisierung durch den 5-Phenyl-Substituenten (Pronucleotide **90** und **241**) im Vergleich zu den unsubstituierten Prototypen **85,87** auf die Erweiterung des Chromophors und die daraus resultierende Stabilisierung des bei der Hydrolyse primär gebildeten Phenolats (vergl. Kapitel **2.2**) zurückgeführt worden war^[88,111]. Es zeigte sich nun, daß diese Erweiterung des Chromophors einen derart massiven Effekt hatte, daß die 3,5-Diphenyl-substituierten Derivate **235,236** labiler als die einfach Phenyl-substituierten Verbindungen waren. Im Falle von 3,5-Diphenyl-*cycloSal*-BVDUMP **236** war diese Labilisierung so deutlich, daß das Pronucleotid zu labil für den BChE-Assay war. Nachfolgend soll daher nur die inhibitorische Potenz des d4T-Derivates **235** im Vergleich zu einigen bereits vorgestellten Verbindungen diskutiert werden (Abb. 182).

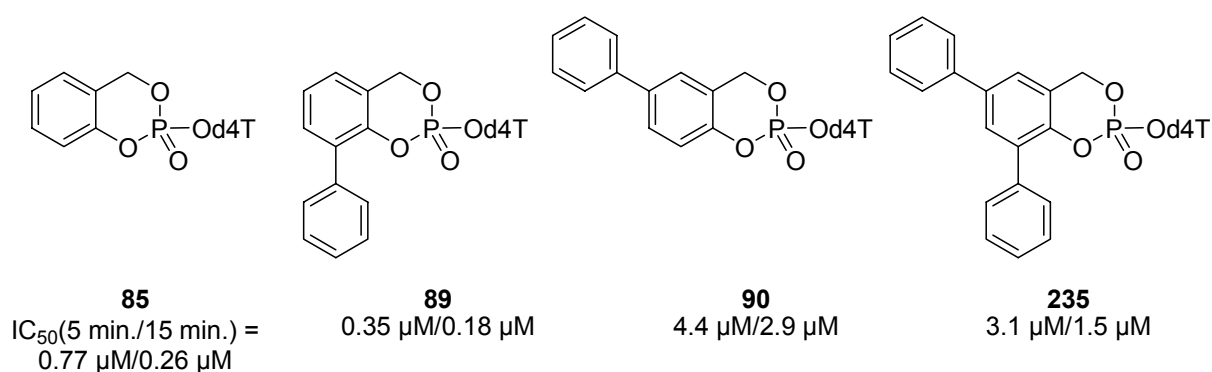


Abb. 182 Inhibitor-Aktivitäten des *cycloSal*-d4TMPs **235** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Das 3,5-Diphenyl-*cycloSal*-d4TMP **235** war zwar ein etwa fünffach schwächerer BChE-Inhibitor als der unsubstituierte Prototyp **85**, allerdings war der Rückgang der inhibitorischen Potenz nur etwa mit der 5-Phenyl-Verbindung **90** vergleichbar. Der aufgrund der starken BChE-Inhibition durch das 3-Phenyl-Derivat **89** belegte attraktive Effekt des 3-Phenyl-Substituenten bei der Bindung der Pronucleotide im aktiven Zentrum des Enzyms schien also den für das Muster der 3,5-Disubstitution erwarteten repulsiven Effekt zu kompensieren.

Es sei noch erwähnt, daß für das Pronucleotid **235** im Rahmen der Kooperation mit der Universität Leuven antivirale *in vitro*-Tests durchgeführt wurden. In Wildtyp-CEM-Zellen war die Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 wie für die Mehrzahl der *cycloSal*-d4TMPs mit der von d4T **4** vergleichbar. Für die Aktivität gegen HIV-2 in TK-

defizienten CEM-Zellen liegen noch keine Ergebnisse vor, weshalb die Daten hier nicht weiter diskutiert werden sollen.

Aufgrund der Resultate für die Phenyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß eine Vermeidung der BChE-Inhibition durch das Einbringen aromatischer Substituenten in die *cycloSal*-Einheit unmöglich scheint. Es wurde daher versucht, die gewünschte sterische Repulsion durch größere Alkyl-Reste herbeizuführen. Zunächst wurden die Mono-*tert*-butyl-substituierten *cycloSal*-NMPs **234,242-244** synthetisiert (Abb. 183), die bis auf das 5-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **244** bereits aus Vorarbeiten bekannt waren^[146,76].

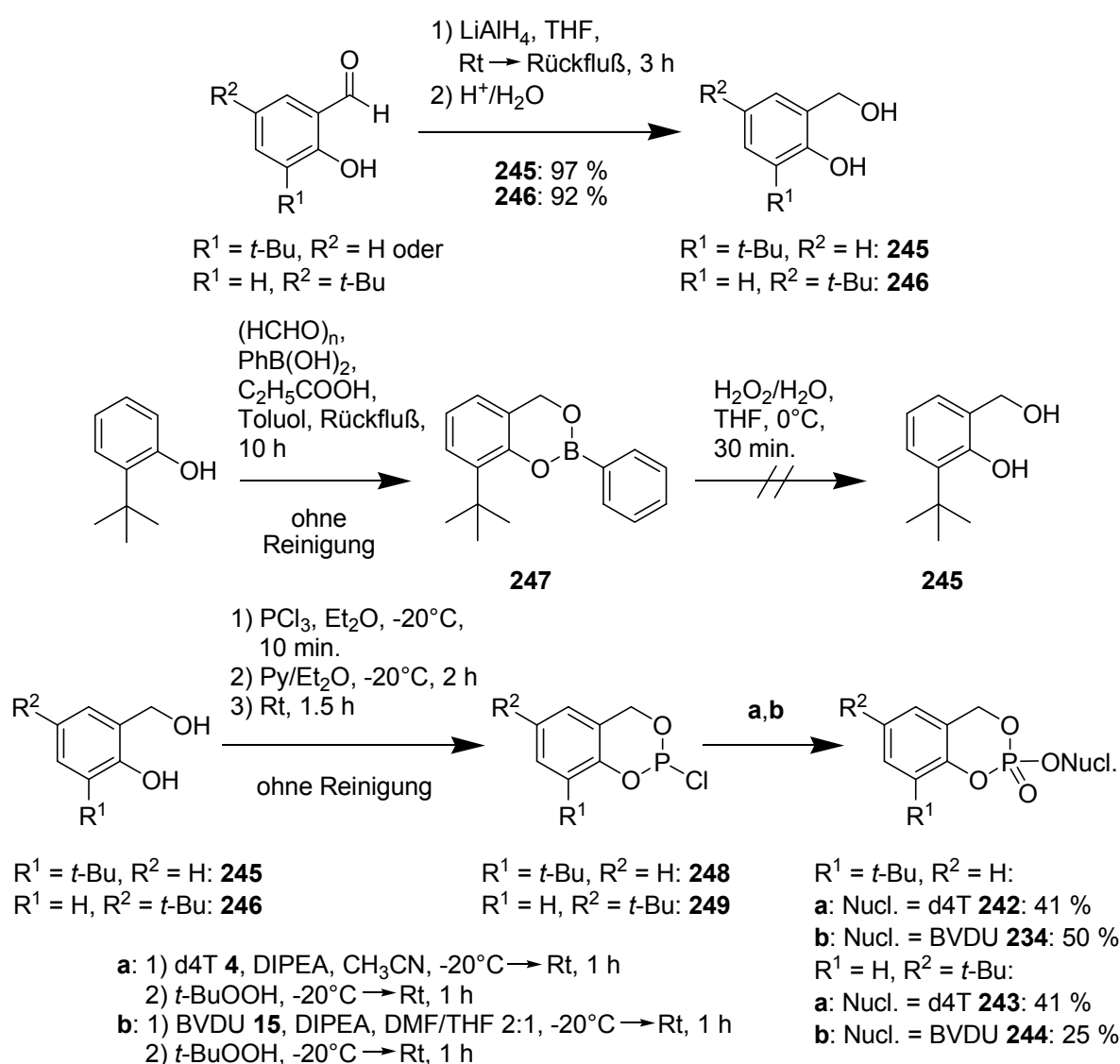


Abb. 183 Synthese der Mono-*tert*-butyl-substituierten *cycloSal*-NMPs **234,242-244**

Die kommerziell verfügbaren *tert*-Butyl-substituierten Salicylaldehyde (in den Vorarbeiten war meist die aufwendige Casiraghi-Formylierung der entsprechenden

Phenole durchgeführt worden) wurden mit Lithiumaluminiumhydrid in beinahe quantitativen Ausbeuten zu den Salicylalkoholen **245** und **246** reduziert. Lediglich für den 3-*tert*-Butylsalicylalkohol **245** wurde alternativ die regioselektive Hydroxymethylierung von *ortho-tert*-Butylphenol nach Nagata über das Dioxaborin **247** erprobt, die jedoch an der chromatographischen Coelution des bei der Oxidation von **247** anfallenden Phenols mit dem Produkt **245** scheiterte. Die abschließende Synthese der *cycloSal*-Nucleotide **234,242-244** aus den zuvor dargestellten Saligenylchlorphosphiten **248,249** erfolgte unter Standardbedingungen. Auch die Derivate **234,242-244** fielen wie alle *cycloSal*-Nucleotide bei der Synthese als Diastereomergemische (R_P/S_P) an. Es war bereits in Kapitel 4.6.6.1 erwähnt worden, daß für das 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **234** die Trennung der Diastereomere mittels präparativer RP-HPLC gelang (Abb. 184).

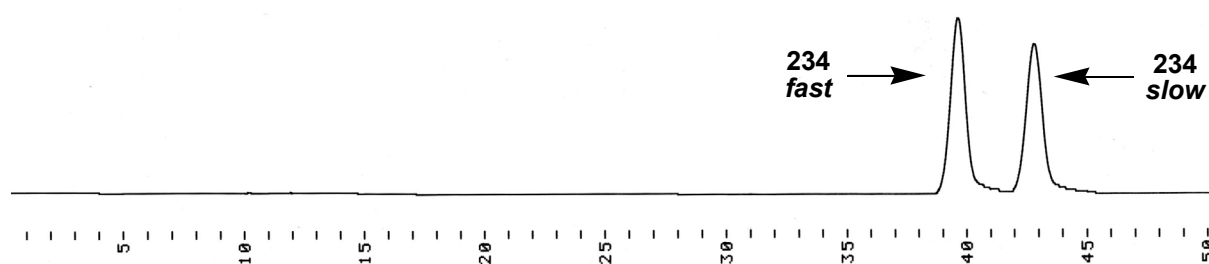


Abb. 184 Trennung der Diastereomere von **234** mittels präparativer RP-HPLC

Neben der Synthese der Mono-*tert*-butyl-substituierten *cycloSal*-NMPs **234,242-244** erfolgte auch die erstmalige Darstellung der 3,5-Bis-*tert*-butyl-substituierten Derivate **250,251** (Abb. 185).

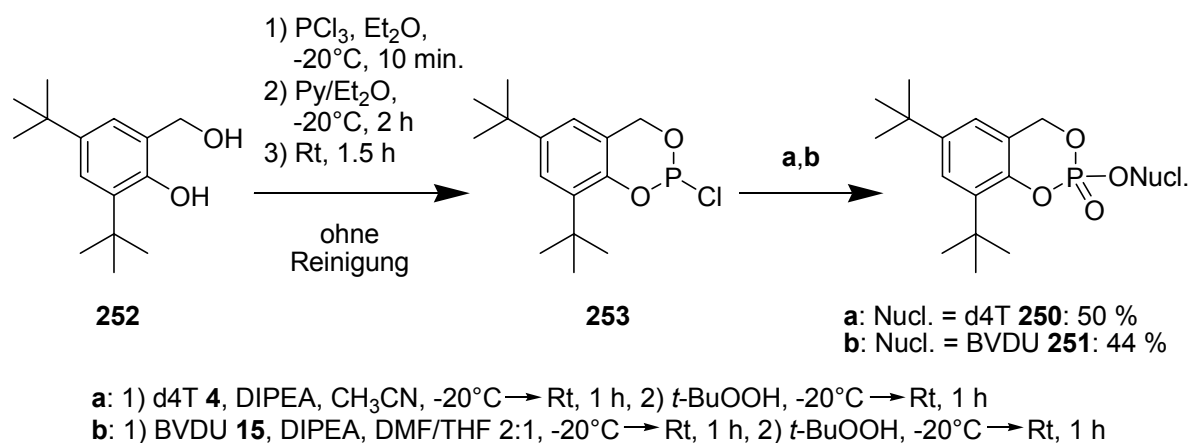


Abb. 185 Synthese der 3,5-Bis-*tert*-butyl-substituierten *cycloSal*-NMPs **250,251**

Zur Synthese von **250** und **251** wurde der aus Vorarbeiten^[82] vorliegende 3,5-Bis-*tert*-butylsalicylalkohol **252** unter den etablierten Bedingungen zum entsprechenden Saligenylchlorphosphit **253** umgesetzt, welches schließlich in für derartige Umsetzungen guten Ausbeuten von 50 % bzw. 44 % die Pronucleotide **250,251** lieferte.

Zunächst wurden die Hydrolyse-Halbwertszeiten der *tert*-Butyl-substituierten *cycloSal*-NMPs in Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) ermittelt (Abb. 186).

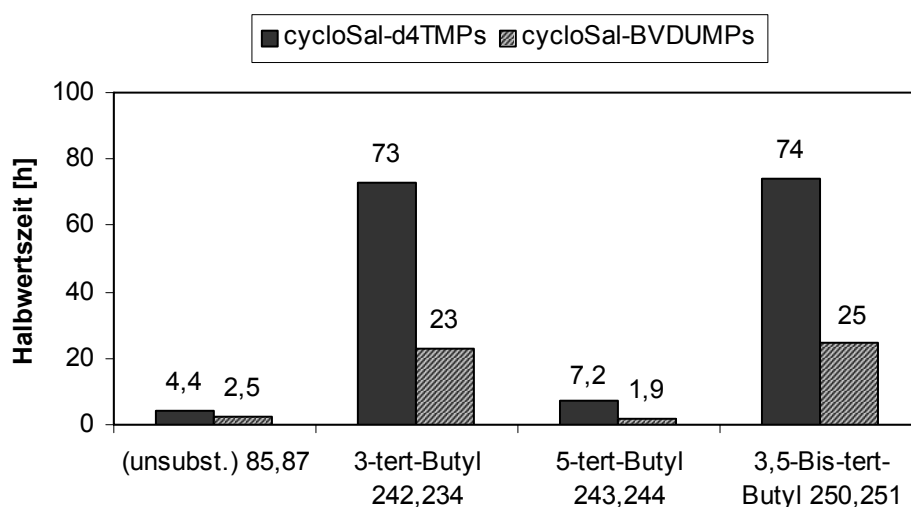


Abb. 186 Hydrolyse-Halbwertszeiten der *cycloSal*-Nucleotide **234,242-244** und **250,251** im Vergleich zu den unsubstituierten Prototypen **85,87** in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Während das 5-*tert*-Butyl-*cycloSal*-d4TMP **243** gegenüber dem unsubstituierten Prototypen **85** nur leicht stabilisiert war (vergleichbar etwa mit der 5-Methyl-Verbindung **131**, vergl. beispielsweise Kapitel 4.5.5) und für das entsprechende BVDU-Derivat **244** sogar eine leichte Labilisierung bezogen auf **87** festzustellen war, die sich wohl nur durch einen Solvationseffekt begründen läßt, erwiesen sich die 3-*tert*-Butyl-substituierten Pronucleotide **242,234** als extrem hydrolysestabil. Dies könnte auf eine sterische Abschirmung der Phosphat-Einheit durch den sterisch anspruchsvollen *tert*-Butyl-Rest hinweisen. Bemerkenswert war, daß die 3,5-Bis-*tert*-Butyl-Derivate **250,251** gegenüber **242,234** nicht mehr signifikant stabilisiert waren. Die getrennten Diastereomere **234 fast** und **234 slow** von 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-BVDUMP **234** waren in ihrer Hydrolysestabilität vergleichbar ($t_{1/2} = 21$ h für **234 fast**, $t_{1/2} = 24$ h für **234 slow**, in der Abbildung 185 nicht dargestellt).

Die Ursache für das Ausbleiben einer weiteren Stabilisierung von **250** und **251** gegenüber **242** bzw. **234** konnte in ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien für **250** und **251** geklärt werden. Die Hydrolyse von **250** erwies sich als mangelnd selektiv, da 34 % des unerwünschten Phenylphosphatdiesters als Anteil am finalen Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden konnten, während **242** nur zu 8 % den unerwünschten Hydrolyseweg beschritt (vergl. auch Kapitel 2.2). Durch das massive Hinzutreten des unerwünschten Spaltungsweges, welches auf die deutliche Stabilisierung des intermediär gebildeten Benzyl-Kations durch die zweite Alkylgruppe zurückzuführen war, wurde offensichtlich der stabilisierende Effekt der zweiten *tert*-Butylgruppe kompensiert.

Die *tert*-Butyl-substituierten Pronucleotide wurden im Cholinesterase-Assay auf ihre Inhibitor-Aktivität gegenüber BChE getestet. Den Ergebnissen für die *tert*-Butyl-substituierten d4TMPs **242,243,250** seien hier nochmals die Werte für einige bereits diskutierte Verbindungen gegenübergestellt (Abb. 187).

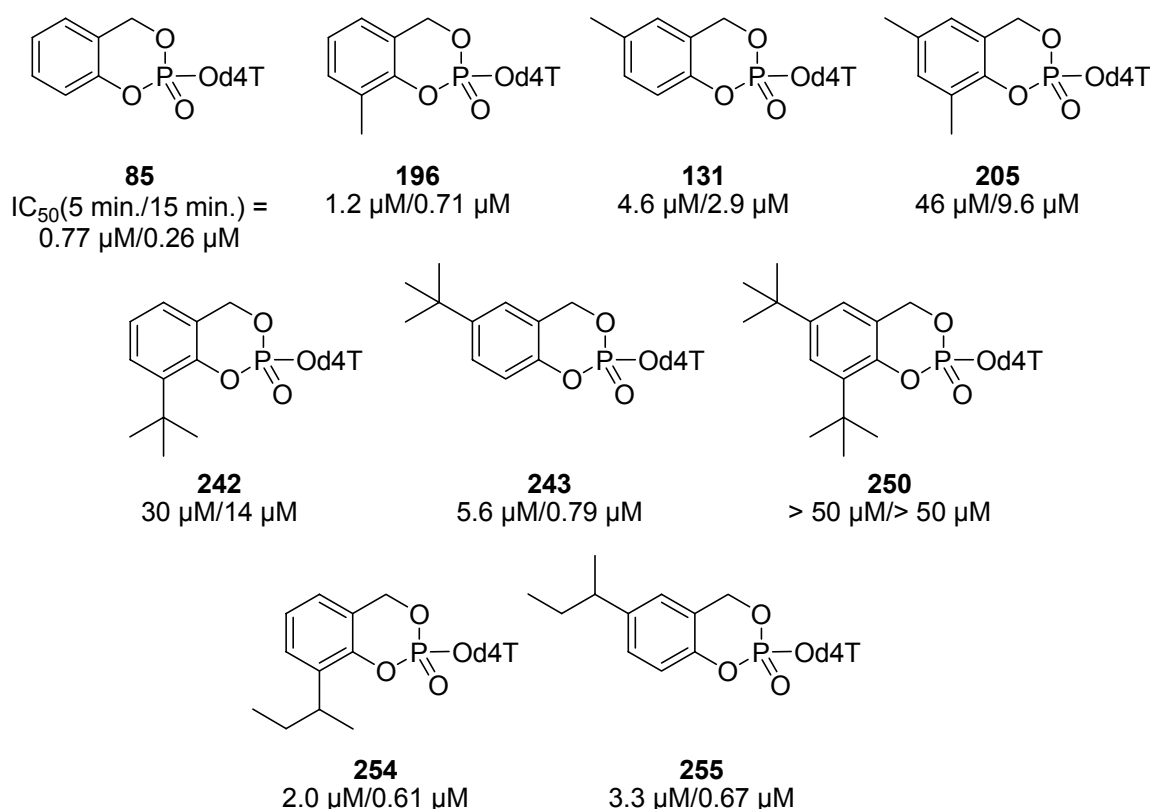


Abb. 187 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **242,243,250** und **254,255** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Während der Übergang vom Methyl- zum *tert*-Butyl-Substituenten in der 5-Position des *cycloSal*-Systems kaum eine Veränderung der Inhibitor-Aktivität brachte (**243** versus **131**), bewirkte der sterisch anspruchsvollere Substituent in der 3-Position einen deutlichen Effekt, da **242** im Gegensatz zu **196** ein deutlich schwächerer Inhibitor als der unsubstituierte Prototyp **85** war. Auch hier erwies sich die Disubstitution als entscheidend, da **250** im beobachteten Konzentrationsbereich keine inhibitorische Potenz gegenüber BChE mehr aufwies, während **205** nur ein deutlich schwächerer Inhibitor als **85** war. Auffällig war, daß die Abnahme der Inhibitor-Aktivität von **242** verglichen mit **196** entscheidend vom Verzweigungsgrad des Substituenten abhing, da sowohl 3-*sek*-Butyl-*cycloSal*-d4TMP **254** als auch das entsprechende 5-substituierte Isomer **255** (beide Verbindungen stammten aus Vorarbeiten^[146]) ähnliche Inhibitorien wie die einfachen Methyl-Verbindungen **196,131** zeigten.

Unklar bleibt, ob der gefundene Effekt wirklich auf einer sterischen Repulsion im aktiven Zentrum des Enzyms beruhte oder aber die *tert*-Butyl-substituierten Derivate **242** und **250** durch sterische Abschirmung der Phosphat-Einheit so unreaktiv waren, daß sie kaum noch als irreversible Inhibitoren fungieren konnten. Die Abfolge der Hydrolyse-Halbwertszeiten deutete auf letztere Erklärung hin, allerdings würde dieser Indikator der Elektrophilie alleine nicht den Unterschied in der inhibitorischen Potenz von **242** und **250** erklären können. Es ist also anzunehmen, daß beide Faktoren (sterische und elektronische Effekte) auch hier eine Rolle spielten (vergl. hierzu auch Kapitel 4.6.5).

Für die *cycloSal*-BVDUMPs war die Abfolge der Inhibitor-Aktivität ähnlich, allerdings waren die IC₅₀-Werte generell höher als im Falle der d4T-Derivate (Abb. 188, S. 183). Bereits das 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP **183** besaß kaum inhibitorische Aktivität, welche nicht nur für das 3,5-Dimethyl-Derivat **256**, sondern auch beim Übergang zum sterisch anspruchsvolleren 3-*tert*-Butyl-Substituenten (Verbindung **234**) vollständig verloren ging. Auch hier war der Effekt für das 5-substituierte Regioisomer **244** geringer. Die Disubstitution (Verbindung **251**) konnte in diesem Fall gegenüber **234** keinen meßbaren Vorteil mehr bringen.

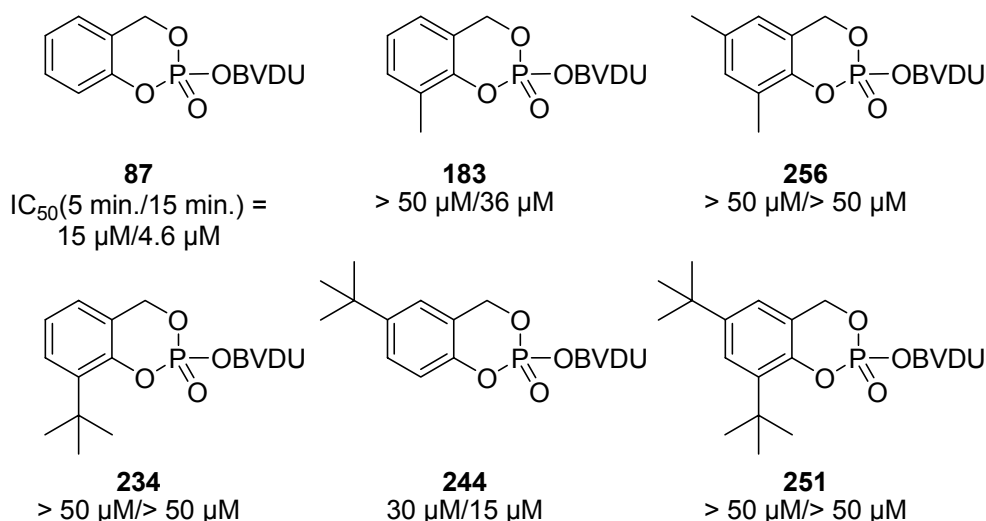


Abb. 188 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-BVDUMPs **234,244,251** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Der Effekt des 3-*tert*-Butyl-Substituenten konnte prinzipiell auch für die *cycloSal*-ddAMPs bestätigt werden. Diese Pronucleotide lagen aus Vorarbeiten vor^[146] und wurden ebenfalls im BChE-Assay untersucht. Auch für diese Derivate war die 3-Methyl-Verbindung **179** ein ähnlich starker Inhibitor wie der unsubstituierte Prototyp **257**, während die 3,5-Dimethyl-Verbindung **258** eine deutlich geringere inhibitorische Potenz aufwies. Das 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-ddAMP **259** zeigte verglichen mit **257** eine etwa achtfach geringere Inhibitor-Aktivität (Abb. 189). Der Effekt war damit zwar deutlich geringer als für die *cycloSal*-d4TMPs (**242** inhibierte BChE etwa 40- bis 50-fach schwächer als die unsubstituierte Verbindung **85**), aber immer noch vorhanden.

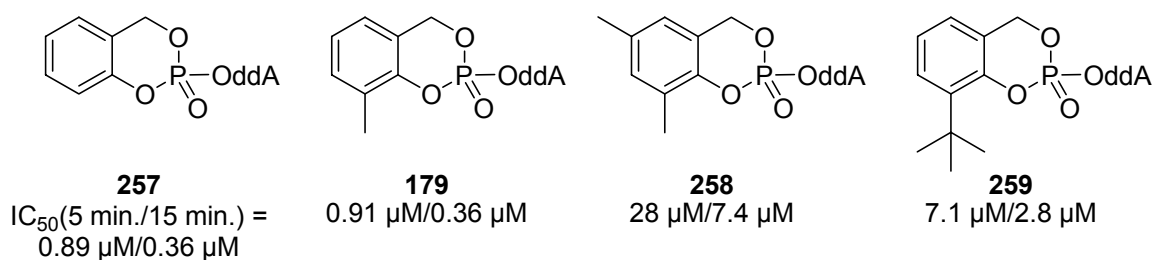


Abb. 189 Inhibitor-Aktivitäten einiger *cycloSal*-ddAMPs gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Die *tert*-Butyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs wurden im Rahmen der Kooperation mit der Universität Leuven antiviralen *in vitro*-Tests unterzogen. Während die Mono-*tert*-butyl-substituierten Derivate **242,243** in Wildtyp-CEM-Zellen ähnliche Aktivitäten gegen HIV-1 und HIV-2 aufwiesen wie d4T **4**, zeigte 3,5-Bis-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **250** hier bereits einen leichten Aktivitätsverlust. In TK-defizienten CEM-Zellen

verloren alle drei Verbindungen etwas an anti-HIV-2-Aktivität im Vergleich zu den Tests in CEM/0-Zellen. Dies wies auf einen ineffizienten TK-Bypass hin. Für **242** läßt sich dies möglicherweise auf die zu hohe Hydrolysestabilität zurückführen, die eine selektiv intrazelluläre Freisetzung von d4TMP durch das Ermöglichen der Rückdiffusion durch die Zellmembran verhinderte, während **243** eventuell nicht stabil genug für eine effiziente Membranpenetration war. Im Falle von **250** führte offensichtlich die Kombination aus zu hoher Hydrolysestabilität und unselektiver Hydrolyse zu der generellen Verschlechterung der anti-HIV-Aktivitäten. Die Cytotoxizitäten der drei Prodrugs unterschieden sich nicht signifikant von der von d4T **4** (Tab. 14).

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
		CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
3- <i>t</i> -Bu 242	0.28 ± 0.18	0.26 ± 0.01	1.10 ± 0.14	68.1 ± 7.7
5- <i>t</i> -Bu 243	0.19 ± 0.09	0.28 ± 0.18	1.00 ± 0.28	53.9 ± 3.9
3,5-Bis- <i>t</i> -Bu 250	1.10 ± 0.14	1.20 ± 0.00	2.00 ± 0.00	27.0 ± 7.4
d4T 4	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02	15.0 ± 7.1	55.8 ± 24.2

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 14 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der *tert*-Butyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **242,243,250** und von d4T **4**

Insgesamt läßt sich also festhalten, daß die Einführung sterisch anspruchsvoller Alkyl-Substituenten in die *cycloSal*-Einheit sehr wohl einen Weg zur Vermeidung der unerwünschten BChE-Inhibition darzustellen schien. Es ergab sich die Frage, ob im Falle von 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-d4TMP **242** ein noch größerer Substituent in der 3-Position die BChE-Inhibition vollständig unterdrücken könnte, ohne dabei zu den nachteiligen Hydrolyseeigenschaften der 3,5-Bis-*tert*-butyl-Verbindung **250** zu führen. Es sollten daher exemplarisch die Verbindungen 3-*neo*-Pentyl-*cycloSal*-d4TMP **260** und 3-Cyclohexyl-(Cy)-*cycloSal*-d4TMP **261** synthetisiert und untersucht werden (Abb. 190, S. 185).

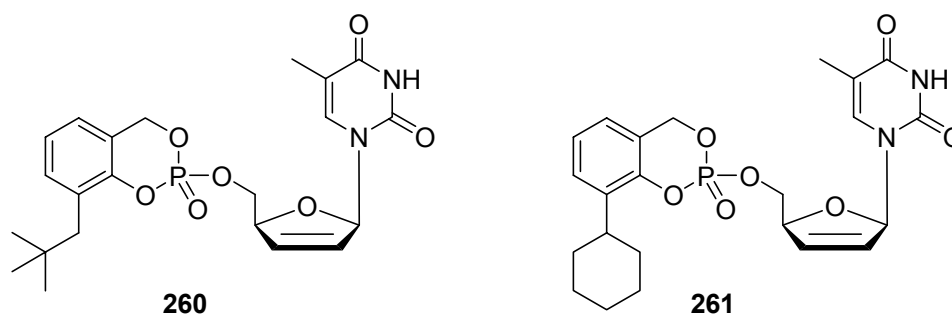


Abb. 190 Die Zielverbindungen **260,261**

Für die Synthese der für die Darstellung von **260** und **261** erforderlichen Salicylalkohol-Derivate konnte erneut das neue Synthesekonzept für Salicylalkohole (vergl. Kapitel **4.3**) Anwendung finden. Die Einführung der Alkylgruppen in der 3-Position gelang durch Grignard-Kreuzkupplung von 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** zu den Verbindungen **262** und **263** (Abb. 191).

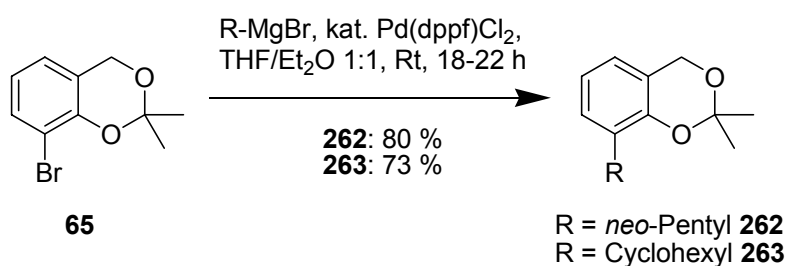


Abb. 191 Synthese der 3-Alkylsalicylalkoholisopropylidenacetale **262,263**

Zunächst wurde die Darstellung von 3-Cyclohexylsalicylalkoholisopropylidenacetal **263** versucht. Aus Cyclohexylbromid wurde das Grignard-Reagenz dargestellt und anschließend zu einer Lösung von **65** und des Katalysators (1,1'-(Bis-diphenylphosphino)-ferrocenyl)-palladium(II)-chlorid (Pd(dppf)Cl_2) gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, aufgearbeitet und das Rohprodukt chromatographisch gereinigt. Wurde die Reaktion mit 1.1 Äquivalenten Cyclohexylbromid und in THF als Lösungsmittel durchgeführt, so ergab sich ein Gemisch aus 21 % des Produktes **263** und 79 % des Eduktes **65**, welches sich chromatographisch nicht trennen ließ. Wurde das Grignard-Reagenz hingegen in Diethylether dargestellt und anschließend zu der THF-Lösung von **65** und dem Katalysator gegeben, so daß für die Kreuzkupplung das Solvens-Gemisch THF/Diethylether 1 : 1 v/v vorlag, so konnte das Produktverhältnis auf 60 % **263** zu 40 % **65** verbessert werden. Im Gegensatz zu der Reaktion in reinem THF konnte das Ausfallen eines farblosen

Niederschlags bei der Kreuzkupplung beobachtet werden, bei dem es sich vermutlich um Magnesiumbromid handelte. Dieses Ausfallen eines Nebenproduktes könnte die entscheidende Triebkraft zur Verbesserung des Umsatzes gewesen sein. Durch Verdoppelung der eingesetzten Menge Cyclohexylbromid auf 2.2 Äquivalente konnte die Reaktion quantitativ erfolgen, so daß das beschriebene Reinigungsproblem ausblieb und das Produkt **263** in 79 % Ausbeute isoliert werden konnte. Die Durchführung der Reaktion im größeren Maßstab brachte dann die oben angegebene Ausbeute von 73 %.

Die für die Darstellung von **263** gefundenen Synthesebedingungen wurden auf die Synthese des *neo*-Pentyl-Derivates **262** übertragen. Die Durchführung der Reaktion mit 2.2 Äquivalenten *neo*-Pentylbromid führte jedoch zu einem Gemisch aus 70 % **262** und 30 % des Eduktes **65**, welches sich ebenfalls als chromatographisch nicht trennbar erwies. Hierzu ist anzumerken, daß die Darstellung des Grignard-Reagenzes aus *neo*-Pentylbromid ausgesprochen schwierig war. Es ist also durchaus möglich, daß diese Umsetzung so unbefriedigend verlief, da zu wenig Äquivalente der Grignard-Verbindung für die Kreuzkupplung gebildet wurden. Durch erneute Erhöhung der Alkylbromid-Menge auf 4.4 Äquivalente konnte dieses Problem überwunden, die Reaktion quantitativ geführt und das Produkt **262** in 82 % Ausbeute isoliert werden. Das „Upscaling“ der Reaktion führte dann zu der oben angegebenen Ausbeute von 80 %.

Für die Entschützung der Acetale **262,263** wurden sowohl die TFA- als auch die Ionentauscher-Methode erprobt (vergl. Kapitel **4.3.3**). Während die Entschützung mit TFA zur Isolierung von 3-*neo*-Pentylsalicylalkohol **264** bzw. 3-Cyclohexylsalicylalkohol **265** in mäßigen Ausbeuten (58 % bzw. 46 %) führte, lieferten die Reaktionen mit saurem Ionentauscher ausschließlich bzw. überwiegend die methylierten Nebenprodukte **266** bzw. **267** (Abb. 192, S. 187). Es ist anzunehmen, daß die Bildung von **266** und **267** nach einem S_N1-artigen Mechanismus verlief, indem nach Protonierung der benzyliischen Hydroxylgruppe des freigesetzten Salicylalkohol-Derivates durch die saure Spezies (TFA bzw. Ionentauscher) Wasser austrat und ein Benzyl-Kation gebildet wurde, welches anschließend mit Methanol reagierte. Offensichtlich begünstigten die elektronenliefernden Alkyl-Substituenten in der 3-Position die Bildung des Benzyl-Kations und damit die Nebenreaktion. Dies mag prinzipiell auch die mäßigen Ausbeuten bei den TFA-Entschützungen erklären, wobei bei diesen Umsetzungen nicht versucht wurde, **266** und **267** zu isolieren. Im Falle der

Verwendung des stark sauren Ionentauschers wurde die Veretherung als Folgereaktion der Acetalspaltung so schnell, daß die Isolierung des Salicylalkohols schwierig bzw. unmöglich wurde.

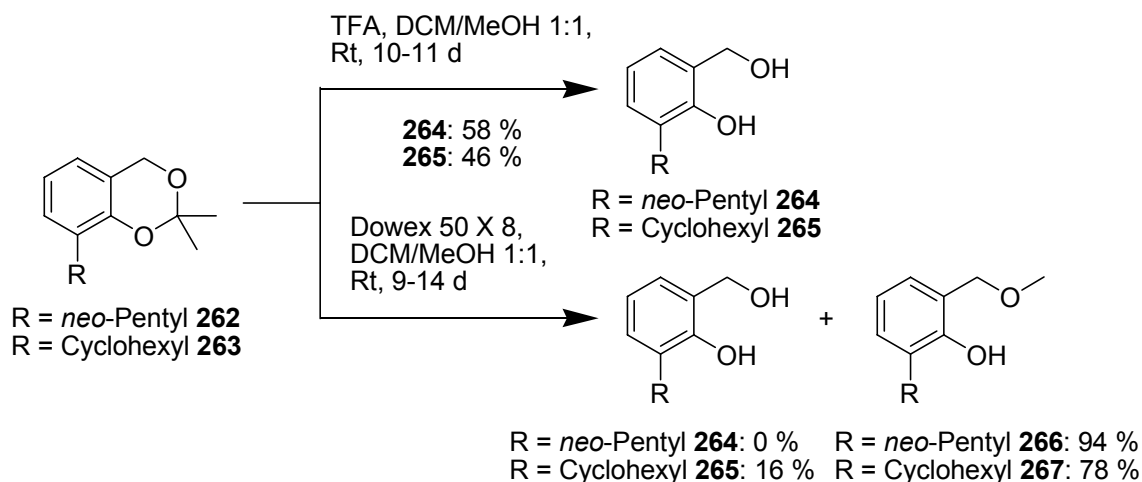


Abb. 192 Synthese der 3-Alkylsalicylalkohole **264,265**

Nach der Synthese der Salicylalkohol-Derivate **264,265** erfolgte die weitere Umsetzung zu den Saligenylchlorphosphiten **268,269** und schließlich zu den *cycloSal*-d4TMPs **260,261** unter den etablierten Bedingungen (Abb. 193). Die Ausbeuten der Nucleotid-Synthesen waren mit 25 % bzw. 29 % mäßig. Die Möglichkeit einer sterischen Blockade des Chlorphosphits durch die voluminösen 3-Substituenten als Ursache für die niedrigen Ausbeuten scheint jedoch angesichts der guten Ausbeuten bei der Darstellung der 3-*tert*-Butyl-substituierten *cycloSal*-NMPs eher unwahrscheinlich.

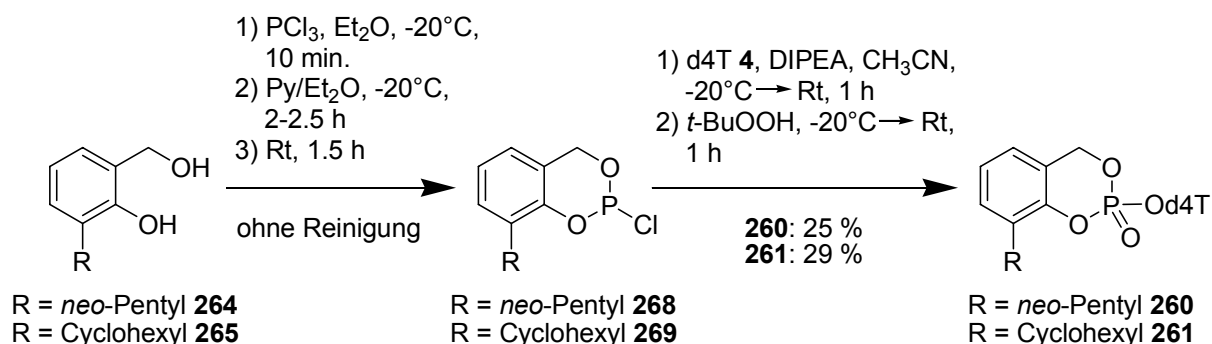


Abb. 193 Synthese der 3-Alkyl-*cycloSal*-d4TMPs **260,261**

Die Hydrolyse-Halbwertszeiten der neu synthetisierten *cycloSal*-d4TMPs **260,261** in Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) wurden mit den Werten für 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **196** und 3-*tert*-Butyl-*cycloSal*-d4TMP **242** verglichen (Abb. 194).

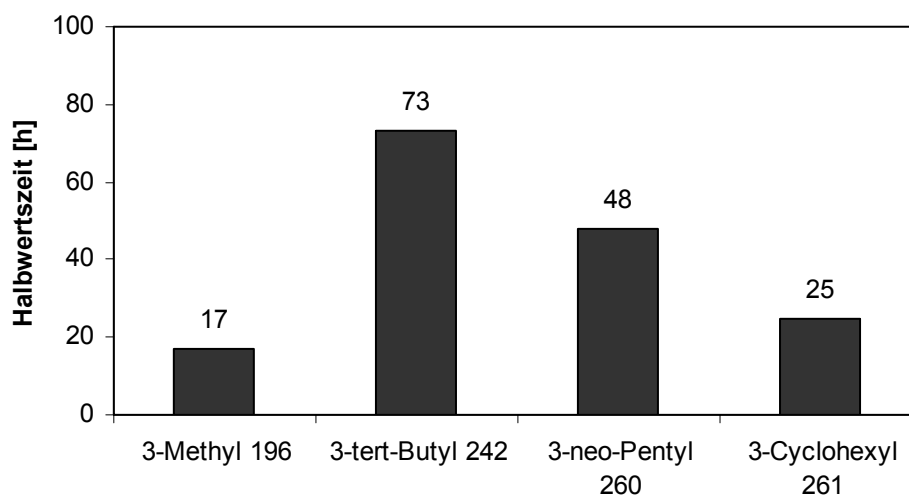


Abb. 194 Hydrolyse-Halbwertszeiten der Alkyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **260,261** und der Vergleichsverbindungen **196,242** in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C

Die Pronucleotide **260** und **261** erwiesen sich als stabiler als die 3-Methyl-Verbindung **196**, jedoch auch als labiler im Vergleich zu dem 3-*tert*-Butyl-Derivat **242**. Es war offensichtlich, daß die Hydrolysestabilität mit der möglichen sterischen Abschirmung des Phosphat-Zentrums durch den 3-Substituenten der *cycloSal*-Einheit korrelierte. Die Verbindung **260** besaß ebenfalls eine *tert*-Butyl-Substruktur, welche allerdings im Gegensatz zu **242** noch durch einen flexiblen Methylen-Linker mit dem Aromaten verbunden war. Diese größere konformationelle Flexibilität resultierte in einer geringeren Hydrolysestabilität. Der Cyclohexyl-Rest in **261** wies nicht nur einen geringeren Verzweigungsgrad als eine *tert*-Butyl-Gruppe auf, ihm kam auch eine nicht unwesentliche konformationelle Dynamik zu, und entsprechend war **261** labiler als **260**.

In ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien in Imidazol/Salzsäure-Puffer (pH 7.3) konnte festgestellt werden, daß die Pronucleotide **260** und **261** zu etwa 20 % den unerwünschten Phenylphosphatdiester als Hydrolyseprodukt bildeten (vergl. Kapitel **2.2**), was deutlich mehr als bei der 3-Methyl-Verbindung **196** (6 %) war.

In der Abbildung 195 (S. 189) sind die Ergebnisse des BChE-Assays für **260** und **261** im Vergleich zu den Referenzverbindungen **196** und **242** sowie zum unsubstituierten Prototypen **85** dargestellt.

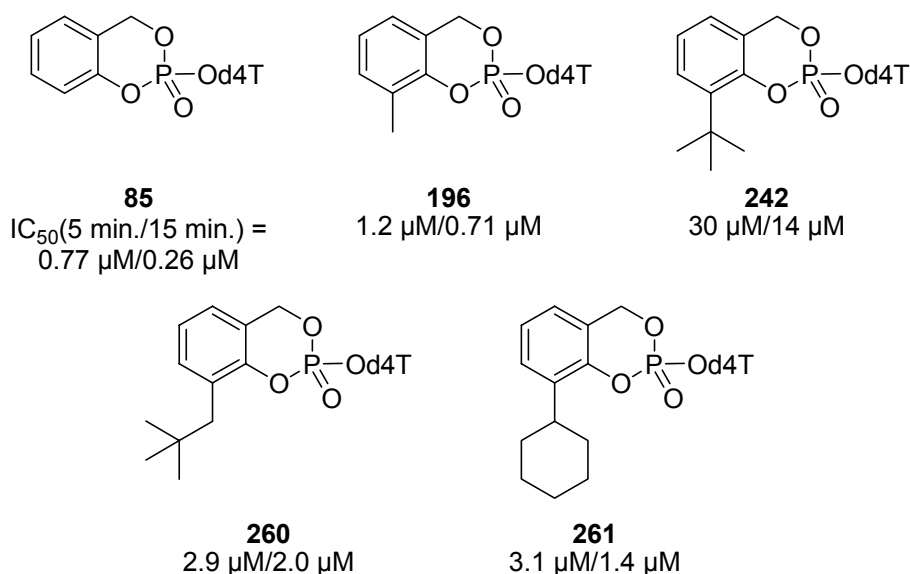


Abb. 195 Inhibitor-Aktivitäten der *cycloSal*-d4TMPs **260,261** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Im Gegensatz zu dem 3-*tert*-Butyl-Derivat **242** besaßen sowohl **260** als auch **261** Inhibitor-Aktivitäten, die nur minimal geringer waren als die inhibitorische Potenz der 3-Methyl-Verbindung **196**, so daß eine deutliche Abschwächung des Inhibitor-Effektes gegenüber dem unsubstituierten Prototyp **85** für diese Pronucleotide nicht festgestellt werden konnte. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß die Sonderrolle von **242** vor allem auf eine effiziente sterische Abschirmung der Phosphat-Einheit und daher auf eine verminderte Reaktivität dieser Verbindung zurückzuführen ist. Für den Fall, daß sterische Repulsion im aktiven Zentrum des Enzyms hierfür eine signifikante Rolle spielte, hätte man für **260** und **261** IC_{50} -Werte zumindest in der Größenordnung der Daten von **242** erwartet.

Die neu synthetisierten *cycloSal*-d4TMPs **260** und **261** wurden im Rahmen der Kooperation mit der Universität Leuven antiviralen *in vitro*-Tests unterzogen (Tab. 15, S. 190). Die antiviralen Aktivitäten von **260** und **261** gegen HIV-1 und HIV-2 in Wildtyp-CEM-Zellen stimmten im Rahmen der Fehlergrenzen des Tests mit denen von d4T **4** überein. Bemerkenswert war der volle Erhalt der anti-HIV-2-Aktivität beider Verbindungen beim Übergang von den CEM/0- zu den TK-defizienten Zellen. Trotz des verhältnismäßig hohen Anteils an unerwünschter Hydrolyse bewirkten also sowohl **260** als auch **261** einen effizienten TK-Bypass. Allerdings waren die Cytotoxizitäten beider Prodrugs in der vorliegenden Testreihe auch deutlich höher als die von d4T **4**.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	<u>CEM/0</u>		<u>CEM/TK</u>	<u>CEM/0</u>
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
3- <i>neo</i> -Pentyl 260	0.33 ± 0.11	0.90 ± 0.42	0.60 ± 0.28	81.6 ± 1.0
3-Cyclohexyl 261	0.31 ± 0.13	0.40 ± 0.00	0.33 ± 0.11	27.4 ± 8.1
3-Methyl 196	0.10 ± 0.07	0.19 ± 0.05	0.10 ± 0.00	31.6 ± 0.0
3- <i>tert</i> -Butyl 242	0.28 ± 0.18	0.26 ± 0.01	1.10 ± 0.14	68.1 ± 7.7
d4T 4	0.37 ± 0.24	0.35 ± 0.09	8.0 ± 3.5	> 250

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 15 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der 3-Alkyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **260,261** und der Vergleichsverbindungen **196,242** und d4T **4**

Ein Vergleich mit den Referenzverbindungen **196** und **242** scheint zu belegen, daß zu hohe Hydrolysestabilitäten nachteilig für die antivirale Aktivität sein können. Die sehr stabile 3-*tert*-Butyl-Verbindung **242** verlor in den Tests in TK-defizienten Zellen leicht an Aktivität, während das 3-Methyl-Derivat **196**, das labiler als **260** und **261** war, die besten antiviralen Daten aufwies.

4.6.7 Konzeption, Synthese und Anwendung einer optimierten *cycloSal*-Maske

Da die 3-*neo*-Pentyl- bzw. 3-Cyclohexyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **260** bzw. **261** zwar gute antivirale Aktivitäten, aber auch noch deutliche inhibitorische Eigenschaften gegenüber humaner BChE besaßen, mußte ein anderer Weg gefunden werden, eine *cycloSal*-Maske zu entwickeln, die zur Unterdrückung der unerwünschten BChE-Inhibition führte. Die einzige *cycloSal*-Maske, die diese Anforderung sicher erfüllte, war die 3,5-Bis-*tert*-butyl-substituierte Maske, die jedoch Pronucleotide mit unselektiver Hydrolyse und daher mit schlechten antiviralen Aktivitäten lieferte. Faßt man diese Maske als Leitstruktur auf, so galt es, einen Weg zu finden, die Eigenschaften der Maske zu optimieren. Dies geschah durch Einführung eines zusätzlichen Fluor-Substituenten in der 6-Position des *cycloSal*-Systems, so daß es sich bei den fraglichen Zielverbindungen um 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-d4TMP **270** bzw. -BVDUMP **271** handelte (Abb. 196, S. 191).

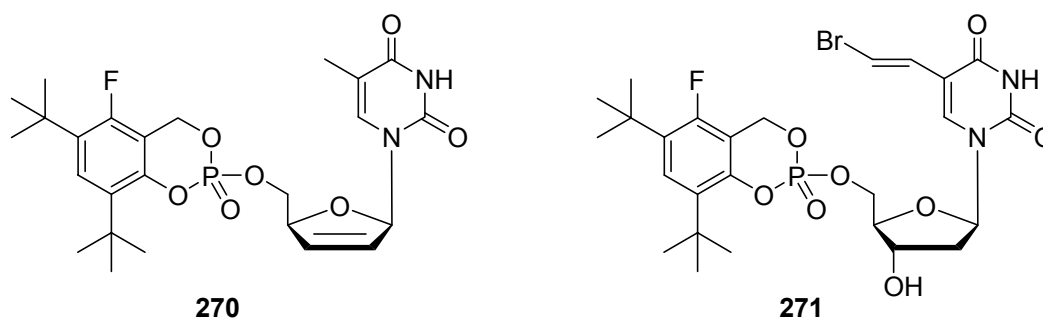


Abb. 196 Die Zielverbindungen **270,271**

Der zusätzliche Fluor-Substituent in der 6-Position der Maske sollte

- aufgrund seines elektronenziehenden Effektes ein Absinken der Hydrolyse-Halbwertszeiten bewirken und damit die zu hohen Hydrolysestabilitäten der 3,5-Bis-*tert*-butyl-Derivate **250,251** kompensieren
- durch die Nachbarschaft zur Benzylester-Funktion den spontanen C-O-Bindungsbruch in der Benzyl-Position durch Destabilisierung des resultierenden Benzyl-Kations verhindern und somit die Hydrolyse der Pronucleotide selektiv auf den erwünschten Weg führen (ohne Bildung des Phenylphosphatdiesters). Dieses Prinzip war bereits von den Benzyl-funktionalisierten *cycloSal*-Nucleotiden mit 6-Chlor-Substituenten bekannt und bestätigt worden^[125]
- als Resultat der aufgeführten Hydrolyseeigenschaften zu guten antiviralen Aktivitäten führen
- kaum Auswirkungen auf das Inhibitor-Verhalten gegenüber humaner BChE haben, so daß **270,271** wie zuvor **250,251** Nicht-Inhibitoren dieses Enzyms sein sollten.

Für die Synthese von **270** und **271** wurde zunächst das kommerziell verfügbare *m*-Fluorphenol in einer Friedel-Crafts-artigen Alkylierung mit Isobuten-Gas und konzentrierter Schwefelsäure in 70 % Ausbeute zum 2,4-Bis-*tert*-butyl-5-fluorphenol **272** umgesetzt. Diese Reaktion war bereits von Rickborn et al. beschrieben worden^[149], deren gewünschte Zielverbindung allerdings das 2,4,6-Tris-*tert*-butyl-5-fluorphenol war und die **272** in einer Ausbeute von lediglich 32 % als Nebenprodukt isolieren konnten. Diese Ausbeute konnte auf den oben angegebenen Wert gesteigert werden, indem die Reaktionszeit verkürzt wurde, so daß der dritte Alkylierungsschritt in der sterisch gehinderten 6-Position des *m*-Fluorphenols

weitgehend ausblieb. Für die anschließende Hydroxymethylierung verblieb als einzige reaktive Position eben diese 6-Position des Phenols, so daß kein Problem bezüglich der Regioselektivität vorlag und 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsalicylalkohol **273** in 72 % Ausbeute erhalten werden konnte. Die weiteren Umsetzungen, zunächst zum 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsaligenylchlorphosphit **274** und anschließend zu den *cycloSal*-NMPs **270,271**, erfolgten unter Standardbedingungen, wobei die Ausbeuten der Nucleotid-Synthesen (58 % für **270**, 41 % für **271**) für diese Reaktionen erstaunlich gut waren (Abb. 197).

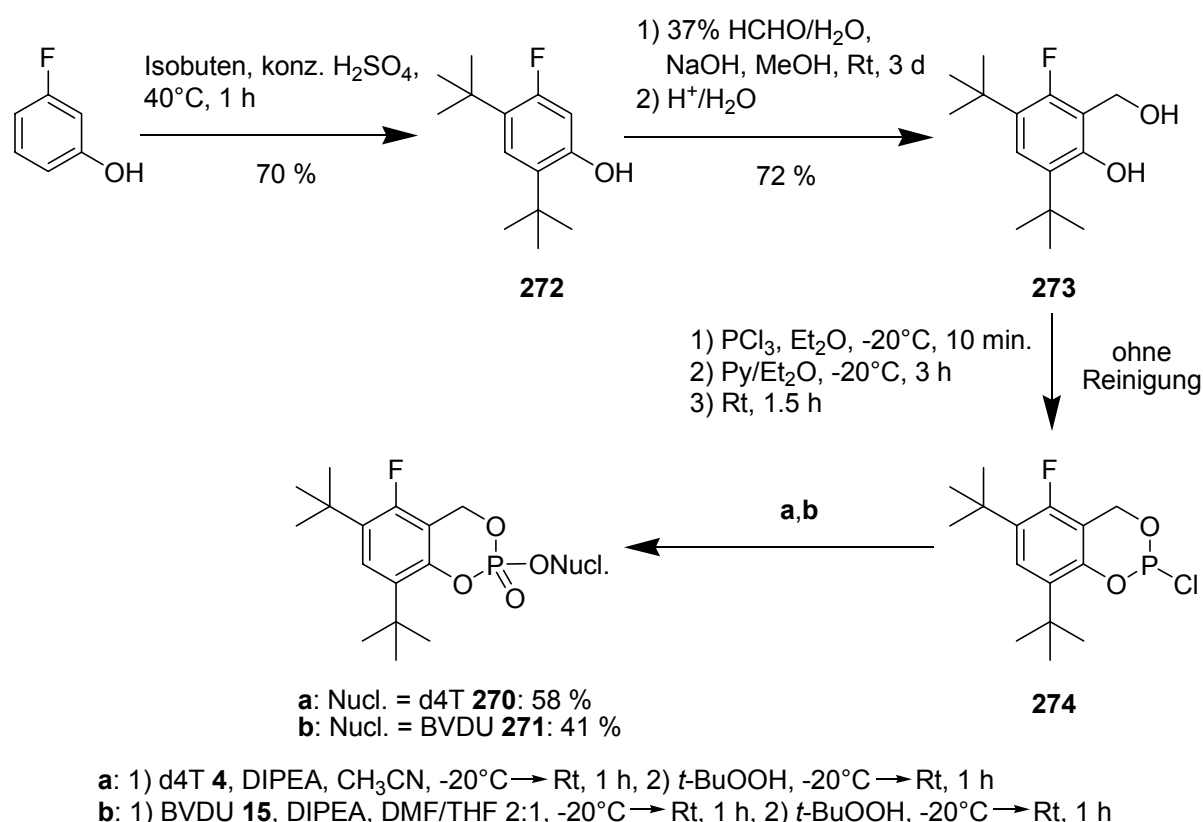


Abb. 197 Synthese der 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-NMPs **270,271**

Zunächst sollen die Hydrolyseeigenschaften und die BChE-Inhibitor-Aktivität von 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-d4TMP **270** im Vergleich zur Leitstruktur 3,5-Bis-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **250** diskutiert werden (Tab. 16, S. 193). In der Tat konnten die bezüglich der Eigenschaften von **270** getroffenen Vorhersagen weitgehend bestätigt werden. Die Hydrolyse-Halbwertszeit sank verglichen mit **250** drastisch auf einen Wert, der der 5-Methyl-Verbindung **131** entsprach. Auch erfolgte die Hydrolyse im Gegensatz zu **250** praktisch selektiv. Daß überhaupt die Entstehung des unerwünschten Phenylphosphatdiesters (zu 3 %) beobachtet werden konnte, liegt

vermutlich daran, daß wegen der hohen Lipophilie der Verbindung **270** die ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien mit einem geringeren Puffer-Anteil durchgeführt werden mußten, um ein Ausfallen des Materials zu vermeiden. Dies verlangsamte die Hydrolyse auf dem erwünschten Weg beträchtlich, so daß der $\text{S}_{\text{N}}1$ -artigen Benzylester-Spaltung als Konkurrenzreaktion wahrscheinlich eine größere Rolle zukam.

Verbindung	$t_{1/2}^{\text{a}}$ [h]	Anteil PPD ^b [%]	$\text{IC}_{50}(5')^{\text{c}}$ [μM]	$\text{IC}_{50}(15')^{\text{d}}$ [μM]
3,5-Bis- <i>t</i> -Bu 250	73	34	> 50	> 50
3,5-Bis- <i>t</i> -Bu-6-F 270	6.2	3	48	29

^aHydrolyse-Halbwertszeit in Phosphatpuffer, pH 7.3, 37°C; ^bAnteil des unerwünschten Phenylphosphatdiesters am finalen Hydrolyseprodukt, bestimmt in ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien in Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7.3; ^c IC_{50} -Wert in μM gegenüber humaner BChE (Serum) bei 5 min. Reaktionszeit; ^d IC_{50} -Wert in μM gegenüber humaner BChE (Serum) bei 15 min. Reaktionszeit

Tab. 16 Vergleichende Übersicht der Eigenschaften des optimierten *cycloSal*-d4TMPs **270** und der Leitstruktur **250**

Wenn **270** auch kein Nicht-Inhibitor der BChE wie **250** war, so läßt sich doch eine im Vergleich zu den meisten *cycloSal*-d4TMPs massiv verminderte inhibitorische Potenz feststellen. Die Zunahme an Inhibitor-Aktivität verglichen mit **250** hat ihre Ursache vermutlich in der höheren Elektrophilie von **270**, was wieder einmal das Wechselspiel sterischer und reaktivitätsbedingter Effekte bei der BChE-Inhibition bestätigt (vergl. Kapitel 4.6.5).

Für das 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-BVDUMP **271** ist anzumerken, daß dieses Pronucleotid so außerordentlich lipophil war, daß bei der Zugabe von wäßrigem Puffer bei den Hydrolysekinetiken ein Ausfallen der Substanz zu beobachten war, so daß sich keine Hydrolyse-Halbwertszeit ermitteln ließ. Die Durchführung der ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien war jedoch mit deutlich vermindertem Puffer-Anteil möglich, und die Entstehung des unerwünschten Phenylphosphatdiesters war wie schon bei **270** zu lediglich 3 % zu beobachten. Wie erwartet war **271** ein Nicht-Inhibitor der humanen BChE ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$ für 5 und 15 min. Reaktionszeit).

Für 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-d4TMP **270** liegen Ergebnisse aus antiviralen *in vitro*-Tests vor (Tab. 17, S. 194). In der Tat führte die Verbesserung der Hydrolyse-eigenschaften für **270** im Vergleich zur Leitstruktur **250** auch zu einer Verbesserung der antiviralen Aktivitäten bereits in den Wildtyp-CEM-Zellen. Besonders überzeugend war jedoch der volle Erhalt der anti-HIV-2-Aktivität von **270** beim Übergang von

CEM/0- zu TK-defizienten CEM-Zellen, der auf einen effizienten TK-Bypass hinwies. Dieses Aktivitätsprofil ging mit einer verglichen mit d4T **4** nur moderat gestiegenen Cytotoxizität einher.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	HIV-1	CEM/0	CEM/TK	CEM/0
		HIV-2	HIV-2	
3,5-Bis- <i>t</i> -Bu-6-F 270	0.16 ± 0.06	0.33 ± 0.11	0.60 ± 0.23	41.1 ± 0.8
3,5-Bis- <i>t</i> -Bu 250	1.10 ± 0.14	1.20 ± 0.00	2.00 ± 0.00	27.0 ± 7.4
d4T 4	0.19 ± 0.13	0.48 ± 0.32	7.5 ± 6.1	112 ± 15

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; ^b50% cytotoxische Konzentration

Tab. 17 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten des optimierten *cycloSal*-d4TMPs **270** und der Vergleichsverbindungen **250** und d4T **4**

Insgesamt läßt sich also festhalten, daß mit 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-d4TMP **270** erstmals ein *cycloSal*-d4TMP konzipiert und synthetisiert wurde, das vier verschiedene Anforderungen vereint:

- eine hinreichende, aber nicht zu hohe Hydrolysestabilität
- eine praktisch selektiv verlaufende Hydrolyse
- als Resultat der guten Hydrolyseeigenschaften einen effizienten TK-Bypass
- deutlich verminderte Inhibitor-Aktivität gegenüber humaner BChE

Als potentieller Nachteil der Verbindung **270** ist lediglich ihre hohe Lipophilie zu nennen. Allerdings ist gegenwärtig noch unklar, ob es abgesehen von Aspekten der praktischen Handhabung einen für Pronucleotide optimalen Lipophiliebereich gibt, so daß sich hierzu keine definitive Aussage treffen läßt.

4.6.8 Interaktion von humaner BChE mit Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden)

Im Rahmen des sterischen Ansatzes zur Vermeidung der unerwünschten Inhibition der humanen BChE durch *cycloSal*-Nucleotide (vergl. Kapitel 4.6.6.2) war erarbeitet worden, daß sterische Repulsion im aktiven Zentrum des Enzyms zum Ausbleiben

des Inhibitor-Effektes führen kann. Es lag daher nahe, auch die sterisch äußerst anspruchsvollen Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** sowie die Referenzverbindung 3-*Sal-cycloSal*-d4TMP **92** und das Syntheseintermediat 3-(*Isopr-Sal*)-*cycloSal*-d4TMP **96** (vergl. Kapitel 4.4) im BChE-Assay zu untersuchen (Abb. 198).

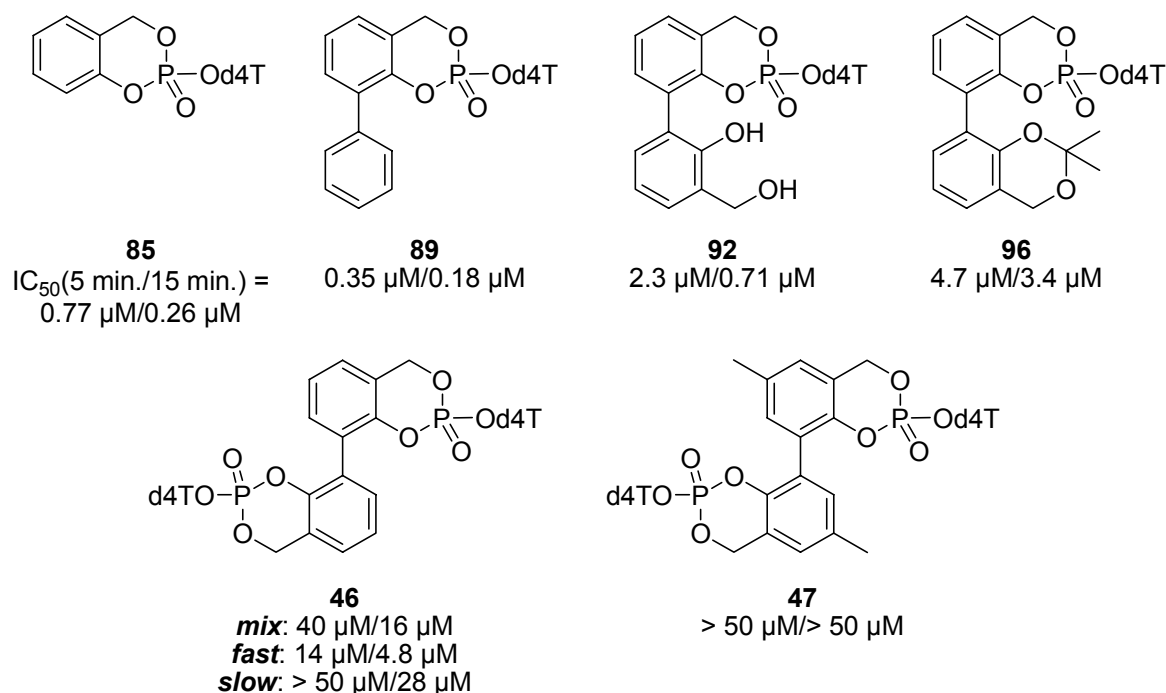


Abb. 198 Inhibitor-Aktivitäten der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47**, der Referenzverbindung **92** und des Syntheseintermediates **96** sowie einiger Vergleichsverbindungen gegenüber humaner BChE (gemessen mit humanem Serum)

Bereits die Referenzverbindung **92** mit ihren beiden freien Hydroxylgruppen in der zweiten Aryl-Einheit war ein schwächerer Inhibitor als das 3-Phenyl-Derivat **89** und auch als der unsubstituierte Prototyp **85**. Daß dieser Effekt möglicherweise auf der Gegenwart der polaren Hydroxylgruppen in einer möglichen lipophilen Tasche des aktiven Zentrums des Enzyms beruhte, ist eher unwahrscheinlich, da die Isopropyliden-geschützte Verbindung **96** mit ihrer gegenüber **92** deutlich verminderten Polarität, aber einem größeren sterischen Anspruch ein noch schwächerer Inhibitor war. Die Tatsache, daß die inhibitorischen Effekte von **92** und **96** ausschließlich von den *S_P*-konfigurierten Diastereomeren stammten, während die *R_P*-Isomere gegenüber BChE inert waren, war bereits in Kapitel 4.6.6.1 erörtert worden. Die für **92** und **96** festgestellte sterische Repulsion war jedoch offensichtlich nicht massiv, da beide Pronucleotide immer noch als recht starke BChE-Inhibitoren anzusehen waren. Dies änderte sich, wenn die zweite Aryl-Einheit eine vollständige weitere *cycloSal*-

Substruktur trug wie im Falle des Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46**. Bereits das Diastereomerengemisch von **46** war nur noch ein schwacher BChE-Inhibitor. Die Untersuchung der teilweise getrennten Diastereomere zeigte, daß beinahe die gesamte inhibitorische Potenz von **46** auf das wahrscheinlich S_P/S_P -konfigurierte Diastereomer **46 fast** zurückging, während **46 slow**, vermutlich ein Gemisch aus den R_P/R_P - und den R_P/S_P -Isomeren, kaum Inhibitor-Aktivität zeigte (zur Zuordnung der Stereochemie von **46** vergl. Kapitel 4.4.7). Auch hier fiel somit auf, daß die S_P -konfigurierte Spezies die BChE-Inhibition bewirkte. Die zusätzlichen Methylgruppen von **47** führten zum Ausbleiben der BChE-Inhibition, wobei nicht sicher festgestellt werden kann, ob dieser Effekt sterischer oder reaktivitätsbedingter Natur war. Auch ist zu bedenken, daß **47** nur als Gemisch von zwei Diastereomeren erhalten worden war (vergl. Kapitel 4.4.5). Fehlte das **46 fast** entsprechende Isomer in diesem Gemisch, so ist die niedrige Inhibitor-Aktivität von **47** nicht verwunderlich. In jedem Fall läßt sich jedoch festhalten, daß mit **47** ein weiterer Nicht-Inhibitor der humanen BChE gefunden war. Genau wie 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-d4TMP **270** besaß **47** eine befriedigende Hydrolysestabilität und hydrolysierte selektiv zu d4TMP und der Maske. Allerdings bewirkte **47** im Gegensatz zu **270** keinen effizienten TK-Bypass (vergl. Kapitel 4.4.8), so daß diese Verbindung von den vier geforderten Eigenschaften eines *cycloSal*-d4TMPs nur drei aufwies (vergl. Kapitel 4.6.7).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigte drei Wege zu einer möglichen Optimierung des *cycloSal*-Pronucleotid-Konzeptes als Wirkstoffsystem auf.

Da die Synthese von *cycloSal*-Nucleotiden generell zunächst die Darstellung von Salicylalkohol-Derivaten erfordert, wurde zunächst ein neues Synthesekonzept für derartige Verbindungen etabliert. Dieses beruhte auf der Funktionalisierung geschützter Bromsalicylalkohole. Es wurden die Isopropyliden-geschützten synthetischen Vorläufer **65-67** dargestellt, von denen **65** und **67** im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden (Abb. 199).

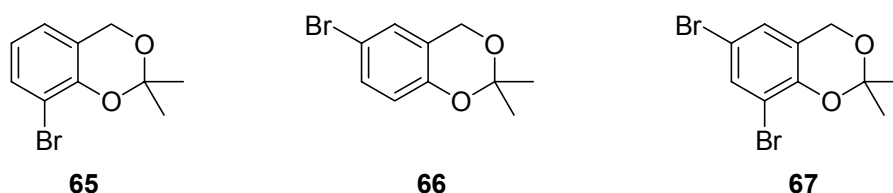


Abb. 199 Die synthetischen Vorläufer **65-67** für Salicylalkohol-Derivate

Als erster Weg zur potentiellen Optimierung des *cycloSal*-Ansatzes wurden Bis-(*cycloSal*-Nucleotide), welche Prodrugs mit einem Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1 : 2 darstellten, synthetisiert. Die Darstellung der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** erforderte die Synthese der entsprechenden Salicylalkohol-Derivate, welche in diesem Fall die Biaryle **91,95** waren. Für **91** wurden zwei Synthesewege etabliert. Der erste beruhte auf der Funktionalisierung von Biphenyl-2,2'-diol und lieferte **91** über den Aldehyd **99** in vier Stufen und einer Gesamt-Ausbeute von 30 %. Der zweite Syntheseweg verwendete den Baustein **65** und bestand aus einer Homokupplung dieses Derivates sowie der anschließenden sauren Entschützung, die sich jedoch aufgrund der Bildung von Nebenprodukten als schwierig erwies. Die Gesamt-Ausbeute lag hier bei 24 % über zwei Stufen. Für die Darstellung von **95** wurde zunächst das 5,5'-Dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **111** in zwei Stufen aus 2-Brom-4-methylanisol synthetisiert, um dann zweifach hydroxymethyliert zu werden. Die erzielte Gesamt-Ausbeute betrug in diesem Fall 25 % über drei Stufen (Abb. 200, S. 198). Zur Überführung von **91** und **95** in die Zielverbindungen **46,47** wurde auf Chlorphosphit- und die mildere Phosphoramidit-Chemie zurückgegriffen, wobei erstmals die Darstellung von Saligenyl-*N,N*-dialkylaminophosphoramiditen aus noch

verunreinigten Saligenylchlorphosphiten gelang. Die Ausbeuten für die Nucleotid-Synthesen waren durchweg schlecht. Da mit dem Chlorphosphit **93** noch das beste Ergebnis für die Darstellung von **46** erzielt wurde, wurde diese Methodik auf die Synthese von **47** übertragen (Abb. 200).

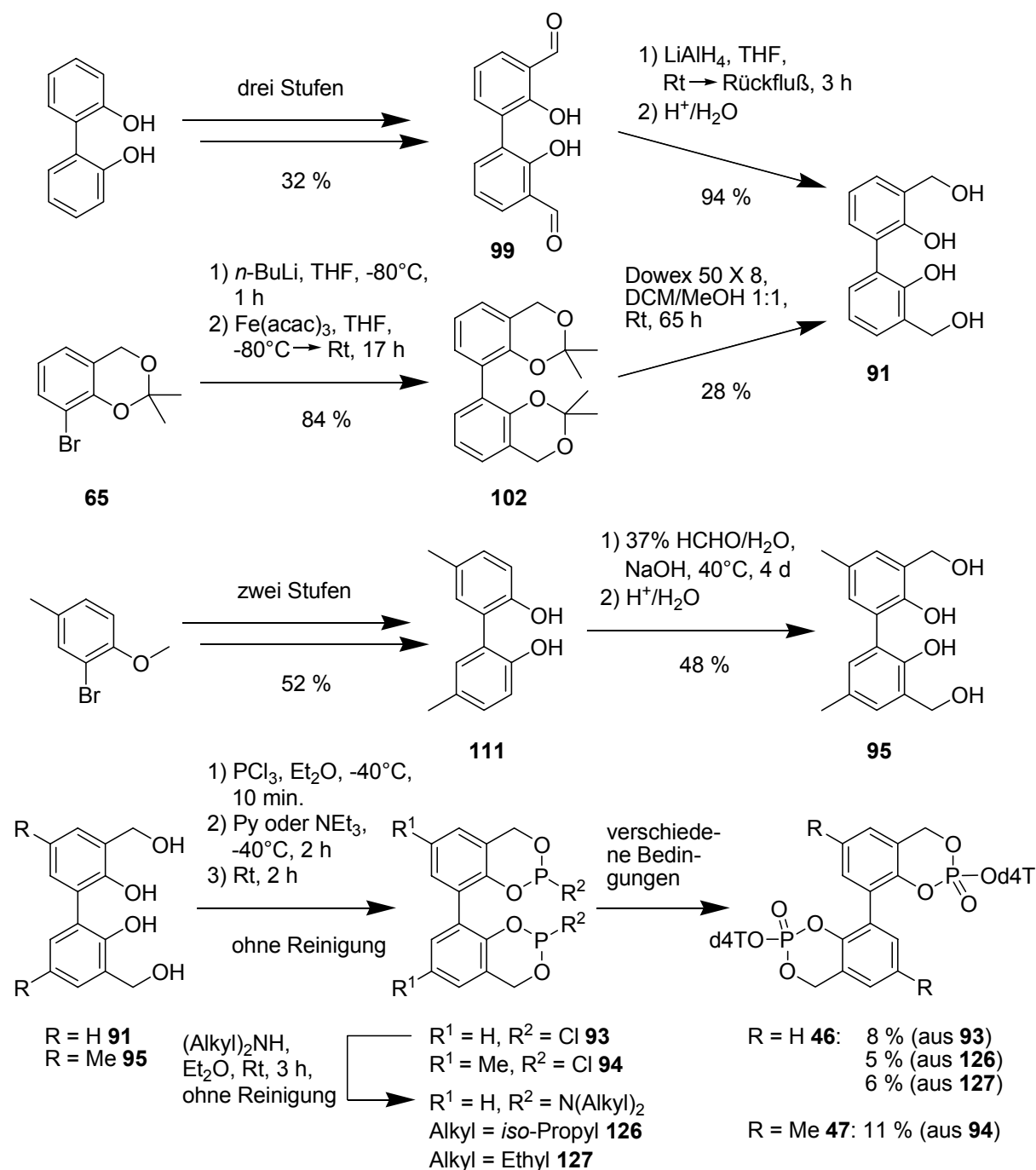


Abb. 200 Synthese der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47**

Die Verbindung **46** fiel wie erwartet als Gemisch aus drei Diastereomeren an (R_P/R_{P^-} , R_P/S_{P^-} und S_P/S_{P^-} -Konfiguration), die mittels präparativer RP-HPLC teilweise getrennt

werden konnten (**46 fast**: ein Diastereomer, **46 slow**: Gemisch aus zwei Diastereomeren). Für **47** wurde nur ein nicht trennbares Gemisch aus zwei Diastereomeren erhalten.

Für nachfolgende Hydrolysestudien wurde ein potentielles Intermediat bei der Spaltung von **46**, die Referenzverbindung 3-Sal-cycloSal-d4TMP **92**, synthetisiert. Die Darstellung dieses Pronucleotids gelang durch einfache Isopropyliden-Schützung des Biaryls **91** zum Salicylalkohol-Derivat **98** in drei Stufen (Gesamt-Ausbeute 28 %) sowie nachfolgende Anwendung der Chlorphosphit-Methodik zur Synthese der geschützten Vorstufe **96**. Diese Verbindung ließ sich mittels präparativer RP-HPLC in ihre Diastereomere (R_P - und S_P -Konfiguration) trennen, so daß die nachfolgende Entschützung zu **92** mit diastereomerenreinem Material erfolgen konnte (Abb. 201).

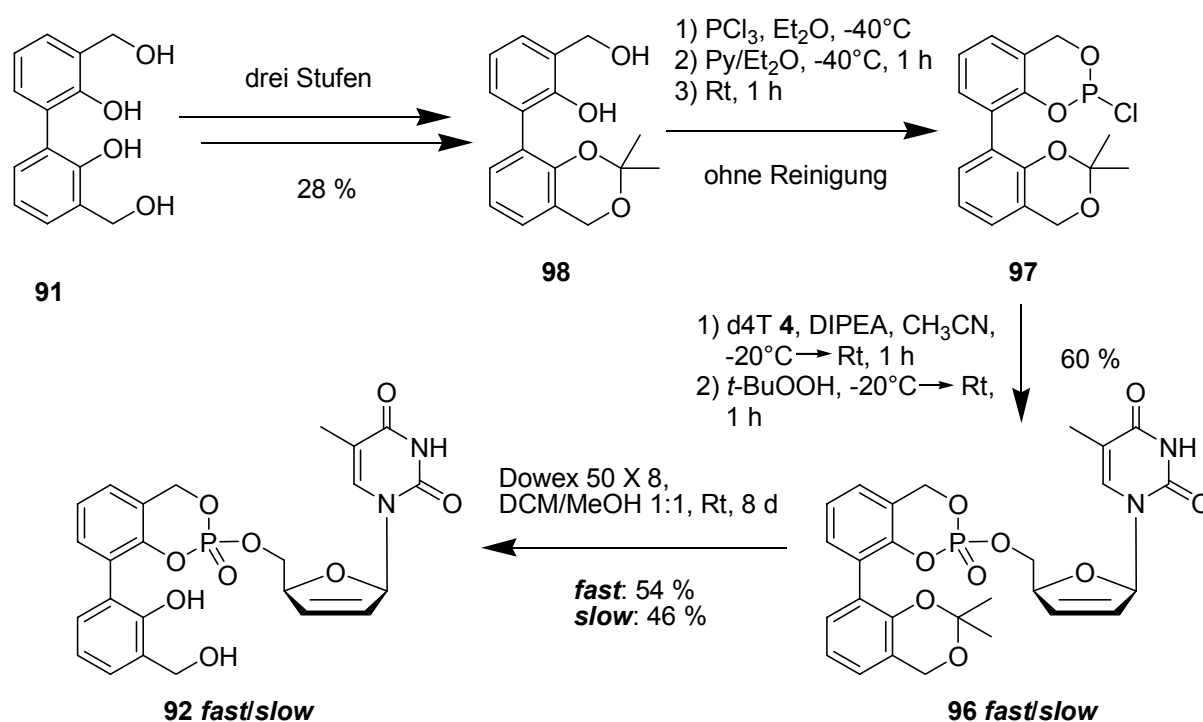


Abb. 201 Synthese der Referenzverbindung **92**

Die Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** erwiesen sich in Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer (pH 7.3, 37°C) als deutlich stabiler als ihre „monomeren“ Stammverbindungen. In ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien in Imidazol/Salzsäure-Puffer (pH 7.3) konnte nachgewiesen werden, daß beide Pronucleotide selektiv zu d4TMP hydrolysierten. Die Referenzverbindung **92** konnte aufgrund ihrer recht hohen Hydrolyselabilität in diesen Untersuchungen nicht als Intermediat der Spaltung von **46** detektiert werden, wohl aber ein anderes Zwischenprodukt mit *cycloSal*-Substruktur, bei dem es sich

vermutlich um den **92** vorangehenden Benzylphosphatdiester handelte. Unter der Annahme einer hinreichenden Vergleichbarkeit der chemischen Verschiebung dieses Intermediates mit der von **92** konnte die stereochemische Konfiguration von **46 fast** und **46 slow** aufgeklärt werden, da die absolute Konfiguration von **92 fast** und **92 slow** zuvor mittels CD-Spektroskopie zugeordnet werden konnte. So wurde **46 fast** die S_P/S_P -Konfiguration zugewiesen, während es sich bei **46 slow** offensichtlich um ein Gemisch der verbliebenen zwei Diastereomere handelte. Diese Ergebnisse eröffneten die Möglichkeit einer vollständigen stereochemischen Betrachtung der Synthese von **46** (vergl. Kapitel 4.4.7).

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, wurden **46** und **47** antiviralen *in vitro*-Tests unterzogen. Hierbei ergaben sich Aktivitätsverluste der Pronucleotide bei anti-HIV-2-Tests an TK-defizienten CEM-Zellen, was als Hinweis auf einen ineffizienten TK-Bypass, möglicherweise infolge einer mäßigen Zellaufnahme der Prodrugs, gewertet wurde. Auch war keine Verbesserung der Aktivitäten gegen HIV-1 und HIV-2 in Wildtyp-CEM-Zellen verglichen mit den „monomeren“ *cycloSal*-Nucleotiden festzustellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die neuartigen „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** synthetisiert und charakterisiert. Die Darstellung dieser Verbindungen gelang durch Alkylierung der Carbonsäure **142**, deren Synthese in sechs Stufen ausgehend von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure bereits bekannt war (Abb. 202, S. 201).

Während die Pronucleotide **48-50** in Phosphatpuffer Hydrolyse-Halbwertszeiten in der Größenordnung mehrerer Stunden besaßen, wurden sie in CEM/0-Zellextrakten mit Halbwertszeiten im Bereich von Bruchteilen einer Stunde (**48,49**) bzw. knapp einer Stunde (**50**) gespalten. Am deutlichsten fiel die Differenz der Stabilitäten in beiden Medien für die POM-modifizierte Verbindung **49** aus (Unterschied etwa 15-fach). Für alle drei Prodrugs konnte in den humanen Zellextrakten die freie Säure **142** als primäres Spaltprodukt detektiert werden. Hieraus wurde geschlossen, daß **48-50** in der Tat einen „lock-in“-Effekt, also die enzymatisch bewirkte schnelle intrazelluläre Freisetzung einer polaren Gruppe zur Verhinderung der Rückdiffusion durch die Zellmembran, aufweisen sollten. Es wurden weitere Hydrolysestudien in den extrazellulären Bereich simulierenden Medien, nämlich in humanem Serum wie auch in RPMI-Kulturmedium durchgeführt. Lediglich das AM-Derivat **48** wies im Kulturmedium, welches in den antiviralen *in vitro*-Tests Verwendung findet, eine

nennenswerte Labilisierung gegenüber der chemischen Hydrolyse in Phosphatpuffer auf und setzte dabei zumindest teilweise auch die Säure **142** frei.

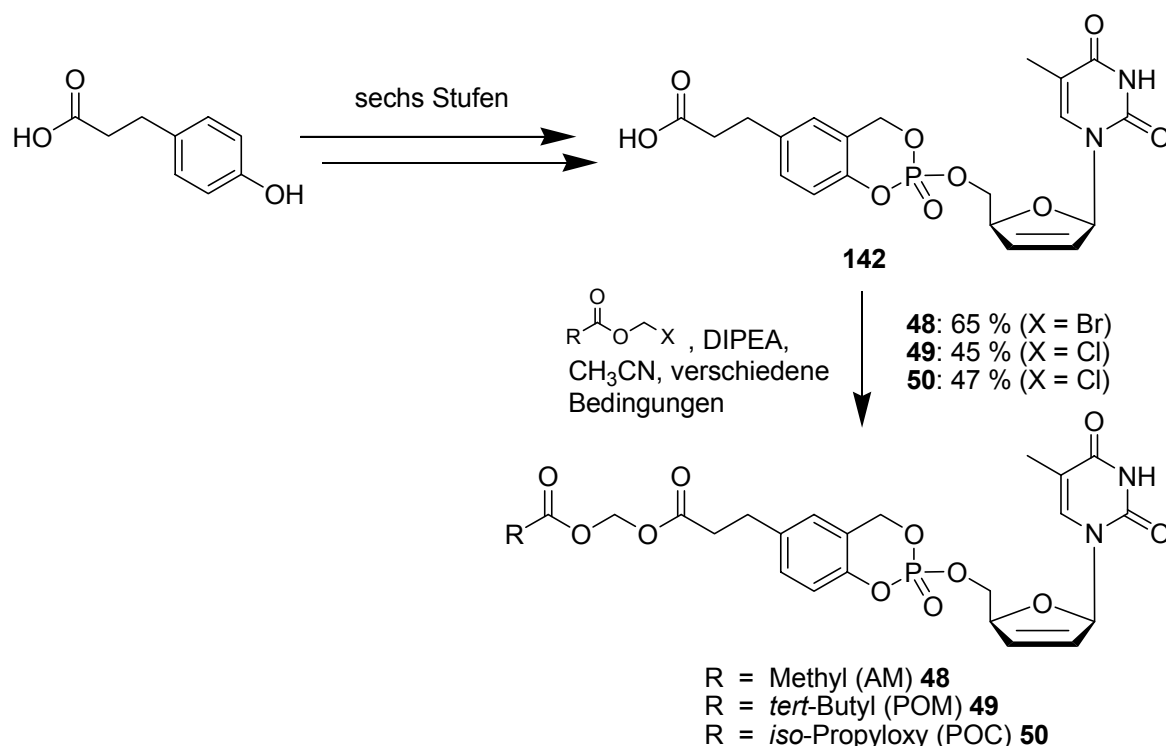


Abb. 202 Synthese der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50**

Die Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen von **48-50** konnten mit den antiviralen *in vitro*-Aktivitäten dieser Verbindungen korreliert werden. Die beste anti-HIV-2-Aktivität in TK-defizienten CEM-Zellen besaß das POM-Derivat **49** mit seiner hinreichenden extrazellulären Stabilität und schnellen intrazellulären Spaltung, während die intrazellulär deutlich stabilere aber extrazellulär etwas labilere POC-Verbindung **50** hier einen leichten Aktivitätsverlust zeigte. Das AM-modifizierte Pronucleotid **48** mit seiner recht deutlichen extrazellulären Labilität unter Bildung von **142** wies in diesen Tests einen massiven Verlust an antiviraler Potenz auf. Es konnten somit in Form von **48-50** zwar erstmals *cycloSal*-d4TMPs erhalten werden, die intrazellulär rasch eine geladene Verbindung freisetzen („lock-in“-Mechanismus), allerdings führte dies noch nicht zu Verbesserungen in den antiviralen Daten.

In einem dritten Projekt im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von Cholinesterasen mit *cycloSal*-Nucleotiden untersucht. Zunächst wurde ein Cholinesterase-Assay mit verschiedenen Quellen von Cholinesterase-Aktivität durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die physiologisch bedeutende Acetylcholinesterase (AChE) von keinem der verwendeten *cycloSal*-Nucleotide

inhibiert wurde und sich der unerwünschte inhibitorische Effekt auf Butyrylcholinesterase (BChE) beschränkte. Vergleichende Tests mit humanem Serum und gereinigter humaner BChE zeigten, daß Blutserum als eine geeignete Quelle für BChE-Aktivität Verwendung im Assay finden konnte. Durch Untersuchung einer Reihe von *cycloSal*-Prodrugs konnte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt werden, wobei sich nicht nur die Struktur der *cycloSal*-Einheit, sondern auch die des Nucleosyl-Restes (Glycon und Nucleobase) als bedeutend erwies. Durch Synthese und Untersuchung geeigneter Derivate konnte erarbeitet werden, daß der inhibitorische Effekt nicht nur von sterischen, sondern auch von reaktivitätsbedingten Faktoren abhing, und daß dem irreversiblen Charakter der Inhibition eine zentrale Rolle zukam. Abschließend wurden Wege zur Vermeidung der unerwünschten BChE-Inhibition ermittelt. Eine Möglichkeit hierzu bestand in der Trennung der bei der Synthese von *cycloSal*-Nucleotiden anfallenden Diastereomere (R_P/S_P), wobei das R_P -Isomer nicht nur das nicht BChE inhibierende Diastereomer, sondern auch das antiviral aktivere war (stereochemischer Ansatz). Der sterische Ansatz zur Unterdrückung der BChE-Inhibition ging von einer Vermeidung des Effektes durch sterische Repulsion im aktiven Zentrum des Enzyms aus. Eine Auswahl der in diesem Zusammenhang synthetisierten und untersuchten Derivate ist in der Abbildung 203 dargestellt. Die Synthese von **235** bzw. **260,261** gelang dabei durch Funktionalisierung von **67** bzw. **65**.

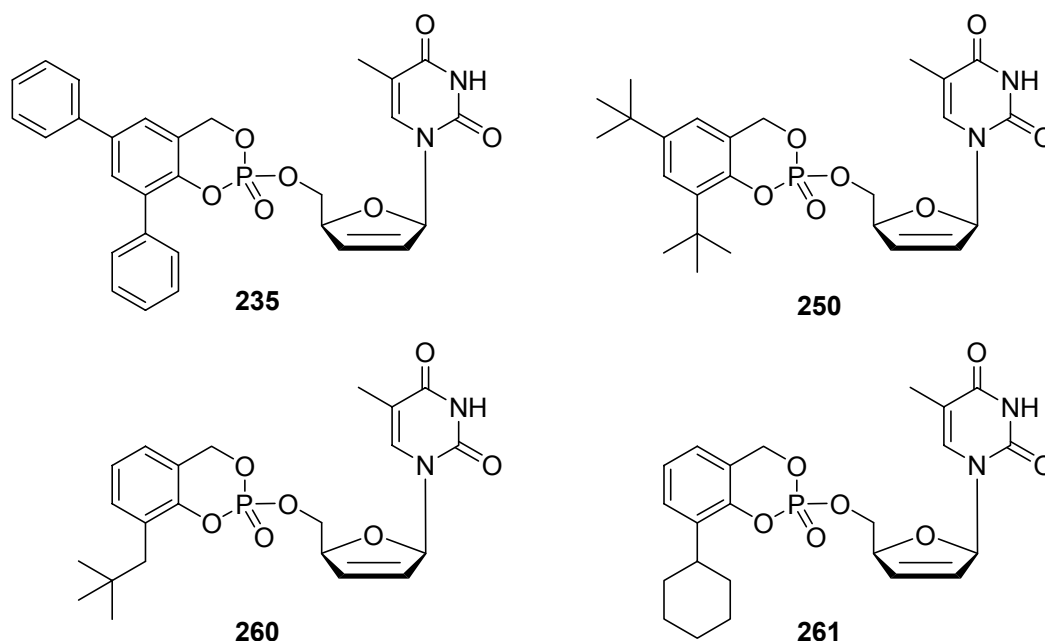


Abb. 203 Einige der im Zusammenhang mit dem sterischen Ansatz zur Vermeidung der BChE-Inhibition synthetisierten *cycloSal*-Nucleotide

Von den synthetisierten *cycloSal*-d4TMPs zeigte lediglich das 3,5-Bis-*tert*-butyl-Derivat **250** als Diastereomerenmisch keine BChE-Inhibitor-Aktivität, allerdings wies es auch ein ungünstiges Hydrolyseverhalten und in Konsequenz davon schlechte anti-HIV-Aktivitäten auf. Zur Verbesserung der Eigenschaften von **250** wurde die *cycloSal*-Maske modifiziert. Die optimierte 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-substituierte Maske, welche nach entsprechender Synthese auf die Nucleosid-Analoga d4T **4** und BVDU **15** angewendet wurde und die Prodrugs **270** und **271** lieferte (Abb. 204), führte bezüglich des d4T-Derivates **270** zur erstmaligen Kombination vier erwünschter Eigenschaften (hinreichende Hydrolysestabilität, selektive Hydrolyse, gute antivirale Aktivitäten und deutlich verminderte BChE-Inhibition).

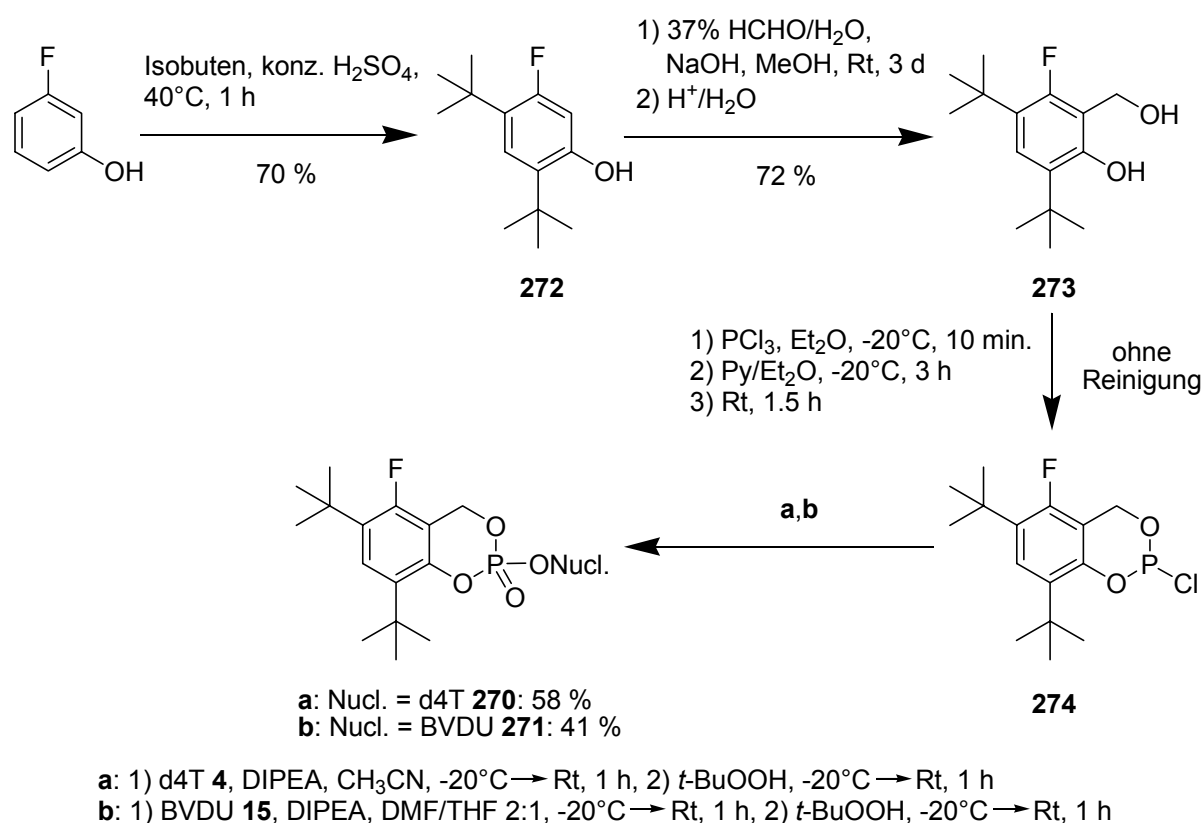


Abb. 204 Synthese der 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-NMPs **270,271**

Von den sterisch äußerst anspruchsvollen Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** erwies sich **46** noch als schwacher und **47** als Nicht-Inhibitor der humanen BChE.

6 Summary

This thesis deals with approaches towards an optimization of the *cycloSal* nucleotide drug delivery system.

For the synthesis of salicyl alcohol derivatives as precursors of the *cycloSal* prodrugs, a novel synthetic route employing the functionalization of protected bromo salicyl alcohols was developed and applied in several cases.

First, bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** were synthesized and investigated. These biaryl derivatives showed a mask-to-drug ratio of 1 : 2. The synthetic route towards these compounds was based on the synthesis of appropriate biaryl-type salicyl alcohols, which were subsequently converted into the pronucleotides *via* chlorophosphite and phosphoramidite chemistry. The „dimeric“ prodrugs **46,47** turned out to be hydrolytically more stable than their „monomeric“ counterparts and displayed a fully selective d4TMP delivery in ³¹P-NMR hydrolysis studies. Careful analysis of these studies along with synthesis of a possible hydrolytic intermediate provided insights into the stereochemistry of the biaryl pronucleotides. Unfortunately, both **46** and **47** displayed unfavorable antiviral activities in TK deficient CEM cells, most probably due to poor cellular uptake.

Second, novel „lock-in“ modified *cycloSal*-d4TMPs **48-50** were synthesized *via* an alkylation of the carboxylic acid **142**. Hydrolysis studies on these derivatives in human CEM cell extracts showed that they all intracellularly delivered the carboxylate **142** due to a rapid enzymatic cleavage, so they should be able to perform the „lock-in“ effect. The POM modified derivative **49** showed the best profile in hydrolysis behaviour with a significant hydrolytic stability, a fast enzymatic degradation in cell lysates and a satisfying stability both in human serum and cell culture medium. Consequently, this prodrug displayed the best antiviral potency of the three analogues.

Third, investigations concerning the interaction of cholinesterases with *cycloSal* nucleotides were carried out. While all *cycloSal* prodrugs tested showed no inhibitor activity towards acetylcholinesterase (AChE), inhibition of butyrylcholinesterase (BChE) was observed in some cases. A structure-activity relationship for the BChE inhibition was found. As inhibition of this enzyme was an unwanted effect, ways to overcome it had to be worked out. Both separation of diastereomers (*R_P*/*S_P*) and introduction of sterically demanding substituents in the *cycloSal* moiety showed

promising results. The optimized pronucleotide 3,5-bis-*tert*-butyl-6-fluoro-*cycloSal*-d4TMP **270** was the first *cycloSal* prodrug to combine four favourable properties: satisfying hydrolytic stability, selective hydrolysis, good antiviral activity and strongly reduced inhibitor activity towards human BChE.

7 Ausblick

Für alle drei im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Aspekte des *cycloSal*-Ansatzes lassen sich ausblickend zukünftige Projekte formulieren.

Die Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **46,47** zeigten zwar zufriedenstellende Hydrolyseeigenschaften, aber auch wenig überzeugende antivirale Aktivitäten. Es bietet sich daher an, ein weiteres Derivat dieser Substanzklasse zu synthetisieren und zu untersuchen. Es war bereits in Kapitel **4.4.1** erläutert worden, daß eine Verknüpfung zweier „monomerer“ *cycloSal*-Nucleotide über die 5-Position wenig erfolgversprechend scheint, da von einer solchen Verbindung keine hinreichende Hydrolysestabilität zu erwarten ist. Dem ließe sich jedoch über die Einführung eines zusätzlichen Methyl-Substituenten in der 3-Position des *cycloSal*-Systems entgegenwirken. Das resultierende Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **275** sollte synthetisch durch eine Übertragung des Syntheseweges von **46** leicht zugänglich sein, indem man das benötigte Salicylalkohol-Derivat **276** durch Homo-Kupplung und anschließende Entschützung des Acetals **277** darstellt. Dieses wiederum sollte sich aus dem im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 3-Methyl-5-bromsalicylalkohol **222** erhalten lassen (Abb. 205).

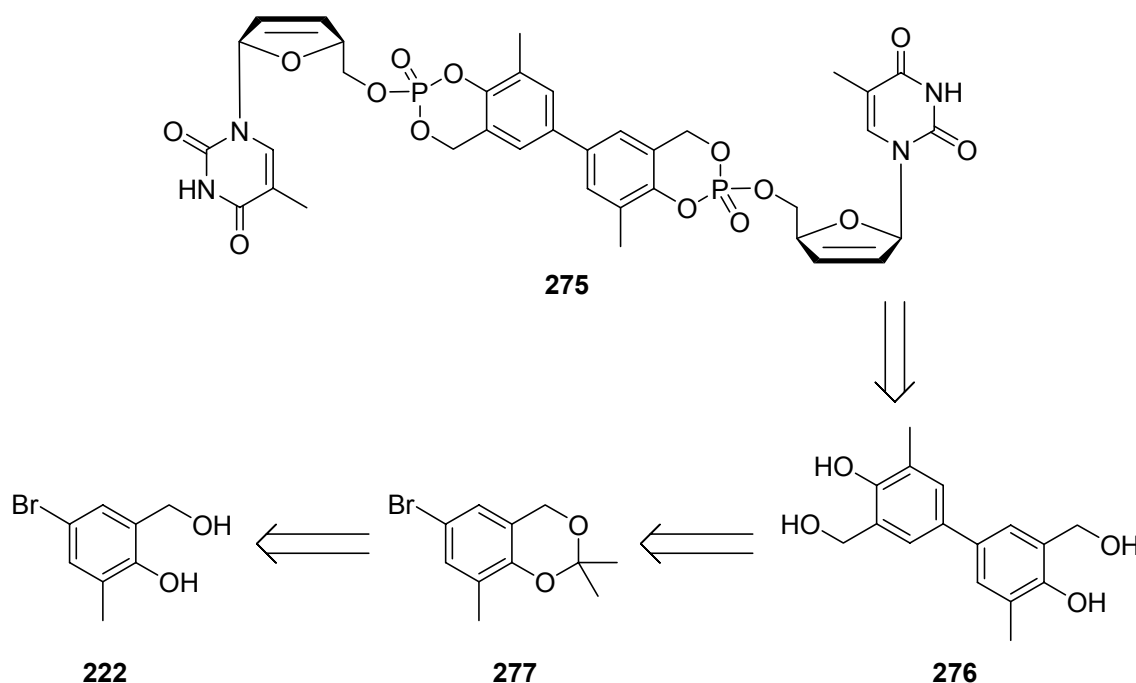


Abb. 205 Die mögliche zukünftige Zielverbindung **275** und Vorschlag für ein Retrosyntheseschema zu ihrer Darstellung

Sollte sich **275** als Pronucleotid mit guten Hydrolyseeigenschaften und antiviralen Aktivitäten erweisen, so könnte die *cycloSal*-Maske **276** auf andere Nucleosid-Analoga wie beispielsweise BVDU **15** angewendet werden.

Auch die antiviralen Eigenschaften der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **48-50** konnten noch nicht voll überzeugen. Es war bereits in Kapitel **4.5.7** beschrieben worden, daß die **48-50** entsprechenden 3-substituierten Regioisomere **155-157** eine höhere Differenz zwischen extrazellulärer (chemischer) und intrazellulärer (enzymatischer) Stabilität aufweisen sollten, was möglicherweise zu besseren biologischen Aktivitäten führen könnte. Die Synthese dieser Verbindungen war im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht gelungen. Mittlerweile konnte ein neuer Syntheseweg erarbeitet werden, der auf einer früheren Einführung der POM-Modifikation beruht^[150], und die Anwendung dieser Strategie sollte zur erfolgreichen Darstellung von 3-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **156** führen können. Alternativ wäre es jedoch auch denkbar, die Prodrugs **48-50** ähnlich wie zuvor für **275** beschreiben ebenfalls mit einer zusätzlichen 3-Methyl-Modifikation hydrolysestabiler zu machen, was zu den Zielverbindungen **278-280** führen würde (Abb. 206).

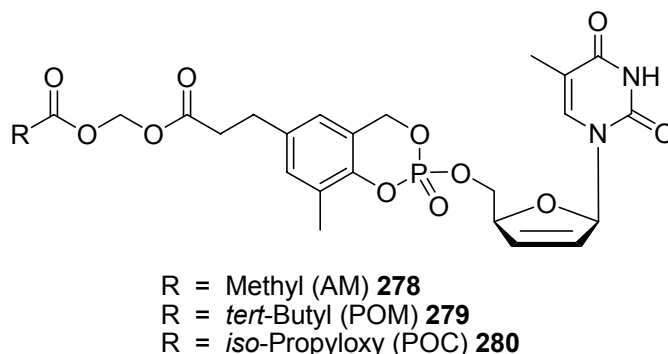


Abb. 206 Die möglichen zukünftigen Zielverbindungen **278-280**

Auch werden inzwischen Versuche zu Variationen in der Linker-Einheit der „lock-in“-Derivate durchgeführt, hier ist es allerdings noch zu früh, um Aussagen über die Auswirkungen dieser Modifikationen zu treffen. Ebenso ist es natürlich denkbar, andere endständige Gruppen als maskierte Carbonsäuren einzusetzen. So sollten beispielsweise auch entsprechend maskierte Aminogruppen (beipielsweise als Carbamate) oder Phosphate (beipielsweise als POM-Ester) zu einem „lock-in“-Effekt führen können. Ist eine „lock-in“-*cycloSal*-Maske gefunden, die für die d4TMP-Prodrugs zu einer wirklichen Verbesserung der antiviralen *in vitro*-Daten führt, so ist diese natürlich auch auf andere Nucleosid-Analoga anzuwenden.

Das Phänomen der BChE-Inhibition durch *cycloSal*-Nucleotide kann durch die vorliegende Arbeit zwar als von experimenteller Seite weitgehend vollständig bearbeitet angesehen werden, allerdings sollten für das weitere theoretische Verständnis des Effektes zukünftig *molecular modeling*-Untersuchungen an der nunmehr vorliegenden Kristallstruktur der humanen BChE durchgeführt werden. Auch empfiehlt sich eine Anwendung der optimierten 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-substituierten *cycloSal*-Maske auf weitere Nucleosid-Analoga.

Von entscheidender Bedeutung wird sein, ob es zukünftig gelingen wird, die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Aspekte zu einer möglichen Optimierung des *cycloSal*-Konzeptes zu kombinieren. Zunächst wäre es wünschenswert, ein *cycloSal*-d4TMP zu synthetisieren, das die „lock-in“-Modifikation besitzt, aber keine oder zumindest eine stark reduzierte BChE-Inhibitor-Aktivität besitzt. Aufgrund des Musters der 3,5-Disubstitution und den Kenntnissen aus der Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die BChE-Inhibition läßt sich vermuten, daß dies schon für die zuvor beschriebenen Derivate **278-280** (vergl. Abb. 206, S. 207) gelten könnte. Kombiniert man dieses Ziel noch mit dem Konzept der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) und der postulierten Zielverbindung **275** (vergl. Abb. 205, S. 206), so gelangt man zu dem Pronucleotid **281**, welches alle im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Aspekte (Maske-Wirkstoff-Verhältnis 1 : 2, „lock-in“-Mechanismus, keine BChE-Inhibitor-Aktivität) vereinen könnte (Abb. 207).

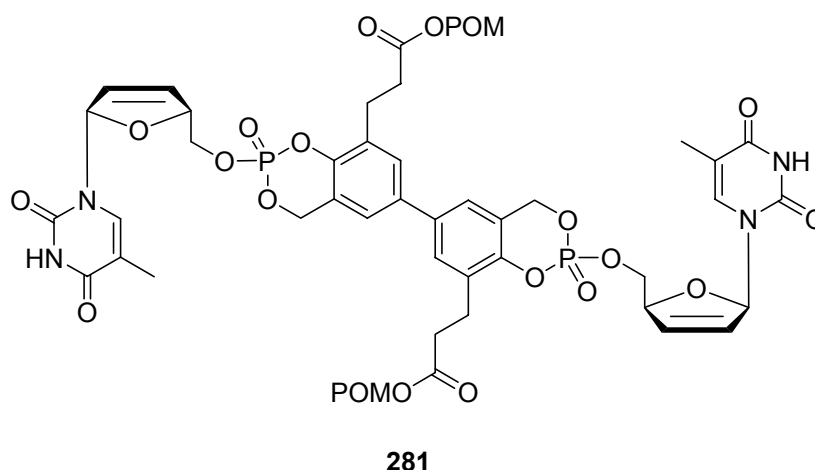


Abb. 207 Die mögliche zukünftige Zielverbindung **281**

Abschließend soll jedoch betont werden, daß alle diese Überlegungen rein konzeptioneller Natur sind und eine konzeptionelle Verbesserung der *cycloSal*-Nucleotide noch nichts über ihre Anwendbarkeit in der antiviralen Therapie aussagt.

8 Experimententeil

8.1 Allgemeines

8.1.1 Edukte und Reagenzien

Sämtliche Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen VWR, Fluka und Aldrich in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung für die Synthesen verwendet. Nucleoside und Nucleosid-Analoga wurden von den Firmen ChemGenes und Berry & Associates, Palladium-haltige Katalysatoren von der Firma Strem bezogen.

Acetylchlorid: unter Inertgas destilliert.

Diethylamin: mehrere Tage unter Rückfluß über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und unter Lichtausschluß aufbewahrt.

Di-iso-propylamin (DIPA): mehrere Tage unter Rückfluß über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und unter Lichtausschluß aufbewahrt.

Di-iso-propylethylamin (DIPEA): unter Rückfluß über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und unter Lichtausschluß aufbewahrt.

Dimethoxymethan: mehrere Tage unter Rückfluß über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas abdestilliert.

Phosphor(III)-chlorid: unter Inertgas destilliert.

Triethylamin: unter Rückfluß über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und unter Lichtausschluß aufbewahrt.

8.1.2 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung (Reaktionen ohne Inertgasbedingungen, Chromatographie) gereinigt. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan: über Calciumchlorid getrocknet und abdestilliert.

Diethylether: am Rotationsverdampfer destilliert.

Ethylacetat: über Calciumchlorid getrocknet und abdestilliert.

Methanol: destilliert.

Petrolether 50/70: Siedebereich 50-70°C, destilliert.

8.1.3 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen unter Luft- und/oder Feuchtigkeitsausschluß wurden die folgenden absoluten Lösungsmittel verwendet.

Acetonitril: mehrere Tage unter Rückfluß über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und über Molekularsieb (0.3 nm) aufbewahrt.

Dichlormethan: unter Rückfluß über Phosphor(V)-oxid getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Diethylether: unter Rückfluß über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

N,N-Dimethylformamid (DMF): Fluka Nr. 40248, absolut über Molekularsieb.

Dimethylsulfoxid (DMSO): Fluka Nr. 40248, absolut über Molekularsieb.

Methanol: unter Rückfluß über Magnesium getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und über Molekularsieb (0.3 nm) aufbewahrt.

Pyridin: mehrere Tage unter Rückfluß über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Tetrahydrofuran (THF): unter Rückfluß über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas abdestilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

8.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Es wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (VWR Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Laufstrecke betrug 7-8 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Nucleosidische Substanzen wurden darüber hinaus durch Färbung (10 %-ige Schwefelsäure in Wasser) detektiert.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Mittels eines Chromatotrons der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4 g getrennt. Als Trennmittel diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF₂₅₄ (VWR Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Trennungen wurde VWR Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) verwendet. Für anspruchsvollere Trennprobleme kam klassische Säulenchromatographie zum Einsatz, für einfachere Trennprobleme wurde Säulenfiltration in einer großen Glasfritte durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage Modell D-7000 durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software
Interface:	D-7000
Pumpe:	L-7100
Automatischer Probenwechsler:	L-7200
Detektion:	Diode Array Detector L-7455
Analytische Säule:	LiChroCart 125-3 mit LiChrospher 100 RP 18 (5 µm) Füllmaterial

HPLC-Methoden:

Methode I: Von 0 bis 25 min. Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (5-100 %), bis 35 min. isokratisch Acetonitril/Wasser 5 : 95 v/v, Flußrate 0.5 mL/min., UV-Detektion (240-260 nm).

Methode II: Von 0 bis 40 min. Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (5-70 %), bis 50 min. Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (70-100 %), bis 60 min. isokratisch Acetonitril/Wasser 5 : 95 v/v, Flußrate 0.5 mL/min., UV-Detektion (240-260 nm).

Methode III: Von 0 bis 22 min. Ionenpuffer mit einem Acetonitril-Gradienten (8-92 %), bis 27 min. reines Acetonitril, bis 33 min. isokratisch Acetonitril/Ionenpuffer 8 : 92 v/v, Flußrate 0.6 mL/min., UV-Detektion (240-260 nm).

Lösungsmittel:

Für alle HPLC-Anwendungen wurde Acetonitril und Methanol des Reinheitsgrades „HPLC grade“ (Firma J. T. Baker) sowie Reinstwasser (Milli-Q) verwendet.

Ionenpuffer:

Stammlösung (9.8 mM TBAH): Es wurden 1000 mL Wasser mit 6.6 mL einer Lösung von Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) in Wasser (ca. 40 %, 1.5 M) versetzt und mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 3.8 eingestellt.

Verwendete Lösung (0.55 mM TBAH): Es wurden 60 mL der 9.8 mM Stammlösung mit 1000 mL Wasser verdünnt.

Präparative HPLC:

Die präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde isokratisch mit einer Merck-Hitachi L-6250 Intelligent Pump mit 5 mL-Schleife durchgeführt. Als Detektor diente ein Merck-Hitachi LaChrom UV-Detektor L-7400 mit einem Merck-Hitachi D-2500A Chromato-Integrator. Die verwendete Säule war eine Merck Hibar Fertigsäule RT 250-25 mit LiChrospher 100 RP-18e (5 μm) Füllmaterial. Die Flußrate betrug 10 mL/min., die Detektion erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei 260 nm.

Das zu trennende Gemisch wurde in einer geringen Menge des Eluenten gelöst. Die für einen einzelnen HPLC-Lauf injizierten Mengen wurden so gewählt, daß das Volumen der injizierten Lösung maximal 2 mL und die injizierte Menge des Substanzgemisches maximal 50 mg betrug. Für anspruchsvollere Trennungen (beispielsweise von Diastereomergemischen) wurde die injizierte Menge pro HPLC-Lauf auf maximal 20-30 mg begrenzt.

Für die präparative HPLC-Trennung von *cycloSal*-Nucleotiden wurde dem Eluenten Essigsäure zugesetzt, um eine Hydrolyse des Produktes zu verhindern. Bei säureempfindlichen *cycloSal*-Derivaten wurde auf den Zusatz von Essigsäure verzichtet, stattdessen wurden sämtliche Fraktionen sowie die Lösung des Substanzgemisches auf 0°C gekühlt.

8.1.5 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung der Instituts für Organische Chemie auf Bruker-Geräten aufgenommen. Auf dem Modell AMX 400 wurden 400 MHz- ^1H -NMR- und 101 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren gemessen. Auf dem Modell DRX 500 wurden 500 MHz- ^1H -NMR-, 126 MHz- ^{13}C -NMR-, 471 MHz- ^{19}F -NMR- und 202 MHz- ^{31}P -NMR-Spektren gemessen. Zusätzlich wurden von allen nicht luftempfindlichen Verbindungen $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - sowie $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren (H,H-COSY bzw. HMQC) aufgenommen. Darüber hinaus wurden einige NMR-Spektren in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Anorganische und Angewandte Chemie aufgenommen (Modell Bruker AVANCE 400, 400 MHz).

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale bezogen, wobei DMSO- d_6 auf 2.52 (^1H) bzw. 39.70 (^{13}C) ppm und CDCl_3 auf 7.27 (^1H) bzw.

77.00 (^{13}C) ppm kalibriert wurde. Die Verschiebungen der ^{19}F -NMR-Signale wurden gegen CFCl_3 als externen Standard, die der ^{31}P -NMR-Signale gegen einen externen Standard von 85 %-iger Phosphorsäure angegeben.

Luftempfindliche Substanzen wurden in zuvor über Molekularsieb (0.4 nm) getrocknetem CDCl_3 vermessen.

Massenspektrometrie (MS)

Die EI-Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer (doppelt fokussierend) gemessen.

Die ESI-Massenspektren wurden an einem Finnigan ThermoQuest MAT 95 XL-Spektrometer aufgenommen.

Die FAB-Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer mit einer MCA-Methode und einer Polyethylenglycol-Matrix gemessen.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden an einem Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR aufgenommen.

Ultraviolett-Spektroskopie (UV) und Photometrie

Als UV-Spektrometer und Photometer kam ein Varian Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer mit einem Varian Cary Temperature Controller zum Einsatz. Als UV-Spektren der *cycloSal*-Nucleotide sind die DAD-Signale aus den HPLC-Läufen angegeben.

8.1.6 Geräte

Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wässriger oder wasserhaltiger Lösungen wurde an einer Christ ALPHA 2-4-Gefriertrocknungsanlage durchgeführt.

Thermomixer

Als Thermomixer wurde ein Eppendorf Thermomixer 5436 verwendet.

SpeedVac

Zur Entfernung kleiner Lösungsmittelmengen kam ein Eppendorf Concentrator 5301 zum Einsatz.

8.2 Synthesen

8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

8.2.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Salicylalkohol-Derivaten durch regioselektive Hydroxymethylierung nach Nagata^[97] (AAV 1)

Es wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen Phenols, 1.2 Äquiv. Phenylboronsäure sowie zunächst 2.0 Äquiv. *para*-Formaldehyd in einer Dean-Stark-Apparatur mit Wasserabscheider in Toluol aufgenommen und mit 0.5 Äquiv. Propionsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluß erhitzt. Alle 2 h wurden weitere 2.0 Äquiv. *para*-Formaldehyd zugegeben und das Reaktionsgemisch weiter unter Rückfluß erhitzt, bis sich insgesamt eine Zugabemenge von 8-10 Äquiv. *para*-Formaldehyd und eine Reaktionszeit von 8-10 h ergab. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Dichlormethan sowie Wasser versetzt. Nach Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde entweder am Chromatotron gereinigt oder direkt in der nachfolgenden Oxidation eingesetzt. Für die Oxidation wurde das Dioxaborin in THF gelöst, auf 0°C abgekühlt und mit 30 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Es wurde noch 30-45 min. bei 0°C gerührt und anschließend mit Wasser auf etwa das fünfache Gesamtvolumen verdünnt. Die wäßrige Phase wurde fünfmal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 39 %-iger Natriumhydrogensulfit-Lösung Peroxid-frei gewaschen, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Die

so erhaltenen Rohprodukte wurde chromatographisch oder durch Umkristallisation gereinigt.

8.2.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Salicylalkohol-Derivaten durch Reduktion von Carbonylverbindungen (AAV 2)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 1.0 (für Aldehyde als Edukte) bzw. 2.0 (für Carbonsäuren und Carbonsäureester) Äquiv. Lithiumaluminiumhydrid in abs. THF suspendiert. Zu dieser Suspension wurde bei Raumtemperatur unter Rühren eine Lösung von 1.0 Äquiv. der jeweiligen Carbonylverbindung in abs. THF innerhalb von 30-40 min. getropft. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend noch 2 h bei Raumtemperatur gerührt und 1 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde bei 0°C überschüssiges Lithiumaluminiumhydrid durch Zugabe von 2 N Salzsäure bis pH 4-5 zerstört. Nach Zugabe von Wasser wurden die Phasen getrennt und die wäßrige Phase noch fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Die so erhaltenen Produkte waren in einigen Fällen noch durch Salze verunreinigt, welche durch Kieselgelfiltration (Ethylacetat) abgetrennt wurden.

8.2.1.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Isopropyliden-Schätzung von Salicylalkohol-Derivaten^[106] (AAV 3)

Es wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen Salicylalkohol-Derivates in Aceton (etwa 4 mL pro mmol Salicylalkohol) gelöst und mit 5.0 Äquiv. 2,2-Dimethoxypropan, 0.1 Äquiv. *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat sowie wasserfreiem Natriumsulfat (etwa 0.4 g pro mmol Salicylalkohol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei 40°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert und der Rückstand in Ethylacetat und Wasser aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wäßrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 1 M Natronlauge und anschließend einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die so erhaltenen

Produkte waren meist nur noch gering verunreinigt und konnten nach Kieselgelfiltration (Dichlormethan) rein erhalten werden.

8.2.1.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entschützung von Salicylalkohol-isopropylidenacetalen mit Trifluoressigsäure (AAV 4)

Es wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen Salicylalkoholisopropylidenacetals in Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v (etwa 23 mL pro mmol Acetal) gelöst und mit 2.5 Äquiv. Trifluoressigsäure (TFA, 15 %-ige Lösung in Dichlormethan) versetzt. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan). Nach ausreichendem Umsatz wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan).

8.2.1.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entschützung von Salicylalkohol-isopropylidenacetalen mit saurem Ionentauscher (AAV 5)

Es wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen Salicylalkoholisopropylidenacetals in Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v (etwa 46 mL pro mmol Acetal) gelöst und mit Dowex 50 X 8 (H⁺-Form, zuvor mit Dichlormethan und Methanol gewaschen, etwa 28 g pro mmol Acetal) versetzt. Das resultierende Gemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan). Nach ausreichendem Umsatz wurde der Ionentauscher abfiltriert und mit Dichlormethan und Methanol gründlich gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand chromatographisch gereinigt.

8.2.1.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Saligenylchlorphosphiten (AAV 6)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen Salicylalkohol-Derivates in abs. Diethylether gelöst bzw. suspendiert und auf -20°C abgekühlt. Anschließend wurden bei -20°C

und unter Rühren 1.2 Äquiv. zuvor destilliertes Phosphor(III)-chlorid zugegeben und nach Rühren für etwa 10 min. 2.3 Äquiv. abs. Pyridin, gelöst in abs. Diethylether, über einen Zeitraum von 2-3 h zugetropft. Nach beendeter Zugabe ließ man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und noch 1-2 h bei Raumtemperatur rühren. Es wurde nunmehr über Nacht bei -20°C aufbewahrt, um ein möglichst vollständiges Ausfallen des entstandenen Pyridinhydrochlorids herbeizuführen. Anschließend wurde unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Es resultierten Öle oder Feststoffe als Rohprodukte, die ohne weitere Reinigung zur Synthese der *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate eingesetzt wurden.

8.2.1.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten (AAV 7)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Variante I

Es wurden 1.0 Äquiv. des Nucleosid-Analogons in abs. Acetonitril gelöst und auf -20°C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden bei -20°C und unter Rühren 2.0 Äquiv. DIPEA sowie vorsichtig das jeweilige Saligenylchlorphosphit (verunreinigtes Rohprodukt, entsprechend 2.0 Äquiv. bei hypothetischer Reinheit), meist gelöst in abs. Acetonitril, gegeben. Man ließ die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmen und noch 1 h bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktion wurde dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurden bei -20°C und unter Rühren 3.4 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid in Form einer Lösung in *n*-Decan zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde erneut auf Raumtemperatur erwärmt und nochmals 1 h gerührt (DC-Kontrolle). Nunmehr wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Aus dem so erhaltenen Rohprodukt wurden in einer ersten Trennung am Chromatotron Salze entfernt (Ethylacetat/Methanol [bei nicht säureempfindlichen Verbindungen angesäuert mit 0.1 % Essigsäure] 9 : 1 v/v). Durch weitere Reinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradienten, bei nicht säureempfindlichen Verbindungen Methanol angesäuert mit 0.1 % Essigsäure) konnte das jeweilige

Produkt zunächst meist in Form eines farblosen Öls isoliert werden. Anschließende Gefriertrocknung ergab farblose Watten.

Variante II

Die Synthese erfolgte analog zu Variante I, aber mit weniger Saligenylchlorphosphit (1.5 Äquiv. bei hypothetischer Reinheit) und in abs. DMF/THF 2 : 1 v/v als Lösungsmittel.

Variante III

Die Synthese erfolgte analog zu Variante I, aber mit weniger Saligenylchlorphosphit (1.5 Äquiv. bei hypothetischer Reinheit) und in abs. DMF/THF 1 : 5 v/v als Lösungsmittel. Außerdem erfolgte die Zugabe des Chlorphosphits bei -40°C, und die Reaktionslösung wurde anschließend auf 0°C statt auf Raumtemperatur erwärmt.

Variante IV

Die Synthese erfolgte analog zu Variante I, aber mit weniger Saligenylchlorphosphit (1.5 Äquiv. bei hypothetischer Reinheit), 2.5 Äquiv. DIPEA, 3.0 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid und in abs. DMF/THF 2 : 1 v/v als Lösungsmittel. Außerdem wurde die Chlorphosphit-Lösung in 20 min. bei -40°C zugetropft und die Phosphitylierung bei dieser Temperatur fortgesetzt, bis zufriedenstellender Umsatz eingetreten war (DC-Kontrolle). Die anschließende Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid erfolgte ebenfalls bei -40°C, erst dann wurde auf Raumtemperatur erwärmt.

8.2.2 Synthese einiger Edukte und Reagenzien

8.2.2.1 Synthese von Chlormethylmethylether (MOM-Chlorid) 51^[89]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 13.5 mL (11.6 g, 152 mmol) Dimethoxymethan mit 0.35 mL (0.28 g, 8.7 mmol) abs. Methanol versetzt. Zu dieser Lösung wurden vorsichtig in drei Portionen 10.5 mL (11.6 g, 148 mmol) zuvor destilliertes Acetylchlorid gegeben, so daß keine zu starke Erwärmung einsetzte. Das Reaktionsgemisch wurde noch 41 h

bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung von Chlormethylmethylether wurde unter Inertgas bei 4°C gelagert und direkt für weitere Synthesen eingesetzt.

Ausbeute: 17.7 mL einer ungefähr 6 M Lösung von Chlormethylmethylether **51** in Methylacetat

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 2.06 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 3.52 (s, 3H, CH_3O), 3.67 (s, 3H, $\text{O}=\text{COCH}_3$), 5.47 (s, 2H, CH_2Cl); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 20.66 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 51.58 (CH_3O), 57.65 ($\text{O}=\text{COCH}_3$), 84.75 (CH_2Cl), 171.53 ($\text{C}=\text{O}$)

8.2.2.2 Synthese von Phenylboronsäure **52**

8.2.2.2.1 Synthese von Tris-(*n*-butyl)-borat **53**^[90]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

In einer Apparatur bestehend aus Dreihalskolben, Vigreux-Kolonnen, Wasserabscheider und Rückflußkühler wurden 130 g (2.10 mol) Borsäure mit 815 mL (660 g, 8.91 mol) *n*-Butanol und etwas Molekularsieb (0.3 nm) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 40 h unter Rückfluß erhitzt. Im Wasserabscheider sammelte sich ein Wasser/Butanol-Gemisch, das von Zeit zu Zeit abgelassen und im Scheidetrichter getrennt wurde. Der *n*-Butanol wurde über Natriumsulfat getrocknet und dem Reaktionsgemisch wieder zugeführt. Als sich kein Wasser mehr abschied, wurde die Reaktion abgebrochen und die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Diese wurde anschließend im Wasserstrahlvakuum fraktionierend destilliert.

Ausbeute: 441 g (1.99 mol, 95 %) einer farblosen Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 0.93 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H4), 1.31-1.42 (m, 6H, H3), 1.47-1.56 (m, 6H, H2), 3.79 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, H1); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 13.85 (C4), 18.98 (C3), 33.69 (C2), 62.89 (C1); MS (EI, m/z): ber.: 230 (M), gef.: 230 (M, 31 %), 187 (68), 173 (39), 157 (34), 131 (45), 117 (58), 101 (83), 89 (12), 56 (100), 41 (96); IR (Film): ν [cm^{-1}]: 2959, 2935, 2878, 1485, 1417, 1337, 1260, 1232, 1073, 1029, 666

8.2.2.2.2 Synthese von Phenylboronsäure **52** bzw. Phenylboronsäureanhydrid **54**^[91]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 4.95 g (204 mmol) Magnesium-Späne langsam mit einer Lösung von 16 mL (24 g, 0.15 mol) Brombenzol in 100 mL abs. THF versetzt. Die Darstellung des Grignard-Reagenzes wurde durch anschließendes 30-minütiges Erhitzen unter Rückfluß vervollständigt.

Es wurden 48 g (0.21 mol) Tris-(*n*-butyl)-borat **53** in 100 mL abs. Diethylether gelöst und auf -95°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde langsam die noch warme Lösung des Grignard-Reagenzes getropft. Es wurde darauf geachtet, daß die Innentemperatur der Reaktion -80°C nicht überschritt. Bei der Zugabe fiel das Trialkylborat-Addukt des Grignard-Reagenzes als farbloser Niederschlag aus. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und noch 2 h gerührt. Der Niederschlag des Adduktes ging dabei wieder in Lösung. Zu der Reaktionslösung wurden nunmehr 200 mL Wasser und 50 mL konz. Salzsäure gegeben. Nach Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase viermal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend am Rotationsverdampfer ohne vorherige Trocknung vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene Rückstand wurde durch zweimaliges Coevaporieren mit je 100 mL Wasser von Resten von *n*-Butanol befreit. Das resultierende Rohprodukt wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 9.19 g eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus Phenylboronsäure **52** und Phenylboronsäureanhydrid **54**

Durch Erhitzen auf 140°C für etwa 3 h konnte das Gemisch aus Phenylboronsäure **52** und Phenylboronsäureanhydrid **54** quantitativ in das Anhydrid **54** überführt werden.

Daten zur Charakterisierung von **54**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.51-7.55 (m, 2H, H3, H5), 7.62 (tt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H4), 8.27 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H2, H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 127.96 (C3, C5), 132.66 (C4), 135.63 (C2, C6); MS (EI, m/z): ber.: 312 (M), gef.: 312 (M, 100 %), 235 (7), 208 (8), 164 (19), 131 (9), 104 (26); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3077, 3052, 3024, 1603, 1494, 1442, 1348, 1306, 1179, 1086, 1024, 780, 701, 578; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 235, 271

8.2.2.3 Synthese von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) 4^[92,93]**8.2.2.3.1 Synthese von 3',5'-Di-O-mesylythymidin 55**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 10.1 g (41.7 mmol) 2'-Desoxythymidin **7** in 100 ml absolutem Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 7.1 mL (11 g, 96 mmol) Mesylchlorid langsam zugetropft. Die nun gelbe Lösung wurde 1 h bei 0°C gerührt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Hierbei fiel Pyridiniumchlorid als farbloser Niederschlag aus, und die Lösung färbte sich orange. Nachdem die Hälfte des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer abdestilliert worden war, wurde die Lösung auf 0°C gekühlt und in 200 mL Eiswasser gegossen. Dabei fiel ein farbloser Niederschlag aus, der nach 1 h abfiltriert und dreimal mit je 100 mL Eiswasser gewaschen wurde. Das Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 12.2 g (30.7 mmol, 74 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 1.81 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, Thymin- CH_3), 2.51-2.56 (m, 2H, H2'), 3.27 (s, 3H, Mesyl- CH_3), 3.34 (s, 3H, Mesyl- CH_3), 4.38-4.41 (m, 1H, H4'), 4.44-4.51 (m, 2H, H5'a, H5'b), 5.31-5.34 (m, 1H, H3'), 6.24 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H1'), 7.53 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, Thymin-H6), 11.41 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 12.21 (Thymin- CH_3), 36.22 (C2'), 37.06 (Mesyl- CH_3), 37.93 (Mesyl- CH_3), 68.68 (C5'), 79.60 (C3'), 80.77 (C4'), 84.30

(C1'), 110.30 (Thymin-C5), 136.03 (Thymin-C6), 150.59 (Thymin-C2), 163.82 (Thymin-C4); MS (FAB): ber.: 399.1 (M+H⁺), gef.: 399.2 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3169, 3113, 3029, 2937, 1723, 1690, 1474, 1359, 1280, 1160, 1094, 1041, 989, 959, 840, 825, 525; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 262; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.45

8.2.2.3.2 Synthese von 3',5'-Anhydrothymidin 56

Es wurden 3.88 g (97.1 mmol) Natriumhydroxid in 80 mL Wasser gelöst. Hierzu wurden 12.0 g (30.1 mmol) 3',5'-Di-O-mesylythymidin **55** portionsweise gegeben. Dabei färbte sich die Lösung über gelb nach orange-rot. Es wurde 1 h unter Rückfluß erhitzt, wobei die Lösung eine dunkelrote Färbung annahm. Nachdem die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde mit 2 M Salzsäure neutralisiert und anschließend fünfmal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene gelbe Farbstoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4.23 g (18.9 mmol, 63 %) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 1.81 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Thymin-CH₃), 2.48-2.52 (m, 2H, H2'), 4.06 (dd, 1H, ²J_{HH} = 8.1 Hz, ³J_{HH} = 2.1 Hz, H5'), 4.71 (dd, 1H, ²J_{HH} = 8.1 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, H5''), 4.91 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ³J_{HH} = 2.1 Hz, H4'), 5.48-5.51 (m, 1H, H3'), 6.52 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H1'), 8.04 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Thymin-H6), 11.35 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 12.60 (Thymin-CH₃), 37.40 (C2'), 75.40 (C5'), 80.09 (C4'), 87.12 (C3'), 88.54 (C1'), 109.86 (Thymin-C5), 136.86 (Thymin-C6), 151.37 (Thymin-C2), 163.92 (Thymin-C4); MS (FAB): ber.: 225.1 (M+H⁺), gef.: 225.2 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3169, 3044, 2876, 2818, 1682, 1466, 1420, 1271, 1090, 970, 951, 859, 759, 425; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 264; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.55

8.2.2.3.3 Synthese von 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) 4

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 4.13 g (18.4 mmol) 3',5'-Anhydrothymidin **56** in 40 mL abs. DMSO gelöst. Unter Rühren wurden 3.25 g (43.8 mmol) Kalium-*tert*-butanolat in vier Portionen zugegeben, wobei sich die Lösung gelb färbte. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei fiel ein gelber Niederschlag aus. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde in 140 mL Toluol gegeben, 45 min. bei 0°C gerührt und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert, in Wasser gelöst, mit 2 M Salzsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Dabei verblieb ein rötlicher Feststoff, der in Ethylacetat suspendiert und durch eine Kieselgelfiltration (Ethylacetat) von Salzen befreit wurde. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient 0-5 %).

Ausbeute: 1.64 g (7.32 mmol, 40 %) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 1.74 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Thymin-CH₃), 3.60-3.64 (m, 2H, H5'), 4.77-4.81 (m, 1H, H4'), 5.02 (s, 1H, OH), 5.92 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H2'), 6.41 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H3'), 6.84 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H1'), 7.66 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Thymin-H6), 11.28 (s, 1H, NH);
¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 12.33 (Thymin-CH₃), 62.44 (C5'), 87.46 (C4'), 89.05 (C1'), 109.14 (Thymin-C5), 126.13 (C2'), 135.11 (C3'), 136.92 (Thymin-C6), 150.96 (Thymin-C2), 164.02 (Thymin-C4); MS (FAB): ber.: 225.1 (M+H⁺), gef.: 225.2 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3465, 3155, 3032, 2823, 1682, 1467, 1422, 1343, 1269, 1252, 1226, 1115, 1091, 1072, 975, 881, 851, 819, 780, 760, 742, 582, 429; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 263; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.31

8.2.2.4 Synthese von 2',3'-Didesoxythymidin (ddT) 57^[94]

Es wurden 301 mg (1.34 mmol) d4T **4** in 20 mL Methanol gelöst. Hierzu wurde eine Spatelspitze des Katalysators Palladium/Kohle (5 %, wäßrig) gegeben. Der Gasraum

über der Lösung wurde evakuiert und mit Wasserstoff befüllt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Nach 4 d Rühren unter Wasserstoff-Atmosphäre (Ballon, 1 bar) wurde eine weitere Spatelspitze des Katalysators hinzugegeben und die Reaktion noch 2 d fortgesetzt. Zur Abtrennung des Katalysators wurde das Reaktionsgemisch durch Celite filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Produkt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient 0-4 %) und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 187 mg (0.827 mmol, 62 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.79 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, Thymin- CH_3), 1.87-2.00 (m, 3H, H_2' , H_3' , H_3''), 2.22-2.31 (m, 1H, H_2''), 3.55 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.3$ Hz, H_5'), 3.70 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, H_5''), 3.99-4.05 (m, 1H, H_4'), 5.04 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, OH), 5.98 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, H_1'), 7.81 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, Thymin- H_6), 11.23 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.42 (Thymin- CH_3), 25.10 (C_3'), 31.69 (C_2'), 62.29 (C_5'), 81.39 (C_4'), 84.90 (C_1'), 108.83 (Thymin- C_5), 136.47 (Thymin- C_6), 150.56 (Thymin- C_2), 164.00 (Thymin- C_4); MS (FAB): ber.: 227.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 227.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3441, 3177, 3043, 1689, 1466, 1274, 1100, 1059, 870, 424; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 266; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.31

8.2.2.5 Synthese von *iso*-2'-Desoxyadenosin (*iso*-dA) 58^[95,96]

8.2.2.5.1 Synthese von 2-*N*,3'-*O*,5'-*O*-Tris-(*iso*-butyryl)-2'-desoxyguanosin 59

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 5.11 g (19.1 mmol) 2'-Desoxyguanosin in 200 mL abs. Pyridin suspendiert. Die Suspension wurde auf 0°C gekühlt, tropfenweise mit 20 mL (20 g, 0.19 mol) *iso*-Butyrylchlorid versetzt, auf Raumtemperatur erwärmt und noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch

vorsichtig in 200 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und bis zur Beendigung der Gasentwicklung gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat suspendiert. Nach einer Kieselgelfiltration (Ethylacetat) wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der so erhaltene Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 7.18 g (15.0 mmol, 79 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.07 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 1.08 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 1.15 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 2.55-2.65 (m, 3H, H2', 2 x *i*-Bu-CH), 2.79 (sep, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH), 2.98-3.05 (m, 1H, H2''), 4.21-4.30 (m, 3H, H4', H5'), 5.34-5.38 (m, 1H, H3'), 6.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, H1'), 8.24 (s, 1H, Guanin-H8), 11.63 (s, 1H, NH), 12.11 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 18.77 (*i*-Bu-CH₃), 18.84 (*i*-Bu-CH₃), 18.87 (*i*-Bu-CH₃), 18.96 (*i*-Bu-CH₃), 19.02 (*i*-Bu-CH₃), 33.20 (*O*-*i*-Bu-CH), 33.27 (*O*-*i*-Bu-CH), 34.93 (*N*-*i*-Bu-CH), 35.83 (C2'), 63.54 (C5'), 74.31 (C3'), 81.92 (C4'), 83.18 (C1'), 120.58 (Guanin-C5), 137.45 (Guanin-C8), 148.36 (Guanin-C4), 148.74 (Guanin-C2), 154.94 (Guanin-C6), 175.76 (O-C=O), 176.05 (O-C=O), 180.29 (N-C=O); MS (FAB-HR): ber.: 478.2302 (M+H⁺), gef.: 478.2329 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3432, 3166, 2975, 2937, 2877, 1739, 1682, 1608, 1157, 786; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 257, 281; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.71

8.2.2.5.2 Synthese von 2'-*N*,3'-*O*,5'-*O*-Tris-(*iso*-butyryl)-6-thio-2'-desoxy-guanosin 60

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 7.00 g (14.7 mmol) 2-*N*,3'-*O*,5'-*O*-Tris-(*iso*-butyryl)-2'-desoxyguanosin **59** in 300 mL abs. Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur nacheinander 7.5 mL (5.4 g, 53 mmol) Triethylamin, 148 mg (1.21 mmol) *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) sowie 7.50 g (24.0 mmol) Mesitylensulfonylchlorid zugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Nachdem sich das Edukt (R_f = 0.71) zu einer unpolaren Verbindung (R_f = 0.84)

umgesetzt hatte, wurde bei 0°C eine Lösung von 14.8 mL (12.1 g, 0.142 mmol) *N*-Methylpyrrolidin in 40 mL trockenem Dichlormethan langsam zugetropft. Nachdem sich nach fortgesetztem Rühren bei 0°C eine polarere Verbindung ($R_f = 0.23$) gebildet hatte, wurde bei 0°C eine Lösung von 14.8 mL (15.8 g, 0.208 mmol) Thioessigsäure in 40 mL abs. Dichlormethan zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und noch 20 min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde es sofort in 370 mL einer 0.5 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung gegeben. Nach Trennung der Phasen wurde die organische Phase zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde zunächst durch Säulenfiltration (Ethylacetat) grob gereinigt, um dann nach mehrfacher Säulenchromatographie (erst Dichlormethan/Methanol 100 : 1 v/v, dann Ethylacetat) rein erhalten zu werden.

Ausbeute: 5.13 g (10.4 mmol, 71 %) eines hellbraunen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.07 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 1.08 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 1.14 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 1.16 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, *i*-Bu-CH₃), 2.55-2.65 (m, 3H, H2', 2 x *i*-Bu-CH), 2.81 (sep, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Bu-CH), 2.99-3.06 (m, 1H, H2''), 4.23-4.29 (m, 3H, H4', H5'), 5.35-5.38 (m, 1H, H3'), 6.26 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, H1'), 8.41 (s, 1H, Guanin-H8), 11.89 (s, 1H, NH), 13.44 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 18.79 (*i*-Bu-CH₃), 18.88 (*i*-Bu-CH₃), 18.90 (*i*-Bu-CH₃), 18.95 (*i*-Bu-CH₃), 19.01 (*i*-Bu-CH₃), 33.23 (*O*-*i*-Bu-CH), 33.30 (*O*-*i*-Bu-CH), 35.05 (*N*-*i*-Bu-CH), 35.87 (C2'), 63.54 (C5'), 74.24 (C3'), 82.07 (C4'), 83.42 (C1'), 132.17 (Guanin-C5), 140.12 (Guanin-C8), 145.25 (Guanin-C4), 147.78 (Guanin-C2), 174.42 (Guanin-C6), 175.80 (O-C=O), 176.09 (O-C=O), 180.69 (N-C=O); MS (FAB-HR): ber.: 478.2073 (M+H⁺), gef.: 494.2088 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3135, 2974, 2936, 1739, 1697, 1611, 1553, 1156, 939; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 220, 333; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.69

8.2.2.5.3 Synthese von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **61**

Es wurden 1.39 g (2.81 mmol) 2'-N,3'-O,5'-O-Tris-(*iso*-butyryl)-6-thio-2'-desoxyguanosin **60** in 55 mL einer 2 M Natriumhydroxid-Lösung in Ethanol gelöst und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 0°C mit Salzsäure neutralisiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der so erhaltene Rückstand wurde aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 573 mg (2.02 mmol, 72 %) eines gelblichen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 2.24 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H2'), 2.50-2.57 (m, 1H, H2''), 3.49-3.61 (m, 2H, H5'), 3.82-3.85 (m, 1H, H4'), 4.34-4.38 (m, 1H, H3'), 4.95 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, 5'-OH), 5.29 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 3'-OH), 6.26 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H1'), 6.85 (s, 2H, NH₂), 8.12 (s, 1H, Guanin-H8), 11.96 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 39.95 (C2'), 61.74 (C5'), 70.77 (C3'), 82.87 (C4'), 87.84 (C1'), 128.54 (Guanin-C5), 138.37 (Guanin-C8), 147.61 (Guanin-C4), 153.21 (Guanin-C2), 175.25 (Guanin-C6); MS (FAB): ber.: 284.1 (M+H⁺), gef.: 284.2 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3422, 2927, 1635, 1578, 1396, 1198, 1096, 932; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 223, 262, 344; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v): 0.64

8.2.2.5.4 Synthese von *iso*-2'-Desoxyadenosin (*iso*-dA) **58**

Es wurden 1.20 g (4.24 mmol) 6-Thio-2'-desoxyguanosin **61** in 140 mL Wasser gelöst und mit 9 mL einer Suspension von Raney-Nickel in Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h bei 60°C einer Wasserstoffatmosphäre (1 bar) ausgesetzt (Hydrierapparat). Anschließend wurde durch Celite filtriert und die Celite viermal mit warmem Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (20-50 %)) und anschließend erneut gefriergetrocknet.

Ausbeute: 813 mg (3.24 mmol, 76 %) einer farblosen Watte

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 2.25 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, H2'), 2.63-2.67 (m, 1H, H2''), 3.50-3.62 (m, 2H, H5'), 3.83-3.87 (m, 1H, H4'), 4.36-4.42 (m, 1H, H3'), 4.99 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, 5'-OH), 5.31 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$ Hz, 3'-OH), 6.28 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, H1'), 6.55 (s, 2H, NH₂), 8.30 (s, 1H, *iso*-Adenin-H8), 8.60 (s, 1H, *iso*-Adenin-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 39.59 (C2'), 62.02 (C5'), 71.08 (C3'), 82.80 (C1'), 88.03 (C4'), 127.41 (*iso*-Adenin-C5), 141.04 (*iso*-Adenin-C8), 149.58 (*iso*-Adenin-C6), 153.10 (*iso*-Adenin-C4), 160.81 (*iso*-Adenin-C2); MS (FAB-HR): ber.: 252.1097 (M+H⁺), gef.: 252.1112 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3323, 3205, 2927, 1621, 1585, 1431, 1092, 937, 793; UV (H₂O): λ_{max} [nm]: 219, 243, 305; DC: R_F-Wert (Ethylacetat/Methanol 1 : 1 v/v): 0.42

8.2.3 Synthese der geschützten Vorläufer 65-67 und 68,69 sowie der entsprechenden *cycloSal*-Nucleotide 79-81 und 82-84

8.2.3.1 Synthese von 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal 65

8.2.3.1.1 Synthese von 3-Bromsalicylalkohol 70

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 aus Kapitel 8.2.1.1 durchgeführt.

Es wurden 50.0 mL (81.5 g, 0.471 mol) *ortho*-Bromphenol, 68.9 g (0.565 mol) Phenylboronsäure, insgesamt 170 g (5.66 mol) *para*-Formaldehyd (in sechs Portionen, Abweichung von der AAV 1), 17.6 mL (17.5 g, 0.236 mol) Propionsäure, 1000 mL Toluol, 340 mL THF und 340 mL 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung eingesetzt. Die Reaktionszeit bei der Synthese des Dioxaborins 71 wurde auf 18 h und das Intervall zwischen den Zugaben von *para*-Formaldehyd auf 3 h verlängert. Das Dioxaborin 71 (98.2 g eines dunkelroten Öls als Rohprodukt, 100 % Ausbeute: 136 g) wurde vor der Oxidation nicht gereinigt und auch nicht charakterisiert. Die Reinigung des Rohproduktes aus der Oxidation erfolgte durch mehrfache Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-2 %)).

Ausbeute: 50.5 g (0.248 mol, 53 % über 2 Stufen) eines gelb-braunen Öls, das nach einigen Tagen bei -20°C kristallisierte

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 4.58 (s, 2H, Benzyl-H), 6.80 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.25-7.32 (m, 1H, H6), 7.40 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 59.48 (Benzyl-C), 110.76 (C3), 121.04 (C5), 126.89 (C6), 131.02 (C4), 131.40 (C1), 150.90 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 202 (M), gef.: 202 (M, 25 %), 184 (100), 156 (14), 105 (83), 94 (17), 77 (47), 63 (12), 51 (20); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3394, 3142, 2866, 1601, 1453, 1329, 1316, 1242, 1230, 1206, 1122, 1027, 840, 751, 717, 647; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 229, 278; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.13

8.2.3.1.2 Versuch der Synthese von 3-Bromsalicylsäure **72**^[108]

Es wurden 3.00 g (8.70 mmol) Quecksilber(II)-nitrat in 30 mL siedendem Wasser gelöst und mit einer Lösung von 1.32 g (9.56 mmol) Salicylsäure in 30 mL heißem Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde einige Minuten gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend wurde er in 20 mL Eisessig gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 0.45 mL (1.4 g, 8.7 mmol) Brom, gelöst in 5 mL Eisessig, versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend in 50 mL Wasser gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Es wurden 1.52 g eines farblosen Feststoffs erhalten, bei dem es sich laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum jedoch nicht um das gewünschte Produkt handelte. Vielmehr deutete das Spektrum auf noch verunreinigte 3,5-Dibromsalicylsäure als erhaltenes Produkt hin.

8.2.3.1.3 Synthese von 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel **8.2.1.3** durchgeführt.

Es wurden 45.4 g (0.224 mol) 3-Bromsalicylalkohol **70**, 139 mL (117 g, 1.12 mol) 2,2-Dimethoxypropan, 4.26 g (22.4 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, 89.6 g wasserfreies Natriumsulfat und 900 mL Aceton eingesetzt.

Ausbeute: 54.0 g (0.222 mol, 99 %) eines braunen Öls, welches bei -20°C fest vorlag

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 1.52 (s, 6H, Acetal- CH_3), 4.86 (s, 2H, Benzyl-H), 6.87 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H5), 7.11 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H6), 7.46 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 24.75 (Acetal- CH_3), 60.09 (Benzyl-C), 100.81 (Acetal-C), 110.02 (C3), 121.52 (C5), 121.81 (C1), 124.74 (C6), 131.40 (C4), 147.60 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 242 (M), gef.: 242 (M, 25 %), 184 (100), 156 (6), 105 (45), 77 (26), 51 (16); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 227, 276, 283; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.64

8.2.3.2 Synthese von 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal 66

8.2.3.2.1 Synthese von 5-Bromsalicylalkohol 73

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel 8.2.1.2 durchgeführt.

Es wurden 8.00 g (39.8 mmol) 5-Bromsalicylaldehyd, gelöst in 60 mL abs. THF, und 1.35 g (35.5 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 100 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 7.15 g (35.2 mmol, 89 %) eines schwach gelblichen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 4.47 (s, 2H, Benzyl-H), 5.20 (s, 1H, Benzyl-OH), 6.74 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, H3), 7.21 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, H4), 7.41 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, H6), 9.70 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 57.79 (Benzyl-C), 110.19 (C5), 116.74 (C3), 129.54 (C6), 129.81 (C4), 131.74 (C1), 153.47 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 202 (M), gef.: 202 (M, 35 %), 184 (100), 156 (55), 94 (12), 77 (84), 63 (12), 51 (28); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3438, 3150, 1482, 1431, 1407, 1268, 1181, 1126, 1011, 1000, 898, 819, 633; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 230, 284; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.13

8.2.3.2.2 Synthese von 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal 66

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel 8.2.1.3 durchgeführt.

Es wurden 7.50 g (36.9 mmol) 5-Bromsalicylalkohol **73**, 5.1 mL (4.3 g, 41 mmol) 2,2-Dimethoxypropan (Abweichung von der AAV 3), 702 mg (3.69 mmol) *para*-Toluol-

sulfonsäure-Monohydrat, 14.8 g wasserfreies Natriumsulfat und 150 mL Aceton eingesetzt.

Ausbeute: 6.40 g (26.3 mmol, 71 %) eines gelblichen Öls, welches bei -20°C fest vorlag

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 1.54 (s, 6H, Acetal- CH_3), 4.81 (s, 2H, Benzyl-H), 6.71 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz, H3), 7.10-7.12 (m, 1H, H6), 7.25-7.27 (m, 1H, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 24.61 (Acetal- CH_3), 60.37 (Benzyl-C), 99.80 (Acetal-C), 112.40 (C5), 118.93 (C3), 121.37 (C1), 127.35 (C6), 131.00 (C4), 150.34 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 242 (M), gef.: 242 (M, 54 %), 184 (94), 156 (63), 77 (23), 51 (17), 43 (12); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 230, 283; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.60

8.2.3.3 Synthese von 3,5-Dibromsalicylaldehyd 67

8.2.3.3.1 Synthese von 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester 75

Es wurden 10.1 g (34.1 mmol) 3,5-Dibromsalicylsäure in 85 mL Methanol gelöst und bei 0°C vorsichtig mit 17 mL (0.30 mol) konz. Schwefelsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 h unter Rückfluß erhitzt, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und in 350 mL Eiswasser gegossen. Der resultierende Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und abschließend gründlich im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 9.65 g (31.1 mmol, 91 %) eines schwach gelblichen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 3.99 (s, 3H, OCH_3), 7.84 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, H4), 7.94 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, H6), 11.38 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 53.08 (OCH_3), 110.74 (C3), 112.31 (C5), 114.41 (C1), 131.51 (C6), 140.92 (C4), 157.36 (C2), 169.14 (C=O); MS (EI, m/z): ber.: 310 (M), gef.: 310 (M, 50 %), 278 (100), 250 (17), 222 (7), 197 (12), 170 (6), 141 (12), 62 (13); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3413, 3067, 2954, 1679, 1600, 1442, 1350, 1315, 1240, 1195, 1168, 967,

890, 791, 726, 682; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 228, 325; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.72

8.2.3.3.2 Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol 74

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel 8.2.1.2 durchgeführt.

Es wurden 8.00 g (25.8 mmol) 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75**, gelöst in 60 mL abs. THF, und 1.00 g (26.4 mmol) Lithiumaluminiumhydrid (Abweichung von der AAV 2), suspendiert in 100 mL abs. THF, eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde lediglich 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend nicht unter Rückfluß erhitzt. Zur Phasentrennung bei der Extraktion war die Sättigung der wässrigen Phase mit Natriumchlorid erforderlich.

Ausbeute: 5.14 g (18.2 mmol, 71 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 4.55 (s, 2H, Benzyl-H), 7.45 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, H6), 7.60 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 58.77 (Benzyl-C), 111.31 (C3), 111.83 (C5), 129.18 (C6), 132.38 (C4), 133.93 (C1), 150.27 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 282 (M), gef.: 282 (M, 26 %), 183 (29), 155 (18), 75 (14), 63 (11), 50 (7), 39 (6); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3420, 3073, 2935, 2879, 1590, 1567, 1470, 1455, 1268, 1242, 1143, 1017, 861, 683; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 230, 289; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.20

8.2.3.3.3 Versuch der Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol 74 durch direkte Reduktion von 3,5-Dibromsalicylsäure mit Lithiumaluminiumhydrid

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel 8.2.1.2 durchgeführt.

Es wurden 10.1 g (34.1 mmol) 3,5-Dibromsalicylsäure, gelöst in 60 mL abs. THF, und 2.61 g (68.8 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 100 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 6.28 g eines gelben Feststoffs, laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Gemisch aus 37 % 3,5-Dibromsalicylalkohol **74**, 10 % 3-Bromsalicylalkohol **70** und 53 % 5-Bromsalicylalkohol **73**

8.2.3.3.4 Versuch der Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkohol **74** durch Reduktion von 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75** mit Calciumborhydrid^[109]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 551 mg (4.96 mmol) wasserfreies Calciumchlorid in 5 mL abs. Ethanol gelöst und auf -10°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von 518 mg (13.7 mmol) Natriumborhydrid in 13 mL abs. Ethanol bei -10°C gegeben. Das Gemisch wurde noch 30 min. bei -10°C gerührt und anschließend bei dieser Temperatur mit einer Suspension von 505 mg (1.63 mmol) 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75** in 5 mL abs. Ethanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung (Dichlormethan) ergab jedoch, daß keine Umsetzung des Edukts **75** stattfand.

8.2.3.3.5 Synthese von 3,5-Dibromsalicylalkoholisopropylidenacetal **67**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel **8.2.1.3** durchgeführt.

Es wurden 4.01 g (14.2 mmol) 3,5-Dibromsalicylalkohol **74**, 8.8 mL (7.4 g, 71 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 278 mg (1.46 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, 5.7 g wasserfreies Natriumsulfat und 55 mL Aceton eingesetzt.

Ausbeute: 4.36 g (13.5 mmol, 95 %) eines gelb-braunen Öls, welches bei -20°C fest vorlag

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 1.58 (s, 6H, Acetal-CH₃), 4.81 (s, 2H, Benzyl-H), 7.07-7.08 (m, 1H, H₆), 7.55-7.56 (m, 1H, H₄); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 24.66 (Acetal-CH₃), 59.74 (Benzyl-C), 101.32 (Acetal-C), 111.12 (C₃), 111.80 (C₅), 123.62 (C₁), 127.52 (C₆), 133.09 (C₄), 147.20 (C₂); MS (EI, m/z): ber.: 322 (M); gef.: 322 (M, 17 %), 264 (100), 236 (10), 183 (20), 155 (14), 75 (15), 50 (8), 43 (12); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 229, 286, 294; DC: R_f-Wert (Dichlormethan): 0.74

8.2.3.4 Versuche zur Entschützung Isopropyliden-geschützter Salicylalkohol-Derivate

Es wurde 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66** als Modellsubstanz gewählt und unter verschiedenen Bedingungen zum 5-Bromsalicylalkohol **73** entschützt.

8.2.3.4.1 mit TFA in Dichlormethan

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 112 mg (0.461 mmol) 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66**, 0.59 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (1.1 mmol TFA) und 11 mL Dichlormethan als Lösungsmittel (Abweichung von der AAV 4) eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

Ausbeute: 14 mg (69 μ mol, 15 %) eines schwach gelblichen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.3.2.1** angegebenen.

8.2.3.4.2 mit TFA und 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Dichlormethan

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 107 mg (0.440 mmol) 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66**, 0.56 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (1.1 mmol TFA) und 10 mL Dichlormethan als Lösungsmittel (Abweichung von der AAV 4) eingesetzt. Außerdem wurden dem Reaktionsgemisch 554 mg einer 50 %-igen Suspension von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Wasser (1.40 mmol 2,4-Dinitrophenylhydrazin) zugefügt. Die Reaktionszeit betrug 20 h. Vor dem Evaporieren des Reaktionsgemisches am Rotationsverdampfer wurde dieses filtriert und der Rückstand mit Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 67 mg eines noch leicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin verunreinigten gelb-bräunlichen Schaums

Die spektroskopischen Daten entsprachen bis auf die Verunreinigung den in Kapitel **8.2.3.2.1** angegebenen.

8.2.3.4.3 mit TFA in Dichlormethan/Methanol

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 129 mg (0.531 mmol) 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66**, 0.68 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (1.3 mmol TFA) und 12 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 38 h.

Ausbeute: 96 mg (0.47 mmol, 89 %) eines schwach gelblichen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.3.2.1** angegebenen.

8.2.3.4.4 mit TFA und 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Dichlormethan/Methanol

mit 3.1 Äquiv. 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 127 mg (0.522 mmol) 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66**, 0.67 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (1.3 mmol TFA) und 12 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Außerdem wurden dem Reaktionsgemisch 639 mg einer 50 %-igen Suspension von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Wasser (1.61 mmol 2,4-Dinitrophenylhydrazin) zugefügt. Die Reaktionszeit betrug 38 h. Vor dem Evaporieren des Reaktionsgemisches am Rotationsverdampfer wurde dieses filtriert und der Rückstand mit Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 93 mg eines noch leicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin verunreinigten hellbraunen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprachen bis auf die Verunreinigung den in Kapitel **8.2.3.2.1** angegebenen.

mit 1.0 Äquiv. 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 173 mg (0.712 mmol) 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66**, 0.91 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (1.8 mmol TFA) und 18 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Außerdem wurden dem Reaktionsgemisch 282 mg einer 50 %-igen Suspension von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Wasser (0.712 mmol 2,4-Dinitrophenylhydrazin) zugefügt. Die Reaktionszeit betrug 42 h. Vor dem Evaporieren des Reaktionsgemisches am Rotationsverdampfer wurde dieses filtriert und der Rückstand mit Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 121 mg eines noch leicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin verunreinigten hellbraunen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprachen bis auf die Verunreinigung den in Kapitel **8.2.3.2.1** angegebenen.

8.2.3.4.5 mit saurem Ionentauscher in Dichlormethan/Methanol

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel **8.2.1.5** durchgeführt.

Es wurden 106 mg (0.436 mmol) 5-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **66**, 12.0 g Dowex 50 X 8 und 20 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 h. Die Reinigung des Produkts erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan).

Ausbeute: 61 mg (0.30 mmol, 69 %) eines schwach gelblichen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.3.2.1** angegebenen.

8.2.3.5 Synthese der Silyl-geschützten Salicylalkohol-Derivate 68,69

8.2.3.5.1 Synthese von Bis-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5-bromsalicylalkohol 68

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 2.09 g (10.3 mmol) 5-Bromsalicylalkohol **73** in 50 mL abs. Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit 6.43 g (42.7 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Chlorid) sowie 4.82 g (70.8 mmol) Imidazol versetzt. Die resultierende Lösung wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschicht-chromatographisch verfolgt (Dichlormethan). Zum Abbruch der Reaktion wurden bei 0°C 20 mL Methanol zugegeben und das Gemisch anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Wasser und Dichlormethan aufgenommen. Nach Trennung der Phasen wurde die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer sowie im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert und durch Säulenfiltration (Dichlormethan) gereinigt.

Ausbeute: 3.42 g (7.92 mmol, 77 %) eines farblosen Öls

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 0.12 (s, 6H, Silyl- CH_3), 0.22 (s, 6H, Silyl- CH_3), 0.97 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 1.00 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 4.71 (s, 2H, Benzyl-H), 6.62 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, H3), 7.21 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, H4), 7.55-7.57 (m, 1H, H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): -5.23 (Silyl- CH_3), -4.34 (Silyl- CH_3), 25.67 (*t*-Bu- CH_3), 25.94 (*t*-Bu- CH_3), 59.73 (Benzyl-C), 113.02 (C5), 120.42 (C3), 129.66 (C4), 130.58 (C6), 134.35 (C1), 151.12 (C2); MS (FAB): ber.: 431.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 431.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 227, 279; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.80

8.2.3.5.2 Synthese von Bis-*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-5-bromsalicylalkohol **69**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 2.04 g (10.0 mmol) 5-Bromsalicylalkohol **73** in 50 mL abs. Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit 10.7 mL (11.5 g, 41.8 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid) sowie 4.78 g (70.2 mmol) Imidazol versetzt. Die resultierende Lösung wurde 4 d bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Petrolether/Ethylacetat 5 : 1 v/v oder Dichlormethan). Zum Abbruch der Reaktion wurden bei 0°C 20 mL Methanol zugegeben, das Gemisch für 10 min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit Toluol coevaporiert und in Wasser und Dichlormethan aufgenommen. Nach Trennung der Phasen (erst nach Zusatz von Natriumchlorid möglich) wurde die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Dichlormethan 10 : 1 v/v), wobei die Abtrennung des TBDPS-Methylethers äußerst schwierig war.

Ausbeute: 1.65 g (2.43 mmol, 24 %) eines farblosen Öls, das nach einigen Tagen bei 4°C kristallisierte, sowie 6.88 g eines farblosen Öls, welches nach längerer Zeit bei 4°C ebenso kristallisierte, als Gemisch aus dem Produkt **69** und dem TBDPS-Methylether, berechneter Gehalt an **69** 3.68 g (5.41 mmol)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 0.89 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 1.16 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 4.93 (s, 2H, Benzyl-H), 6.20-6.23 (m, 1H, Aryl-H3), 6.92 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz, Aryl-H4), 7.31-7.35 (m, 4H, TBDPS-H4), 7.38-7.47 (m, 8H, TBDPS-H3, TBDPS-H5), 7.57-7.59 (m, 4H, TBDPS-H2, TBDPS-H6), 7.71-7.74 (m, 5H, Aryl-H6, TBDPS-H2, TBDPS-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 18.76 (*t*-Bu-C), 18.89 (*t*-Bu-C), 25.97 (*t*-Bu- CH_3), 26.66 (*t*-Bu- CH_3), 60.82 (Benzyl-C), 112.89 (Aryl-C5), 119.67 (Aryl-C3), 128.01 (TBDPS-C3, TBDPS-C5), 128.13 (TBDPS-C3,

TBDPS-C5), 129.26 (Aryl-C4), 130.08 (TBDPS-C4), 130.40 (TBDPS-C4), 131.13 (TBDPS-C1), 132.50 (TBDPS-C1), 133.29 (Aryl-C1), 134.47 (Aryl-C6), 134.81 (TBDPS-C2, TBDPS-C6), 134.99 (TBDPS-C2, TBDPS-C6), 150.61 (Aryl-C2); MS (FAB): ber.: 431.1 (M+H⁺), gef.: 431.1 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3069, 2964, 2928, 2857, 1590, 1483, 1471, 1427, 1374, 1264, 1245, 1185, 1113, 1086, 1068, 917, 854, 825, 810, 740, 727, 701, 690, 615, 504, 487; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 225; DC: R_f-Wert (Petrolether/Ethylacetat 5 : 1 v/v): 0.54, R_f-Wert (Dichlormethan): 0.78, R_f-Wert (Hexan/Dichlormethan 10 : 1 v/v): 0.11

8.2.3.6 Synthese der Saligenylchlorphosphite 76-78

8.2.3.6.1 Synthese von 3-Bromsaligenylchlorphosphit 76

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.01 g (4.97 mmol) 3-Bromsalicylalkohol **70**, 0.51 mL (0.80 g, 5.8 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.91 mL (0.89 g, 11 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 4.6 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 830 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.38 g)

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 4.99-5.05 (m, 1H, Benzyl-H), 5.41-5.46 (m, 1H, Benzyl-H'), 6.93-6.96 (m, 1H, H6), 6.98 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H5), 7.51-7.54 (m, 1H, H4); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 60.94 (d, ²J_{CP} = 2.0 Hz, Benzyl-C), 113.64 (d, ³J_{CP} = 3.1 Hz, C3), 124.50 (C5), 124.83 (d, ³J_{CP} = 2.0 Hz, C1), 125.47 (C6), 133.00 (C4), 133.94 (C2); ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 141.26

8.2.3.6.2 Synthese von 5-Bromsaligenylchlorphosphit 77

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 501 mg (2.45 mmol) 5-Bromsalicylalkohol **73**, 0.26 mL (0.41 g, 3.0 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.46 mL (0.45 g, 5.7 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 2.3 mL abs. Diethylether, und 20 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 444 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 653 mg)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 5.01 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.8$ Hz, Benzyl-H), 5.40 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.2$ Hz, Benzyl-H'), 6.88 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, H3), 7.14 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H6), 7.38 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 140.32

8.2.3.6.3 Synthese von 3,5-Dibromsaligenylchlorphosphit 78

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (3.55 mmol) 3,5-Dibromsalicylalkohol **74**, 0.37 mL (0.58 g, 4.2 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.61 mL (0.60 g, 7.6 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 3 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.20 g eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.23 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 5.00 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.5$ Hz, Benzyl-H), 5.40 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, Benzyl-H'), 7.09-7.11 (m, 1H, H6), 7.66 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 60.32 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, Benzyl-C), 114.64 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C3), 116.23 (C5), 124.26 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.3$ Hz, C1), 127.65 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, H6), 135.20 (C4), 145.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 140.57

8.2.3.7 Synthese der *cycloSal*-d4T-Monophosphate 79-81

8.2.3.7.1 Synthese von 3-Brom-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3-Br-*cycloSal*-d4TMP) 79

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt.

Es wurden 102 mg (0.455 mmol) d4T **4**, 244 mg noch verunreinigtes 3-Bromsaligenylchlorphosphit **76**, 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.28 mL einer 5.5 M

Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 76 mg (0.16 mmol, 35 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.63 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.68 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 4.26-4.42 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.96-5.01 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.53-5.60 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.03-6.06 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.38-6.45 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.80-6.83 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.16-7.20 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Thymin-H6), 7.32-7.35 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H6), 7.69-7.72 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.99 (1 x Thymin- CH_3), 12.07 (1 x Thymin- CH_3), 68.38 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 68.82 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x C5'), 68.98 (1 x C5'), 84.16 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x C4'), 89.35 (1 x C1'), 89.39 (1 x C1'), 109.81 (2 x Thymin-C5), 111.28 (2 x Aryl-C3), 123.73 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 2 x Aryl-C1), 125.90 (2 x Aryl-C5), 125.95 (2 x Aryl-C6), 127.58 (2 x C2'), 132.81 (1 x C3'), 132.89 (1 x C3'), 133.27 (1 x Aryl-C4), 133.30 (1 x Aryl-C4), 135.77 (1 x Thymin-C6), 135.83 (1 x Thymin-C6), 148.87 (2 x Aryl-C2), 150.84 (2 x Thymin-C2), 163.87 (2 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.05, -8.07; MS (FAB): ber.: 471.0 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 471.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.38; HPLC: $t_R = 13.9$ min. (Methode I)

8.2.3.7.2 Synthese von 5-Brom-cycloSal-d4T-monophosphat (5-Br-cycloSal-d4TMP) 80

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 126 mg (0.558 mmol) d4T **4**, 280 mg noch verunreinigtes 5-Bromsalicylchlorphosphit **77** (gelöst in 1.2 mL abs. Acetonitril), 0.19 mL (0.14 g, 1.1 mmol) DIPEA, 0.34 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.9 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 14 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 75 mg (0.16 mmol, 29 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.66 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.70 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 4.27-4.38 (m, 2 x 2H, 2 x $\text{H5}'$), 4.95-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x $\text{H4}'$), 5.39 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.42 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.47-5.52 (m, 1 x 1H, 1 x Benzyl- H'), 5.53 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.2$ Hz, 1 x Benzyl- H'), 6.02-6.06 (m, 2 x 1H, 2 x $\text{H2}'$), 6.38-6.44 (m, 2 x 1H, 2 x $\text{H3}'$), 6.80-6.83 (m, 2 x 1H, 2 x $\text{H1}'$), 7.11 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, 1 x Aryl- H3), 7.14 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl- H3), 7.18 (q, 1 x 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1 x Thymin- H6), 7.20 (q, 1 x 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1 x Thymin- H6), 7.55-7.59 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl- H4 , 2 x Aryl- H6), 11.37 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 12.03 (1 x Thymin- CH_3), 12.10 (1 x Thymin- CH_3), 67.70 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 67.85 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.71 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x $\text{C5}'$), 68.77 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x $\text{C5}'$), 84.19 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x $\text{C4}'$), 84.27 (1 x $\text{C4}'$), 89.39 (2 x $\text{C1}'$), 109.83 (1 x Thymin- C5), 109.85 (1 x Thymin- C5), 116.29 (2 x Aryl- C5), 120.51 (1 x Aryl- C3), 120.60 (1 x Aryl- C3), 123.72 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl- C1), 123.85 (1 x Aryl- C1), 127.52 (1 x $\text{C2}'$), 127.54 (1 x $\text{C2}'$), 129.13 (1 x Aryl- C4), 129.15 (1 x Aryl- C4), 132.67 (1 x Aryl- C6), 132.75 (1 x Aryl- C6), 132.90 (1 x $\text{C3}'$), 132.97 (1 x $\text{C3}'$), 135.85 (2 x Thymin- C6), 148.97 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl- C2), 150.85 (1 x Thymin- C2), 150.88 (1 x Thymin- C2), 163.88 (2 x Thymin- C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_6): -8.62, -8.68; MS (FAB): ber.: 471.0 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 471.0 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.36; HPLC: $t_R = 14.6$ min. (Methode I)

8.2.3.7.3 Synthese von 3,5-Dibrom-cycloSal-d4T-monophosphat (3,5-Di-Br-cycloSal-d4TMP) 81

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.446 mmol) d4T **4**, zunächst 293 mg noch verunreinigtes 3,5-Dibromsaligenylchlorphosphit **78** (gelöst in 1.0 mL abs. Acetonitril), 0.19 mL (0.14 g, 1.1 mmol) DIPEA und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt. Da die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung auf unvollständigen Umsatz von d4T **4** hinwies, wurde in Abweichung von der AAV 7 vor der Oxidation erneut auf -20°C abgekühlt, weitere 100 mg noch verunreinigtes 3,5-Dibromsaligenylchlorphosphit **78** (gelöst in 0.3 mL abs. Acetonitril) wurden zugegeben, das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und nochmals 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende

Oxidation erfolgte gemäß der AAV 7 mit 0.28 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid).

Ausbeute: 99 mg (0.18 mmol, 40 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.5

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.65 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.69 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 4.28-4.40 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.97-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.40-5.45 (m, 2 x 1H, 2 x Benzyl-H), 5.54 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.3$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.57 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.6$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.04-6.07 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.39-6.44 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.81-6.83 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.18 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.20 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.61 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-H6), 7.98 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 11.36 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.06 (2 x Thymin- CH_3), 67.79 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.2$ Hz, 2 x Benzyl-C), 69.16 (2 x C5'), 84.13 (2 x C4'), 89.40 (2 x C1'), 109.86 (2 x Thymin-C5), 114.08 (2 x Aryl-C3), 116.63 (2 x Aryl-C5), 125.30 (2 x Aryl-C1), 127.64 (2 x C2'), 128.80 (2 x Aryl-C6), 132.81 (2 x C3'), 135.01 (2 x Aryl-C4), 135.03 (2 x Thymin-C6), 148.12 (2 x Aryl-C2), 150.87 (2 x Thymin-C2), 163.88 (2 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.57, -8.59; MS (FAB): ber.: 550.9 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 550.7 ($\text{M}+\text{H}^+$); DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.45

8.2.3.8 Synthese der *cycloSal*-BVDU-Monophosphate 82-84

8.2.3.8.1 Synthese von 3-Brom-*cycloSal*-BVDU-monophosphat (3-Br-*cycloSal*-BVDUMP) 82

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, 145 mg noch verunreinigtes 3-Bromsali-genylchlorphosphit **76**, 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 83 mg (0.15 mmol, 42 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.18-2.25 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.95-3.98 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.22-4.46 (m, 2 x 3H, 2 x H3', 2 x H5'), 5.43-5.63 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.16 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1 x H1'), 6.19 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1 x H1'), 6.87 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.90 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.16 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 2 x Aryl-H5), 7.28-7.33 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H6, 2 x BVU-H8), 7.67-7.70 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.77 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.79 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.61 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 39.95 (2 x C2'), 68.26 (1 x Benzyl-C), 68.35 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.58 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x C5'), 69.77 (1 x C3'), 69.82 (1 x C3'), 84.48 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 2 x C4'), 84.77 (2 x C1'), 107.11 (2 x BVU-C8), 110.26 (1 x BVU-C5), 110.34 (1 x BVU-C5), 111.21 (1 x Aryl-C3), 111.29 (1 x Aryl-C3), 123.30 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 1 x Aryl-C1), 125.84 (2 x Aryl-C5), 125.88 (2 x Aryl-C6), 129.92 (2 x BVU-C7), 133.20 (1 x Aryl-C4), 133.22 (1 x Aryl-C4), 139.41 (1 x BVU-C6), 139.52 (1 x BVU-C6), 149.33 (2 x Aryl-C2), 149.90 (1 x BVU-C2), 149.92 (1 x BVU-C2), 161.74 (1 x BVU-C4), 161.76 (1 x BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.36, -8.42; MS (FAB): ber.: 580.9 (M+H $^+$), gef.: 581.1 (M+H $^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 250, 293; DC: R $_f$ -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.42; HPLC: t $_R$ = 16.1, 16.3 min. (Methode I)

8.2.3.8.2 Synthese von 5-Brom-cycloSal-BVDU-monophosphat (5-Br-cycloSal-BVDUMP) 83

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 121 mg (0.363 mmol) BVDU **15**, 130 mg noch verunreinigtes 5-Bromsalicylchlorphosphit **77**, 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 42 mg (75 μmol , 21 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.14-2.24 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.93-3.97 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.24-4.43 (m, 2 x 3H, 2 x H3', 2 x H5'), 5.42-5.56 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.17 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1 x H1'), 6.18 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1 x H1'), 6.86 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.89 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.11 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.12 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.31 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.32 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.54-7.58 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6), 7.78 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.80 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.61 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 39.95 (2 x C2'), 67.91 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 68.08 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 2 x C5'), 69.78 (1 x C3'), 69.84 (1 x C3'), 84.51 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x C4'), 84.85 (2 x C1'), 107.14 (2 x BVU-C8), 110.27 (1 x BVU-C5), 110.30 (1 x BVU-C5), 116.28 (1 x Aryl-C5), 116.31 (1 x Aryl-C5), 120.48 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 2 x Aryl-C1), 120.52 (1 x Aryl-C3), 120.60 (1 x Aryl-C3), 129.04 (2 x Aryl-C4), 129.89 (2 x BVU-C7), 132.59 (1 x Aryl-C6), 132.66 (1 x Aryl-C6), 139.47 (1 x BVU-C6), 139.50 (1 x BVU-C6), 148.87 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 149.33 (1 x BVU-C2), 149.36 (1 x BVU-C2), 161.74 (1 x BVU-C4), 161.76 (1 x BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.85, -8.96; MS (FAB): ber.: 580.9 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 580.9 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 226, 250, 291; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.40; HPLC: $t_R = 17.0$ min. (Methode I)

8.2.3.8.3 Synthese von 3,5-Dibrom-cycloSal-BVDU-monophosphat (3,5-Di-Br-cycloSal-BVDUMP) 84

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, zunächst 187 mg noch verunreinigtes 3,5-Dibromsaligenylchlorphosphit **78** (gelöst in 1.0 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v), 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt. Da die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung auf ungenügenden Umsatz von BVDU **15** hinwies, wurde in Abweichung von der AAV 7 vor der Oxidation erneut auf -20°C abgekühlt, weitere 100 mg noch verunreinigtes 3,5-Dibromsaligenylchlorphosphit **78** (gelöst in 0.5 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v) wurden zugegeben, das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und nochmals 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende Oxidation erfolgte gemäß der AAV 7 mit 0.23 mL einer

5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.3 mmol *tert*-Butylhydroperoxid).

Ausbeute: 32 mg (49 μ mol, 14 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.8 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.15-2.26 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.94-3.98 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.23-4.29 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.31-4.47 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.43-5.59 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.16 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 1 x H1'), 6.18 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.85 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.88 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.29 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.31 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.57-7.59 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H6), 7.76 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.79 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.93 (s, 1 x 1H, 1 x Aryl-H4), 7.96 (s, 1 x 1H, 1 x Aryl-H4), 11.61 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 38.84 (2 x C2'), 67.94 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.01 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.49 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.4$ Hz, 2 x C5'), 69.71 (1 x C3'), 69.79 (1 x C3'), 84.45 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, 2 x C4'), 84.79 (1 x C1'), 84.83 (1 x C1'), 107.09 (1 x BVU-C8), 107.11 (1 x BVU-C8), 110.22 (1 x BVU-C5), 110.34 (1 x BVU-C5), 114.14 (1 x Aryl-C3), 114.16 (1 x Aryl-C3), 116.58 (1 x Aryl-C5), 116.68 (1 x Aryl-C5), 124.92 (1 x Aryl-C1), 125.05 (1 x Aryl-C1), 128.64 (1 x Aryl-C6), 128.66 (1 x Aryl-C6), 129.87 (1 x BVU-C7), 129.89 (1 x BVU-C7), 134.94 (2 x Aryl-C4), 139.40 (1 x BVU-C6), 139.52 (1 x BVU-C6), 148.38 (2 x Aryl-C2), 149.32 (1 x BVU-C2), 149.34 (1 x BVU-C2), 161.72 (2 x BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.80, -8.88; MS (FAB): ber.: 658.8 (M+H $^+$); gef.: 658.9 (M+H $^+$); DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.50

8.2.4 Synthese der Bis-(*cycloSal*-Nucleotide) 46,47

8.2.4.1 Synthese des Salicylalkohol-Derivates 91

8.2.4.1.1 Synthese von Bis-*O*-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol 100^[112]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 2.59 g einer 60 %-igen Suspension von Natriumhydrid in Öl (108 mmol Natriumhydrid) in 60 mL abs. THF suspendiert. Zu der hellgrauen Suspension wurde bei 0°C vorsichtig eine Lösung von 5.00 g (26.8 mmol) Biphenyl-2,2'-diol in 20 mL abs. THF getropft. Das hellbraune Reaktionsgemisch wurde nach Erwärmen auf Raumtemperatur noch 1 h gerührt. Anschließend wurden bei 0°C 13.5 mL der Chlormethylmethylether-Lösung in Methylacetat (vergl. Kapitel 8.2.2.1, etwa 81 mmol Chlormethylmethylether) vorsichtig zugegeben. Die Suspension verfärbte sich unter Aufschäumen weiß-gelblich. Nach erneutem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch noch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden vorsichtig bei 0°C 50 mL Wasser zugegeben. Es wurde eine klare braune Lösung erhalten, die noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Zugabe von 100 mL Diethylether wurden die Phasen getrennt. Die wäßrige Phase wurde noch dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 1 M Natronlauge sowie je einmal mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde ein braunes Öl erhalten, welches zunächst durch Säulenfiltration (Dichlormethan) und dann säulenchromatographisch (Dichlormethan) gereinigt wurde.

Ausbeute: 4.88 g (17.8 mmol, 66 %) eines gelben Öls

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 3.25 (s, 6H, CH₃), 5.09 (s, 4H, CH₂), 7.06 (ddd, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H5, H5'), 7.18-7.20 (m, 4H, H3, H3', H6, H6'), 7.30-7.34 (m, 2H, H4, H4'); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 55.52 (CH₃), 95.56 (CH₂), 115.23 (C3, C3'), 121.52 (C5, C5'), 128.70 (C4, C4'), 128.73 (C1, C1'), 131.34 (C6, C6'), 154.55 (C2, C2'); MS (EI, m/z): ber.: 274 (M), gef.:

274 (M, 26 %), 211 (11), 198 (100), 169 (33), 139 (10), 118 (13), 45 (85);
UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 235, 276; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.16

8.2.4.1.2 Synthese von 3,3'-Bis-formyl-bis-O-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **101**^[112]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 10.1 g (36.8 mmol) Bis-O-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **100** in 440 mL abs. Diethylether gelöst, bei Raumtemperatur mit 76.7 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (123 mmol *n*-Butyllithium) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die braune Suspension auf 0°C abgekühlt, zügig mit 11.1 mL (10.4 g, 142 mmol) abs. DMF versetzt und erneut auf Raumtemperatur erwärmt. Die resultierende milchig-gelbe Suspension wurde noch 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 600 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung bei 0°C abgebrochen. Nach der Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene orange-braune Öl wurde zunächst durch Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-10 %)) und anschließend durch Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-2 %)) gereinigt. Die dabei erhaltene Mischfraktion wurde zusätzlich am Chromatotron getrennt (zunächst Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-10 %), dann Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)). Trotz der aufwendigen chromatographischen Reinigung konnte das Produkt **101** nicht ganz rein erhalten werden, so daß es noch mit Nebenprodukten verunreinigt für die nachfolgende Synthese von 3,3'-Bis-formyl-biphenyl-2,2'-diol **99** eingesetzt werden mußte.

Ausbeute: 9.66 g eines noch verunreinigten gelben Feststoffs

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 3.16 (s, 6H, CH₃), 4.81 (s, 4H, CH₂), 7.37 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ³J_{HH} = 7.7 Hz, H5, H5'), 7.68 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H6, H6'), 7.93 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H4, H4'), 10.44 (s, 2H, CHO);

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 57.39 (CH_3), 100.93 (CH_2), 124.73 (C_5 , C_5'), 128.97 (C_4 , C_4'), 130.10 (C_1 , C_1'), 132.51 (C_3 , C_3'), 137.77 (C_6 , C_6'), 157.95 (C_2 , C_2'), 190.11 ($\text{C}=\text{O}$); DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 20 : 1 v/v): 0.73

8.2.4.1.3 Synthese von 3,3'-Bis-formyl-biphenyl-2,2'-diol **99**^[112]

Es wurden 9.50 g noch verunreinigtes 3,3'-Bis-formyl-bis-O-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **101** in der minimal möglichen Menge Dichlormethan gelöst, mit 150 mL Ethanol und 150 mL 6 M Salzsäure (entspricht 900 mmol Chlorwasserstoff) versetzt und 16 h unter Rückfluß erhitzt. Die braune Reaktionslösung wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Nach Zugabe von 250 mL Wasser erfolgte dreimalige Extraktion mit Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene dunkle Rohprodukt wurde durch Säulenfiltration (Dichlormethan) gereinigt. Die dabei angefallene Mischfraktion wurde am Chromatotron getrennt (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 4.27 g (17.6 mmol, 48 % bezogen auf Bis-O-(methoxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **100** über 2 Stufen) eines gelblichen Feststoffs

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.13 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5, H5'), 7.62-7.66 (m, 4H, H4, H4', H6, H6'), 9.96 (s, 2H, CHO), 11.44 (s, 2H, OH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 119.49 (C_5 , C_5'), 120.83 (C_1 , C_1'), 125.06 (C_3 , C_3'), 133.77 (C_4 , C_4'), 138.84 (C_6 , C_6'), 159.08 (C_2 , C_2'), 196.63 ($\text{C}=\text{O}$); MS (EI, m/z): ber.: 242 (M), gef.: 242 (M, 100 %), 214 (31), 195 (19), 168 (13), 139 (28), 128 (20), 77 (5), 63 (7), 51 (8), 40 (30); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3427, 3024, 2872, 1633, 1613, 1426, 1389, 1296, 1267, 1222, 1134, 781, 746, 731, 667; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 233, 340; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 20 : 1 v/v): 0.82

8.2.4.1.4 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91** durch Reduktion von **99**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel **8.2.1.2** durchgeführt.

Es wurden 6.03 g (25.1 mmol) 3,3'-Bis-formyl-biphenyl-2,2'-diol **99**, gelöst in 100 mL abs. THF, und 1.58 g (41.6 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 160 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 5.77 g (23.5 mmol, 94 %) eines gelb-braunen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 4.62 (s, 4H, Benzyl-H), 6.89 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H5, H5'), 7.05 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H6, H6'), 7.26 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H4, H4'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 60.07 (Benzyl-C), 120.11 (C5, C5'), 124.24 (C3, C3'), 126.54 (C1, C1'), 129.57 (C4, C4'), 130.22 (C6, C6'), 153.12 (C2, C2'); MS (EI, m/z): ber.: 246 (M), gef.: 246 (M, 1 %), 214 (35), 200 (66), 181 (58), 152 (50), 139 (22), 128 (45), 115 (49), 102 (11), 91 (28), 77 (39), 63 (26), 51 (32), 39 (100); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3384, 2927, 1589, 1446, 1325, 1228, 1202, 1013, 768, 744; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 225, 243, 284; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.45, R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.09

8.2.4.1.5 Synthese von Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 46.5 g (0.191 mol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** in 400 mL abs. THF gelöst und auf -80°C abgekühlt. Diese Lösung wurde bei -80°C mit 120 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (0.192 mol *n*-Butyllithium) versetzt und für 1 h bei -80°C gerührt. Anschließend wurde sie bei -80°C in eine Lösung von 74.2 g (0.210 mol) Eisen(III)-acetylacetonat in 160 mL abs. THF überführt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 17 h bei

Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 M Salzsäure und Ethylacetat aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wäßrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden viermal mit 2 M Salzsäure sowie je zweimal mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene rötliche Öl wurde durch mehrfache Säulenfiltration (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (25-100 %)) gereinigt.

Ausbeute: 26.2 g (80.4 mmol, 84 %) von **102** als bräunliches Öl und 842 mg (3.82 μ mol, 2 %) des Nebenproduktes 3-*n*-Butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **103** als schwach gelbliches Öl

Daten zur Charakterisierung von **102**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.43 (s, 12H, Acetal- CH_3), 4.87 (s, 4H, Benzyl-H), 6.93 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H5, H5'), 7.02 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H6, H6'), 7.05 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H4, H4'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 24.88 (Acetal- CH_3), 60.41 (Benzyl-C), 99.41 (Acetal-C), 119.72 (C5, C5'), 124.40 (C4, C4'), 126.26 (C1, C1', C3, C3'), 130.10 (C6, C6'), 148.43 (C2, C2'); MS (EI, m/z): ber.: 326 (M), gef.: 326 (M, 25 %), 268 (29), 269 (6), 268 (29), 211 (32), 210 (100), 183 (10), 182 (61), 181 (28), 154 (6), 153 (25), 152 (17), 115 (5), 91 (8), 43 (6); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 226, 282; DC: R_f -Wert (Petrolether/Dichlormethan 3 : 1 v/v): 0.12

Daten zur Charakterisierung von **103**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 0.90 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Butyl-H4), 1.25-1.32 (m, 2H, Butyl-H3), 1.43-1.55 (m, 8H, Acetal- CH_3 , Butyl-H2), 2.48-2.53 (m, 2H, Butyl-H1), 4.81 (s, 2H, Benzyl-H), 6.82 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Aryl-H5), 6.89 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, Aryl-H6), 7.01 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Aryl-H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 13.95 (Butyl-C4), 21.88 (Butyl-C3), 24.78 (Acetal- CH_3), 28.54 (Butyl-C1), 31.67 (Butyl-C2), 60.31 (Benzyl-C), 99.12 (Acetal-C), 119.26 (Aryl-C1), 119.86 (Aryl-C5), 122.62 (Aryl-C6), 128.20 (Aryl-C4),

129.79 (Aryl-C3), 148.66 (Aryl-C2); MS (EI, m/z): ber.: 220 (M), gef.: 220 (M, 71 %), 163 (15), 162 (66), 161 (9), 148 (14), 147 (75), 145 (11), 133 (12), 121 (25), 120 (100), 119 (21), 107 (11), 106 (8), 105 (8), 92 (25), 91 (26), 79 (7), 78 (13), 77 (14), 65 (15), 43 (21); UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 226, 273, 279; DC: R_F-Wert (Petrol-ether/Dichlormethan 3 : 1 v/v): 0.52

*Versuche zur Lithiierung von 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** durch Synthese von 3-Deuterosalicylalkoholisopropylidenacetal **104***

Um die Lithiierungsreaktion in der Synthese von **102** näher zu untersuchen, wurde die Lithiierung im kleinen Maßstab mit drei verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt und schließlich durch Zugabe von Deuteriumoxid abgebrochen.

mit 10 min. Reaktionszeit

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 235 mg (0.967 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** in 5 mL abs. THF gelöst und auf -80°C abgekühlt. Diese Lösung wurde bei -80°C mit 0.60 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (0.96 mmol *n*-Butyllithium) versetzt und für 10 min. bei -80°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Deuteriumoxid abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 30 min gerührt. Nach Zugabe von Wasser und Ethylacetat wurden die Phasen getrennt, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert.

Ausbeute: 125 mg (0.757 mmol, 78 %) eines gelblichen Öls

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 1.48 (s, 6H, Acetal-CH₃), 4.83 (s, 2H, Benzyl-H), 6.91 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H5), 7.06-7.09 (m, 1H, H6), 7.14-7.18 (m, 1H, H4)

mit 30 min. Reaktionszeit

Durchführung wie oben, aber mit 255 mg (1.05 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 0.66 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.1 mmol *n*-Butyllithium) und 30 min. Reaktionszeit vor der Zugabe von Deuteriumoxid.

Ausbeute: 134 mg (0.811 mmol, 77 %) eines gelblichen Öls

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

mit 1 h Reaktionszeit

Durchführung wie oben, aber mit 279 mg (1.15 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 0.72 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.2 mmol *n*-Butyllithium) und 1 h Reaktionszeit vor der Zugabe von Deuteriumoxid.

Ausbeute: 168 mg (1.02 mmol, 89 %) eines gelblichen Öls

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

8.2.4.1.6 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91 durch Entschützung von **102** mit saurem Ionentauscher**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel **8.2.1.5** durchgeführt.

Es wurden 9.78 g (30.0 mmol) Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**, 117 g Dowex 50 X 8 und 400 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt (Abweichung von der AAV 5). Die Reaktionszeit betrug 65 h, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Die Reinigung des Produkts erfolgte mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol-Gradient (3-10 %)).

Ausbeute: 2.08 g (8.45 mmol, 28 %) eines gelb-braunen Feststoffs

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.4.1.4** angegebenen.

Weitere Synthesversuche

Es wurden weitere Versuche zur Entschützung von **102** mit saurem Ionentauscher durchgeführt.

gemäß der AAV 5

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel **8.2.1.5** durchgeführt.

Es wurden 209 mg (0.640 mmol) Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**, 9.8 g Dowex 50 X 8 und 16 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 46 h, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Die Reinigung des Produkts erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-5 %)).

Ausbeute: 58 mg (0.24 mmol, 38 %) von **91** als gelb-brauner Feststoff und 100 mg (0.384 mmol, 60 %) des Nebenproduktes 3-(Methoxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **105** als gelblicher Feststoff

Daten zur Charakterisierung von **91**

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.4.1.4** angegebenen.

Daten zur Charakterisierung von **105**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 3.37 (s, 3H, CH₃), 4.52 (s, 2H, H7), 4.67 (s, 2H, H7'), 6.94 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H5, H5'), 7.09 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H6), 7.12 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H6'), 7.27 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H4), 7.31 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H4'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 57.93 (CH₃), 59.89 (Benzyl-C'), 69.79 (Benzyl-C), 119.80 (C5), 119.82 (C5'), 126.08 (C4'), 126.50 (C4),

126.79 (C3), 127.01 (C1), 128.00 (C1'), 129.40 (C3'), 130.11 (C6'), 130.87 (C6), 151.48 (C2'), 151.79 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 260 (M), gef.: 260 (M, 25 %), 228 (100), 210 (78), 197 (52), 181 (58), 153 (39), 141 (12), 128 (16), 115 (20), 105 (9), 91 (7), 76 (12), 61 (7), 40 (28); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3411, 3215, 2995, 2920, 2869, 1590, 1462, 1443, 1385, 1230, 1071, 1016, 943, 840, 776, 750; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 225, 243, 282; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.38

gemäß der AAV 5, aber mit weniger Ionentauscher

Durchführung wie oben, aber mit 207 mg (0.634 mmol) Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**, 4.9 g Dowex 50 X 8 und 16 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v. Die Reaktionszeit betrug 73 h.

Ausbeute: 70 mg (0.28 mmol, 44 %) von **91** als gelb-brauner Feststoff und 51 mg (0.20 mmol, 32 %) des Nebenproduktes **105** als gelblicher Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

gemäß der AAV 5, aber mit weniger Ionentauscher und weniger Methanol

Durchführung wie oben, aber mit 202 mg (0.619 mmol) Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**, 4.8 g Dowex 50 X 8 und 15 mL Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v. Die Reaktionszeit betrug 67 h. Da die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion ergab, daß noch viel Edukt vorhanden war, sich aber bereits deutlich mehr Nebenprodukt **105** als Produkt **91** im Reaktionsgemisch befand, wurde der Ansatz verworfen.

gemäß der AAV 5, aber mit weniger Ionentauscher und weniger Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit 205 mg (0.628 mmol) Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**, 2.4 g Dowex 50 X 8 und 8 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v. Die Reaktionszeit betrug 45 h.

Ausbeute: 66 mg (0.27 mmol, 43 %) von **91** als gelb-brauner Feststoff und 39 mg (0.15 mmol, 24 %) des Nebenproduktes **105** als gelblicher Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

8.2.4.1.7 Versuch der Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91 durch Entschützung von **102** mit TFA**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 67 mg (0.21 mmol) Bis-(isopropyliden)-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **102**, 0.53 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (1.0 mmol TFA) und 10 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 40 h, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Die Reinigung des Produkts erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %), Abweichung von der AAV 4). Anhand des ¹H-NMR-Spektrums der potentiell produkthaltigen Fraktionen konnte erkannt werden, daß **91** nicht rein erhalten werden konnte.

8.2.4.1.8 Versuch der Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91 durch regioselektive Hydroxymethylierung nach Nagata**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 aus Kapitel **8.2.1.1** durchgeführt.

Es wurden 931 mg (5.00 mol) Biphenyl-2,2'-diol, 1.52 g (12.5 mmol) Phenylboronsäure, insgesamt 3.04 g (101 mmol) *para*-Formaldehyd (in fünf Portionen), 0.37 mL (0.37 g, 5.0 mmol) Propionsäure und 70 mL Toluol eingesetzt. Die Reaktionszeit wurde auf 14 h erhöht. Das ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts aus der Synthese des Bis-Dioxaborins **106** wies jedoch keine produkttypischen Signale auf, so daß auf die nachfolgende Oxidation verzichtet wurde.

8.2.4.2 Versuche zur Synthese der geschützten Saligen-3-yl-boronsäure **108** und der geschützten Saligen-3-yl-boronsäureester **109,110**

8.2.4.2.1 Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure **108**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 250 mg (1.03 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** in 1.5 mL abs. Diethylether gelöst und auf -80°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden bei -80°C 0.77 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.23 mmol *n*-Butyllithium) getropft. Die resultierende Lösung wurde noch 1 h bei -80°C gerührt und dann bei dieser Temperatur über 30 min. in eine Lösung von 0.56 mL (0.47 g, 2.0 mmol) Tris(*n*-butyl)-borat **53** in 1.5 mL abs. Diethylether überführt. Das Reaktionsgemisch wurde noch 1 h bei -80°C gerührt, dann auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser und 1 M Salzsäure bei 0°C abgebrochen ($\text{pH} = 4$). Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Restlicher *n*-Butanol wurde durch zweimaliges Coevaporieren mit Wasser entfernt. Es resultierte ein braunes Öl, von dem sich am Rand jedoch einige farblose Kristalle abschieden, bei denen es sich laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum um das gewünschte Produkt **108** handelte. Der verbliebene Rückstand wurde auf verschiedene Arten versucht zu reinigen: Das Auswaschen mit kaltem *n*-Pentan führte nicht zur vollständigen Entfernung der Nebenprodukte. Bei der Umkristallisation aus Wasser wurde die allmähliche Zersetzung des Produktes beobachtet. Ein anderes Lösungsmittelsystem zur Umkristallisation konnte nicht gefunden werden. Auch der Versuch einer Reinigung am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)) mißlang.

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 1.53 (s, 6H, Acetal- CH_3), 4.84 (s, 2H, Benzyl-H), 6.92 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, H5), 7.12-7.14 (m, 1H, H6), 7.49 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.7 \text{ Hz}$, H4), 7.58 (s, 2H, OH)

8.2.4.2.2 Versuch der Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-pinacolester 109

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 254 mg (1.03 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** in 6 mL abs. DMF gelöst und mit 297 mg (1.17 mmol) Bis-(pinacolato)-diboran, 316 mg (3.22 mmol) Kaliumacetat (zuvor mehrere Stunden bei 120°C getrocknet) sowie zunächst 49 mg (60 µmol) des Katalysators (1,1'-(Bis-diphenylphosphino)-ferrocenyl)-palladium(II)-chlorid (Pd(dppf)Cl₂, Dichlormethan-Addukt) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 45 h bei 80°C gerührt und die Reaktion dabei dünnschicht-chromatographisch verfolgt (Hexan/Dichlormethan 1 : 3 v/v). Da der Umsatz ungenügend erschien, wurden insgesamt weitere 136 mg (0.167 mmol) des Katalysators in drei Portionen über die Reaktionsdauer verteilt zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit je 50 mL Diethylether sowie gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Nach der Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene braune Öl wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)). Die dabei isolierte potentielle Produkt-Fraktion (lediglich 25 mg eines gelben Feststoffs) erwies sich jedoch laut ¹H-NMR-Spektrum als noch stark mit aromatischen Nebenprodukten und Bis-(pinacolato)-diboran verunreinigt.

8.2.4.2.3 Versuch der Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-ethylenglycolester 110 aus einer Aryllithium-Verbindung

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 322 mg (1.32 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** in 2.5 mL abs. Diethylether gelöst und auf -80°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden bei -80°C 1.00 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.60 mmol *n*-Butyllithium) getropft. Die resultierende Lösung wurde noch 30 min. bei -80°C gerührt und dann bei dieser Temperatur langsam in eine Lösung von 0.30 mL (0.28 g, 2.7 mmol)

Trimethylborat in 2.5 mL abs. Diethylether überführt. Das Reaktionsgemisch wurde noch 30 min. bei -80°C gerührt, dann auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 5 mL Ethylenglycol und 5 mL Toluol aufgenommen. Dieses zweiphasige Gemisch wurde unter starkem Rühren 19 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Phasen getrennt und die hydrophile Ethylenglycol-Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten lipophilen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene Rückstand (82 mg eines gelben Öls) wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht, wobei jedoch keine produkttypischen Signale gefunden wurden.

8.2.4.2.4 Versuch der Synthese von Isopropyliden-saligen-3-yl-boronsäure-ethylenglycolesterester 110 aus einem Grignard-Reagenz

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 200 mg (8.23 mmol) Magnesium-Späne langsam mit einer Lösung von 250 mg (1.02 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** in 5 mL abs. THF versetzt. Die Darstellung des Grignard-Reagenzes wurde durch anschließendes einstündiges Erhitzen unter Rückfluß vervollständigt.

Es wurden 0.23 mL (0.21 g, 2.0 mmol) Trimethylborat in 5 mL abs. THF gelöst und auf -80°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde langsam die noch warme Lösung des Grignard-Reagenzes getropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum abkondensiert und der Rückstand mit 3 mL Ethylenglycol und 10 mL Toluol versetzt sowie 18 h unter starkem Rühren unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde die Toluol-Phase abgetrennt und durch Coevaporation mit Dichlormethan vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron (Dichlormethan) gereinigt. Die potentiell produktthaltige Fraktion (91 mg eines gelben Öls) wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht, wobei jedoch keine produkttypischen Signale gefunden wurden.

8.2.4.3 Synthese des Salicylalkohol-Derivates 95

8.2.4.3.1 Synthese von 2,2'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-biphenyl 112^[117,118]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 15.0 g (74.6 mmol) 2-Brom-4-methylanisol in 75 mL abs. THF gelöst und auf -80 °C abgekühlt. Diese Lösung wurde bei -80°C mit 50 mL einer 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (80 mmol *n*-Butyllithium) versetzt und für 10 min. bei -80°C gerührt. Anschließend wurde sie bei -80°C in eine Lösung von 30.1 g (85.2 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat in 30 mL abs. THF überführt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 M Salzsäure und Ethylacetat aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wäßrige Phase einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden viermal mit 2 M Salzsäure sowie zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/Dichlormethan 1 : 3 v/v).

Ausbeute: 7.50 g (31.0 mmol, 83 %) eines gelblichen Öls

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 2.40 (s, 6H, Aryl-CH₃), 3.83 (s, 6H, OCH₃), 6.95 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, H3, H3'), 7.13 (s, 2H, H6, H6'), 7.20 (dd, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H4, H4'); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 20.42 (Aryl-CH₃), 55.82 (OCH₃), 111.06 (C3, C3'), 127.78 (C1, C1'), 128.81 (C4, C4'), 129.42 (C5, C5'), 131.92 (C6, C6'), 154.98 (C2, C2'); MS (EI, m/z): ber.: 242 (M), gef.: 242 (M, 100 %), 212 (14), 195 (11), 40 (33); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 219, 286; DC: R_f-Wert (Petrolether/Dichlormethan 1 : 1 v/v): 0.34

8.2.4.3.2 Synthese von 5,5'-Dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **111**^[117,118]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 7.41 g (30.6 mmol) 2,2'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-biphenyl **112** in 350 mL abs. Dichlormethan gelöst und auf -80°C gekühlt. Bei -80°C wurden 88 mL einer 1 M Lösung von Bortribromid in Dichlormethan (88 mmol Bortribromid) unter Rühren zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmen und noch 2 d gerührt. Die Reaktion wurde durch vorsichtige Zugabe von Wasser bei 0°C abgebrochen. Nach der Trennung der Phasen wurde die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-2 %)).

Ausbeute: 4.13 g (19.3 mmol, 63 %) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 2.34 (s, 6H, Aryl-CH₃), 5.31 (s, 2H, OH), 6.93 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, H3, H3'), 7.07 (d, 2H, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, H6, H6'), 7.13 (dd, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, H4, H4'); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 20.47 (Aryl-CH₃), 116.42 (C3, C3'), 123.33 (C1, C1'), 130.43 (C4, C4'), 130.81 (C5, C5'), 131.48 (C6, C6'), 150.66 (C2, C2'); MS (EI, m/z): ber.: 214 (M), gef.: 214 (M, 100 %), 199 (27), 171 (42), 152 (13), 145 (14), 128 (18), 115 (19), 106 (11), 91 (9), 77 (15), 63 (7), 51 (11), 39 (11); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3133, 2915, 1498, 1403, 1387, 1269, 1229, 1207, 1115, 812, 769; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 227, 290; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.65

8.2.4.3.3 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-5,5'-dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **95**

Es wurden 3.00 g (13.8 mmol) 5,5'-Dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **111** und 18.0 g (450 mmol) Natriumhydroxid bei 0°C in 200 mL einer 37 %-igen wässrigen Formaldehyd-Lösung gelöst und 4 d bei 40°C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v, es wurde wenig Reaktionslösung entnommen, angesäuert, mit Ethylacetat extrahiert und die

organische Phase getüpfelt) und durch Ansäuern mit 10 %-iger Salzsäure auf pH 4-5 abgebrochen. Anschließend wurde fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Durch Kieselgelfiltration (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v) wurden zunächst die polymeren Formaldehyd-Nebenprodukte abgetrennt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 19 : 1 v/v).

Ausbeute: 1.86 g (6.78 mmol, 48 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 2.27 (s, 6H, Aryl- CH_3), 4.61 (s, 4H, Benzyl-H), 6.88 (d, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H6, H6'), 7.10 (d, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H4, H4'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 20.50 (Aryl- CH_3), 59.74 (Benzyl-C), 126.64 (C1, C1'), 127.23 (C4, C4'), 128.22 (C3, C3'), 129.36 (C5, C5'), 130.32 (C6, C6'), 148.96 (C2, C2'); MS (EI, m/z): ber.: 274 (M), gef.: 274 (M, 23 %), 256 (100), 238 (60), 225 (93), 210 (70), 195 (48), 182 (14), 165 (39), 152 (23), 141 (14), 128 (20), 115 (24), 104 (17), 91 (8), 77 (20), 65 (6), 40 (100); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3277, 2917, 1472, 1355, 1220, 1198, 1045, 862, 641, 606; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 225, 291; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.45

Weiterer Syntheseversuch

Es wurden 500 mg (2.33 mmol) 5,5'-Dimethyl-biphenyl-2,2'-diol **111** und 210 mg (5.25 mmol) Natriumhydroxid in 3 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 1.10 mL einer 37 %-igen wässrigen Formaldehyd-Lösung (13.6 mmol Formaldehyd) zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v) und durch Eingießen in Wasser und vorsichtiges Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4-5 beendet. Es wurde fünfmal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Es wurde im Wesentlichen das Edukt **111** reisoliert.

8.2.4.3.4 Versuch der Synthese von 3-Brom-5-methylsalicylalkohol 114

Es wurden 5.03 g (26.9 mmol) 2-Brom-4-methylphenol und 12.2 g (305 mmol) Natriumhydroxid bei 0°C in 150 mL einer 37 %-igen wäßrigen Formaldehyd-Lösung gelöst und 3 d bei 40°C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v, es wurde wenig Reaktionslösung entnommen, angesäuert, mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase getüpfelt) und durch Ansäuern mit 10 %-iger Salzsäure auf pH 4-5 abgebrochen. Anschließend wurde fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Durch Kieselgelfiltration (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v) wurden zunächst die polymeren Formaldehyd-Nebenprodukte abgetrennt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 19 : 1 v/v). Das ¹H-NMR-Spektrum der potentiell produkthaltigen Fraktion zeigte jedoch, daß sich das Produkt, welches gemäß der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung entstanden sein sollte, offensichtlich während der Aufarbeitung und Reinigung zersetzt hatte.

8.2.4.4 Synthese der Bis-(saligenylchlorphosphite) 93,94

8.2.4.4.1 Synthese von Bis-(saligenylchlorphosphit) 93

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.03 g (4.11 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.84 mL (1.32 g, 9.6 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 1.50 mL (1.47 g, 18.6 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 7.5 mL abs. Diethylether, und 100 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 erfolgten die Zugabe von Phosphor(III)-chlorid und das Zutropfen von Pyridin bei -40°C.

Ausbeute: 938 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren, eines von ihnen ein Enantiomerenpaar (100 % Ausbeute: 1.50 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 4.85-5.60 (m, 2 x 4H, 2 x Benzyl-H), 6.86 (d, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H6), 7.08 (dd, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H5), 7.16 (d, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 61.14 (2 x Benzyl-C), 121.54 (1 x C3), 121.67 (1 x C3), 123.52 (2 x C5), 125.59 (2 x C6), 127.71 (2 x C1), 131.07 (2 x C4), 143.72 (2 x C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 140.40

Weitere Syntheseveruche

Es wurden Vorversuche zur Synthese von **93** bei drei verschiedenen Temperaturen im kleineren Maßstab durchgeführt.

bei -20°C

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 101 mg (0.410 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.08 mL (0.13 g, 0.95 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.15 mL (0.15 g, 1.9 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 0.75 mL abs. Diethylether, und 10 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 129 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren, eines von ihnen ein Enantiomerenpaar (100 % Ausbeute: 154 mg)

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen, allerdings war laut $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum ein größerer Anteil an Verunreinigungen festzustellen.

bei -40°C

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 102 mg (0.414 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.09 mL (0.14 g, 10 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.15 mL (0.15 g, 1.9 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 7.5 mL abs. Diethylether, und 10 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 erfolgten die Zugabe von Phosphor(III)-chlorid und das Zutropfen von Pyridin bei -40°C .

Ausbeute: 129 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren, eines von ihnen ein Enantiomerenpaar (100 % Ausbeute: 155 mg)

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

bei -60°C

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 101 mg (0.410 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.08 mL (0.13 g, 0.95 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.15 mL (0.15 g, 1.9 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 7.5 mL abs. Diethylether, und 10 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 erfolgten die Zugabe von Phosphor(III)-chlorid und das Zutropfen von Pyridin bei -60°C.

Ausbeute: 114 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren, eines von ihnen ein Enantiomerenpaar (100 % Ausbeute: 154 mg)

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen, wobei laut ³¹P-NMR-Spektrum kein signifikant verringerter Anteil an Verunreinigungen im Vergleich zum Produkt aus der bei -40°C durchgeführten Reaktion festzustellen war.

8.2.4.4.2 Synthese von Bis-(5-methylsaligenylchlorphosphit) 94

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 1.72 g (6.27 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-5,5'-dimethylbiphenyl-2,2'-diol **95**, 1.32 mL (2.07 g, 15.1 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 2.33 mL (2.28 g, 28.8 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 12 mL abs. Diethylether, und 155 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 erfolgten die Zugabe von Phosphor(III)-chlorid und das Zutropfen von Pyridin bei -40°C.

Ausbeute: 1.54 g eines noch verunreinigten farblosen Feststoffs als Gemisch von 2 Diastereomeren, eines von ihnen ein Enantiomerenpaar (100 % Ausbeute: 2.53 g)

Wegen der extrem schlechten Löslichkeit von **94** in deuteriertem Chloroform wurde auf eine NMR-spektroskopische Charakterisierung verzichtet.

8.2.4.4.3 Synthese von Biphenylchlorphosphit 118 (Modellreaktion)

Die Reaktion wurde in Analogie zu der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (5.37 mmol) Biphenyl-2,2'-diol, 0.54 mL (0.85 g, 6.2 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 1.00 mL (980 mg, 12.4 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 4 mL abs. Diethylether, und 33 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.31 g eines noch verunreinigten gelb-braunen Feststoffs (100 % Ausbeute: 1.35 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.25 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H3, H3'), 7.37 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5, H5'), 7.43 (ddd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H4, H4'), 7.52 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H6, H6'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 122.21 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C3, C3'), 126.28 (C5, C5'), 129.46 (C4, C4'), 130.18 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C6, C6'), 130.94 (d, $^3J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, C1, C1'), 149.26 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C2, C2'); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 180.80

8.2.4.5 Synthese der Bis-(saligenylphosphoramidite) 126,127 sowie Modellreaktionen zu ihrer Synthese und Verwendung

8.2.4.5.1 Synthese von Bis-(saligenylchlorphosphit) 93 unter Verwendung von Triethylamin als Base

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 990 mg (4.00 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.85 mL (1.3 g, 9.5 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 2.55 mL (1.85 g, 18.3 mmol)

Triethylamin (anstelle von Pyridin in der AAV 6) und 50 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 erfolgten die Zugabe von Phosphor(III)-chlorid und das Zutropfen von Pyridin bei -40°C . Bei der langwierigen Filtration unter Inertgas wurde der klumpige Niederschlag (Triethylaminhydrochlorid) mehrfach gründlich mit abs. Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 1.01 g eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren, eines von ihnen ein Enantiomerenpaar (100 % Ausbeute: 1.46 g)

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.4.4.1** angegebenen.

8.2.4.5.2 Synthese von Bis-(saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphor- amidit) 126

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 1.01 g noch verunreinigtes Bis-(saligenylchlorphosphit) **93** (unter Verwendung von Triethylamin als Base hergestellt, vergl. Kapitel **8.2.4.5.1**) in 20 mL abs. Diethylether gelöst. Bei Raumtemperatur wurde langsam eine Lösung aus 1.80 mL (1.30 g, 12.8 mmol) DIPA in 4 mL abs. Diethylether zugetropft und das Reaktionsgemisch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Weitere Reinigung erfolgte nicht.

Ausbeute: 1.14 g eines noch verunreinigten farblosen Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren (eines von ihnen ein Enantiomerenpaar) im Verhältnis 0.7 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.07 (d, 1 x 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 1 x *i*-Pr- CH_3), 1.08 (d, 1 x 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 1 x *i*-Pr- CH_3), 1.19 (d, 2 x 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 2 x *i*-Pr- CH_3), 3.53-3.63 (m, 2 x 4H, 2 x *i*-Pr-CH), 4.90 (dd, 1 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 3.9$ Hz, 1 x Benzyl-H), 4.93 (dd, 1 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 3.5$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.15 (dd, 1 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 5.3$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.18

(dd, 1 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 5.4$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.91-6.97 (m, 2 x 4H, 2 x H5, 2 x H6), 7.32 (dd, 1 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, 1 x H4), 7.37 (dd, 1 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, 1 x H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 24.72 (1 x *i*-Pr- CH_3), 25.05 (1 x *i*-Pr- CH_3), 44.47 (1 x *i*-Pr-CH), 44.60 (1 x *i*-Pr-CH), 64.84 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 65.09 (1 x Benzyl-C), 120.29 (1 x C5), 120.40 (1 x C5), 124.72 (1 x C6), 124.76 (1 x C6), 127.96 (2 x C3), 128.26 (2 x C4), 131.42 (1 x C1), 131.82 (1 x C1), 150.81 (1 x C2), 151.09 (1 x C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 136.28, 137.12

8.2.4.5.3 Synthese von Bis-(saligenyl-*N,N*-diethylaminophosphoramidit) 127

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 1.37 g noch verunreinigtes Bis-(saligenylchlorphosphit) **93** (unter Verwendung von Triethylamin als Base hergestellt, vergl. Kapitel 8.2.4.5.1) in 27 mL abs. Diethylether gelöst. Bei Raumtemperatur wurde langsam eine Lösung aus 1.77 mL (1.25 g, 17.1 mmol) Diethylamin in 5 mL abs. Diethylether zugetropft und das Reaktionsgemisch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Weitere Reinigung erfolgte nicht.

Ausbeute: 1.46 g eines noch verunreinigten farblosen Öls als Gemisch von 2 Diastereomeren (eines von ihnen ein Enantiomerenpaar) im Verhältnis 1.0 : 0.7

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.01 (t, 1 x 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1 x Et- CH_3), 1.01 (t, 1 x 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1 x Et- CH_3), 3.04-3.11 (m, 2 x 8H, 2 x Et- CH_2), 4.89-4.97 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 5.04-5.11 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H'), 6.97-7.02 (m, 2 x 4H, 2 x H5, 2 x H6), 7.30-7.33 (m, 2 x 2H, 2 x H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 14.82 (1 x Et- CH_3), 14.84 (1 x Et- CH_3), 37.78 (1 x Et- CH_2), 37.99 (1 x Et- CH_2), 63.67 (1 x Benzyl-C), 64.00 (1 x Benzyl-C), 120.42 (1 x C5), 120.52 (1 x C5), 124.64 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x C3), 125.53 (1 x C6), 125.64 (1 x C6), 127.66 (1 x C4), 127.77 (1 x C4), 131.20 (1 x C1), 131.32 (1 x C1), 149.78 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C2), 149.90 (1 x C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 130.55, 131.03

8.2.4.5.4 Synthese von 3-Phenylsalicylalkohol **121**^[88]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 aus Kapitel **8.2.1.1** durchgeführt.

Es wurden 2.98 g (17.3 mmol) 2-Hydroxybiphenyl, 2.56 g (21.0 mmol) Phenylboronsäure, insgesamt 4.23 g (141 mol) *para*-Formaldehyd (in vier Portionen), 0.66 mL (0.65 g, 8.8 mmol) Propionsäure, 100 mL Toluol, 12 mL THF und 12 mL 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung eingesetzt. Das Dioxaborin **120** wurde vor der Oxidation am Chromatotron (Dichlormethan) gereinigt (3.53 g (12.4 mmol, 72 %) eines gelblichen Öls). Das Rohprodukt aus der Oxidation wurde aus *n*-Pentan umkristallisiert.

Ausbeute: 2.12 g (10.6 mmol, 61 % über 2 Stufen) eines farblosen Feststoffes

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 4.67 (s, 2H, Benzyl-H), 5.3-5.8 (br, 1H, Benzyl-OH), 6.93 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H5), 7.15 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H6), 7.24 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H4), 7.33 (tt, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H4'), 7.43 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H3', H5'), 7.52 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H2', H6'), 8.2-8.9 (br, 1H, Phenol-OH); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 60.49 (Benzyl-C), 119.91 (C5), 126.80 (C4'), 126.92 (C4), 128.21 (C3', C5'), 129.17 (C6), 129.19 (C3), 129.23 (C1), 129.40 (C2', C6'), 138.75 (C1'), 151.70 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 200 (M); gef.: 200 (M, 30 %), 182 (100), 153 (20), 115 (7), 91 (5), 76 (6); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3548, 3277, 3029, 2889, 1590, 1457, 1439, 1392, 1333, 1233, 1219, 1184, 996, 962, 797, 764, 754, 704; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 225, 246, 286; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.83

8.2.4.5.5 Synthese von 3-Phenylsaligenylchlorphosphit **119**^[88]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (4.99 mmol) 3-Phenylsalicylalkohol **121**, 0.51 mL (0.80 g, 5.8 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.93 mL (0.91 g, 12 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 3.9 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.26 g eines noch verunreinigten gelblichen Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.32 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 5.03 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.1$ Hz, Benzyl-H), 5.42 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.1$ Hz, Benzyl-H'), 6.89 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, H6), 7.08 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.21-7.43 (m, 6H, H4, H2', H3', H4', H5', H6'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 61.38 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, Benzyl-C), 121.98 (C3), 122.10 (C1), 123.84 (C5), 124.94 (C4'), 127.59 (C6), 128.18 (C2', C6'), 129.47 (C3', C5'), 130.62 (C4), 132.62 (C1'), 136.48 (C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 140.58

8.2.4.5.6 Versuch der Synthese von 3-Phenylsaligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylamino-phosphoramidit **122** (Modellreaktion)

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 1.13 g des noch verunreinigten 3-Phenylsaligenylchlorphosphits **119** in 20 mL abs. Diethylether gelöst. Bei Raumtemperatur wurde langsam eine Lösung aus 1.20 mL (866 mg, 8.56 mmol) DIPA in 5 mL abs. Diethylether zugetropft und das Reaktionsgemisch 20 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde unter Inertgas durch neutrales Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III) filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der so erhaltene Rückstand wurde am Chromatotron (Dichlormethan) gereinigt.

Ausbeute: 1.26 g (3.83 mmol) des unerwünschten Produktes **123** als farbloser kristalliner Feststoff (Gemisch von 2 Enantiomeren)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 1.29 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, *i*-Pr- CH_3), 3.01 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 18.3$ Hz, $^2J_{\text{HP}} = 11.4$ Hz, Benzyl-H), 3.22 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 18.3$ Hz, $^2J_{\text{HP}} = 18.3$ Hz, Benzyl-H'), 3.30-3.40 (m, 2H, *i*-Pr-CH), 7.08 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.21 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H6), 7.33-7.35 (m, 2H, H4, H4'), 7.42 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H3', H5'), 7.64 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H2', H6'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 22.31 (*i*-Pr- CH_3), 22.33 (*i*-Pr- CH_3), 22.91 (*i*-Pr- CH_3), 28.02 (d,

$^1J_{CP} = 111.9$ Hz, Benzyl-C), 46.45 (d, $^2J_{CP} = 5.6$ Hz, *i*-Pr-CH), 122.74 (C1, C5), 125.93 (C4'), 126.11 (C6), 127.41 (C2', C6'), 128.20 (C3', C5'), 128.84 (C4), 129.20 (C1'), 144.71 (C2); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, $CDCl_3$): 47.78; MS (EI, *m/z*): ber.: 329 (M), gef.: 329 (M, 26 %), 314 (54), 286 (14), 272 (100), 229 (19), 183 (15), 165 (9), 43 (7); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 2968, 2933, 1468, 1451, 1429, 1412, 1391, 1369, 1260, 1218, 1201, 1186, 1153, 1127, 1031, 1010, 888, 854, 778, 762, 703, 565; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 246, 282; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.73

Weiterer Syntheseversuch

Durchführung wie oben, aber mit 250 mg des noch verunreinigten 3-Phenylsaligenylchlorphosphits **119**, 0.27 mL (0.19 g, 1.9 mmol) DIPA, gelöst in 2 mL abs. Diethylether, und 8 mL abs. Diethylether sowie einer Reaktionszeit von 3 h. Auf die Reinigung am Chromatotron wurde verzichtet. Es wurden 316 mg eines trüben Öls erhalten, bei dem es sich laut den 1H - und ^{31}P -NMR-Spektren im Wesentlichen wieder um das unerwünschte Produkt **123** handelte.

8.2.4.5.7 Synthese von Saligenylchlorphosphit **124** unter Verwendung von Triethylamin als Base (Modellreaktion)

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 1.01 g (8.10 mmol) Salicylalkohol, 0.85 mL (1.3 g, 9.5 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 2.60 mL (1.89 g, 18.7 mmol) Triethylamin (anstelle von Pyridin in der AAV 6) und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt. Bei der langwierigen Filtration unter Inertgas wurde der klumpige Niederschlag (Triethylaminhydrochlorid) mehrfach gründlich mit abs. Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 1.30 g eines noch verunreinigten gelblichen Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.53 g)

1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, $CDCl_3$): 4.94 (dd, 1H, $^2J_{HH} = 13.9$ Hz, $^3J_{HH} = 9.9$ Hz, Benzyl-H), 5.36 (d, 1H, $^2J_{HH} = 13.9$ Hz, Benzyl-H'), 6.87-6.92 (m, 2H, H4, H6), 7.01 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7.6$ Hz, $^3J_{HH} = 7.6$ Hz, H5), 7.15-7.19 (m, 1H, H3); ^{13}C -NMR: δ [ppm]

(101 MHz, CDCl₃): 61.52 (d, ²J_{CP} = 3.0 Hz, Benzyl-C), 119.88 (C3), 124.41 (C5), 126.21 (C6), 129.68 (C4), 130.72 (C1), 146.58 (d, ²J_{CP} = 5.1 Hz, C2); ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 141.27

8.2.4.5.8 Synthese von Saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphoramidit 125 (Modellreaktion)

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 757 mg noch verunreinigtes Saligenylchlorphosphit **124** (unter Verwendung von Triethylamin als Base hergestellt, vergl. Kapitel 8.2.4.5.7) in 9 mL abs. Diethylether gelöst. Bei Raumtemperatur wurde langsam eine Lösung aus 1.20 mL (866 mg, 8.56 mmol) DIPA in 4 mL abs. Diethylether zugetropft und das Reaktionsgemisch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Weitere Reinigung erfolgte nicht.

Ausbeute: 1.04 g eines noch verunreinigten gelblichen Öls

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 1.13-1.19 (m, 12H, *i*-Pr-CH₃), 3.50-3.60 (m, 2H, *i*-Pr-CH), 4.78 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 4.2 Hz, 1 x Benzyl-H), 5.05 (dd, 1H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 4.1 Hz, 1 x Benzyl-H), 6.79-6.89 (m, 3H, H4, H5, H6), 7.06-7.11 (m, 1H, H5); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 24.49 (d, ³J_{CP} = 8.2 Hz, *i*-Pr-CH₃), 24.65 (d, ³J_{CP} = 7.6 Hz, *i*-Pr-CH₃), 44.08 (*i*-Pr-CH), 44.21 (*i*-Pr-CH), 64.20 (d, ²J_{CP} = 4.7 Hz, Benzyl-C), 119.02 (C3), 120.98 (C5), 125.17 (C6), 128.53 (C4), 129.16 (C1), 153.23 (d, ²J_{CP} = 4.2 Hz, C2); ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 137.04

8.2.4.5.9 Synthese von *cyclo*Sal-d4T-monophosphat (*cyclo*Sal-d4TMP) **85** unter Verwendung des Phosphoramidits 125 (Modellreaktion)

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 84 mg (0.37 mmol) d4T **4** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 179 mg (1.51 mmol) Pyridinhydrochlorid versetzt. Bei 0°C wurden 241 mg

noch verunreinigtes Saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphoramidit **125**, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 0°C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Nach vollständiger Umsetzung von d4T **4** wurden bei 0°C 0.23 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.3 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) zugegeben. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle). Nunmehr wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Aus dem so erhaltenen Rohprodukt wurden in einer ersten Trennung am Chromatotron Salze entfernt (Ethylacetat/Methanol [angesäuert mit 0.1 % Essigsäure] 9 : 1 v/v). Durch weitere Reinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradient, Methanol angesäuert mit 0.1 % Essigsäure) konnte das Produkt zunächst in Form eines farblosen Öls isoliert werden. Anschließende Gefriertrocknung ergab eine farblose Watte.

Ausbeute: 77 mg (0.20 mmol, 54 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 1.63 (d, 1 x 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1 x Thymin-CH₃), 1.68 (d, 1 x 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1 x Thymin-CH₃), 4.23-4.38 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.95-4.99 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.39-5.52 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.01-6.07 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.37 (ddd, 1 x 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1 x H3'), 6.43 (ddd, 1 x 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1 x H3'), 6.78-6.81 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.11-7.16 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H3), 7.17-7.22 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 7.27-7.30 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H5), 7.35-7.40 (m, 2 x 1H, 2 x H4), 11.34 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.36 (s, 1 x 1H, 1 x NH); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 12.03 (1 x Thymin-CH₃), 12.11 (1 x Thymin-CH₃), 68.26-68.59 (m, 2 x Benzyl-C, 2 x C5'), 84.28 (d, ³J_{CP} = 7.1 Hz, 2 x C4'), 89.35 (2 x C1'), 109.85 (2 x Thymin-C5), 118.30 (d, ³J_{CP} = 9.2 Hz, 2 x Aryl-C3), 121.49 (d, ³J_{CP} = 8.1 Hz, 2 x Aryl-C1), 124.67 (2 x Aryl-C5), 126.37 (1 x Aryl-C6), 126.40 (1 x Aryl-C6), 127.48 (1 x C2'), 127.52 (1 x C2'), 130.02 (1 x Aryl-C4), 130.10 (1 x Aryl-C4), 132.99 (1 x C3'), 133.05 (1 x C3'), 135.85 (1 x Thymin-C6), 135.88 (1 x Thymin-C6), 149.66 (d, ²J_{CP} = 3.1 Hz, 1 x Aryl-C2), 149.73 (d, ²J_{CP} = 3.1 Hz, 1 x Aryl-C2), 150.87 (1 x Thymin-C2), 150.89 (1 x Thymin-C2), 163.92 (2 x Thymin-C4); ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -8.09; MS (FAB): ber.: 393.1 (M+H⁺), gef.: 393.1 (M+H⁺);

UV (HPLC): λ_{\max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.60; HPLC: t_R = 12.3 min. (Methode I)

8.2.4.6 Synthese der Bis-(*cycloSal*-Nucleotide) 46,47

8.2.4.6.1 Synthese von Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphat) (Bis-(*cycloSal*-d4TMP)) 46 unter Verwendung des Chlorphosphits 93

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 300 mg (1.34 mmol) d4T 4, 938 mg noch verunreinigtes Bis-(saligenylchlorphosphit) 93 (Abweichung von der AAV 7), 0.47 mL (0.35 g, 2.7 mmol) DIPEA, 0.86 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (4.8 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 30 mL abs. Acetonitril eingesetzt. Die abschließende Reinigung am Chromatotron war aufgrund der zahlreichen Nebenprodukte schwierig.

Ausbeute: 42 mg (52 μ mol, 8 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 3 Diastereomeren im Verhältnis 1.1 : 2.0 : 1.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.60 (s, 2 x 6H, 2 x Thymin- CH_3), 1.64 (s, 1 x 6H, 1 x Thymin- CH_3), 4.18-4.29 (m, 3 x 4H, 3 x H5'), 4.88-4.99 (m, 3 x 2H, 3 x H4'), 5.40-5.64 (m, 3 x 4H, 3 x Benzyl-H), 5.92-6.03 (m, 3 x 2H, 3 x H2'), 6.27-6.32 (m, 3 x 2H, 3 x H3'), 6.76-6.81 (m, 3 x 2H, 3 x H1'), 7.12 (s, 1 x 2H, 1 x Thymin-H6), 7.16 (s, 1 x 2H, 1 x Thymin-H6), 7.17 (s, 1 x 2H, 1 x Thymin-H6), 7.23-7.27 (m, 3 x 2H, 3 x Aryl-H5), 7.27-7.36 (m, 3 x 2H, 3 x Aryl-H6), 7.36-7.42 (m, 3 x 2H, 3 x Aryl-H4), 11.34 (s, 3 x 2H, 3 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.08 (1 x Thymin- CH_3), 12.15 (2 x Thymin- CH_3), 68.34 (3 x Benzyl-C), 68.95 (3 x C5'), 84.42 (3 x C4'), 89.78 (3 x C1'), 110.04 (3 x Thymin-C5), 122.39 (3 x Aryl-C5), 126.77 (3 x Aryl-C4), 127.66 (3 x C2'), 131.12 (3 x Aryl-C3), 131.34 (3 x Aryl-C6), 133.09 (3 x C3'), 135.86 (3 x Thymin-C6), 136.02 (3 x Aryl-C1), 147.23 (3 x Aryl-C2), 151.07 (3 x Thymin-C2), 164.10 (2 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.75, -8.21, -8.47; MS (FAB): ber.: 783.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 783.3 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{\max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.40; HPLC: t_R = 12.6 min. (Methode I)

8.2.4.6.2 Synthese von Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphat) (Bis-(*cycloSal*-d4TMP)) **46** unter Verwendung des Phosphoramidits **126**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 379 mg (1.69 mmol) d4T **4** in 20 mL abs. Acetonitril gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 781 mg (6.76 mmol) Pyridinhydrochlorid versetzt. Bei 0°C wurden 1.10 g noch verunreinigtes Bis-(saligenyl-*N,N*-di-*iso*-propylaminophosphoramidit) **126**, gelöst in 25 mL abs. Acetonitril, zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 0°C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Nach vollständiger Umsetzung von d4T **4** wurden bei 0°C 0.90 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (4.9 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) zugegeben. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle). Nunmehr wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Aus dem so erhaltenen Rohprodukt wurden in einer ersten Trennung am Chromatotron Salze weitgehend entfernt (Ethylacetat/Methanol [angesäuert mit 0.1 % Essigsäure] 9 : 1 v/v). Durch weitere aufwendige Reinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradient, Methanol angesäuert mit 0.1 % Essigsäure) und anschließende Gefriertrocknung konnten 108 mg einer farblosen Watte erhalten werden, bei der es sich laut den ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren um das vor allem noch mit Diisopropylaminhydrochlorid verunreinigte Produkt handelte (Gemisch von 3 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 2.0 : 2.0). Weitere Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 24 : 76 v/v, Wasser angesäuert mit 0.5 % Essigsäure), wobei die Diastereomere teilweise getrennt werden konnten.

Ausbeute: 6 mg **46 fast** als farblose Watte (1 Diastereomer) und 28 mg **46 slow** als farblose Watte (Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 1.0), zusammen 34 mg (43 µmol, 5 %)

Daten zur Charakterisierung von **46 fast**

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 1.61 (s, 6H, Thymin-CH₃), 4.18-4.29 (m, 4H, H5'), 4.88-4.98 (m, 2H, H4'), 5.46 (dd, 2H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 12.0 Hz, Benzyl-H),

5.57 (dd, 2H, $^3J_{\text{HP}} = 15.1$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, Benzyl-H'), 5.98-6.04 (m, 2H, H2'), 6.29-6.35 (m, 2H, H3'), 6.78-6.83 (m, 2H, H1'), 7.16 (s, 2H, Thymin-H6), 7.27-7.32 (m, 2H, Aryl-H5), 7.32-7.36 (m, 2H, Aryl-H6), 7.36-7.41 (m, 2H, Aryl-H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.09 (Thymin- CH_3), 68.28 (Benzyl-C), 68.88 (C5'), 84.34 (C4'), 89.59 (C1'), 110.05 (Thymin-C5), 122.34 (Aryl-C5), 126.77 (Aryl-C4), 127.66 (C2'), 131.08 (Aryl-C3), 131.83 (Aryl-C6), 133.00 (C3'), 133.27 (Aryl-C4), 135.86 (Thymin-C6), 135.99 (Aryl-C1), 147.23 (Aryl-C2), 151.04 (Thymin-C2), 164.06 (Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.76; HPLC: $t_{\text{R}} = 12.6$ min. (Methode I), $t_{\text{R}} = 25.4$ min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 24 : 76 v/v)

Daten zur Charakterisierung von **46 slow**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.61 (s, 1 x 6H, 1 x Thymin- CH_3), 1.64 (s, 1 x 6H, 1 x Thymin- CH_3), 4.18-4.29 (m, 2 x 4H, 2 x H5'), 4.88-4.99 (m, 2 x 2H, 2 x H4'), 5.46 (dd, 1 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 12.6$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.50 (dd, 1 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 13.1$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.59 (dd, 1 x 2H, $^3J_{\text{HP}} = 15.1$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.61 (dd, 1 x 2H, $^3J_{\text{HP}} = 15.1$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.90-5.96 (m, 1 x 2H, 1 x H2'), 5.99-6.05 (m, 1 x 2H, 1 x H2'), 6.27-6.32 (m, 2 x 2H, 2 x H3'), 6.76-6.82 (m, 2 x 2H, 2 x H1'), 7.12 (s, 1 x 2H, 1 x Thymin-H6), 7.18 (s, 1 x 2H, 1 x Thymin-H6), 7.24-7.28 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5), 7.28-7.37 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H6), 7.41 (dd, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, 2 x Aryl-H4), 11.33 (s, 2 x 2H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.09 (1 x Thymin- CH_3), 12.15 (1 x Thymin- CH_3), 68.67 (2 x Benzyl-C), 68.95 (2 x C5'), 84.37 (2 x C4'), 89.32 (1 x C1'), 89.52 (1 x C1'), 110.34 (2 x Thymin-C5), 122.06 (2 x Aryl-C5), 126.76 (1 x Aryl-C4), 126.83 (1 x Aryl-C4), 127.61 (2 x C2'), 131.60 (2 x Aryl-C3), 131.75 (2 x Aryl-C6), 133.03 (2 x C3'), 135.85 (2 x Thymin-C6), 136.69 (2 x Aryl-C1), 147.26 (2 x Aryl-C2), 151.04 (2 x Thymin-C2), 164.07 (2 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.22, -8.46; HPLC: $t_{\text{R}} = 12.6$ min. (Methode I), $t_{\text{R}} = 27.6$ min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 24 : 76 v/v)

8.2.4.6.3 Synthese von Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphat) (Bis-(*cycloSal*-d4TMP)) **46** unter Verwendung des Phosphoramidits **127**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 539 mg (2.40 mmol) d4T **4** in 30 mL abs. Acetonitril gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 1.11 g (9.61 mmol) Pyridinhydrochlorid versetzt. Bei 0°C wurden 1.40 g noch verunreinigtes Bis-(saligenyl-*N,N*-diethylaminophosphoramidit) **127**, gelöst in 35 mL abs. Acetonitril, zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 0°C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Nach vollständiger Umsetzung von d4T **4** wurden bei 0°C 1.41 mL einer 5-6 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (≥ 7.05 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) zugegeben. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle). Nunmehr wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Aus dem so erhaltenen Rohprodukt wurden in einer ersten Trennung am Chromatotron Salze entfernt (Ethylacetat/Methanol [angesäuert mit 0.1 % Essigsäure] 9 : 1 v/v). Durch weitere aufwendige Reinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradient, Methanol angesäuert mit 0.1 % Essigsäure) konnte das Produkt zunächst in Form eines farblosen Öls isoliert werden. Anschließende Gefriertrocknung ergab eine farblose Watte. Die Trennung der Diastereomere erfolgte wie in Kapitel **8.2.4.6.2** beschrieben.

Ausbeute: 53 mg (68 μ mol, 6 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 3 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 2.5 : 2.5
Aus 45 mg Diastereomergemisch konnten 4 mg **46 fast** und 24 mg **46 slow** erhalten werden

Die spektroskopischen Daten entsprachen bis auf das Diastereomerenverhältnis den in den Kapiteln **8.2.4.6.1** und **8.2.4.6.2** angegebenen.

8.2.4.6.4 Synthese von Bis-(5-methyl-cycloSal-d4T-monophosphat) (Bis-(5-Me-cycloSal-d4TMP)) 47

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 779 mg (3.47 mmol) d4T **4**, insgesamt 1.18 g noch verunreinigtes Bis-(5-methylsaligenylchlorphosphit) **94** (suspendiert in 30 mL abs. Acetonitril, Abweichung von der AAV 7), 1.22 mL (903 mg, 7.00 mmol) DIPEA, 2.34 mL einer 5-6 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (≥ 11.7 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 80 mL abs. Acetonitril eingesetzt. In Abweichung von der AAV 7 wurde die Reaktionszeit für die Phosphitylierung auf 6 h verlängert, und die Zugabe des Chlorphosphits erfolgte in mehreren Portionen im Abstand von etwa 1.5-2 h (Zugabe jeweils bei -20°C, anschließend Erwärmen auf Raumtemperatur). Die abschließende Reinigung am Chromatotron war aufgrund der zahlreichen Nebenprodukte und des nicht vollständig umgesetzten d4T **4** schwierig. Auch hier wurde eine Trennung der Diastereomere mittels präparativer HPLC versucht (Acetonitril/Wasser 35 : 65 v/v, Wasser angesäuert mit 0.5 % Essigsäure), die jedoch nicht erfolgreich war.

Ausbeute: 160 mg (0.197 mmol, 11 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.7 : 1.0

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 1.62 (s, 1 x 6H, 1 x Thymin-CH₃), 1.65 (s, 1 x 6H, 1 x Thymin-CH₃), 2.30 (s, 1 x 6H, 1 x Aryl-CH₃), 2.33 (s, 1 x 6H, 1 x Aryl-CH₃), 4.16-4.26 (m, 2 x 4H, 2 x H5'), 4.88-4.92 (m, 2 x 2H, 2 x H4'), 5.40 (dd, 1 x 2H, ²J_{HH} = 14.1 Hz, ³J_{HP} = 14.1 Hz, 1 x Benzyl-H), 5.45 (dd, 1 x 2H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 14.5 Hz, 1 x Benzyl-H), 5.53 (dd, 1 x 2H, ²J_{HH} = 14.1 Hz, ³J_{HP} = 14.1 Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.56 (dd, 1 x 2H, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HP} = 14.5 Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.91-5.94 (m, 1 x 2H, 1 x H2'), 6.00-6.03 (m, 1 x 2H, 1 x H2'), 6.28-6.31 (m, 2 x 2H, 2 x H3'), 6.77-6.81 (m, 2 x 2H, 2 x H1'), 7.08-7.19 (m, 2 x 6H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 11.34 (s, 2 x 2H, 2 x NH); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 11.88 (1 x Thymin-CH₃), 11.98 (1 x Thymin-CH₃), 20.24 (2 x Aryl-CH₃), 68.55 (d, ²J_{CP} = 8.8 Hz, 2 x Benzyl-C), 68.72 (d, ²J_{CP} = 6.1 Hz, 2 x C5'), 84.22 (d, ³J_{CP} = 7.8 Hz, 2 x C4'), 89.32 (2 x C1'), 109.82 (2 x Thymin-C5), 125.38 (1 x Aryl-C3), 125.43 (1 x Aryl-C3), 125.73 (2 x Aryl-C1), 126.66 (1 x Aryl-C6), 127.44 (2 x C2'), 131.79 (2 x Aryl-C4), 132.83 (1 x C3'), 132.93 (1 x C3'), 133.67 (1 x Aryl-C5), 133.69

(1 x Aryl-C5), 135.87 (2 x Thymin-C6), 150.41 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 150.48 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 150.83 (1 x Thymin-C2), 150.88 (1 x Thymin-C2), 163.87 (2 x Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.13, -8.26; MS (FAB-HR): ber.: 833.1601 ($\text{M}+\text{Na}^+$), gef.: 833.1594 ($\text{M}+\text{Na}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.34; HPLC: $t_R = 13.4$ min. (Methode I), $t_R = 24.6$ min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 35 : 65 v/v)

8.2.4.7 Synthese der Referenzverbindung 92

8.2.4.7.1 Synthese von 3-(O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol 128

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 2.84 g (11.5 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91** in 50 mL abs. THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. Diese Lösung wurde bei 0°C mit 2.41 mL (1.75 g, 17.3 mmol) Triethylamin, einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylamino-pyridin (DMAP) und 2.25 mL (2.38 g, 8.65 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mL Methanol und 5-minütiges Rühren bei Raumtemperatur abgebrochen. Nach Abkondensieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Ethylacetat und Wasser aufgenommen und die Phasen getrennt. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene braune Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-10 %)).

Ausbeute: 2.98 g (6.15 mmol, 53 % bezogen auf **91**) von **128** als gelblich-trübes Öl und 904 mg (1.25 mmol, 11 % bezogen auf **91**) des Nebenproduk-

tes 3,3'-Bis-(*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **129** als schwach gelbliches Öl

Daten zur Charakterisierung von **128**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.09 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 4.63 (s, 2H, H7'), 4.85 (s, 2H, H7), 6.93 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, Biphenyl-H5), 7.03 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Biphenyl-H5'), 7.07 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, Biphenyl-H4), 7.10 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, Biphenyl-H4'), 7.28 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, Biphenyl-H6), 7.45-7.54 (m, 7H, Biphenyl-H6', TBDPS-H3, TBDPS-H4, TBDPS-H5), 7.69-7.72 (m, 4H, TBDPS-H2, TBDPS-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 19.15 (*t*-Bu-C), 26.90 (*t*-Bu-CH₃), 59.91 (C7'), 61.53 (C7), 119.77 (Biphenyl-C5'), 119.92 (Biphenyl-C5), 120.14 (Biphenyl-C1), 126.35 (Biphenyl-C6), 126.74 (Biphenyl-C6'), 126.85 (Biphenyl-C1'), 128.22 (TBDPS-C3, TBDPS-C5), 128.88 (Biphenyl-C3), 129.41 (Biphenyl-C3'), 130.11 (TBDPS-C4), 130.13 (Biphenyl-C4'), 130.18 (Biphenyl-C4), 133.09 (TBDPS-C1), 135.21 (TBDPS-C2, TBDPS-C6), 150.49 (Biphenyl-C2), 151.47 (Biphenyl-C2'); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 224, 284; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.57

Daten zur Charakterisierung von **129**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.08 (s, 18H, *t*-Bu-CH₃), 4.83 (s, 4H, H7, H7'), 7.02 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, Biphenyl-H5, Biphenyl-H5'), 7.10 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, Biphenyl-H4, Biphenyl-H4'), 7.44-7.52 (m, 12H, TBDPS-H3, TBDPS-H4, TBDPS-H5), 7.52-7.56 (m, 2H, Biphenyl-H6, Biphenyl-H6'), 7.68-7.71 (m, 8H, TBDPS-H2, TBDPS-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 19.13 (*t*-Bu-C), 26.88 (*t*-Bu-CH₃), 61.54 (C7, C7'), 120.03 (Biphenyl-C5, Biphenyl-C5'), 125.45 (Biphenyl-C6, Biphenyl-C6'), 127.70 (Biphenyl-C1, Biphenyl-C1'), 128.19 (TBDPS-C3, TBDPS-C5), 129.38 (Biphenyl-C3, Biphenyl-C3'), 130.10 (TBDPS-C4), 130.16 (Biphenyl-C4, Biphenyl-C4'), 133.07 (TBDPS-C1), 135.20 (TBDPS-C2, TBDPS-C6), 150.74 (Biphenyl-C2, Biphenyl-C2'); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 224, 244, 282; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.77

Weitere Syntheseversuche

Es wurden Vorversuche zur Synthese von **128** mit verschiedenen Mengen TBDPS-Chlorid und DMAP im kleineren Maßstab durchgeführt.

mit 0.5 Äquiv. TBDPS-Chlorid

Durchführung wie oben, aber mit 300 mg (1.22 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.16 mL (0.17 g, 0.62 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid), 0.26 mL (0.19 g, 1.9 mmol) Triethylamin, einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 5 mL abs. THF. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 206 mg (0.425 mmol, 35 % bezogen auf **91**) von **128** als gelblich-trübes Öl

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

mit 0.75 Äquiv. TBDPS-Chlorid

Durchführung wie oben, aber mit 300 mg (1.22 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.24 mL (0.25 g, 0.92 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid), 0.26 mL (0.19 g, 1.9 mmol) Triethylamin, einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 5 mL abs. THF. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 248 mg (0.512 mmol, 42 % bezogen auf **91**) von **128** als gelblich-trübes Öl

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

mit 1.0 Äquiv. TBDPS-Chlorid

Durchführung wie oben, aber mit 300 mg (1.22 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.31 mL (0.33 g, 1.2 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid), 0.26 mL (0.19 g, 1.9 mmol) Triethylamin, einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 5 mL abs. THF. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 140 mg (0.289 mmol, 24 % bezogen auf **91**) von **128** als gelblich-trübes Öl

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

mit 0.75 Äquiv. TBDPS-Chlorid, aber ohne DMAP

Durchführung wie oben, aber mit 300 mg (1.22 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 0.24 mL (0.25 g, 0.92 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid), 0.26 mL (0.19 g, 1.9 mmol) Triethylamin, 5 mL abs. THF und ohne Zugabe von *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP). Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 215 mg (0.444 mmol, 36 % bezogen auf **91**) von **128** als gelblich-trübes Öl

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

8.2.4.7.2 Synthese von 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-*O*-isopropylidenacetal **130**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel **8.2.1.3** durchgeführt.

Es wurden 2.96 g (6.11 mmol) 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **128**, 3.9 mL (3.3 g, 32 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 120 mg (0.631 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, 2.5 g wasserfreies Natriumsulfat und 120 mL Aceton eingesetzt. In Abweichung von der AAV 3

wurde auf das Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 1 M Natronlauge verzichtet, und die abschließende Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Petrolether/Dichlormethan 1 : 1 v/v).

Ausbeute: 1.92 g (3.66 mmol, 60 %) eines farblosen Öls

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.08 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 1.42 (s, 6H, Acetal-CH₃), 4.83 (s, 2H, H7), 4.87 (s, 2H, H7'), 6.95 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Biphenyl-H5), 6.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Biphenyl-H5'), 7.02-7.09 (m, 3H, Biphenyl-H4, Biphenyl-H4', Biphenyl-H6), 7.44-7.52 (m, 7H, Biphenyl-H6', TBDPS-H3, TBDPS-H4, TBDPS-H5), 7.68-7.71 (m, 4H, TBDPS-H2, TBDPS-H6), 7.98 (s, 1H, OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 19.14 (*t*-Bu-C), 24.81 (Acetal-CH₃), 26.90 (*t*-Bu-CH₃), 60.44 (C7'), 61.71 (C7), 99.63 (Acetal-C), 119.54 (Biphenyl-C1, Biphenyl-C1'), 119.99 (Biphenyl-C5'), 120.08 (Biphenyl-C5), 124.35 (Biphenyl-C6), 125.65 (Biphenyl-C6'), 126.63 (Biphenyl-C3'), 128.21 (TBDPS-C3, TBDPS-C5), 128.46 (Biphenyl-C3), 130.07 (TBDPS-C4), 130.18 (Biphenyl-C4), 130.28 (Biphenyl-C4'), 133.10 (TBDPS-C1), 135.24 (TBDPS-C2, TBDPS-C6), 148.46 (Biphenyl-C2), 150.93 (Biphenyl-C2'); MS (ESI): ber.: 547.2 (M+Na⁺), gef.: 547.4 (M+Na⁺); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 224, 244, 284; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.83

8.2.4.7.3 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98** durch Entschützung von **130** mit Ammoniumfluorid

Es wurden 1.89 g (3.60 mmol) 3-(*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-*O*-isopropylidenacetal **130** in 60 mL Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1.34 g (36.2 mmol) Ammoniumfluorid gegeben und das resultierende Reaktionsgemisch 61 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat und Wasser aufgenommen und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom

Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 915 mg (3.20 mmol, 89 %) eines gelblich-trüben Öls

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 1.44 (s, 6H, Acetal- CH_3), 4.63 (s, 2H, H7), 4.88 (s, 2H, H7'), 5.41 (s, 1H, Benzyl-OH), 6.86 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H5'), 6.95 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H5), 7.01 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H4'), 7.04-7.07 (m, 1H, H4), 7.08-7.10 (m, 1H, H6), 7.22-7.24 (m, 1H, H6'), 8.19 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 24.82 (Acetal- CH_3), 60.11 (C7), 60.42 (C7'), 99.51 (Acetal-C), 119.01 (C5'), 119.87 (C5), 119.92 (C1'), 124.13 (C4), 125.37 (C3'), 126.68 (C6'), 126.85 (C1), 128.91 (C3), 129.98 (C4'), 130.26 (C6), 148.39 (C2'), 152.02 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 286 (M), gef.: 286 (M, 4 %), 228 (100), 210 (54), 198 (40), 182 (55), 153 (28), 139 (6), 128 (9), 115 (14), 91 (8), 77 (6), 43 (20); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 225, 242, 283; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v): 0.51

8.2.4.7.4 Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98** durch Entschützung von **130** mit Tetrabutylammoniumfluorid

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 52 mg (99 μmol) 3-(O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-hydroxymethyl)-3'-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **130** in 3 mL abs. THF gelöst. Diese Lösung wurde mit 0.10 mL einer 1 M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF (0.10 mmol TBAF) versetzt und zunächst 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden weitere 0.90 mL der TBAF-Lösung (0.90 mmol TBAF) zugesetzt und das Reaktionsgemisch für weitere 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mL Methanol abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat und Wasser aufgenommen und die wäßrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)).

Ausbeute: 2 mg (7 μ mol, 7 %) eines gelblich-trüben Öls

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.4.7.3** angegebenen.

8.2.4.7.5 Versuch der Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98 durch direkte Schützung von **91****

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel **8.2.1.3** durchgeführt.

Es wurden 102 mg (0.414 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 54 μ L (46 mg, 0.44 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 7 mg (0.04 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 0.3 g wasserfreies Natriumsulfat eingesetzt. In Abweichung von der AAV 3 wurden 10 mL THF als Lösungsmittel verwendet, und die Reaktionszeit betrug lediglich 1 d, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Auf das Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 1 M Natronlauge wurde verzichtet, und die abschließende Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-2 %)). Das gewünschte Produkt **98** konnte nicht isoliert werden, stattdessen wurde ein untrennbares Produktgemisch erhalten.

Weitere Syntheseversuche

Das Lösungsmittel wurde variiert.

mit Chloroform als Lösungsmittel

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel **8.2.1.3** durchgeführt.

Es wurden 100 mg (0.406 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 54 μ L (46 mg, 0.44 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 7 mg (0.04 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 0.2 g wasserfreies Natriumsulfat eingesetzt. In Abweichung von der AAV 3 wurden 10 mL Chloroform (technisch, enthielt 4 %

Ethanol zur Stabilisierung) als Lösungsmittel verwendet, und die Reaktionszeit betrug lediglich 2 d, wobei die Reaktion dünn-schichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Auf das Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 1 M Natronlauge wurde verzichtet, und die abschließende Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-2 %)). Das gewünschte Produkt **98** konnte nicht isoliert werden, stattdessen wurden weitgehend nur Veretherungsprodukte (Ethylether) erhalten.

mit 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 aus Kapitel **8.2.1.3** durchgeführt.

Es wurden 101 mg (0.410 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol **91**, 54 μ L (46 mg, 0.44 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 7 mg (0.04 mmol) *para*-Toluol-sulfonsäure-Monohydrat und 0.3 g wasserfreies Natriumsulfat eingesetzt. In Abweichung von der AAV 3 wurden 10 mL 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel verwendet, und die Reaktionszeit betrug lediglich 2 d, wobei die Reaktion dünn-schichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Auf das Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 1 M Natronlauge wurde verzichtet, und die abschließende Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-2 %)). Das gewünschte Produkt **98** konnte nicht isoliert werden, stattdessen wurde ein untrennbares Produktgemisch erhalten.

8.2.4.7.6 Synthese von 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-saligenylchlorphosphit 97

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 896 mg (3.13 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-2,2'-diol-2',3'-O-isopropylidenacetal **98**, 0.32 mL (0.50 g, 3.6 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.56 mL (0.55 g, 7.0 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 2.5 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 erfolgten die Zugabe von Phosphor(III)-chlorid und das Zutropfen von Pyridin bei -40°C . Außerdem wurde mit dem Zutropfen von Pyridin unmittelbar nach der Zugabe von Phosphor(III)-chlorid begonnen und die Dauer des Zutropfens auf 1 h verringert. Vor der Filtration unter Inertgas wurde das Reaktionsgemisch lediglich 3 h bei -20°C aufbewahrt.

Ausbeute: 696 mg eines noch verunreinigten gelben Feststoffs als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.10 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.54 (s, 3H, Acetal- CH_3), 1.55 (s, 3H, Acetal- CH_3), 4.89-4.96 (m, 2H, H7'a, H7'b), 5.04-5.12 (m, 1H, H7a), 5.54 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, H7b), 6.95-7.02 (m, 3H, H5, H5', H6), 7.11-7.16 (m, 2H, H4, H6'), 7.25-7.28 (m, 1H, H4'); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 24.19 (Acetal- CH_3), 25.30 (Acetal- CH_3), 60.99 (C7), 61.37 (C7'), 99.87 (Acetal-C), 119.46 (C5'), 119.74 (C5), 121.33 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz, C1), 123.31 (C6'), 124.53 (C6), 124.99 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C3'), 125.39 (C1'), 129.18 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C3), 130.05 (C4'), 131.51 (C4), 143.79 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, C2), 148.82 (C2'); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 142.42

8.2.4.7.7 Synthese von 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-cycloSal-d4T-monophosphat (3-(Isopr-Sal)-cycloSal-d4TMP) 96

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 354 mg (1.58 mmol) d4T **4**, 665 mg noch verunreinigtes 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-saligenylchlorphosphit **97** (Abweichung von der AAV 7), 0.41 mL (0.30 g, 2.3 mmol) DIPEA (Abweichung von der AAV 7), 0.95 mL einer 5-6 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (≥ 4.8 mmol *tert*-Butylhydroperoxid, Abweichung von der AAV 7) und 36 mL abs. Acetonitril eingesetzt. Die Trennung der Diastereomere erfolgte mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 2 : 5 v/v).

Ausbeute: 525 mg (0.947 mmol, 60 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9
Aus 480 mg Diastereomergemisch wurden 192 mg **96 fast** und 206 mg **96 slow** erhalten

Daten zur Charakterisierung des Diastereomergemisches **96**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.40 (s, 1 x 3H, 1 x Acetal- CH_3), 1.42 (s, 1 x 3H, 1 x Acetal- CH_3), 1.45 (s, 1 x 3H, 1 x Acetal- CH_3), 1.46 (s, 1 x 3H, 1 x Acetal- CH_3), 1.52 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.58 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 4.17-4.30

(m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.86-4.94 (m, 2 x 3H, 2 x H4', 2 x H7'), 5.41-5.47 (m, 2 x 1H, 2 x H7a), 5.51-5.57 (m, 2 x 1H, 2 x H7b), 5.92-5.95 (m, 1 x 1H, 1 x H2'), 5.99-6.02 (m, 1 x 1H, 1 x H2'), 6.24-6.26 (m, 1 x 1H, 1 x H3'), 6.30-6.32 (m, 1 x 1H, 1 x H3'), 6.79-6.81 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 6.97 (dd, 1 x 1H, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 1 x Aryl-H5'), 6.99 (dd, 1 x 1H, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 1 x Aryl-H5'), 7.06-7.17 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 7.24-7.31 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H4', 2 x Aryl-H6'), 11.34 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.80 (1 x Thymin-CH₃), 11.87 (1 x Thymin-CH₃), 23.97 (1 x Acetal-CH₃), 24.32 (1 x Acetal-CH₃), 24.77 (1 x Acetal-CH₃), 25.14 (1 x Acetal-CH₃), 60.30 (2 x C7'), 68.23 (d, $^2J_{CP} = 6.1$ Hz, 1 x C7), 68.29 (d, $^2J_{CP} = 5.1$ Hz, 1 x C7), 68.64 (d, $^2J_{CP} = 6.1$ Hz, 2 x C5'), 84.27 (2 x C4'), 89.28 (1 x C1'), 89.33 (1 x C1'), 99.83 (2 x Acetal-C), 109.93 (1 x Thymin-C5), 109.96 (1 x Thymin-C5), 119.93 (1 x Aryl-C5'), 120.01 (1 x Aryl-C5', 1 x Aryl-C1'), 120.07 (1 x Aryl-C1'), 121.49 (1 x Aryl-C3'), 121.58 (1 x Aryl-C3', 1 x Aryl-C3), 121.69 (1 x Aryl-C3), 124.08-124.20 (m, 2 x Aryl-C6', 2 x Aryl-C1), 125.31 (2 x Aryl-C5), 125.69 (1 x Aryl-C4'), 125.71 (1 x Aryl-C4'), 127.54 (1 x C2'), 127.56 (1 x C2'), 129.77 (2 x Aryl-C6), 131.88 (1 x Aryl-C4), 131.93 (1 x Aryl-C4), 132.85 (1 x C3'), 132.91 (1 x C3'), 135.73 (1 x Thymin-C6), 135.85 (1 x Thymin-C6), 147.17 (1 x Aryl-C2), 147.26 (d, $^2J_{CP} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C2), 148.41 (1 x Aryl-C2'), 148.43 (1 x Aryl-C2'), 150.87 (2 x Thymin-C2), 163.89 (1 x Thymin-C4), 163.91 (1 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.62, -7.71; MS (FAB): ber.: 555.2 (M+H⁺), gef.: 555.2 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 248, 267; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.52; HPLC: t_R = 15.5, 15.7 min. (Methode I), t_R = 26.0, 26.4 min. (Methode II), t_R = 38.2, 41.1 min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 2 : 5 v/v)

Daten zur Charakterisierung von **96 fast**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.40 (s, 3H, Acetal-CH₃), 1.45 (s, 3H, Acetal-CH₃), 1.52 (s, 3H, Thymin-CH₃), 4.19 (ddd, 1H, $^2J_{HH} = 11.0$ Hz, $^3J_{HP} = 6.1$ Hz, $^3J_{HH} = 4.9$ Hz, H5'), 4.25-4.30 (m, 1H, H5''), 4.88 (s, 2H, H7'), 4.92-4.96 (m, 1H, H4'), 5.43 (dd, 1H, $^2J_{HH} = 14.3$ Hz, $^3J_{HP} = 10.6$ Hz, H7a), 5.54 (dd, 1H, $^3J_{HP} = 17.9$ Hz, $^2J_{HH} = 14.3$ Hz, H7b), 5.92-5.95 (m, 1H, H2'), 6.30-6.32 (m, 1H, H3'), 6.79-6.81 (m, 1H, H1'), 6.97 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, Aryl-H5'), 7.06-7.13 (m, 3H, Aryl-H5, Aryl-H6, Thymin-H6), 7.24-7.30 (m, 3H, Aryl-H4, Aryl-H4', Aryl-H6'), 11.35 (s, 1H,

NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.78 (Thymin- CH_3), 24.30 (Acetal- CH_3), 24.76 (Acetal- CH_3), 60.27 (C7'), 68.26 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, C7), 68.54 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.0$ Hz, C5'), 84.19 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.7$ Hz, C4'), 89.25 (C1'), 99.79 (Acetal-C), 109.93 (Thymin-C5), 119.90 (Aryl-C5'), 119.98 (Aryl-C1'), 121.58 (Aryl-C3'), 121.67 (Aryl-C3), 124.17 (Aryl-C6'), 124.19 (Aryl-C1), 125.28 (Aryl-C5), 125.68 (Aryl-C4'), 127.51 (C2'), 129.76 (Aryl-C6), 131.90 (Aryl-C4), 132.88 (C3'), 135.70 (Thymin-C6), 147.15 (Aryl-C2), 148.38 (Aryl-C2'), 150.85 (Thymin-C2), 163.84 (Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.62

Daten zur Charakterisierung von **96 slow**

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.42 (s, 3H, Acetal- CH_3), 1.47 (s, 3H, Acetal- CH_3), 1.58 (s, 3H, Thymin- CH_3), 4.21 (dd, 2H, $^3J_{\text{HP}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.3$ Hz, H5'), 4.86-4.93 (m, 3H, H4', H7'), 5.45 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.2$ Hz, 1 x H7b), 5.54 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.2$ Hz, 1 x H7b), 5.99-6.02 (m, 1H, H2'), 6.24-6.26 (m, 1H, H3'), 6.79-6.81 (m, 1H, H1'), 6.99 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 1 x Aryl-H5'), 7.08-7.17 (m, 3H, Aryl-H5, Aryl-H6, Thymin-H6), 7.24-7.31 (m, 3H, Aryl-H4, Aryl-H4', Aryl-H6'), 11.34 (s, 2 x 1H, 2 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.84 (Thymin- CH_3), 23.95 (Acetal- CH_3), 25.12 (Acetal- CH_3), 60.29 (C7'), 68.22 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C7), 68.61 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.2$ Hz, C5'), 84.24 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz, C4'), 89.31 (C1'), 99.80 (Acetal-C), 109.90 (Thymin-C5), 119.97 (Aryl-C5'), 120.05 (Aryl-C1'), 121.47 (Aryl-C3'), 121.57 (Aryl-C3), 124.12 (Aryl-C6'), 124.15 (Aryl-C1), 125.28 (Aryl-C5), 125.65 (Aryl-C4'), 127.54 (C2'), 129.75 (Aryl-C6), 131.85 (Aryl-C4), 132.81 (C3'), 135.82 (Thymin-C6), 147.22 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C2), 148.41 (Aryl-C2'), 150.84 (Thymin-C2), 163.87 (Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.72

8.2.4.7.8 Synthese von 3-(Saligen-3'-yl)-cycloSal-d4T-monophosphat (3-Sal-cycloSal-d4TMP) **92 fast**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel **8.2.1.5** durchgeführt.

Es wurden 166 mg (0.299 mmol) 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-cycloSal-d4T-monophosphat **96 fast**, 8.3 g Dowex 50 X 8 und 14 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 8 d, wobei die Reaktion mittels analytischer

HPLC verfolgt wurde. Hierzu wurden jeweils 10 μL des Überstandes der Reaktionsmischung entnommen, an der SpeedVac für 10 min. bei 45°C vom Lösungsmittel befreit und in 40 μL Acetonitril HPLC-grade und 100 μL Milli-Q-Wasser aufgenommen. Von der so erhaltenen Probe wurden 40 μL HPLC-analytisch untersucht (Methode II). Die Reinigung des Produkts erfolgte schließlich mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 2 : 5 v/v).

Ausbeute: 84 mg (0.16 mmol, 54 %) einer farblosen Watte

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.60 (s, 3H, Thymin- CH_3), 4.22 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.1$ Hz, H5'), 4.28 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, H5''), 4.65 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, H7'), 4.93-4.96 (m, 1H, H4'), 5.45 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.3$ Hz, H7a), 5.51 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, Benzyl-OH), 5.55 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.3$ Hz, H7b), 5.95-5.97 (m, 1H, H2'), 6.31 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H3'), 6.80-6.82 (m, 1H, H1'), 6.89 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, Aryl-H5'), 7.02 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, Aryl-H6'), 7.18 (q, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.1$ Hz, Thymin-H6), 7.24-7.31 (m, 4H, Aryl-H4, Aryl-H4', Aryl-H5, Aryl-H6), 8.61 (s, 1H, Phenol-OH), 11.35 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 11.92 (Thymin- CH_3), 60.24 (C7'), 68.46 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.0$ Hz, C7), 68.53 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, C5'), 84.26 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, C4'), 89.22 (C1'), 109.88 (Thymin-C5), 119.17 (Aryl-C5'), 121.66 (Aryl-C1'), 121.75 (Aryl-C3'), 123.69 (Aryl-C3), 124.06 (Aryl-C5), 125.36 (Aryl-C6), 127.45 (C2'), 127.64 (Aryl-C1), 128.71 (Aryl-C4'), 129.61 (Aryl-C6'), 131.99 (Aryl-C4), 132.93 (C3'), 135.77 (Thymin-C6), 148.35 (Aryl-C2), 150.86 (Thymin-C2), 152.19 (Aryl-C2'), 163.89 (Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_6): -7.88; MS (FAB): ber.: 515.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 515.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 269; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.38; HPLC: $t_R = 12.5$ min. (Methode I), $t_R = 19.5$ min. (Methode II), $t_R = 13.8$ min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 2 : 5 v/v)

8.2.4.7.9 Synthese von 3-(Saligen-3'-yl)-cycloSal-d4T-monophosphat (3-Sal-cycloSal-d4TMP) 92 slow

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel 8.2.1.5 durchgeführt.

Es wurden 181 mg (0.326 mmol) 3-(Isopropylidensaligen-3'-yl)-*cyclo*Sal-d4T-mono-phosphat **96 slow**, 9.1 g Dowex 50 X 8 und 15 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 8 d, wobei die Reaktion mittels analytischer HPLC verfolgt wurde. Hierzu wurden jeweils 10 μ L des Überstandes der Reaktionsmischung entnommen, an der SpeedVac für 10 min. bei 45°C vom Lösungsmittel befreit und in 40 μ L Acetonitril HPLC-grade und 100 μ L Milli-Q-Wasser aufgenommen. Von der so erhaltenen Probe wurden 40 μ L HPLC-analytisch untersucht (Methode II). Die Reinigung des Produkts erfolgte schließlich mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 2 : 5 v/v).

Ausbeute: 76 mg (0.15 mmol, 46 %) einer farblosen Watte

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.65 (s, 3H, Thymin- CH_3), 4.20-4.28 (m, 2H, H5'), 4.65 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, H7'), 4.91-4.94 (m, 1H, H4'), 5.44 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.4$ Hz, H7a), 5.49 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, Benzyl-OH), 5.53 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.4$ Hz, H7b), 6.00-6.02 (m, 1H, H2'), 6.28-6.31 (m, 1H, H3'), 6.81-6.83 (m, 1H, H1'), 6.91 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, Aryl-H5'), 7.03 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, Aryl-H6'), 7.21 (q, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 0.9$ Hz, Thymin-H6), 7.23-7.32 (m, 4H, Aryl-H4, Aryl-H4', Aryl-H5, Aryl-H6), 8.60 (s, 1H, Phenol-OH), 11.34 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.98 (Thymin- CH_3), 60.08 (C7'), 68.34 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.5$ Hz, C7), 68.60 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, C5'), 84.31 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, C4'), 89.26 (C1'), 109.88 (Thymin-C5), 119.25 (Aryl-C5'), 121.67 (Aryl-C1'), 121.77 (Aryl-C3'), 123.73 (Aryl-C3), 124.06 (Aryl-C5), 125.39 (Aryl-C6), 127.45 (C2'), 127.64 (Aryl-C1), 128.86 (Aryl-C4'), 129.63 (Aryl-C6'), 131.98 (Aryl-C4), 133.01 (C3'), 135.94 (Thymin-C6), 147.50 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C2), 150.89 (Thymin-C2), 152.07 (Aryl-C2'), 163.91 (Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.98; MS (FAB): ber.: 515.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 515.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 269; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.38; HPLC: $t_R = 12.5$ min. (Methode I), $t_R = 19.5$ min. (Methode II), $t_R = 14.1$ min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 2 : 5 v/v)

8.2.5 Synthese der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotide 48-50

8.2.5.1 Synthese von 5-(2-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (5-(HOOC-Et)-*cycloSal*-d4TMP) 142^[95]

8.2.5.1.1 Synthese von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester 151

Es wurden 3.81 g (22.9 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure und 22.2 g (0.300 mol) *tert*-Butanol in 50 mL Toluol gelöst. Die Lösung wurde unter Rückfluß erhitzt und dann über einen Zeitraum von 30 min. tropfenweise mit 15.9 g (68.7 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-dineopentylacetal versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h unter Rückfluß erhitzt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und je zweimal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert, wobei dreimal mit Dichlormethan coevaporiert wurde. Das so erhaltene Produkt wurde nicht weiter gereinigt.

Ausbeute: 3.51 g (15.8 mmol, 69 %) eines hellbraunen Öls

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 1.42 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 2.50 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H2), 2.84 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, H3), 6.74-6.77 (m, 2H, Aryl-H3, Aryl-H5), 7.07 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, Aryl-H2, Aryl-H6); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 28.50 (*t*-Bu-CH₃), 30.71 (C3), 37.81 (C2), 80.78 (*t*-Bu-C), 115.63 (Aryl-C3, Aryl-C5), 129.85 (Aryl-C2, Aryl-C6), 133.29 (Aryl-C1), 154.33 (Aryl-C4), 172.89 (C=O); DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.70

8.2.5.1.2 Synthese von 5-(*tert*-Butyloxycarbonyl)ethyl)-salicylalkohol 153

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 aus Kapitel 8.2.1.1 durchgeführt.

Es wurden 2.36 g (10.6 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester **151**, 1.55 g (12.7 mmol) Phenylboronsäure, insgesamt 3.20 g (103 mmol) *para*-Formaldehyd (in fünf Portionen), 0.39 mL (0.39 g, 5.3 mmol) Propionsäure, 70 mL

Toluol, 8 mL THF und 6.5 mL 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung eingesetzt. Die Reaktionszeit bei der Synthese des Dioxaborins **152** betrug 10 h. Vor der Oxidation wurde es am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-10 %), wobei 2.20 g (6.50 mmol, 61 %) eines hellgelben Feststoffs erhalten wurden. Das Produkt aus der Oxidation wurde aus Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 1.37 g (5.42 mmol, 51 % über 2 Stufen) eines farblosen Feststoffs

Daten zur Charakterisierung von **152**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 1.43 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 2.53 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, H10), 2.87 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, H9), 5.21 (s, 2H, Borin-H4), 6.85 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, Borin-H5), 7.01 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, Borin-H8), 7.07-7.10 (m, 1H, Borin-H7), 7.40-7.44 (m, 2H, Phenyl-H3, Phenyl-H5), 7.49-7.52 (m, 1H, Phenyl-H4), 7.97 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, Phenyl-H2, Phenyl-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 28.09 (*t*-Bu- CH_3), 30.44 (C9), 37.17 (C10), 62.91 (Borin-C4), 80.43 (*t*-Bu-C), 117.83 (Borin-C8), 122.32 (Borin-C4a), 124.55 (Borin-C5), 127.71 (Phenyl-C3, Phenyl-C5), 128.55 (Borin-C7), 131.42 (Phenyl-C4), 134.30 (Phenyl-C2, Phenyl-C6), 135.60 (Borin-C6), 147.47 (Borin-C8a), 172.13 (C=O); DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.72

Daten zur Charakterisierung von **153**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.38 (s, *t*-Bu- CH_3), 2.44 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H9), 2.71 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H8), 4.45 (s, 2H, Benzyl-H), 4.91 (s, 1H, Benzyl-OH), 6.67 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, H3), 6.88 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, H4), 7.13 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, H6), 9.11 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 27.95 (*t*-Bu- CH_3), 30.19 (C8), 37.13 (C9), 58.50 (Benzyl-C), 79.75 (*t*-Bu-C), 114.57 (C3), 127.13 (C6), 127.40 (C4), 128.41 (C1), 130.63 (C5), 152.60 (C2), 171.86 (C=O); MS (EI, m/z): ber.: 252 (M), gef.: 252 (M, 26 %), 196 (22), 178 (100), 161 (7), 137 (27), 119 (16), 105 (12), 91 (7), 57 (24), 41 (7); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3354, 2952, 2869, 1704, 1615, 1513, 1439, 1368, 1274, 1208, 1183, 1132, 996, 822; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 231, 282; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.52

8.2.5.1.3 Synthese von 5-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-saligenylchlorphosphit **154**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 1.29 g (5.11 mmol) 5-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-salicylalkohol **153**, 0.54 mL (0.85 g, 6.2 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.95 mL (0.93 g, 12 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 5 mL abs. Diethylether, und 35 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 wurde mit dem Zutropfen von Pyridin unmittelbar nach der Zugabe von Phosphor(III)-chlorid begonnen und die Dauer des Zutropfens auf 1 h verringert. Vor der Filtration unter Inertgas wurde das Reaktionsgemisch lediglich 3 h bei -20°C aufbewahrt.

Ausbeute: 1.49 g eines noch verunreinigten gelblichen Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.62 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.41 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 2.50-2.54 (m, 2H, H9), 2.86 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H8), 4.96-5.01 (m, 1H, Benzyl-H), 5.40-5.43 (m, 1H, Benzyl-H'), 6.80 (s, 1H, H6), 6.89-6.91 (m, 1H, H3), 7.09 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 28.06 (*t*-Bu- CH_3), 30.33 (C8), 36.09 (C9), 61.10 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, Benzyl-C), 80.55 (*t*-Bu-C), 119.36 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C3), 121.16 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz, C1), 125.48 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C6), 129.11 (C4), 136.61 (C5), 144.41 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, C2), 171.95 (C=O); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 141.03

8.2.5.1.4 Synthese von 5-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (5-(*t*-Bu-Pr)-*cycloSal*-d4TMP) **140**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel **8.2.1.7** durchgeführt.

Es wurden 496 mg (2.21 mmol) d4T **4**, 1.40 g noch verunreinigtes 5-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-saligenylchlorphosphit **154**, 0.77 mL (0.57 g, 4.4 mmol) DIPEA, 1.40 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (7.70 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 50 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 408 mg (0.784 mmol, 35 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.36 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.37 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.63 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 1.69 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 2.50-2.54 (m, 2 x 2H, 2 x H₉), 2.79 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H₈), 4.25-4.35 (m, 2 x 2H, 2 x H_{5'}), 4.95-4.97 (m, 2 x 1H, 2 x H_{4'}), 5.34-5.49 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.01-6.04 (m, 2 x 1H, 2 x H_{2'}), 6.36 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, 1 x H_{3'}), 6.43 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, 1 x H_{3'}), 6.80 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, 1 x H_{1'}), 6.82 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, 1 x H_{1'}), 7.03 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 1 x Aryl-H₃), 7.06 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H₃), 7.14-7.25 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H₄, 2 x Aryl-H₆, 2 x Thymin-H₆), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.03 (1 x Thymin-CH₃), 12.11 (1 x Thymin-CH₃), 27.90 (2 x *t*-Bu-CH₃), 29.79 (2 x C₈), 36.26 (2 x C₉), 68.39-68.50 (m, 2 x C_{5'}, 2 x Benzyl-C), 79.95 (2 x *t*-Bu-C), 84.27 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x C_{4'}), 84.34 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x C_{4'}), 89.35 (2 x C_{1'}), 109.86 (2 x Thymin-C₅), 118.09 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C₃), 125.96 (1 x Aryl-C₆), 126.00 (1 x Aryl-C₆), 127.49 (1 x C_{2'}), 127.53 (1 x C_{2'}), 129.08 (d, $^3J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 2 x Aryl-C₁), 129.79 (1 x Aryl-C₄), 129.89 (1 x Aryl-C₄), 132.98 (2 x C_{3'}), 135.85 (1 x Thymin-C₆), 135.87 (1 x Thymin-C₆), 137.14 (2 x Aryl-C₅), 147.91 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x Aryl-C₂), 150.87 (1 x Thymin-C₂), 150.89 (1 x Thymin-C₂), 163.90 (1 x Thymin-C₄), 163.92 (1 x Thymin-C₄), 171.54 (2 x C=O); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.02; MS (FAB-HR): ber.: 521.1689 (M+H⁺), gef.: 521.1641 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.49; HPLC: t_R = 16.7 min. (Methode I)

8.2.5.1.5 Synthese von 5-(2-Carboxyethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat (5-(HOOC-Et)-cycloSal-d4TMP) 142

Es wurden 120 mg (0.231 mmol) 5-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat **140** in 115 mL Dichlormethan gelöst und mit 19.2 mL (28.4 g, 0.249 mol) Trifluoressigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 50 min. bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlor-

methan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurden das Lösungsmittel und die TFA am Rotationsverdampfer entfernt. Der dunkle ölige Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-5 %), Methanol angesäuert mit 0.1 % Essigsäure). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 105 mg (0.226 mmol, 98 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.64 (d, 1 x 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, 1 x Thymin- CH_3), 1.70 (d, 1 x 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, 1 x Thymin- CH_3), 2.51-2.55 (m, 2 x 2H, 2 x H9), 2.81 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H8), 4.24-4.37 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.95-4.98 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.34-5.51 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.01-6.05 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.36 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1 x H3'), 6.43 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1 x H3'), 6.80 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1 x H1'), 6.82 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1 x H1'), 7.03 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.06 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.15-7.26 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 11.34 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.35 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 12.0-12.3 (br, 2 x 1H, 2 x COOH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.02 (1 x Thymin- CH_3), 12.10 (1 x Thymin- CH_3), 29.64 (2 x C8), 35.16 (2 x C9), 68.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 68.48 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x C5'), 84.28 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x C4'), 89.35 (2 x C1'), 109.86 (2 x Thymin-C5), 118.06 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C3), 118.14 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C3), 125.87 (1 x Aryl-C6), 125.93 (1 x Aryl-C6), 127.46 (1 x C2'), 127.50 (1 x C2'), 129.73 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 2 x Aryl-C1), 129.81 (2 x Aryl-C4), 132.97 (1 x C3'), 133.05 (1 x C3'), 135.84 (1 x Thymin-C6), 135.88 (1 x Thymin-C6), 137.41 (2 x Aryl-C5), 147.94 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 150.86 (1 x Thymin-C2), 150.89 (1 x Thymin-C2), 163.90 (2 x Thymin-C4), 173.75 (2 x C=O); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.01, -8.06; MS (FAB-HR): ber.: 465.1063 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 465.1041 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.15; HPLC: $t_R = 10.2$ min. (Methode I), $t_R = 10.6$ min. (Methode III)

8.2.5.2 Synthese der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Nucleotide 48-50

8.2.5.2.1 Synthese von 5-(Acetoxymethyloxycarbonylethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (5-(AM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP) 48

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Zu einer Lösung von 70 mg (0.15 mmol) von 5-(2-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat **142** in 22 mL abs. Acetonitril wurden bei 10°C 2.7 mL einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.17 mmol DIPEA) und 1.7 mL einer Lösung von Brommethylacetat in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.17 mmol Brommethylacetat) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 10°C gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Nicht umgesetztes Edukt **142** konnte nicht in reiner Form reisoliert werden.

Ausbeute: 53 mg (99 μ mol, 65 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.62 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.69 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 2.05 (s, 1 x 3H, 1 x Acetyl- CH_3), 2.06 (s, 1 x 3H, 1 x Acetyl- CH_3), 2.70 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 2 x H9), 2.84 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 2 x H8), 4.24-4.35 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.94-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.34-5.58 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 5.66 (s, 1 x 2H, 1 x H11), 5.67 (s, 1 x 2H, 1 x H11), 6.00-6.04 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.36 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1 x H3'), 6.42 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1 x H3'), 6.78 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1 x H1'), 6.80 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1 x H1'), 7.02 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.05 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.15-7.26 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 11.34 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.00 (1 x Thymin- CH_3), 12.09 (1 x Thymin- CH_3), 20.64 (2 x Acetyl- CH_3), 29.16 (2 x C8), 34.59 (2 x C9), 68.38 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 68.52 (d,

$^2J_{CP} = 6.1$ Hz, 2 x C5'), 79.15 (2 x C11), 84.28 (d, $^3J_{CP} = 8.0$ Hz, 2 x C4'), 89.35 (2 x C1'), 109.82 (2 x Thymin-C5), 118.14 (d, $^3J_{CP} = 8.0$ Hz, 2 x Aryl-C3), 125.94 (1 x Aryl-C6), 126.00 (1 x Aryl-C6), 127.46 (2 x C2'), 127.97 (2 x Aryl-C1), 129.78 (1 x Aryl-C4), 129.96 (1 x Aryl-C4), 132.96 (1 x C3'), 133.03 (1 x C3'), 135.82 (1 x Thymin-C6), 135.86 (1 x Thymin-C6), 136.65 (2 x Aryl-C5), 148.08 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 150.85 (1 x Thymin-C2), 150.88 (1 x Thymin-C2), 163.88 (1 x Thymin-C4), 163.90 (1 x Thymin-C4), 169.44 (2 x C12), 171.22 (2 x C10); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.00, -8.07; MS (FAB): ber.: 537.1 (M+H⁺), gef.: 537.0 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.36; HPLC: t_R = 14.0 min. (Methode I), t_R = 11.9 min. (Methode III)

8.2.5.2.2 Synthese von 5-(Pivaloyloxymethyloxycarbonylethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat (5-(POM-Pr)-cycloSal-d4TMP) 49

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Zu einer Lösung von 40 mg (86 μmol) von 5-(2-Carboxyethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat **142** in 10 mL abs. Acetonitril wurden bei Raumtemperatur 1.53 mL einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 94.7 μmol DIPEA) und 1.37 mL einer Lösung von Chlormethylpivalat in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 94.7 μmol Chlormethylpivalat) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 9 d bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Nicht umgesetztes Edukt **142** konnte nicht in reiner Form reisoliert werden.

Ausbeute: 23 mg (39 μmol , 45 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.11 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.12 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.63 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 1.70 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 2.71 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H9), 2.84 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 2 x H8),

4.25-4.37 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.96-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.33-5.48 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 5.69 (s, 1 x 2H, 1 x H11), 5.70 (s, 1 x 2H, 1 x H11), 6.02-6.05 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.36 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1 x H3'), 6.42 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1 x H3'), 6.79-6.82 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.02 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2 \text{ Hz}$, 1 x Aryl-H3), 7.05 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2 \text{ Hz}$, 1 x Aryl-H3), 7.16-7.25 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.02 (1 x Thymin- CH_3), 12.10 (1 x Thymin- CH_3), 26.61 (2 x *t*-Bu- CH_3), 29.16 (2 x C8), 34.52 (2 x C9), 38.33 (2 x *t*-Bu-C), 68.41-68.52 (m, 2 x C5', 2 x Benzyl-C), 79.48 (2 x C11), 84.29 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1 \text{ Hz}$, 1 x C4'), 84.53 (1 x C4'), 89.35 (2 x C1'), 109.84 (2 x Thymin-C5), 118.06 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1 \text{ Hz}$, 2 x Aryl-C3), 125.94 (1 x Aryl-C6), 126.00 (1 x Aryl-C6), 127.48 (1 x C2'), 127.51 (1 x C2'), 128.43 (2 x Aryl-C1), 129.77 (1 x Aryl-C4), 129.86 (1 x Aryl-C4), 132.95 (1 x C3'), 133.02 (1 x C3'), 135.86 (2 x Thymin-C6), 136.64 (2 x Aryl-C5), 147.41 (2 x Aryl-C2), 150.67 (1 x Thymin-C2), 150.85 (1 x Thymin-C2), 163.89 (1 x Thymin-C4), 163.91 (1 x Thymin-C4), 167.17 (1 x C12), 167.32 (1 x C12), 171.19 (1 x C10), 171.24 (1 x C10); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.01, -8.08; MS (FAB): ber.: 537.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 537.0 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.43; HPLC: $t_R = 17.6 \text{ min.}$ (Methode I), $t_R = 14.8 \text{ min.}$ (Methode III)

Weitere Syntheseveruche

Die Synthese von **49** unter Verwendung von Iodmethylpivalat wurde versucht.

mit vorausgegangener Darstellung von Iodmethylpivalat

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 1.00 g (6.67 mmol) Natriumiodid in 8 mL Aceton gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.96 mL (6.6 mmol) Chlormethylpivalat getropft. Dabei war das langsame Ausfallen eines gelben Niederschlages zu beobachten. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem sich der Niederschlag gesetzt hatte, wurde die überstehende Lösung für die weitere Synthese verwendet.

Zu einer Lösung von 50 mg (0.11 mmol) von 5-(2-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat **142** in 10 mL abs. Acetonitril wurden bei Raumtemperatur 2.02 mL einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol DIPEA) und 0.15 mL der zuvor frisch hergestellten Lösung von Iodmethylpivalat in Aceton getropft. Das Reaktionsgemisch wurde sofort trüb und wurde noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Laut ¹H-NMR-Spektrum war ein Produktgemisch erhalten worden.

mit katalytischer in situ-Darstellung von Iodmethylpivalat

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Zu einer Lösung von 50 mg (0.11 mmol) von 5-(2-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat **142** in 10 mL abs. Acetonitril wurden bei Raumtemperatur 2.02 mL einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol DIPEA) und 1.71 mL einer Lösung von Chlormethylpivalat in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol Chlormethylpivalat) getropft sowie eine kleine Spatelspitze Natriumiodid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde sofort trüb und wurde noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Laut ¹H-NMR-Spektrum war ein Produktgemisch erhalten worden.

8.2.5.2.3 Synthese von 5-(*iso*-Propyloxycarbonyloxymethyloxycarbonylethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (5-(POC-Pr)-*cycloSal*-d4TMP) 50

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Zu einer Lösung von 70 mg (0.15 mmol) von 5-(2-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat **142** in 18 mL abs. Acetonitril wurden bei Raumtemperatur 1.47 mL

einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 50 v/v, 0.17 mmol DIPEA) und 0.76 mL einer Lösung von *iso*-Propyloxycarbonyloxymethylchlorid (POC-Chlorid) in abs. Acetonitril (33 mg/mL, 0.17 mmol POC-Chlorid) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 16 d bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Da der Umsatz von **142** nur gering war, wurde weitere 7 d bei 50°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-5 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Nicht umgesetztes Edukt **142** konnte nicht in reiner Form reisoliert werden.

Ausbeute: 41 mg (71 μ mol, 47 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.5 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.25 (d, 2 x 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 2 x *i*-Pr-CH₃), 1.63 (d, 1 x 3H, $^4J_{\text{HH}} = 0.6$ Hz, 1 x Thymin-CH₃), 1.70 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 2.73 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2 x H9), 2.85 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2 x H8), 4.25-4.36 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.82 (sep, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 2 x *i*-Pr-CH), 4.95-4.99 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.35-5.39 (m, 2 x 1H, 2 x Benzyl-H), 5.43 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 5.8$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.47 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 5.9$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.69 (s, 2 x 2H, 2 x H11), 6.01-6.05 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.35-6.38 (m, 1 x 1H, 1 x H3'), 6.42-6.45 (m, 1 x 1H, 1 x H3'), 6.79-6.81 (m, 1 x 1H, 1 x H1'), 6.81-6.83 (m, 1 x 1H, 1 x H1'), 7.03 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.05 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.16-7.27 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 11.35 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.36 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.00 (1 x Thymin-CH₃), 12.09 (1 x Thymin-CH₃), 21.49 (2 x *i*-Pr-CH₃), 29.12 (2 x C8), 34.57 (2 x C9), 68.44 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 68.55 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.8$ Hz, 2 x C5'), 72.78 (2 x *i*-Pr-CH), 81.86 (2 x C11), 84.27 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x C4'), 89.35 (2 x C1'), 109.81 (1 x Thymin-C5), 109.83 (1 x Thymin-C5), 118.16 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 2 x Aryl-C3), 125.92 (1 x Aryl-C6), 125.99 (1 x Aryl-C6), 127.46 (1 x C2'), 127.49 (1 x C2'), 129.73 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x Aryl-C1), 129.80 (1 x Aryl-C4), 129.85 (1 x Aryl-C4), 133.02 (1 x C3'), 133.04 (1 x C3'), 135.80 (1 x Thymin-C6), 135.85 (1 x Thymin-C6), 136.59 (1 x Aryl-C5), 136.62 (1 x Aryl-C5), 148.06 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.4$ Hz, 2 x Aryl-C2), 150.93 (2 x Thymin-C2), 152.87

(2 x C12), 163.86 (1 x Thymin-C4), 163.89 (1 x Thymin-C4), 171.19 (2 x C10); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.01, -8.09; MS (FAB-HR): ber.: 581.1536 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 581.1530 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.53; HPLC: t_R = 14.1 min. (Methode I), t_R = 13.3 min. (Methode III)

8.2.5.3 Synthese von 3-(2-Carboxyethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat (3-(HOOC-Et)-cycloSal-d4TMP) 138^[95]

8.2.5.3.1 Synthese von 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester 158

Es wurden 3.01 g (18.1 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure und 17.4 g (0.234 mol) *tert*-Butanol in 44 mL Toluol gelöst. Die Lösung wurde unter Rückfluß erhitzt und dann über einen Zeitraum von 30 min. tropfenweise mit 12.5 g (45.1 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-dineopentylacetal versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h unter Rückfluß erhitzt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und je zweimal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert, wobei dreimal mit Dichlormethan coevaporiert wurde. Das so erhaltene Produkt wurde nicht weiter gereinigt.

Ausbeute: 3.37 g (15.2 mmol, 84 %) eines farblosen Öls

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.43 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 2.65 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, H2), 2.86 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, H3), 6.84-6.91 (m, 2H, Aryl-H3, Aryl-H5), 7.07 (m, 2H, Aryl-H4, Aryl-H6), 7.57 (s, 1H, OH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 25.06 (C3), 28.44 (*t*-Bu- CH_3), 36.88 (C2), 80.78 (*t*-Bu-C), 117.81 (Aryl-C3), 121.04 (Aryl-C5), 128.33 (Aryl-C4), 131.02 (Aryl-C6), 154.83 (Aryl-C2), 174.52 (C=O); MS (EI, m/z): ber.: 222 (M), gef.: 222 (M, 5 %), 166 (48), 148 (100), 120 (71), 107 (36), 91 (18), 77 (19), 57 (52), 41 (29); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 225, 273; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.60

8.2.5.3.2 Synthese von 3-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-salicylalkohol **160**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 aus Kapitel **8.2.1.1** durchgeführt.

Es wurden 3.37 g (15.2 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester **158**, 2.51 g (16.4 mmol) Phenylboronsäure, insgesamt 3.64 g (121 mmol) *para*-Formaldehyd (in vier Portionen), 0.67 mL (0.67 g, 7.1 mmol) Propionsäure, 70 mL Toluol, 10 mL THF und 10 mL 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung eingesetzt. Die Reaktionszeit bei der Synthese des Dioxaborins **159** betrug 8 h. Vor der Oxidation wurde es am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-20 %), wobei 3.50 g (10.3 mmol, 68 %) eines gelblichen Öls erhalten wurden. Das Produkt aus der Oxidation wurde mehrfach am Chromatotron gereinigt (Petrolether/Diethylether 4 : 1 v/v).

Ausbeute: 1.63 g (6.47 mmol, 43 % über 2 Stufen) eines farblosen Öls, das langsam kristallisierte

Daten zur Charakterisierung von **159**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 1.47 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 2.65 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, H10), 3.10 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, H9), 5.24 (s, 2H, Borin-H4), 6.89 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, Borin-H5), 6.98 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, Borin-H6), 7.12-7.18 (m, 1H, Borin-H7), 7.40-7.47 (m, 2H, Phenyl-H3, Phenyl-H5), 7.48-7.55 (m, 1H, Phenyl-H4), 7.97-8.07 (m, 2H, Phenyl-H2, Phenyl-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 26.22 (C9), 28.52 (*t*-Bu- CH_3), 36.04 (C10), 63.39 (Borin-C4), 77.42 (*t*-Bu-C), 123.15 (Borin-C8a), 123.28 (Borin-C6), 124.80 (Borin-C5), 128.40 (Phenyl-C3, Phenyl-C5), 128.68 (Borin-C8), 129.71 (Borin-C4a), 129.92 (Borin-C7), 131.95 (Phenyl-C4), 134.75 (Phenyl-C2, Phenyl-C6), 168.53 (C=O); DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.91

Daten zur Charakterisierung von **160**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.38 (s, *t*-Bu- CH_3), 2.44 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H9), 2.71 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H8), 4.45 (s, 2H, Benzyl-H), 4.91 (s, 1H, Benzyl-OH), 6.67 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, H4), 6.88 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, H5), 7.13

(d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, H6), 9.11 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 25.73 (C8), 28.12 (*t*-Bu-CH $_3$), 35.25 (C9), 60.37 (Benzyl-C), 79.89 (*t*-Bu-C), 119.45 (C5), 125.89 (C6), 127.59 (C3), 128.39 (C1), 128.55 (C4), 152.75 (C2), 172.20 (C=O); MS (EI, m/z): ber.: 252 (M), gef.: 252 (M, 8 %), 196 (48), 178 (48), 161 (84), 132 (100), 119 (15), 104 (9), 91 (20), 77 (18), 57 (74), 41 (29); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3471, 3346, 2980, 2939, 1705, 1596, 1464, 1392, 1368, 1310, 1262, 1220, 1153, 1086, 1022, 998, 932, 846, 790, 748; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 224, 276; DC: R $_f$ -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.56

8.2.5.3.3 Synthese von 3-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-saligenylchlorphosphit 161

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.63 g (6.47 mmol) 3-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-salicylalkohol **160**, 0.66 mL (1.0 g, 7.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 1.20 mL (1.18 g, 14.9 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 6 mL abs. Diethylether, und 50 mL abs. Diethylether eingesetzt. In Abweichung von der AAV 6 wurde mit dem Zutropfen von Pyridin unmittelbar nach der Zugabe von Phosphor(III)-chlorid begonnen.

Ausbeute: 1.66 g eines noch verunreinigten schwach gelblichen Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 2.05 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.42 (s, 9H, *t*-Bu-CH $_3$), 2.50 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H9), 2.89 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H8), 5.01 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.3$ Hz, Benzyl-H), 5.40 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, Benzyl-H'), 6.82 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H6), 7.01 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.14 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 25.34 (C8), 28.05 (*t*-Bu-CH $_3$), 35.22 (C9), 61.18 (d, $^2J_{\text{CP}} = 1.9$ Hz, Benzyl-C), 80.32 (*t*-Bu-C), 121.35 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz, C1), 123.53 (C5), 123.83 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C6), 129.80 (C4), 131.01 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.1$ Hz, C1), 144.38 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C2), 172.05 (C=O); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 141.34

8.2.5.3.4 Synthese von 3-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3-(*t*-Bu-Pr)-*cycloSal*-d4TMP) 136

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 740 mg (3.29 mmol) d4T **4**, 1.66 g noch verunreinigtes 5-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-saligenylchlorphosphit **161** (gelöst in 30 mL abs. Acetonitril), 1.08 mL (801 mg, 6.21 mmol) DIPEA, 2.04 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (11.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 90 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 840 mg (1.61 mmol, 49 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.37 (s, 2 x 9H, 2 x *t*-Bu-CH₃), 1.60 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 1.67 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 2.48-2.56 (m, 2 x 2H, 2 x H₉), 2.77-2.90 (m, 2 x 2H, 2 x H₈), 4.28-4.38 (m, 2 x 2H, 2 x H_{5'}), 4.97-5.01 (m, 2 x 1H, 2 x H_{4'}), 5.36-5.52 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.02-6.06 (m, 2 x 1H, 2 x H_{2'}), 6.39-6.43 (m, 2 x 1H, 2 x H_{3'}), 6.82-6.83 (m, 2 x 1H, 2 x H_{1'}), 7.11-7.16 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H₅, 2 x Aryl-H₆), 7.22 (s, 2 x 1H, 2 x Thymin-H₆), 7.28-7.29 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H₄), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, DMSO- d_6): 11.90 (1 x Thymin-CH₃), 12.01 (1 x Thymin-CH₃), 24.39 (1 x C₈), 24.42 (1 x C₈), 27.86 (2 x *t*-Bu-CH₃), 34.55 (1 x C₉), 34.61 (1 x C₉), 68.38 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.6$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.44 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.73 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x C_{5'}), 68.78 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x C_{5'}), 80.04 (2 x *t*-Bu-C), 84.28 (1 x C_{4'}), 84.34 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x C_{4'}), 89.30 (1 x C_{1'}), 89.35 (1 x C_{1'}), 109.84 (1 x Thymin-C₅), 109.86 (1 x Thymin-C₅), 121.63 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.5$ Hz, 2 x Aryl-C₃), 124.25 (2 x Aryl-C₅), 124.44 (1 x Aryl-C₆), 124.46 (1 x Aryl-C₆), 127.55 (2 x C_{2'}), 129.64 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C₁), 129.70 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C₁), 130.33 (1 x Aryl-C₄), 130.34 (1 x Aryl-C₄), 132.90 (1 x C_{3'}), 132.96 (1 x C_{3'}), 135.77 (1 x Thymin-C₆), 135.83 (1 x Thymin-C₆), 147.93 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.8$ Hz, 1 x Aryl-C₂), 147.99 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.8$ Hz, 1 x Aryl-C₂), 150.86 (2 x Thymin-C₂), 163.87 (2 x Thymin-C₄), 171.35 (1 x C=O), 171.39 (1 x C=O); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.47, -7.49; MS (FAB): ber.: 521.2 (M+H⁺), gef.: 521.1 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.47; HPLC: t_R = 16.6 min. (Methode I)

8.2.5.3.5 Synthese von 3-(2-Carboxyethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat (3-(HOOC-Et)-cycloSal-d4TMP) 138

Es wurden 200 mg (0.384 mmol) 3-(*tert*-Butyloxycarbonylethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat **136** in 200 mL Dichlormethan gelöst und mit 32.0 mL (47.4 g, 0.416 mol) Trifluoressigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 50 min. bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurden das Lösungsmittel und die TFA am Rotationsverdampfer entfernt. Der dunkle ölige Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-5 %), Methanol angesäuert mit 0.1 % Essigsäure). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 163 mg (0.351 mmol, 91 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.60 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.67 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 2.51-2.57 (m, 2 x 2H, 2 x H9), 2.78-2.87 (m, 2 x 2H, 2 x H8), 4.27-4.37 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.97-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.35-5.52 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.03-6.07 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.38-6.43 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.79-6.82 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.03 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.16-7.18 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.23 (s, 2 x 1H, 2 x Thymin-H6), 7.28-7.30 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 11.38 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, DMSO- d_6): 11.93 (1 x Thymin- CH_3), 12.04 (1 x Thymin- CH_3), 24.27 (2 x C8), 33.50 (1 x C9), 33.57 (1 x C9), 68.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.48 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.71 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x C5'), 68.76 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x C5'), 84.32 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 2 x C4'), 89.33 (1 x C1'), 89.39 (1 x C1'), 109.87 (1 x Thymin-C5), 109.89 (1 x Thymin-C5), 121.65 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.5$ Hz, 2 x Aryl-C3), 124.34 (2 x Aryl-C5), 124.40 (2 x Aryl-C6), 127.53 (1 x C2'), 127.55 (1 x C2'), 129.92 (1 x Aryl-C1), 129.99 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C1), 130.23 (1 x Aryl-C4), 130.26 (1 x Aryl-C4), 132.93 (1 x C3'), 133.01 (1 x C3'), 135.79 (1 x Thymin-C6), 135.87 (1 x Thymin-C6), 147.91 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C2), 147.96 (1 x Aryl-C2), 150.87 (1 x Thymin-C2), 150.89 (1 x Thymin-C2), 163.89 (2 x Thymin-C4), 173.62 (1 x C=O), 173.66 (1 x C=O); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.48, -7.55; MS (FAB): ber.:

465.1 (M+H⁺), gef.: 465.1 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{\max} [nm]: 265; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.18; HPLC: t_R = 8.2 min. (Methode I)

8.2.5.4 Versuch der Synthese der „lock-in“-modifizierten cycloSal-Nucleotide 155,156

8.2.5.4.1 Versuch der Synthese von 3-(Acetoxymethyloxycarbonylethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat (3-(AM-Pr)-cycloSal-d4TMP) 155

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Zu einer Suspension von 50 mg (0.11 mmol) von 3-(2-Carboxyethyl)-cycloSal-d4T-monophosphat **138** in 20 mL abs. Acetonitril wurden bei 10°C 2.1 mL einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol DIPEA) und 1.3 mL einer Lösung von Brommethylacetat in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol Brommethylacetat) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 10°C gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Laut ¹H-NMR-Spektrum wurde ein Produktgemisch erhalten.

Weitere Syntheseversuche

Das Lösungsmittel wurde variiert.

mit DMF als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit 5 mL abs. DMF als Lösungsmittel (klare Lösung statt Suspension). Auch hier wurde laut ¹H-NMR-Spektrum ein Produktgemisch erhalten.

mit Acetonitril/DMF 5 : 1 v/v als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit 6 mL abs. Acetonitril/DMF 5 : 1 v/v als Lösungsmittel (klare Lösung statt Suspension). Auch hier wurde laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Produktgemisch erhalten.

8.2.5.4.2 Versuch der Synthese von 3-(Pivaloyloxymethyloxycarbonylethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3-(POM-Pr)-*cycloSal*-d4TMP) 156

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Zu einer Suspension von 50 mg (0.11 mmol) von 3-(2-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4T-monophosphat **138** in 20 mL abs. Acetonitril wurden bei Raumtemperatur 2.1 mL einer Lösung von DIPEA in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol DIPEA) und 1.7 mL einer Lösung von Chlormethylpivalat in abs. Acetonitril (1 : 100 v/v, 0.12 mmol Chlormethylpivalat) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 9 d bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet. Laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde ein Produktgemisch erhalten.

Weitere Syntheseversuche

Das Lösungsmittel wurde variiert.

mit DMF als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit 5 mL abs. DMF als Lösungsmittel (klare Lösung statt Suspension). Auch hier wurde laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Produktgemisch erhalten.

mit Acetonitril/DMF 5 : 1 v/v als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit 6 mL abs. Acetonitril/DMF 5 : 1 v/v als Lösungsmittel (klare Lösung statt Suspension). Auch hier wurde laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Produktgemisch erhalten.

8.2.6 Synthese von Verbindungen für den Cholinesterase-Assay

8.2.6.1 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-Derivaten der natürlichen Desoxyribonucleoside

8.2.6.1.1 Synthese von 3-Methylsalicylalkohol 175

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel 8.2.1.2 durchgeführt.

Es wurden 12.0 g (78.9 mmol) 3-Methylsalicylsäure, gelöst in 90 mL abs. THF, und 5.92 g (156 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 100 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 6.80 g (49.2 mmol, 62 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 2.15 (s, 1H, Benzyl-OH), 2.27 (s, 3H, Aryl- CH_3), 4.87 (s, 2H, Benzyl-H), 6.77 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H5), 6.89 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H4), 7.10 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H6), 7.38 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 15.45 (Aryl- CH_3), 64.11 (Benzyl-C), 119.61 (C5), 124.11 (C3), 125.12 (C1), 125.45 (C6), 130.62 (C4), 153.89 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 138 (M), gef.: 138 (M, 59 %), 120 (100), 99 (10), 91 (97), 77 (15), 65 (17), 63 (7), 51 (13), 39 (20); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3383, 2922, 1596, 1473, 1439, 1265, 1222, 996, 772, 747; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 226, 276; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.69

8.2.6.1.2 Synthese von 3-Methylsaligenylchlorphosphit 174

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 2.00 g (14.5 mmol) 3-Methylsalicylalkohol **175**, 1.46 mL (2.30 g, 16.7 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 2.70 mL (2.65 g, 33.5 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 7 mL abs. Diethylether, und 70 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 2.36 g eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 2.93 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 2.26 (s, 3H, Aryl- CH_3), 5.02 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.5$ Hz, Benzyl-H), 5.44 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 2.5$ Hz, Benzyl-H'), 6.82 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H4), 7.00 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.14 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 15.99 (Aryl- CH_3), 61.70 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, Benzyl-C), 121.57 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz, C3), 123.63 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C6), 123.81 (C5), 128.76 (d, $^3J_{\text{CP}} = 1.5$ Hz, C1), 130.94 (C4), 144.98 (C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 142.03

8.2.6.1.3 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxyadenosin-monophosphat (3-Me-cycloSal-dAMP) **172**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante III aus Kapitel **8.2.1.7** durchgeführt. Es wurden 300 mg (1.11 mmol) 2'-Desoxyadenosin-Monohydrat (vor Beginn der Reaktion fünfmal mit abs. Pyridin coevaporiert), 345 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.40 mL (0.30 g, 2.3 mmol) DIPEA, 0.67 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (3.7 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 18 mL abs. DMF/THF 1 : 5 v/v eingesetzt. In Abweichung von der AAV 7 erfolgte die erste Trennung am Chromatotron mit Ethylacetat/Methanol 4 : 1 v/v. Da das Produkt auch nach mehrfacher Trennung am Chromatotron nicht rein erhalten werden konnte, wurde es schließlich mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 3 : 7 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 69 mg (0.16 mmol, 14 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.7 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.14 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.20 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.32 (ddd, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, 2 x H $2'$), 2.77-2.85 (m, 2 x 1H, 2 x H $2''$), 4.00-4.04 (m, 2 x 1H, 2 x H $4'$), 4.22-4.31 (m, 2 x 1H, 2 x H $5'$), 4.36 (ddd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, 2 x H $5''$), 4.38 (ddd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, 2 x H $5''$), 4.45-4.49 (m, 2 x 1H, 2 x H $3'$), 5.31-5.48 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 5.52 (s, 2 x 1H, 2 x OH), 6.36 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 2 x H $1'$), 7.03-7.10 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H 5 , 2 x Aryl-H 6), 7.21-7.27 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H 4 , 2 x NH_2), 8.11 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 8), 8.12 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 8), 8.25 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 2), 8.27 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 2); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 14.91 (1 x Aryl- CH_3), 15.02 (1 x Aryl- CH_3), 38.44 (1 x C $2'$), 38.57 (1 x C $2'$), 67.88 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.04 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.45 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C $5'$), 68.51 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C $5'$), 70.42 (2 x C $3'$), 83.62 (d, $^3J_{\text{CP}} = 12.2$ Hz, 2 x C $4'$), 84.78 (1 x C $1'$), 84.85 (1 x C $1'$), 119.35 (1 x Adenin-C 5), 119.39 (1 x Adenin-C 5), 121.07 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 2 x Aryl-C 1), 123.62 (1 x Aryl-C 5), 123.67 (1 x Aryl-C 5), 124.04 (2 x Aryl-C 6), 126.98 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x Aryl-C 3), 130.99 (2 x Aryl-C 4), 139.54 (1 x Adenin-C 8), 139.64 (1 x Adenin-C 8), 148.06 (2 x Aryl-C 2), 149.18 (2 x Adenin-C 4), 152.68 (2 x Adenin-C 2), 156.22 (2 x Adenin-C 6); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.93, -8.09; MS (FAB-HR): ber.: 434.1229 (M+H $^+$), gef.: 434.1232 (M+H $^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 259; DC: R $_f$ -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.23; HPLC: $t_{\text{R}} = 11.5$ min. (Methode I), $t_{\text{R}} = 16.8$ min. (Methode II)

8.2.6.1.4 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxyguanosin-monophosphat (3-Me-cycloSal-dGMP) 173

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante III aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 300 mg (1.05 mmol) 2'-Desoxyguanosin-Monohydrat (vor Beginn der Reaktion fünfmal mit abs. Pyridin coevaporiert), 319 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.36 mL (0.27 g, 2.1 mmol) DIPEA, 0.64 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (3.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 18 mL abs. DMF/THF 1 : 5 v/v eingesetzt. In Abweichung von der AAV 7 erfolgte die erste Trennung am Chromatotron mit Ethylacetat/Methanol 4 : 1 v/v.

Ausbeute: 18 mg (4.2 μmol , 4 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.17 (s, 2 x 3H, 2 x Aryl- CH_3), 2.25-2.30 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 2.55-2.62 (m, 2 x 1H, 2 x H2''), 3.96-4.01 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.20-4.42 (m, 2 x 3H, 2 x H3', 2 x H5'), 5.33-5.50 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.13 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 1 x H1'), 6.13 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 1 x H1'), 6.45 (s, 2 x 2H, 2 x NH_2), 7.07-7.26 (m, 2 x 3H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.78 (s, 2 x 1H, 2 x Guanin-H8), 10.60 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 14.96 (1 x Aryl- CH_3), 15.07 (1 x Aryl- CH_3), 39.95 (2 x C2'), 68.04 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.19 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.50 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C5'), 68.57 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 70.39 (2 x C3'), 82.78 (d, $^3J_{\text{CP}} = 11.2$ Hz, 2 x C4'), 84.69 (1 x C1'), 84.76 (1 x C1'), 116.93 (1 x Guanin-C5), 116.96 (1 x Guanin-C5), 120.95 (d, $^3J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 121.09 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 1 x Aryl-C1), 123.67 (1 x Aryl-C5), 123.70 (1 x Aryl-C5), 124.10 (2 x Aryl-C6), 126.99 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C3), 127.07 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C3), 131.03 (2 x Aryl-C4), 135.25 (1 x Guanin-C8), 135.32 (1 x Guanin-C8), 148.04 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 151.02 (2 x Guanin-C4), 153.83 (2 x Guanin-C2), 156.86 (2 x Guanin-C6); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.84, -7.98; MS (FAB-HR): ber.: 450.1179 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 450.1165 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 253; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.20; HPLC: $t_R = 10.7$ min. (Methode I), $t_R = 14.9$ min. (Methode II)

8.2.6.1.5 Synthese von *N*-(Dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin 177^[144,145]

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 2.00 g (7.58 mmol) 2'-Desoxycytidin-hydrochlorid fünfmal mit abs. Pyridin coevaporiert und dann in 35 mL abs. Pyridin suspendiert. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur mit 4.85 mL (4.15 g, 38.2 mmol) Trimethylsilylchlorid (TMS-Chlorid) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich eine leicht gelbliche, klare Lösung ergab. Anschließend wurden 5.14 g (15.2 mmol) Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Chlorid) zugegeben und das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 35 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung bei

0°C wurde auf Raumtemperatur erwärmt und noch 20 min. bei Raumtemperatur gerührt. Die klare gelbe Lösung wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene Rückstand wurde zunächst dreimal mit Dichlormethan coevaporiert, um restliches Pyridin zu entfernen, und dann mehrfach am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-7 %)).

Ausbeute: 3.60 g (6.80 mmol, 90 %) eines schwach gelblichen Schaums

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.89 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H2'), 1.98-2.12 (m, 1H, H2''), 3.46-3.58 (m, 2H, H5'), 3.70-3.74 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 4.14-4.20 (m, 1H, H3'), 4.93 (s, 1H, 5'-OH), 5.16 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$ Hz, 3'-OH), 6.06 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H1'), 6.25 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, Cytosin-H5), 6.85 (d, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, DMTr-H3', DMTr-H5'), 7.13-7.28 (m, 9H, DMTr-H2, DMTr-H3, DMTr-H4, DMTr-H5, DMTr-H6, DMTr-H2', DMTr-H6'), 7.71 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, Cytosin-H6), 8.33 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 40.38 (C2'), 55.14 (OCH₃), 61.62 (C5'), 69.48 (C3'), 70.76 (DMTr-C7), 84.84 (C1'), 87.32 (C4'), 96.43 (Cytosin-C5), 112.86 (DMTr-C3', DMTr-C5'), 127.55 (DMTr-C4), 128.64 (DMTr-C2, DMTr-C6), 130.03 (DMTr-C3, DMTr-C5, DMTr-C2', DMTr-C6'), 137.12 (DMTr-C1'), 139.65 (Cytosin-C6), 145.65 (DMTr-C1), 149.26 (Cytosin-C2), 157.59 (DMTr-C4'), 163.49 (Cytosin-C4); MS (FAB): ber.: 530.2 (M+H⁺), gef.: 530.3 (M+H⁺); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3393, 2932, 1642, 1508, 1414, 1297, 1253, 1180, 1092, 1032, 831, 784, 704, 591; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 225, 281; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1): 0.25

8.2.6.1.6 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-N-(dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidinmonophosphat (3-Me-cycloSal-N-DMTr-dCMP) 178

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.566 mmol) N-(Dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin **177**, 176 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.20 mL (0.15 g, 1.2 mmol) DIPEA, 0.34 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.9 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 6 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 63 mg (89 μ mol, 16 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.86-1.93 (m, 1 x 1H, 1 x H2'), 2.00-2.15 (m, 1 x 1H, 1 x H2''), 2.20 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.24 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 3.74 (s, 2 x 6H, 2 x OCH₃), 3.84-3.90 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.10-4.17 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.18-4.31 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.31-5.52 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.04-6.10 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 6.20 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Cytosin-H5), 6.21 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 1 x Cytosin-H5), 6.84-7.35 (m, 2 x 16H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6, 2 x DMTr-H2, 2 x DMTr-H3, 2 x DMTr-H4, 2 x DMTr-H5, 2 x DMTr-H6, 2 x DMTr-H2', 2 x DMTr-H3', 2 x DMTr-H5', 2 x DMTr-H6'), 7.41 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Cytosin-H6), 7.43 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 1 x Cytosin-H6), 8.37 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 8.39 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 15.07 (1 x Aryl-CH₃), 15.15 (1 x Aryl-CH₃), 40.05 (2 x C2'), 68.63 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 2 x C5'), 68.70 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 70.27 (2 x C3'), 84.73 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x C4'), 84.82 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x C4'), 85.32 (1 x C1'), 85.37 (1 x C1'), 96.80 (1 x Cytosin-C5), 96.84 (1 x Cytosin-C5), 112.94 (2 x DMTr-C3', 2 x DMTr-C5'), 120.67 (2 x Aryl-C1), 123.76 (1 x Aryl-C5), 123.79 (1 x Aryl-C5), 124.23 (2 x Aryl-C6), 127.06 (1 x Aryl-C3), 127.15 (1 x Aryl-C3), 127.65 (2 x DMTr-C4), 128.67 (2 x DMTr-C2, 2 x DMTr-C6), 130.11 (2 x DMTr-C3, 2 x DMTr-C5, 2 x DMTr-C2', 2 x DMTr-C6'), 131.12 (2 x Aryl-C4), 137.11 (1 x DMTr-C1'), 137.13 (1 x DMTr-C1'), 139.54 (1 x Cytosin-C6), 139.64 (1 x Cytosin-C6), 145.77 (1 x DMTr-C1), 145.86 (1 x DMTr-C1), 147.50 (1 x Aryl-C2), 147.66 (1 x Aryl-C2), 149.61 (2 x Cytosin-C2), 157.64 (2 x DMTr-C4'), 163.53 (1 x Cytosin-C4), 163.59 (1 x Cytosin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.92; MS (FAB): ber.: 711.2 (M), gef.: 711.4 (M); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 276; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.37; HPLC: t_R = 19.0 min. (Methode I)

8.2.6.1.7 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxycytidin-monophosphat-hydrotrifluoracetat (3-Me-cycloSal-dCMP, TFA-Salz) 176

Es wurden 50 mg (70 μ mol) 3-Methyl-cycloSal-N-(dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin-monophosphat **178** in 10 mL Dichlormethan/Methanol 7 : 3 v/v gelöst und bei Raumtemperatur zunächst mit 0.60 mL (0.89 g, 7.8 mmol) TFA versetzt. Die

Reaktionslösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und nach 1 bzw. 2 h jeweils mit weiteren 0.60 mL (0.89 g, 7.8 mmol) TFA versetzt, so daß sich schließlich eine dunkelrote Färbung der Lösung ergab. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 4 : 1 v/v). Nach vollständiger Umsetzung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-15 %)). Das so erhaltene Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 32 mg (61 μ mol, 87 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.01-2.08 (m, 1 x 1H, 1 x H2'), 2.15-2.20 (m, 1 x 1H, 1 x H2''), 2.23 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.24 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 3.93-3.97 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.16-4.21 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.24-4.36 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.39-5.53 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 5.76 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1 x Cytosin-H5), 5.80 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1 x Cytosin-H5), 6.14 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.14 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 7.10-7.12 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.25-7.29 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.66 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1 x Cytosin-H6), 7.66 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1 x Cytosin-H6), 7.82 (s, 1 x 1H, 1 x NH₃⁺), 8.15 (s, 1 x 1H, 1 x NH₃⁺); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 15.07 (2 x Aryl-CH₃), 40.05 (2 x C2'), 67.78 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C5'), 67.85 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x C5'), 68.61 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.68 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.90 (1 x C3'), 70.00 (1 x C3'), 84.57 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C4'), 84.66 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 1 x C4'), 85.57 (2 x C1'), 94.27 (1 x Cytosin-C5), 94.31 (1 x Cytosin-C5), 120.46 (2 x Aryl-C1), 123.73 (1 x Aryl-C5), 123.77 (1 x Aryl-C5), 124.20 (2 x Aryl-C6), 127.02 (2 x Aryl-C3), 131.11 (2 x Aryl-C4), 142.20 (1 x Cytosin-C6), 142.27 (1 x Cytosin-C6), 148.01 (2 x Aryl-C2), 151.95 (1 x Cytosin-C2), 151.97 (1 x Cytosin-C2), 163.11 (1 x Cytosin-C4), 163.14 (1 x Cytosin-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -74.08; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.83, -7.96; MS (FAB): ber.: 410.1 (M+H⁺, freies Amin), gef.: 410.2 (M+H⁺, freies Amin); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 271; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.33; HPLC: t_R = 10.5, 10.6 min. (Methode I)

8.2.6.1.8 Versuch der Synthese von 3-Methyl-cycloSal-2'-desoxycytidin-monophosphat (3-Me-cycloSal-dCMP) 176 durch direkte Reaktion von 174 mit 2'-Desoxycytidin

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante III aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 300 mg (1.22 mmol) 2'-Desoxycytidin-Monohydrat (vor Beginn der Reaktion fünfmal mit abs. Pyridin coevaporiert), 387 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.44 mL (0.33 g, 2.6 mmol) DIPEA, 0.79 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (4.3 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 18 mL abs. DMF/THF 1 : 5 v/v eingesetzt. In Abweichung von der AAV 7 erfolgte die erste Trennung am Chromatotron mit Ethylacetat/Methanol 4 : 1 v/v. Das gewünschte Produkt **176** konnte nicht isoliert werden.

8.2.6.2 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-Derivaten verschiedener Nucleosid-Analoga

8.2.6.2.1 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-ddT-monophosphat (3-Me-cycloSal-ddTMP) 181

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.442 mmol) ddT **57**, 183 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.27 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 40 mg (98 μ mol, 22 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.72 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.75 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.82-1.89 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 1.90-2.06 (m, 2 x 2H, 2 x H2', 2 x H3''), 2.22 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.23 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.23-2.30 (m, 2 x 1H, 2 x H2''), 4.16-4.22 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.23-4.40 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.41 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.3$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.42 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 5.6$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.46 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz,

$^3J_{\text{HP}} = 8.2 \text{ Hz}$, 1 x Benzyl-H'), 5.51 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}} = 8.2 \text{ Hz}$, 1 x Benzyl-H'), 6.00 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.8 \text{ Hz}$, 1 x H1'), 6.02 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.8 \text{ Hz}$, 1 x H1'), 7.08-7.12 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.25-7.28 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.44 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.45 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 11.28 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.15 (1 x Thymin- CH_3), 12.20 (1 x Thymin- CH_3), 14.97 (1 x Aryl- CH_3), 15.02 (1 x Aryl- CH_3), 25.31 (1 x C3'), 25.44 (1 x C3'), 30.41 (1 x C2'), 30.50 (1 x C2'), 68.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, 1 x Benzyl-C), 68.55 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, 1 x Benzyl-C), 69.14 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1 \text{ Hz}$, 1 x C5'), 69.19 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1 \text{ Hz}$, 1 x C5'), 77.91 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, 2 x C4'), 84.95 (1 x C1'), 85.06 (1 x C1'), 109.61 (2 x Thymin-C5), 121.11 (1 x Aryl-C1), 121.19 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1 \text{ Hz}$, 1 x Aryl-C1), 123.73 (2 x Aryl-C5), 124.09 (2 x Aryl-C6), 127.00 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, 2 x Aryl-C3), 131.03 (1 x Aryl-C4), 131.07 (1 x Aryl-C4), 135.86 (1 x Thymin-C6), 135.93 (1 x Thymin-C6), 148.08 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.4 \text{ Hz}$, 1 x Aryl-C2), 148.14 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.4 \text{ Hz}$, 1 x Aryl-C2), 150.52 (1 x Thymin-C2), 150.54 (1 x Thymin-C2), 163.86 (2 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.65, -7.73; MS (FAB-HR): ber.: 409.1165 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 434.1159 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.42; HPLC: $t_R = 13.7 \text{ min.}$ (Methode I), $t_R = 21.3 \text{ min.}$ (Methode II)

8.2.6.2.2 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-ddG-monophosphat (3-Me-cycloSal-ddGMP) 182

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante IV aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.36 mmol) ddG, 109 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174** (gelöst in 1.2 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v), 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.1 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 6 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit für die Phosphitylierung betrug 2 h. In Abweichung von der AAV 7 erfolgte die erste Trennung am Chromatotron mit Ethylacetat/Methanol 4 : 1 v/v. Da das Produkt auch nach mehrfacher Trennung am Chromatotron nicht rein erhalten werden konnte, wurde es schließlich mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 1 : 3 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 41 mg (95 μ mol, 26 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.8 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.98-2.15 (m, 2 x 2H, 2 x H3'), 2.17 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.22 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.27-2.44 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 4.18-4.36 (m, 2 x 3H, 2 x H4', 2 x H5'), 5.32-5.49 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 5.99 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, 1 x H1'), 6.01 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, 1 x H1'), 6.44 (s, 2 x 2H, 2 x NH₂), 7.05-7.10 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.22-7.26 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.76 (s, 1 x 1H, 1 x Guanin-H8), 7.80 (s, 1 x 1H, 1 x Guanin-H8), 10.60 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 15.08 (2 x Aryl-CH₃), 25.86 (1 x C3'), 25.88 (1 x C3'), 31.08 (1 x C2'), 31.14 (1 x C2'), 68.45 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.9$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.56 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, 2 x C5'), 78.66 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x C4'), 83.78 (1 x C1'), 83.87 (1 x C1'), 116.94 (1 x Guanin-C5), 116.98 (1 x Guanin-C5), 121.05 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.4$ Hz, 2 x Aryl-C1), 123.64 (2 x Aryl-C5), 124.05 (2 x Aryl-C6), 127.03 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.8$ Hz, 2 x Aryl-C3), 130.98 (2 x Aryl-C4), 135.04 (1 x Guanin-C8), 135.09 (1 x Guanin-C8), 148.01 (2 x Aryl-C2), 150.82 (2 x Guanin-C4), 153.71 (2 x Guanin-C2), 156.88 (2 x Guanin-C6); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.93, -8.05; MS (FAB-HR): ber.: 434.1229 (M+H⁺), gef.: 434.1238 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 253; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 4 : 1 v/v): 0.37; HPLC: t_R = 10.9 min. (Methode I), t_R = 25.7 min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 1 : 3 v/v)

8.2.6.2.3 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-FdU-monophosphat (3-Me-cycloSal-FdUMP) 184

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 119 mg (0.483 mmol) FdU, 151 mg noch verunreinigtes 3-Methylsallylchlorphosphit **174**, 0.17 mL (0.13 g, 1.0 mmol) DIPEA, 0.30 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.6 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt. Bei der Trennung am Chromatotron wurde neben dem Produkt **184** auch das Nebenprodukt **185** isoliert. Die Trennung der Diastereomere erfolgte mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 1 : 3 v/v, Wasser angesäuert mit 0.5 % Essigsäure).

Ausbeute: 79 mg (0.19 mmol, 39 %) von **184** als farblose Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8 sowie 42 mg (71 μ mol, 15 %) von **185** als Gemisch von 4 Diastereomeren im Verhältnis 0.9 : 0.9 : 1.0 : 0.9
Aus 48 mg Diastereomergemisch **184** wurden 17 mg **184 fast** und 14 mg **184 slow** erhalten

Daten zur Charakterisierung des Diastereomergemisches **184**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.06-2.15 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 2.23 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.24 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl-CH₃), 3.88-3.94 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.16-4.22 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.23-4.32 (m, 2 x 1H, 2 x H5'), 4.37 (ddd, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 2 x H5''), 5.38-5.55 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.14 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 2 x H1'), 7.08-7.13 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.23-7.28 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.86 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HF}} = 6.9$ Hz, 1 x FU-H6), 7.88 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HF}} = 6.9$ Hz, 1 x FU-H6);
 $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 15.00 (1 x Aryl-CH₃), 15.02 (1 x Aryl-CH₃), 38.53 (1 x C2'), 38.66 (1 x C2'), 67.64 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 67.85 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 68.55 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.63 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.72 (1 x C3'), 69.82 (1 x C3'), 84.41 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C4'), 84.50 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C4'), 84.68 (2 x C1'), 121.07 (1 x Aryl-C1), 121.08 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 1 x Aryl-C1), 123.72 (2 x Aryl-C5), 124.13 (2 x Aryl-C6), 124.79 (d, $^2J_{\text{CF}} = 34.6$ Hz, 2 x FU-C6), 127.03 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C3), 131.04 (2 x Aryl-C4), 140.51 (d, $^1J_{\text{CF}} = 285.9$ Hz, 1 x FU-C5), 140.96 (d, $^1J_{\text{CF}} = 82.4$ Hz, 1 x FU-C5), 148.03 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 148.07 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 149.12 (2 x FU-C2), 157.11 (d, $^2J_{\text{CF}} = 26.5$ Hz, 1 x FU-C4), 157.17 (d, $^2J_{\text{CF}} = 17.3$ Hz, 1 x FU-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, DMSO- d_6): -167.20, -167.24; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.76, -7.83; MS (FAB): ber.: 429.1 (M+H⁺), gef.: 429.2 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.33; HPLC: t_R = 12.6 min. (Methode I), t_R = 19.1 min. (Methode II), t_R = 34.5, 36.2 min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 1 : 3 v/v)

Daten zur Charakterisierung von **184 fast**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.06-2.15 (m, 2H, H2'), 2.23 (s, 3H, Aryl-CH₃), 3.88-3.94 (m, 1H, H4'), 4.16-4.22 (m, 1H, H3'), 4.23-4.32 (m, 1H, H5'), 4.37 (ddd, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 2 x H5'), 5.38-5.55 (m, 3H, Benzyl-H, OH), 6.15 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, H1'), 7.08-7.13 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 7.25-7.30 (m, 1H, Aryl-H4), 7.76 (d, 1H, $^3J_{\text{HF}} = 6.9$ Hz, FU-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 15.00 (Aryl-CH₃), 38.66 (C2'), 67.85 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C5'), 68.63 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, Benzyl-C), 69.82 (C3'), 84.50 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C4'), 84.68 (C1'), 121.08 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, Aryl-C1), 123.72 (Aryl-C5), 124.13 (Aryl-C6), 124.79 (d, $^2J_{\text{CF}} = 34.6$ Hz, FU-C6), 127.03 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C3), 131.04 (Aryl-C4), 140.96 (d, $^1J_{\text{CF}} = 82.4$ Hz, FU-C5), 148.03 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C2), 149.12 (FU-C2), 157.11 (d, $^2J_{\text{CF}} = 26.5$ Hz, FU-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, DMSO- d_6): -167.13; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.83

Daten zur Charakterisierung von **184 slow**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.06-2.20 (m, 2H, H2'), 2.23 (s, 3H, Aryl-CH₃), 3.88-3.94 (m, 1H, H4'), 4.17-4.23 (m, 1H, H3'), 4.27-4.40 (m, 2H, H5'), 5.38-5.55 (m, 3H, Benzyl-H, OH), 6.15 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, H1'), 7.08-7.13 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 7.25-7.30 (m, 1H, Aryl-H4), 7.80 (d, 1H, $^3J_{\text{HF}} = 6.9$ Hz, FU-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 15.02 (Aryl-CH₃), 38.53 (C2'), 67.64 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C5'), 68.55 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Benzyl-C), 69.72 (C3'), 84.41 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, C4'), 84.68 (C1'), 121.07 (Aryl-C1), 123.72 (Aryl-C5), 124.13 (Aryl-C6), 124.79 (d, $^2J_{\text{CF}} = 34.6$ Hz, FU-C6), 127.03 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C3), 131.04 (Aryl-C4), 140.51 (d, $^1J_{\text{CF}} = 285.9$ Hz, FU-C5), 148.07 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C2), 149.12 (FU-C2), 157.17 (d, $^2J_{\text{CF}} = 17.3$ Hz, FU-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, DMSO- d_6): -167.09; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.76

Daten zur Charakterisierung des Nebenproduktes **185**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.06-2.15 (m, 4 x 1H, 4 x H2'), 2.20-2.25 (m, 4 x 6H, 4 x Aryl-CH₃, 4 x Aryl-CH₃'), 2.37-2.49 (m, 4 x 1H, 4 x H2''), 3.88-3.94 (m, 4 x 1H, 4 x H4'), 4.16-4.47 (m, 4 x 3H, 4 x H3', 4 x H5'), 5.38-5.55 (m, 2 x 4H,

4 x Benzyl-H, 4 x Benzyl-H'), 6.09 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 2 x H1'), 6.13 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 2 x H1'), 7.07-7.15 (m, 4 x 4H, 4 x Aryl-H5, 4 x Aryl-H5', 4 x Aryl-H6, 4 x Aryl-H6'), 7.23-7.31 (m, 4 x 2H, 4 x Aryl-H4, 4 x Aryl-H4'), 7.92-7.99 (m, 4 x 1H, 4 x FU-H6), 11.90 (s, 4 x 1H, 4 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 14.99 (3 x Aryl- CH_3), 15.07 (1 x Aryl- CH_3), 38.50 (1 x C2'), 38.54 (1 x C2'), 38.60 (1 x C2'), 38.65 (1 x C2'), 66.50-66.87 (m, 4 x C5'), 68.57-68.87 (m, 4 x Benzyl-C, 4 x Benzyl-C'), 69.77 (4 x C3'), 82.08-82.31 (m, 4 x C4'), 84.74 (1 x C1'), 84.77 (2 x C1'), 84.80 (1 x C1'), 119.25 (4 x Aryl-C1'), 120.96-121.12 (4 x Aryl-C1), 123.72 (4 x Aryl-C5), 123.80 (4 x Aryl-C5'), 124.15 (4 x Aryl-C6), 124.30 (4 x Aryl-C6'), 124.92-125.33 (m, 4 x FU-C6), 126.63-127.15 (m, 4 x Aryl-C3, 4 x Aryl-C3'), 131.04 (4 x Aryl-C4), 131.17 (4 x Aryl-C4'), 140.27 (d, $^1J_{\text{CF}} = 231.9$ Hz, 4 x FU-C5), 147.82-148.02 (m, 4 x Aryl-C2), 149.07 (4 x FU-C2), 157.11 (d, $^2J_{\text{CF}} = 26.5$ Hz, 4 x FU-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, DMSO- d_6): -167.21, -167.25, -167.28, -167.31; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.90, -7.96, -8.01, -9.03, -9.09; MS (FAB): ber.: 611.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 611.3 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 267; DC: R_{F} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.51; HPLC: $t_{\text{R}} = 17.0$ min. (Methode I)

8.2.6.2.4 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-iso-2'-desoxyadenosin-monophosphat (3-Me-cycloSal-iso-dAMP) 186

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante III aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.477 mmol) *iso*-2'-Desoxyadenosin **58**, 145 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.17 mL (0.13 g, 1.0 mmol) DIPEA, 0.29 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.6 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 6 mL abs. DMF/THF 1 : 5 v/v eingesetzt. In Abweichung von der AAV 7 erfolgte die erste Trennung am Chromatotron mit Ethylacetat/Methanol 4 : 1 v/v. Da das Produkt auch nach mehrfacher Trennung am Chromatotron nicht rein erhalten werden konnte, wurde es schließlich mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 3 : 7 v/v, Wasser angesäuert mit 0.5 % Essigsäure) gereinigt.

Ausbeute: 24 mg (55 μmol , 12 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.13 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.21 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.31 (ddd, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.1$ Hz, 2 x H $2'$), 2.70 (ddd, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, 2 x H $2''$), 3.98-4.04 (m, 2 x 1H, 2 x H $4'$), 4.21-4.42 (m, 2 x 1H, 2 x H $5'$), 4.42-4.48 (m, 2 x 1H, 2 x H $3'$), 5.29-5.48 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 5.50 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 1 x OH), 5.51 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 1 x OH), 6.29 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 2 x H $1'$), 6.57 (s, 2 x 2H, 2 x NH_2), 7.02-7.10 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H 5 , 2 x Aryl-H 6), 7.22 (d, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 2 x Aryl-H 4), 8.16 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 8), 8.18 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 8), 8.59 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 6), 8.60 (s, 1 x 1H, 1 x Adenin-H 6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 14.90 (1 x Aryl- CH_3), 15.08 (1 x Aryl- CH_3), 38.52 (1 x C $2'$), 38.59 (1 x C $2'$), 68.02 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz, 1 x C $5'$), 68.14 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz, 1 x C $5'$), 68.46 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.53 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 70.39 (2 x C $3'$), 82.70 (1 x C $1'$), 82.75 (1 x C $1'$), 84.74 (1 x C $4'$), 84.82 (1 x C $4'$), 120.90 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C 1), 121.01 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C 1), 123.69 (1 x Aryl-C 5), 123.74 (1 x Aryl-C 5), 124.09 (2 x Aryl-C 6), 127.01 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C 3), 127.08 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C 3), 127.30 (2 x *iso*-Adenin-C 5), 131.02 (2 x Aryl-C 4), 140.71 (1 x *iso*-Adenin-C 8), 140.79 (1 x *iso*-Adenin-C 8), 148.04 (1 x Aryl-C 2), 148.08 (1 x Aryl-C 2), 149.49 (1 x *iso*-Adenin-C 6), 149.52 (1 x *iso*-Adenin-C 6), 152.72 (2 x *iso*-Adenin-C 4), 160.60 (2 x *iso*-Adenin-C 2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.81, -7.94; MS (ESI-HR): ber.: 456.1049 ($\text{M}+\text{Na}^+$), gef.: 456.1040 ($\text{M}+\text{Na}^+$); UV (H_2O): λ_{max} [nm]: 217, 243, 306; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.15; HPLC: $t_R = 11.7$ min. (Methode I), $t_R = 12.7$ min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 3 : 7 v/v)

8.2.6.2.5 Synthese von 3-Methyl-cycloSal-3'-O-levulinyl-2'-desoxythymidin-monophosphat (3-Me-cycloSal-3'-O-Lev-dTMP) 188

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.588 mmol) 3'-O-Levulinyl-2'-desoxythymidin, 242 mg noch verunreinigtes 3-Methylsaligenylchlorphosphit **174**, 0.21 mL (0.16 g, 1.2 mmol) DIPEA, 0.36 mL einer 5-6 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (≥ 2.0 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 14 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 101 mg (0.193 mmol, 33 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.9 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.74 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.76 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 2.13 (s, 2 x 3H, 2 x Lev-H5), 2.21 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.23 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.25-2.40 (m, 2 x 2H, 2 x H_2'), 2.49-2.51 (m, 2 x 2H, 2 x Lev-H2), 2.75 (t, 2 x 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 2 x Lev-H3), 4.12-4.16 (m, 2 x 1H, 2 x H_4'), 4.31-4.42 (m, 2 x 2H, 2 x H_5'), 5.17 (ddd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, 2 x H_3'), 5.40-5.54 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.17 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 2 x H_1'), 7.09-7.13 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.25-7.29 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.49 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.52 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 11.37 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.37 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.13 (1 x Thymin- CH_3), 12.17 (1 x Thymin- CH_3), 14.91 (1 x Aryl- CH_3), 14.98 (1 x Aryl- CH_3), 27.80 (2 x Lev-C2), 29.63 (2 x Lev-C5), 35.57 (1 x C_2'), 35.71 (1 x C_2'), 37.56 (2 x Lev-C3), 67.68 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 1 x C_5'), 67.75 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x C_5'), 68.54 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.67 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 73.64 (1 x C_3'), 73.69 (1 x C_3'), 81.63 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C_4'), 81.69 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C_4'), 84.18 (1 x C_1'), 84.34 (1 x C_1'), 110.12 (1 x Thymin-C5), 110.15 (1 x Thymin-C5), 121.19 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 2 x Aryl-C1), 123.73 (2 x Aryl-C5), 124.13 (1 x Aryl-C6), 124.15 (1 x Aryl-C6), 126.96 (1 x Aryl-C3), 127.05 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C3), 131.07 (2 x Aryl-C4), 135.74 (1 x Thymin-C6), 135.89 (1 x Thymin-C6), 148.02 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 1 x Aryl-C2), 148.08 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, 1 x Aryl-C2), 150.51 (2 x Thymin-C2), 163.73 (1 x Thymin-C4), 163.75 (1 x Thymin-C4), 172.13 (2 x Lev-C1), 206.99 (Lev-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.87, -7.90; MS (FAB-HR): ber.: 523.1482 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 523.1492 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.44; HPLC: $t_R = 14.7$ min. (Methode I), $t_R = 23.9$ min. (Methode II)

8.2.6.3 Synthese der 3-Methyl-5-brom-substituierten *cycloSal*-Nucleotide 220,221

8.2.6.3.1 Synthese von 3-Methylsalicylsäuremethylester 225

Es wurden 80.0 g (0.526 mol) 3-Methylsalicylsäure in 1.3 L Methanol gelöst und bei 0°C vorsichtig mit 252 mL (4.73 mol) konz. Schwefelsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und in 3 L Eiswasser gegossen. Es entstand eine trübe Lösung, in der das Produkt als Öl vorlag. Dieses Gemisch wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene dunkelrote Öl wurde im Ölpumpenvakuum destilliert (Siedepunkt 64°C).

Ausbeute: 74.7 g (0.450 mol, 86 %) einer farblosen Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 2.28 (s, 3H, Aryl- CH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 6.79 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.31-7.35 (m, 1H, H4), 7.68-7.72 (m, 1H, H6), 11.03 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 15.62 (Aryl- CH_3), 52.19 (OCH_3), 111.59 (C1), 118.45 (C5), 126.57 (C3), 127.34 (C6), 136.42 (C4), 159.99 (C2), 171.00 (C=O); MS (EI, m/z): ber.: 166 (M), gef.: 166 (M, 78 %), 134 (100), 106 (97), 77 (64), 63 (11), 51 (47), 39 (33); IR (Film): ν [cm^{-1}]: 3178, 2954, 1677, 1614, 1440, 1335, 1293, 1251, 1198, 1149, 1084, 1017, 757; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 241, 310; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.65

8.2.6.3.2 Synthese von 3-Methyl-5-bromsalicylsäuremethylester 226

Es wurden 5.01 g (30.1 mmol) 3-Methylsalicylsäuremethylester **225** in 50 mL Chloroform gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei Raumtemperatur in 45 min. eine Lösung von 1.53 mL (4.79 g, 30.0 mmol) Brom in 30 mL Chloroform getropft. Während und nach dem Zutropfen war eine stetige Gasentwicklung zu beobachten. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 39 %-iger Natriumhydrogensulfit-Lösung gewaschen, um nicht

umgesetztes Brom zu reduzieren. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene farblose Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 6.10 g (24.9 mmol, 83 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 2.25 (s, 3H, Aryl- CH_3), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 7.40-7.44 (m, 1H, H4), 7.79-7.83 (m, 1H, H6), 10.96 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 15.51 (Aryl- CH_3), 52.53 (OCH_3), 110.17 (C5), 112.96 (C1), 129.21 (C3), 129.53 (C6), 138.84 (C4), 159.12 (C2), 169.96 (C=O); MS (EI, m/z): ber.: 244 (M), gef.: 244 (M, 47 %), 212 (100), 184 (47), 157 (6), 105 (8), 77 (43), 51 (25), 40 (16); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3431, 3083, 2953, 1685, 1609, 1463, 1445, 1328, 1281, 1252, 1193, 1159, 1020, 986, 890, 793, 727, 695; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 223, 321; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.72

8.2.6.3.3 Synthese von 3-Methyl-5-bromsalicylalkohol 222

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel 8.2.1.2 durchgeführt.

Es wurden 2.00 g (8.16 mmol) 3-Methyl-5-bromsalicylsäuremethylester **226**, gelöst in 30 mL abs. THF, und 620 mg (16.3 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 50 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 1.62 g (7.46 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 2.16 (s, 3H, Aryl- CH_3), 4.53 (s, 2H, Benzyl-H), 7.13-7.18 (m, 1H, H4), 7.23-7.27 (m, 1H, H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 16.14 (Aryl- CH_3), 58.90 (Benzyl-C), 110.66 (C5), 127.21 (C3), 127.29 (C6), 131.06 (C1), 131.51 (C4), 151.61 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 216 (M), gef.: 216 (M, 30 %), 198 (88), 170 (27), 108 (11), 91 (100), 77 (14), 65 (25), 51 (21), 39 (24); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3404, 2922, 2879, 1465, 1435, 1316, 1255, 1003, 946, 877, 865, 720, 632, 571, 555; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 228, 284; DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.15

8.2.6.3.4 Synthese von 3-Methyl-5-bromsaligenylchlorphosphit **227**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (4.61 mmol) 3-Methyl-5-bromsalicylalkohol **222**, 0.46 mL (0.76 g, 5.5 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.86 mL (0.84 g, 11 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 4 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.19 g eines noch verunreinigten schwach gelblichen Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.21 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 2.45 (s, 3H, Aryl- CH_3), 5.33 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.5$ Hz, Benzyl-H), 5.50 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.5$ Hz, Benzyl-H'), 7.41-7.56 (m, 2H, H4, H6); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 141.00

8.2.6.3.5 Synthese von 3-Methyl-5-brom-cycloSal-d4T-monophosphat (3-Me-5-Br-cycloSal-d4TMP) **220**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel **8.2.1.7** durchgeführt.

Es wurden 100 mg (0.446 mmol) d4T **4**, 251 mg noch verunreinigtes 3-Methyl-5-bromsaligenylchlorphosphit **227** (gelöst in 1.6 mL abs. Acetonitril), 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.28 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 55 mg (0.11 mmol, 25 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.8 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.66 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.67 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 2.19 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.22 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 4.23-4.35 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.94-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.35 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.7$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.38 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.4$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.46 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.2$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.48 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.2$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.01-6.07 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.36-6.45 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.79-6.84 (m, 2 x 1H,

2 x H1'), 7.20 (q, 1 x 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1 x Thymin-H6), 7.21 (q, 1 x 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1 x Thymin-H6), 7.38 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.51 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-H6), 11.35 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.36 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.00 (1 x Thymin- CH_3), 12.05 (1 x Thymin- CH_3), 14.69 (1 x Aryl- CH_3), 14.81 (1 x Aryl- CH_3), 67.67 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 67.78 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.87 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x C5'), 84.26 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.2$ Hz, 1 x C4'), 84.28 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C4'), 89.38 (1 x C1'), 89.43 (1 x C1'), 109.86 (1 x Thymin-C5), 109.90 (1 x Thymin-C5), 115.85 (2 x Aryl-C5), 123.65 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 2 x Aryl-C3), 126.54 (2 x Aryl-C4), 127.53 (2 x C2'), 129.87 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x Aryl-C1), 132.93 (1 x C3'), 132.99 (1 x C3'), 133.45 (1 x Aryl-C6), 133.47 (1 x Aryl-C6), 135.89 (2 x Thymin-C6), 147.57 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 150.89 (2 x Thymin-C2), 163.89 (1 x Thymin-C4), 163.92 (1 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.94, -8.13; MS (FAB): ber.: 485.0 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 485.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.38; HPLC: $t_R = 15.4$ min. (Methode I)

8.2.6.3.6 Synthese von 3-Methyl-5-brom-cycloSal-BVDU-monophosphat (3-Me-5-Br-cycloSal-BVDUMP) 221

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, zunächst 152 mg noch verunreinigtes 3-Bromsaligenylchlorphosphit **227** (gelöst in 1.1 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v), 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt. Da die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung auf ungenügenden Umsatz von BVDU **15** hinwies, wurde in Abweichung von der AAV 7 vor der Oxidation erneut auf -20°C abgekühlt, weitere 76 mg noch verunreinigtes 3,5-Dibromsaligenylchlorphosphit **227** (gelöst in 0.6 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v) wurden zugegeben, das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und nochmals 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende Oxidation erfolgte gemäß der AAV 7 mit 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid).

Ausbeute: 73 mg (0.12 mmol, 33 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.8 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.16-2.20 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 2.20 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.22 (s, 1 x 3H, 1 x Aryl- CH_3), 3.91-3.97 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.22-4.28 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.29-4.43 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.35 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 16.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 3.8$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.41 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.7$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.47 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 16.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.5$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.48 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, 1 x OH), 5.49 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 1 x OH), 5.50 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.5$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.16 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, 1 x H1'), 6.18 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.87 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.88 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.30 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.31 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.33-7.37 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.47 (s, 1 x 1H, 1 x Aryl-H6), 7.50 (s, 1 x 1H, 1 x Aryl-H6), 7.78 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.79 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.61 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 14.79 (1 x Aryl- CH_3), 14.83 (1 x Aryl- CH_3), 39.95 (2 x C2'), 67.87 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 67.99 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.05 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C5'), 68.17 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C5'), 69.76 (1 x C3'), 69.83 (1 x C3'), 84.56 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 1 x C4'), 84.61 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 1 x C4'), 84.81 (1 x C1'), 84.83 (1 x C1'), 107.16 (2 x BVU-C8), 110.28 (1 x BVU-C5), 110.33 (1 x BVU-C5), 115.84 (2 x Aryl-C5), 123.21 (d, $^3J_{\text{CP}} = 10.2$ Hz, 1 x Aryl-C3), 123.39 (d, $^3J_{\text{CP}} = 10.2$ Hz, 1 x Aryl-C3), 126.38 (1 x Aryl-C4), 126.42 (1 x Aryl-C4), 129.86 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x Aryl-C1), 129.90 (2 x BVU-C7), 133.35 (1 x Aryl-C6), 133.38 (1 x Aryl-C6), 139.47 (1 x BVU-C6), 139.50 (1 x BVU-C6), 147.39 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 147.45 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 149.36 (1 x BVU-C2), 149.38 (1 x BVU-C2), 161.75 (2 x BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.23, -8.36; MS (FAB): ber.: 594.9 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 595.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 250, 293; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.42; HPLC: $t_R = 17.6$ min. (Methode I)

8.2.6.3.7 Versuch der Synthese von 4-Brom-2-methylphenol 223^[147]

Es wurden 1.08 g (10.0 mmol) *o*-Kresol in 10 mL Acetonitril gelöst und mit 1.78 g (10.0 mmol) *N*-Bromsuccinimid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bis zur vollständigen Entfärbung bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 30 : 1 v/v). Anschließend wurde

das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert und der Rückstand $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht.

Ausbeute: 1.44 g eines farblosen Feststoffs als Gemisch von 3-Brom-2-methylphenol oder 6-Brom-2-methylphenol und nicht umgesetztem *o*-Kresol im Verhältnis 1.7 : 1.0 (100 % Ausbeute: 1.87 g)

8.2.6.3.8 Versuch der Synthese von 3-Methyl-5-bromsalicylsäure **224**

Es wurden 5.00 g (32.9 mmol) 3-Methylsalicylsäure in 50 mL Chloroform suspendiert und mit 1.68 mL (5.23 g, 32.7 mmol) Brom versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 7 : 3 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert und das so erhaltene Rohprodukt aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 5.74 g eines farblosen Feststoffs als Gemisch von 3-Methyl-5-bromsalicylsäure **224** und nicht umgesetzter 3-Methylsalicylsäure im Verhältnis 1.0 : 1.0 (100 % Ausbeute: 7.60 g)

8.2.6.4 Synthese der *cyclo*Biphenylyl-Nucleotide **230,231**

8.2.6.4.1 Synthese von *cyclo*Biphenylyl-d4T-monophosphat (*cyclo*Biphen-d4TMP) **230**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel **8.2.1.7** in Analogie zu der Synthese der *cyclo*Sal-Nucleotide durchgeführt.

Es wurden 106 mg (0.473 mmol) d4T **4**, 238 mg noch verunreinigtes Biphenylylchlorphosphit **118** (gelöst in 1.8 mL abs. Acetonitril), 0.17 mL (0.13 g, 1.0 mmol) DIPEA, 0.29 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.6 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 12 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 157 mg (0.346 mmol, 73 %) einer farblosen Watte

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.34 (s, 3H, Thymin- CH_3), 4.50-4.54 (m, 2H, H5'), 4.98-5.01 (m, 1H, H4'), 6.00-6.03 (m, 1H, H2'), 6.47-6.50 (m, 1H, H3'), 6.80-6.82 (m, 1H, H1'), 7.01 (s, 1H, Thymin-H6), 7.39 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, Biphenyl-H3), 7.43 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, Biphenyl-H3'), 7.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, Biphenyl-H5), 7.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, Biphenyl-H5'), 7.51 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, Biphenyl-H4), 7.57 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, Biphenyl-H4'), 7.67 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, Biphenyl-H6), 7.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, Biphenyl-H6'), 11.28 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.83 (Thymin- CH_3), 69.07 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, C5'), 84.17 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, C4'), 89.22 (C1'), 109.47 (Thymin-C5), 121.45 (d, $^3J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, Biphenyl-C3), 121.52 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, Biphenyl-C3'), 127.21 (Biphenyl-C5), 127.26 (Biphenyl-C5'), 127.53 (C2'), 127.69 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Biphenyl-C1, Biphenyl-C1'), 130.25 (Biphenyl-C6), 130.41 (Biphenyl-C6'), 130.51 (Biphenyl-C4), 130.70 (Biphenyl-C4'), 133.07 (C3'), 135.78 (Thymin-C6), 146.99 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, Biphenyl-C2), 147.08 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, Biphenyl-C2'), 150.87 (Thymin-C2), 163.80 (Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): 2.85; MS (FAB): ber.: 455.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 455.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 246; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.35; HPLC: $t_R = 13.2$ min. (Methode I)

8.2.6.4.2 Synthese von *cyclo*Biphenylyl-BVDU-monophosphat (*cyclo*Biphenyl-BVDUMP) 231

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 in Analogie zu der Synthese der *cyclo*Sal-Nucleotide durchgeführt.

Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, 135 mg noch verunreinigtes Biphenylylchlorphosphit **118** (gelöst in 1.1 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v), 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 51 mg (91 μmol , 25 %) einer farblosen Watte

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.18-2.23 (m, 2H, H2'), 4.01-4.05 (m, 1H, H4'), 4.28-4.32 (m, 1H, H3'), 4.50 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz,

$^3J_{HP} = 6.1$ Hz, H5'), 4.56 (ddd, 1H, $^2J_{HH} = 11.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.1$ Hz, $^3J_{HP} = 3.7$ Hz, H5''), 5.55 (d, 1H, $^3J_{HH} = 3.8$ Hz, OH), 6.21 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 6.6$ Hz, $^3J_{HH} = 6.6$ Hz, H1'), 6.73 (d, 1H, $^3J_{HH} = 13.2$ Hz, BVU-H7), 7.25 (d, 1H, $^3J_{HH} = 13.2$ Hz, BVU-H8), 7.41 (d, 1H, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, Biphenyl-H3), 7.42 (d, 1H, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, Biphenyl-H3'), 7.47-7.50 (m, 2H, Biphenyl-H5, Biphenyl-H5'), 7.55 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, Biphenyl-H4), 7.56 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, Biphenyl-H4'), 7.70-7.73 (m, 3H, Biphenyl-H6, Biphenyl-H6', BVU-H6), 11.61 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 39.95 (C2'), 68.81 (d, $^2J_{CP} = 6.1$ Hz, C5'), 69.77 (C3'), 84.58 (d, $^3J_{CP} = 5.9$ Hz, C4'), 84.85 (C1'), 107.15 (BVU-C8), 110.23 (BVU-C5), 121.39 (d, $^3J_{CP} = 5.1$ Hz, Biphenyl-C3), 121.43 (d, $^3J_{CP} = 4.1$ Hz, Biphenyl-C3'), 127.22 (Biphenyl-C5, Biphenyl-C5'), 127.68 (d, $^3J_{CP} = 3.1$ Hz, Biphenyl-C1, Biphenyl-C1'), 129.86 (BVU-C7), 130.45 (Biphenyl-C6, Biphenyl-C6'), 130.68 (Biphenyl-C4, Biphenyl-C4'), 139.30 (BVU-C6), 147.10 (d, $^2J_{CP} = 9.2$ Hz, Biphenyl-C2, Biphenyl-C2'), 149.38 (BVU-C2), 161.76 (BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): 3.00; MS (FAB): ber.: 563.0 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 563.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 243, 294; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.37; HPLC: $t_R = 17.2$ min. (Methode I)

8.2.6.5 Synthese der 3,5-Diphenyl-substituierten *cycloSal*-Nucleotide 235,236

8.2.6.5.1 Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkoholisopropylidenacetal 237

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff auszuschließen.

Es wurden 2.20 g (6.83 mmol) 3,5-Dibromsalicylalkoholisopropylidenacetal **67** in 48 mL entgastem 1,2-Dimethoxyethan/Wasser 3 : 1 v/v gelöst und mit 1.56 g (15.0 mmol) Phenylboronsäureanhydrid **54**, 2.83 g (20.5 mmol) Kaliumcarbonat sowie 789 mg (0.683 mmol) des Katalysators Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 d bei 90°C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 20 mL Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene dunkle Rückstand wurde zunächst in einer Kieselgelfiltration (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v) von

Palladium-Resten befreit und anschließend am Chromatotron gereinigt (Petrol-ether/Dichlormethan-Gradient (0-100 %)). Das resultierende noch leicht verunreinigte Produkt wurde schließlich aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1.47 g (4.65 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs (lange nadel-förmige Kristalle)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.52 (s, 6H, Acetal- CH_3), 4.98 (s, 2H, Benzyl-H), 7.32-7.38 (m, 2H, H_4' , H_4''), 7.41-7.50 (m, 6H, H_4 , H_6 , H_3' , H_5' , H_3'' , H_5''), 7.60-7.63 (m, 2H, H_2' , H_6'), 7.67-7.70 (m, 2H, H_2'' , H_6''); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 24.81 (Acetal- CH_3), 60.53 (Benzyl-C), 99.84 (Acetal-C), 120.70 (C1), 122.81 (C4), 126.50 (C2'', C6''), 127.07 (C4'), 127.24 (C4''), 127.31 (C6), 128.27 (C3', C5'), 129.01 (C3'', C5''), 129.36 (C2', C6'), 129.55 (C3), 132.44 (C5), 137.40 (C1'), 139.88 (C1''), 147.45 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 316 (M), gef.: 316 (M, 10 %), 258 (100), 229 (18), 215 (8), 202 (6), 181 (7), 152 (6), 43 (7); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3442, 3028, 2992, 2939, 2855, 1469, 1439, 1374, 1275, 1257, 1142, 1116, 1072, 1055, 957, 888, 774, 759, 699, 606, 550, 507; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 248; DC: R_f -Wert (Petrolether/Dichlormethan 1 : 3 v/v): 0.57

8.2.6.5.2 Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238** durch Entschützung von **237** mit TFA

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 1.10 g (3.48 mmol) 3,5-Diphenylsalicylalkoholisopropylidenacetal **237**, 4.47 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (8.70 mmol TFA) und 90 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 15 d.

Ausbeute: 765 mg (2.77 mmol, 80 %) eines gelblich-trüben Öls

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 4.73 (s, 2H, Benzyl-H), 7.32 (tt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, H_4'), 7.35 (tt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H_4''), 7.42-7.47 (m, 5H, H_6 , H_3' , H_5' , H_3'' , H_5''), 7.57 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, H_4), 7.59-7.62 (m, 2H, H_2' , H_6'), 7.64-7.67 (m, 2H, H_2'' , H_6''); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 60.38 (Benzyl-C), 125.20 (C4), 126.37 (C2'', C6''), 126.78 (C4'), 126.98 (C4''),

127.32 (C6), 128.28 (C3', C5'), 129.02 (C3'', C5''), 129.54 (C2', C6'), 129.69 (C3), 129.91 (C1), 131.87 (C5), 138.66 (C1'), 140.42 (C1''), 151.44 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 276 (M), gef.: 276 (M, 41 %), 258 (100), 229 (23), 215 (12), 202 (9), 181 (8), 152 (6), 115 (8), 101 (5), 40 (6); UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 246; DC: R_f-Wert (Dichlormethan): 0.14

8.2.6.5.3 Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkohol 238 durch Entschützung von 237 mit saurem Ionentauscher

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel 8.2.1.5 durchgeführt.

Es wurden 50 mg (0.16 mmol) 3,5-Diphenylsalicylalkoholisopropylidenacetal **237**, 4.4 g Dowex 50 X 8 und 8 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 8 d.

Ausbeute: 26 mg (94 μ mol, 59 %) eines gelblich-trüben Öls

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel 8.2.6.4.2 angegebenen.

8.2.6.5.4 Synthese von 3,5-Diphenylsaligenylchlorphosphit 239

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 715 mg (2.59 mmol) 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238**, 0.26 mL (0.41 g, 3.0 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.48 mL (0.47 g, 5.9 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 2.1 mL abs. Diethylether, und 20 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 702 mg eines noch verunreinigten gelblich-trüben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 883 mg)

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 5.14-5.21 (m, 1H, Benzyl-H), 5.58 (d, 1H, ²J_{HH} = 13.2 Hz, Benzyl-H'), 7.20 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H6), 7.37-7.40 (m, 2H, H4', H4''), 7.42-7.50 (m, 5H, H4, H3', H5', H3'', H5''), 7.55-7.59 (m, 4H, H2', H6', H2'', H6''); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 61.49 (d, ²J_{CP} = 2.0 Hz, Benzyl-C), 122.19 (d, ³J_{CP} = 12.2 Hz, C1), 123.44 (d, ⁴J_{CP} = 2.0 Hz, C4), 126.91 (C2'', C6''), 127.57 (C4'), 127.73 (C4''), 128.26 (C3', C5'), 128.89 (C3'', C5''), 129.34 (C6),

129.50 (C2', C6'), 132.96 (d, $^3J_{CP} = 2.0$ Hz, C3), 136.45 (C5), 137.04 (C1'), 139.72 (C1''), 142.61 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, C2); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 141.13

8.2.6.5.5 Synthese von 3,5-Diphenyl-cycloSal-d4T-monophosphat (3,5-Di-Ph-cycloSal-d4TMP) 235

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.446 mmol) d4T **4**, 303 mg noch verunreinigtes 3,5-Diphenylsaligenylchlorphosphit **239** (gelöst in 2.3 mL abs. Acetonitril), 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.27 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 69 mg (0.13 mmol, 29 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.6 : 1.0

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.55 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.57 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 4.31-4.37 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.95-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.54 (dd, 2 x 1H, $^2J_{HH} = 14.8$ Hz, $^3J_{HP} = 13.6$ Hz, 2 x Benzyl-H), 5.62 (dd, 1 x 1H, $^2J_{HH} = 14.8$ Hz, $^3J_{HP} = 3.2$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.65 (dd, 1 x 1H, $^2J_{HH} = 14.8$ Hz, $^3J_{HP} = 3.2$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.94-5.97 (m, 1 x 1H, 1 x H2'), 6.02-6.04 (m, 1 x 1H, 1 x H2'), 6.33-6.37 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.81-6.84 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.18 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.20 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.40-7.58 (m, 2 x 6H, 2 x Aryl-H3', 2 x Aryl-H4', 2 x Aryl-H5', 2 x Aryl-H3'', 2 x Aryl-H4'', 2 x Aryl-H5''), 7.58-7.61 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6), 7.67-7.75 (m, 2 x 4H, 2 x Aryl-H2', 2 x Aryl-H6', 2 x Aryl-H2'', 2 x Aryl-H6''), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 11.85 (2 x Thymin- CH_3), 68.47 (d, $^2J_{CP} = 2.0$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.56 (d, $^2J_{CP} = 4.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.87 (d, $^2J_{CP} = 2.0$ Hz, 1 x C5'), 68.95 (d, $^2J_{CP} = 4.1$ Hz, 1 x C5'), 84.27 (d, $^3J_{CP} = 2.0$ Hz, 1 x C4'), 84.33 (d, $^3J_{CP} = 3.1$ Hz, 1 x C4'), 89.28 (1 x C1'), 89.34 (1 x C1'), 109.86 (1 x Thymin-C5), 109.89 (1 x Thymin-C5), 123.32 (d, $^3J_{CP} = 3.1$ Hz, 2 x Aryl-C1), 124.13 (2 x Aryl-C4), 126.97 (2 x Aryl-C2'', 2 x Aryl-C6''), 127.55 (1 x C2'), 127.57 (1 x C2'), 127.96 (2 x Aryl-C4'), 128.17 (2 x Aryl-C4''), 128.57 (2 x Aryl-C3', 2 x Aryl-C5'), 128.63 (2 x Aryl-C3), 129.09 (2 x Aryl-C6), 129.18 (2 x Aryl-C3'', 2 x Aryl-C5''), 129.40 (2 x Aryl-C2', 2 x Aryl-C6'), 132.90 (1 x C3'), 132.94 (1 x C3'), 135.48

(1 x Aryl-C5), 135.54 (1 x Aryl-C5), 135.73 (1 x Thymin-C6), 135.84 (1 x Thymin-C6), 136.81 (1 x Aryl-C1'), 136.85 (1 x Aryl-C1'), 138.85 (2 x Aryl-C1''), 146.11 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 150.86 (2 x Thymin-C2), 163.86 (2 x Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.15, -7.19; MS (FAB): ber.: 545.1 (M+H⁺), gef.: 545.3 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 248; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.49; HPLC: t_R = 19.3 min. (Methode I)

8.2.6.5.6 Synthese von 3,5-Diphenyl-cycloSal-BVDU-monophosphat (3,5-Di-Ph-cycloSal-BVDUMP) 236

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, 184 mg noch verunreinigtes 3,5-Diphenylsaligenylchlorphosphit **239** (gelöst in 1.5 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v), 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.24 mL einer 5-6 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (≥ 1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 80 mg (0.12 mmol, 33 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 2.13-2.21 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 3.94-3.98 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.22-4.28 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.31-4.45 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.49 (d, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, 2 x OH), 5.55-5.67 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.16 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.19 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 1 x H1'), 6.83 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.87 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.25 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.28 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.39-7.51 (m, 2 x 6H, 2 x Aryl-H3', 2 x Aryl-H4', 2 x Aryl-H5', 2 x Aryl-H3'', 2 x Aryl-H4'', 2 x Aryl-H5''), 7.58-7.61 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H6), 7.63-7.69 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H2', 2 x Aryl-H6'), 7.72-7.75 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H2'', 2 x Aryl-H6''), 7.78 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.80 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.61 (s, 2 x 1H, 2 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 38.89 (1 x C2'), 38.94 (1 x C2'), 68.29 (d, $^2J_{CP} = 6.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 68.67 (d, $^2J_{CP} = 3.1$ Hz, 1 x C5'), 68.75 (d, $^2J_{CP} = 4.1$ Hz, 1 x C5'), 69.78 (1 x C3'), 69.80 (1 x C3'), 84.64 (d, $^3J_{CP} = 2.0$ Hz, 1 x C4'), 84.82 (2 x C1'), 107.08 (1 x BVU-C8),

107.12 (1 x BVU-C8), 110.27 (1 x BVU-C5), 110.36 (1 x BVU-C5), 122.80 (1 x Aryl-C1), 122.88 (d, $^3J_{CP} = 2.0$ Hz, 1 x Aryl-C1), 124.00 (2 x Aryl-C4), 126.97 (2 x Aryl-C2''), 2 x Aryl-C6''), 127.95 (1 x Aryl-C4'), 128.05 (1 x Aryl-C4'), 128.09 (1 x Aryl-C4''), 128.13 (1 x Aryl-C4''), 128.53 (2 x Aryl-C3', 2 x Aryl-C5'), 128.61 (2 x Aryl-C3), 129.03 (1 x Aryl-C6), 129.05 (1 x Aryl-C6), 129.17 (2 x Aryl-C3'', 2 x Aryl-C5''), 129.42 (2 x Aryl-C2', 2 x Aryl-C6'), 129.87 (2 x BVU-C7), 135.57 (1 x Aryl-C5), 135.60 (1 x Aryl-C5), 136.76 (2 x Aryl-C1'), 138.86 (1 x Aryl-C1''), 138.88 (1 x Aryl-C1''), 139.35 (1 x BVU-C6), 139.50 (1 x BVU-C6), 146.27 (2 x Aryl-C2), 149.35 (2 x BVU-C2), 161.77 (2 x BVU-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.46, -7.51; MS (FAB): ber.: 653.1 (M+H⁺), gef.: 653.2 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 246; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.41; HPLC: t_R = 20.3, 20.6 min. (Methode I)

8.2.6.5.7 Versuch der Synthese von 3,5-Diphenylsalicylsäuremethylester **240**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff auszuschließen.

Es wurden 500 mg (1.61 mmol) 3,5-Dibromsalicylsäuremethylester **75** in 8 mL entgastem 1,2-Dimethoxyethan/Wasser 3 : 1 v/v gelöst und mit 373 mg (3.59 mmol) Phenylboronsäureanhydrid **54**, 673 mg (4.87 mmol) Kaliumcarbonat sowie 199 mg (0.172 mmol) des Katalysators Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei 90°C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und vorsichtig mit 2 M Salzsäure auf pH 5 gebracht. Nach Zugabe von 10 mL Diethylether und Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase noch dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene dunkle Rückstand wurde in einer Kieselgelfiltration (Petrolether/Dichlormethan 1 : 2 v/v) von Palladium-Resten befreit. Es wurden lediglich 50 mg eines gelben Feststoffs erhalten, bei dem es sich laut ^1H -NMR-Spektrum jedoch nicht um das gewünschte Produkt **240** handelte.

8.2.6.5.8 Versuch der Synthese von 3,5-Diphenylsalicylalkohol **238** durch direkte Umsetzung von 3,5-Dibromsalicylalkohol **74**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff auszuschließen.

Es wurden 504 mg (1.78 mmol) 3,5-Dibromsalicylalkohol **74** in 8 mL entgastem 1,2-Dimethoxyethan/Wasser 3 : 1 v/v gelöst und mit 408 mg (3.92 mmol) Phenylboronsäureanhydrid **54**, 742 mg (5.35 mmol) Kaliumcarbonat sowie 210 mg (0.181 mmol) des Katalysators Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 40 h bei 90°C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 M Salzsäure versetzt, so daß sich ein pH-Wert von 4-5 ergab. Nach Zugabe von 10 mL Diethylether und Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der so erhaltene dunkle Rückstand wurde zunächst in einer Kieselgelfiltration (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v) von Palladium-Resten befreit und anschließend am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan/Methanol-Gradient (0-3 %)). Es wurden lediglich etwa 50 mg eines bräunlichen Öls erhalten (100% Ausbeute: 492 mg), bei dem es sich laut ¹H-NMR-Spektrum um das noch verunreinigte Produkt **238** gehandelt haben könnte.

8.2.6.6 Synthese der Mono-*tert*-butyl-substituierten *cycloSal*-Nucleotide **234,242-244**

8.2.6.6.1 Synthese von 3-*tert*-Butylsalicylalkohol **245** durch Reduktion von 3-*tert*-Butylsalicylaldehyd

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel **8.2.1.2** durchgeführt.

Es wurden 5.00 g (28.1 mmol) 3-*tert*-Butylsalicylaldehyd, gelöst in 60 mL abs. THF, und 1.06 g (28.0 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 100 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 4.91 g (27.2 mmol, 97 %) eines farblosen Öls

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 1.38 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 4.65 (s, 2H, Benzyl-H), 6.75 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.01 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H6), 7.10 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 29.94 (*t*-Bu- CH_3), 34.67 (*t*-Bu-C), 62.00 (Benzyl-C), 119.21 (C5), 125.49 (C4), 125.75 (C6), 127.73 (C1), 136.56 (C3), 154.60 (C2); MS (EI, *m/z*): ber.: 180 (M), gef.: 180 (M, 32 %), 162 (45), 147 (100), 119 (81), 107 (14), 91 (37), 77 (34), 65 (17), 51 (18), 39 (27); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 226, 274; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.75

8.2.6.6.2 Versuch der Synthese von 3-*tert*-Butylsalicylalkohol 245 durch regioselektive Hydroxymethylierung nach Nagata

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 aus Kapitel 8.2.1.1 durchgeführt.

Es wurden 3.00 g (20.0 mmol) *ortho-tert*-Butylphenol, 2.93 g (24.0 mmol) Phenylboronsäure, insgesamt 6.00 g (200 mol) *para*-Formaldehyd (in fünf Portionen), 0.71 mL (0.70 g, 9.4 mmol) Propionsäure, 300 mL Toluol, 12 mL THF und 12 mL 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung eingesetzt. Das Dioxaborin **247** (3.20 g eines braunen Öls als Rohprodukt, 100 % Ausbeute: 5.32 g) wurde vor der Oxidation nicht gereinigt und auch nicht charakterisiert. Es wurde versucht, das Rohprodukt aus der Oxidation säulenchromatographisch (Hexan/Ethylacetat 2 : 1 v/v) zu reinigen, wobei sich das Nebenprodukt Phenol jedoch nicht vollständig abtrennen ließ.

8.2.6.6.3 Synthese von 3-*tert*-Butylsaligenylchlorphosphit 248^[146]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.02 g (5.66 mmol) 3-*tert*-Butylsalicylalkohol **245**, 0.60 mL (0.94 g, 6.8 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 1.06 mL (1.04 g, 13.1 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 5 mL abs. Diethylether, und 40 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.16 g eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.38 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.40 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 5.03 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.4$ Hz, Benzyl-H), 5.37 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, Benzyl-H'),

6.83 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H4), 7.04 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.28 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 29.81 (*t*-Bu-CH₃), 34.69 (*t*-Bu-C), 61.53 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, Benzyl-C), 123.53 (C1), 124.02 (C5), 124.50 (C6), 126.65 (C4), 127.94 (C3), 140.36 (C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 140.08

8.2.6.6.4 Synthese von 3-*tert*-Butyl-cycloSal-d4T-monophosphat

(3-*t*-Bu-cycloSal-d4TMP) 242^[146]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.535 mmol) d4T **4**, 262 mg noch verunreinigtes 3-*tert*-Butylsali-genylchlorphosphit **248**, 0.19 mL (0.14 g, 1.1 mmol) DIPEA, 0.32 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.8 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 12 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 97 mg (0.22 mmol, 41 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.9

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.33 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.36 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.60 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 1.61 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin-CH₃), 4.32-4.36 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.97-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.36-5.47 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.02-6.07 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.41-6.45 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.82-6.84 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.14-7.20 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.22 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.25 (q, 1 x 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1 x Thymin-H6), 7.36 (d, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 2 x Aryl-H4), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 11.96 (1 x Thymin-CH₃), 11.98 (1 x Thymin-CH₃), 29.72 (1 x *t*-Bu-CH₃), 29.75 (1 x *t*-Bu-CH₃), 34.46 (1 x *t*-Bu-C), 34.52 (1 x *t*-Bu-C), 68.37 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.02 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C5'), 69.07 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 84.31-84.47 (m, 2 x C4'), 89.27 (1 x C1'), 89.41 (1 x C1'), 109.84 (1 x Thymin-C5), 109.90 (1 x Thymin-C5), 123.19 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 123.27 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 124.35 (2 x Aryl-C5), 124.72 (2 x Aryl-C6), 127.47 (1 x Aryl-C4), 127.49 (1 x Aryl-C4), 127.51 (1 x C2'), 127.54 (1 x C2'), 133.01 (1 x C3'), 133.08 (1 x C3'), 135.89 (1 x Thymin-C6), 135.95 (1 x Thymin-C6), 138.48 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 1 x Aryl-C3), 138.56 (d,

$^3J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x Aryl-C3), 148.86 (d, $^2J_{CP} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 148.93 (d, $^2J_{CP} = 4.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 150.90 (1 x Thymin-C2), 150.93 (1 x Thymin-C2), 163.92 (1 x Thymin-C4), 163.95 (1 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.24, -7.49; MS (FAB): ber.: 449.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 449.3 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.36; HPLC: $t_R = 16.0$ min. (Methode I), $t_R = 26.1, 26.4$ min. (Methode II)

8.2.6.6.5 Synthese von 3-*tert*-Butyl-cycloSal-BVDU-monophosphat

(3-*t*-Bu-cycloSal-BVDUMP) **234**^[76]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel **8.2.1.7** durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, 125 mg noch verunreinigtes 3-*tert*-Butylsaligenylchlorphosphit **248**, 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt. Die Trennung der Diastereomere erfolgte mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 13 : 7 v/v, Wasser angesäuert mit 0.5 % Essigsäure).

Ausbeute: 99 mg (0.18 mmol, 50 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8
Aus 44 mg Diastereomergemisch **234** wurden 14 mg **234 fast** und 13 mg **234 slow** erhalten

Daten zur Charakterisierung des Diastereomergemisches **234**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.35 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.37 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 2.18-2.25 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.95-4.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.24-4.28 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.31-4.45 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.43 (d, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.44 (d, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.48 (s, 2 x 1H, 2 x OH), 6.18 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 1 x H1'), 6.20 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.87 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.88 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.13-7.18 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.30 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.31 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.34-7.37 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.82 (s,

1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.83 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.62 (s, 2 x 1H, 2 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 29.71 (1 x *t*-Bu-CH₃), 29.74 (1 x *t*-Bu-CH₃), 34.46 (1 x *t*-Bu-C), 34.49 (1 x *t*-Bu-C), 39.95 (2 x C2'), 68.38 (2 x Benzyl-C), 68.45 (2 x C5'), 69.83 (2 x C3'), 84.63 (2 x C4'), 84.71 (2 x C1'), 107.08 (2 x BVU-C8), 110.29 (2 x BVU-C5), 122.85 (2 x Aryl-C1), 124.26 (2 x Aryl-C5), 124.56 (2 x Aryl-C6), 127.32 (2 x Aryl-C4), 129.91 (2 x BVU-C7), 138.51 (2 x Aryl-C3), 139.40 (1 x BVU-C6), 139.44 (1 x BVU-C6), 148.84 (2 x Aryl-C2), 149.32 (1 x BVU-C2), 149.36 (1 x BVU-C2), 161.75 (2 x BVU-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.35, -7.63; MS (FAB): ber.: 557.1 (M+H⁺), gef.: 557.2 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 250, 293; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.38; HPLC: t_R = 18.4, 18.7 min. (Methode I), t_R = 39.7, 42.9 min. (präparative HPLC, Acetonitril/Wasser 13 : 7 v/v)

Daten zur Charakterisierung von **234 fast**

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.35 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 2.16-2.24 (m, 1H, H2'), 3.98 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H4'), 4.25-4.28 (m, 1H, H3'), 4.31-4.36 (m, 1H, H5'), 4.43 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H5''), 5.43 (d, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, Benzyl-H), 5.48 (s, 1H, OH), 6.20 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H1'), 6.87 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, BVU-H7), 7.13-7.18 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 7.30 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, BVU-H8), 7.35 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, Aryl-H4), 7.82 (s, 1H, BVU-H6), 11.62 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 29.72 (*t*-Bu-CH₃), 34.48 (*t*-Bu-C), 39.95 (2 x C2'), 68.36 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, Benzyl-C), 68.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C5'), 69.83 (C3'), 84.65 (C4'), 84.71 (C1'), 107.09 (BVU-C8), 110.30 (BVU-C5), 122.83 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, Aryl-C1), 124.25 (Aryl-C5), 124.60 (Aryl-C6), 127.35 (Aryl-C4), 129.93 (BVU-C7), 138.47 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, Aryl-C3), 139.48 (BVU-C6), 148.81 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, Aryl-C2), 149.38 (BVU-C2), 161.78 (BVU-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.35

Daten zur Charakterisierung von **234 slow**

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.37 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 2.16-2.21 (m, 1H, H2'), 3.97 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, H4'), 4.26 (ddd, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 8.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 4.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 4.6 \text{ Hz}$, H3'), 4.34-4.38 (m, 1H, H5'), 5.44 (d, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5 \text{ Hz}$, Benzyl-H), 5.48 (s, 1H, OH), 6.18 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 6.6 \text{ Hz}$, H1'), 6.88 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6 \text{ Hz}$, BVU-H7), 7.14-7.18 (m, 2H, Aryl-H5, Aryl-H6), 7.31 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.6 \text{ Hz}$, BVU-H8), 7.36 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9 \text{ Hz}$, Aryl-H4), 7.81 (s, 1H, BVU-H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 29.75 (*t*-Bu- CH_3), 34.51 (*t*-Bu-C), 39.95 (2 x C2'), 68.16 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1 \text{ Hz}$, Benzyl-C), 68.50 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, C5'), 69.85 (C3'), 84.68 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, C4'), 84.85 (C1'), 107.12 (BVU-C8), 110.31 (BVU-C5), 122.77 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2 \text{ Hz}$, Aryl-C1), 124.28 (Aryl-C5), 124.59 (Aryl-C6), 127.33 (Aryl-C4), 129.94 (BVU-C7), 138.49 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.1 \text{ Hz}$, Aryl-C3), 139.43 (BVU-C6), 148.78 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8.1 \text{ Hz}$, Aryl-C2), 149.35 (BVU-C2), 161.79 (BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.63

8.2.6.6.6 Synthese von 5-*tert*-Butylsalicylalkohol 246

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 aus Kapitel 8.2.1.2 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (5.61 mmol) 5-*tert*-Butylsalicylaldehyd, gelöst in 15 mL abs. THF, und 219 mg (5.77 mmol) Lithiumaluminiumhydrid, suspendiert in 25 mL abs. THF, eingesetzt.

Ausbeute: 933 mg (5.18 mmol, 92 %) eines farblosen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.25 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 4.48 (s, 2H, Benzyl-H), 4.92 (s, 1H, Benzyl-OH), 6.68 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.3 \text{ Hz}$, H3), 7.06 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.3 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.6 \text{ Hz}$, H4), 7.32 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.6 \text{ Hz}$, H6), 9.06 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 31.67 (*t*-Bu- CH_3), 33.86 (*t*-Bu-C), 58.68 (Benzyl-C), 114.22 (C3), 123.97 (C4), 124.24 (C6), 127.69 (C1), 140.78 (C5), 151.99 (C2); MS (EI, *m/z*): ber.: 180 (M), gef.: 180 (M, 12 %), 162 (13), 147 (100), 119 (20), 91 (18), 77 (12), 65 (6), 57 (5), 51 (6), 41 (14); IR (KBr): ν [cm^{-1}]: 3406, 2961, 1510, 1426, 1360, 1273, 1206, 1185, 1129, 994, 980, 892, 829; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 227, 279; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.85

8.2.6.6.7 Synthese von 5-*tert*-Butylsaligenylchlorphosphit 249^[146]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 500 mg (2.77 mmol) 5-*tert*-Butylsalicylalkohol **246**, 0.29 mL (0.46 g, 3.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.51 mL (0.50 g, 6.3 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 3 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 631 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 678 mg)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.24 (s, 9H, *t*-Bu- CH_3), 4.93-4.98 (m, 1H, Benzyl-H), 5.30-5.37 (m, 1H, Benzyl-H'), 6.81 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, H3), 7.04 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, H4), 7.24 (s, 1H, H6); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 31.23 (*t*-Bu- CH_3), 35.43 (*t*-Bu-C), 61.29 (d, $^2J_{\text{CP}} = 1.9$ Hz, Benzyl-C), 118.82 (C3), 120.56 (C4), 122.38 (C6), 126.18 (C1), 143.67 (C5), 145.87 (C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 141.39

8.2.6.6.8 Synthese von 5-*tert*-Butyl-cycloSal-d4T-monophosphat

(5-*t*-Bu-cycloSal-d4TMP) **243**^[146]

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel **8.2.1.7** durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.535 mmol) d4T **4**, 260 mg noch verunreinigtes 5-*tert*-Butylsalicylgenylchlorphosphit **249** (gelöst in 2.4 mL abs. Acetonitril), 0.18 mL (0.13 g, 1.0 mmol) DIPEA, 0.33 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.8 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 12 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 98 mg (0.22 mmol, 41 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.27 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.28 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.61 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.68 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 4.26-4.37 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.95-4.99 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.40 (dd, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.7$ Hz, 2 x Benzyl-H), 5.45-5.53 (m, 2 x 1H, 2 x Benzyl-H'), 6.00-6.05 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.36-6.39 (m, 1 x 1H, 1 x H3'), 6.42-6.45 (m, 1 x 1H, 1 x H3'), 6.79-6.81 (m, 1 x 1H, 1 x H1'), 6.81-6.83 (m, 1 x 1H, 1 x H1'), 7.04 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.07 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.18 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.22 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.32 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-

H6), 7.38 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H4), 7.41 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 x Aryl-H4), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.98 (1 x Thymin- CH_3), 12.07 (1 x Thymin- CH_3), 31.23 (2 x *t*-Bu- CH_3), 34.37 (2 x *t*-Bu-C), 68.39 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.47 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.66 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 68.80 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 84.29 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x C4'), 89.33 (2 x C1'), 109.84 (2 x Thymin-C5), 117.67-117.76 (m, 2 x Aryl-C3), 120.61 (2 x Aryl-C1), 123.02 (1 x Aryl-C6), 123.06 (1 x Aryl-C6), 126.75 (1 x Aryl-C4), 126.88 (1 x Aryl-C4), 127.47 (1 x C2'), 127.51 (1 x C2'), 132.98 (1 x C3'), 133.05 (1 x C3'), 135.81 (1 x Thymin-C6), 135.86 (1 x Thymin-C6), 137.59 (2 x Aryl-C5), 147.18 (2 x Aryl-C2), 150.86 (1 x Thymin-C2), 150.89 (1 x Thymin-C2), 163.87 (1 x Thymin-C4), 163.89 (1 x Thymin-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.84, -7.86; MS (FAB): ber.: 449.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 449.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.36; HPLC: $t_{\text{R}} = 16.8$ min. (Methode I), $t_{\text{R}} = 27.9, 28.2$ min. (Methode II)

8.2.6.6.9 Synthese von 5-*tert*-Butyl-cycloSal-BVDU-monophosphat

(5-*t*-Bu-cycloSal-BVDUMP) 244

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 63 mg (0.19 mmol) BVDU **15**, 93 mg noch verunreinigtes 5-*tert*-Butylsaligenylchlorphosphit **249**, 0.07 mL (0.05 g, 0.4 mmol) DIPEA, 0.12 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (0.66 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 27 mg (48 μmol , 25 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.26 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.27 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 2.16-2.23 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.94-3.97 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.22-4.44 (m, 2 x 3H, 2 x H3', 2 x H5'), 5.41-5.51 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.16 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 1 x H1'), 6.18 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 1 x H1'), 6.89 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.91 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.04 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.06 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz, 1 x Aryl-H3), 7.28-7.34 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H6,

2 x BVU-H8), 7.34-7.41 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 7.79 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.82 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.61 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 31.23 (2 x *t*-Bu-CH₃), 34.36 (2 x *t*-Bu-C), 38.86 (1 x C2'), 39.01 (1 x C2'), 67.79 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 2 x C5'), 68.86 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.00 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.82 (1 x C3'), 69.87 (1 x C3'), 84.62 (2 x C4'), 84.80 (1 x C1'), 84.82 (1 x C1'), 107.08 (1 x BVU-C8), 107.11 (1 x BVU-C8), 110.26 (1 x BVU-C5), 110.29 (1 x BVU-C5), 117.71 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C3), 117.78 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C3), 120.30 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, 1 x Aryl-C1), 120.39 (1 x Aryl-C1), 122.88 (2 x Aryl-C6), 126.71 (1 x Aryl-C4), 126.78 (1 x Aryl-C4), 129.93 (2 x BVU-C7), 138.88 (2 x Aryl-C5), 139.46 (1 x BVU-C6), 139.50 (1 x BVU-C6), 147.12 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.6$ Hz, 2 x Aryl-C2), 149.32 (1 x BVU-C2), 149.35 (1 x BVU-C2), 161.75 (1 x BVU-C4), 161.77 (1 x BVU-C4); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.09, -8.17; MS (FAB): ber.: 557.1 (M+H⁺), gef.: 557.2 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 250, 293; DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.38; HPLC: t_R = 18.4, 18.7 min. (Methode I)

8.2.6.7 Synthese der Bis-*tert*-butyl-substituierten *cycloSal*-Nucleotide 250,251

8.2.6.7.1 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit 253

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (4.23 mmol) 3,5-Bis-*tert*-butylsalicylalkohol **252**, 0.44 mL (0.69 g, 5.0 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.79 mL (0.77 g, 9.7 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 4 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.20 g eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.27 g)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 1.32 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 1.42 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 4.98-5.10 (m, 1H, Benzyl-H), 5.33-5.50 (m, 1H, Benzyl-H'), 6.82 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, H6), 7.31 (dd, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 29.82 (*t*-Bu-CH₃), 31.36 (*t*-Bu-CH₃), 34.49 (*t*-Bu-C), 34.85 (*t*-Bu-C), 61.74 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.2$ Hz, Benzyl-C), 120.39 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.1$ Hz, C6), 121.05 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz,

C1), 123.68 (C4), 139.03 (d, $^3J_{CP} = 2.2$ Hz, C3), 142.96 (d, $^2J_{CP} = 7.4$ Hz, C2), 145.96 (C5); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 139.12

8.2.6.7.2 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat

(3,5-Bis-*t*-Bu-cycloSal-d4TMP) 250

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt.

Es wurden 80 mg (0.36 mmol) d4T **4**, 217 mg noch verunreinigtes 3,5-Bis-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **253**, 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 8 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 91 mg (0.18 mmol, 50 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 1.28 (s, 2 x 9H, 2 x *t*-Bu- CH_3), 1.33 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.36 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.57 (d, 1 x 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, 1 x Thymin- CH_3), 1.58 (d, 1 x 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, 1 x Thymin- CH_3), 4.29-4.41 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.96-5.01 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.33-5.47 (m, 2 x 2H, 2 x Benzyl-H), 6.02-6.07 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.42 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1 x H3'), 6.44 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1 x H3'), 6.81-6.85 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.20-7.24 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 7.32 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 11.35 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.36 (s, 1 x 1H, 1 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 11.87 (1 x Thymin- CH_3), 11.92 (1 x Thymin- CH_3), 29.74 (1 x *t*-Bu- CH_3), 29.77 (1 x *t*-Bu- CH_3), 31.28 (2 x *t*-Bu- CH_3), 34.50 (2 x *t*-Bu-C), 34.56 (1 x *t*-Bu-C), 34.62 (1 x *t*-Bu-C), 68.64 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.69 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.87 (d, $^2J_{CP} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 68.93 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x C5'), 84.32 (d, $^3J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x C4'), 84.39 (d, $^3J_{CP} = 7.1$ Hz, 1 x C4'), 89.21 (1 x C1'), 89.34 (1 x C1'), 109.81 (1 x Thymin-C5), 109.89 (1 x Thymin-C5), 121.47 (2 x Aryl-C4), 122.47 (d, $^3J_{CP} = 8.1$ Hz, 2 x Aryl-C1), 123.91 (2 x Aryl-C6), 127.48 (1 x C2'), 127.54 (1 x C2'), 132.99 (1 x C3'), 133.09 (1 x C3'), 135.83 (1 x Thymin-C6), 135.87 (1 x Thymin-C6), 137.65 (d, $^3J_{CP} = 2.0$ Hz, 2 x Aryl-C3), 146.39 (2 x Aryl-C5), 146.59 (d, $^2J_{CP} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 146.67 (d, $^2J_{CP} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C2), 150.86 (1 x Thymin-C2), 150.89

(1 x Thymin-C2), 163.86 (1 x Thymin-C4), 163.90 (1 x Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -6.93, -7.23; MS (FAB-HR): ber.: 505.2104 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 505.2116 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.50; HPLC: t_R = 19.3, 19.5 min. (Methode I), t_R = 34.1, 34.6 min. (Methode II)

8.2.6.7.3 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butyl-cycloSal-BVDU-monophosphat (3,5-Bis-*t*-Bu-cycloSal-BVDUMP) 251

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.360 mmol) BVDU **15**, 162 mg noch verunreinigtes 3,5-Bis-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **253**, 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 98 mg (0.16 mmol, 44 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 0.8

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.28 (s, 2 x 9H, 2 x *t*-Bu- CH_3), 1.34 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 1.36 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu- CH_3), 2.18-2.23 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.95-3.99 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.26-4.44 (m, 2 x 3H, 2 x H3', 2 x H5'), 5.41 (dd, 2 x 2H, $^2J_{\text{HH}} = 14.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.1$ Hz, 2 x Benzyl-H), 5.50 (dd, 2 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, 2 x OH), 6.17 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.20 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.87 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.89 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.19 (s, 2 x 1H, 2 x Aryl-H6), 7.28-7.32 (m, 2 x 2H, 2 x Aryl-H4, 2 x BVU-H8), 7.83 (s, 2 x 1H, 2 x BVU-H6), 11.62 (s, 2 x 1H, 2 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 29.83 (2 x *t*-Bu- CH_3), 31.34 (2 x *t*-Bu- CH_3), 34.54 (2 x *t*-Bu-C), 34.65 (1 x *t*-Bu-C), 34.69 (1 x *t*-Bu-C), 39.95 (2 x C2'), 68.79 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C5'), 68.86 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, 1 x C5'), 69.91 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 2 x Benzyl-C), 69.95 (1 x C3'), 69.99 (1 x C3'), 84.79 (2 x C4'), 84.97 (2 x C1'), 107.15 (1 x BVU-C8), 107.18 (1 x BVU-C8), 110.35 (2 x BVU-C5), 121.39 (2 x Aryl-C4), 122.80 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 2 x Aryl-C1), 123.93 (1 x Aryl-C6), 123.95 (1 x Aryl-C6), 129.94 (2 x BVU-C7), 138.17 (2 x Aryl-C3), 139.43 (2 x BVU-C6), 146.39 (2 x Aryl-C5), 146.41 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 2 x Aryl-C2),

149.39 (1 x BVU-C2), 149.43 (1 x BVU-C2), 161.82 (2 x BVU-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.01, -7.32; MS (FAB): ber.: 613.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 613.3 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 250, 293; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.52; HPLC: t_R = 21.1, 21.3 min. (Methode I)

8.2.6.8 Synthese der 3-Alkyl-substituierten *cycloSal*-Nucleotide 260,261

8.2.6.8.1 Synthese von 3-*neo*-Pentylsalicylalkoholisopropylidenacetal 262

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 5.29 mL (6.30 g, 41.7 mmol) *neo*-Pentylbromid und 18 mL abs. Diethylether langsam zu 1.38 g (56.8 mmol) Magnesium-Spänen gegeben. Die Grignard-Reaktion sprang erst nach Erhitzen, Zugabe von etwas 1,2-Dibromethan und Behandlung im Ultraschall-Bad an und wurde durch anschließendes einstündiges Erhitzen unter Rückfluß vervollständigt.

Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung des Grignard-Regenzes wurde bei Raumtemperatur langsam zu einer Lösung von 2.30 g (9.46 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** und 257 mg (0.315 mmol) des Katalysators (1,1'-(Bis-diphenylphosphino)-ferrocenyl)-palladium(II)-chlorid ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, Dichlormethan-Addukt) in 18 mL abs. THF gegeben. Bei der Zugabe wurde die Lösung erst dunkel, dann orange-braun, dann wieder dunkler, schließlich fiel ein farbloser Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wurde 22 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 30 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Nach Zugabe von Dichlormethan und Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene dunkle Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/Dichlormethan 4 : 1 v/v).

Ausbeute: 1.78 g (7.60 mmol, 80 %) eines schwach gelblichen Öls

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 0.89 (s, 9H, *neo*-Pentyl- CH_3), 1.46 (s, 6H, Acetal- CH_3), 2.45 (s, 2H, *neo*-Pentyl- CH_2), 4.81 (s, 2H, Benzyl-H), 6.82 (dd, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, H5), 6.90-6.93 (m, 1H, H6), 6.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.7 \text{ Hz}$, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 24.89 (Acetal- CH_3), 29.61 (*neo*-Pentyl- CH_3), 32.37 (*neo*-Pentyl-C), 41.60 (*neo*-Pentyl- CH_2), 60.33 (Benzyl-C), 99.18 (Acetal-C), 119.13 (C1), 119.21 (C5), 123.03 (C6), 126.92 (C3), 130.69 (C4), 149.19 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 234 (M), gef.: 234 (M, 60 %), 176 (55), 161 (39), 145 (7), 120 (100), 91 (26), 57 (53), 41 (22); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 226, 274, 281; DC: R_f -Wert (Petrolether/Dichlormethan 1 : 3 v/v): 0.50

Weitere Syntheseveruche

Es wurden Vorversuche zur Synthese von **262** mit verschiedenen Mengen *neo*-Pentylbromid (und damit verschiedenen Mengen des Grignard-Reagenzes) im kleineren Maßstab durchgeführt.

mit 2.2 Äquiv. *neo*-Pentylbromid

Durchführung wie oben, aber mit folgenden Mengen: 508 mg (2.09 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 0.60 mL (0.71 g, 4.7 mmol) *neo*-Pentylbromid, 165 mg (6.79 mmol) Magnesium-Späne, 55 mg (67 μmol) des Katalysators Pd(dppf) Cl_2 (Dichlormethan-Addukt), 4 mL abs. THF und 4 mL abs. Diethylether. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte zunächst durch Kieselgelfiltration (Dichlormethan) und dann am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-20 %)).

Ausbeute: 433 mg eines farblosen Öls, laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Gemisch aus 70 % **262** und 30 % des Edukts **65** (100 % Ausbeute: 490 mg)

mit 4.4 Äquiv. *neo*-Pentylbromid

Durchführung wie oben, aber mit folgenden Mengen: 456 mg (1.88 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 1.05 mL (1.25 g, 8.28 mmol) *neo*-Pentylbromid, 274 mg (11.3 mmol) Magnesium-Späne, 49 mg (60 μmol) des Katalysators Pd(dppf) Cl_2 (Dichlormethan-Addukt), 3.5 mL abs. THF und 3.5 mL abs. Diethylether. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte zunächst durch Kieselgelfiltration

(Dichlormethan) und dann am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-20 %)).

Ausbeute: 360 mg (1.54 mmol, 82 %) eines schwach gelblichen Öls

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

8.2.6.8.2 Synthese von 3-*neo*-Pentylsalicylalkohol 264 durch Entschützung von 262 mit TFA

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel 8.2.1.4 durchgeführt.

Es wurden 1.64 g (7.00 mmol) 3-*neo*-Pentylsalicylalkoholisopropylidenacetal **262**, 9.00 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (17.5 mmol TFA) und 180 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 10 d.

Ausbeute: 793 mg (4.08 mmol, 58 %) eines schwach gelblichen Öls, das nach 2 d bei -20°C zu einem schwach gelblichen Feststoff kristallisierte

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 0.89 (s, 9H, *neo*-Pentyl-CH₃), 2.52 (s, 2H, *neo*-Pentyl-CH₂), 4.60 (d, 2H, ³J_{HH} = 4.2 Hz, Benzyl-H), 5.48 (t, 1H, ³J_{HH} = 4.2 Hz, Benzyl-OH), 6.73 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H5), 6.91 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, H6), 7.04-7.07 (m, 1H, H4), 8.32 (Phenol-OH); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 29.59 (*neo*-Pentyl-CH₃), 32.56 (*neo*-Pentyl-C), 42.17 (*neo*-Pentyl-CH₂), 60.69 (Benzyl-C), 118.55 (C5), 125.46 (C4), 126.13 (C1), 127.93 (C3), 130.99 (C6), 153.45 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 194 (M), gef.: 194 (M, 24 %), 161 (21), 138 (10), 120 (100), 91 (24), 57 (53), 41 (25); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3428, 2956, 2863, 1592, 1456, 1364, 1260, 1226, 1004, 953, 794, 760; UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 226, 274, 281; DC: R_F-Wert (Dichlormethan): 0.15

8.2.6.8.3 Versuch der Synthese von 3-*neo*-Pentylsalicylalkohol 264 durch Entschützung von 262 mit saurem Ionentauscher

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel 8.2.1.5 durchgeführt.

Es wurden 124 mg (0.529 mmol) 3-*neo*-Pentylsalicylalkoholisopropylidenacetal **262**, 14.6 g Dowex 50 X 8 und 24 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 9 d.

Ausbeute: 104 mg (0.499 mmol, 94 %) des unerwünschten Produktes 1-*O*-Methyl-3-*neo*-pentylsalicylalkohol **266** als farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 0.89 (s, 9H, *neo*-Pentyl- CH_3), 2.55 (s, 2H, *neo*-Pentyl- CH_2), 3.31 (s, 3H, OCH_3), 4.47 (s, 2H, Benzyl-H), 6.75 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H5), 6.96 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H6), 7.07 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H4), 8.11 (Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 29.50 (*neo*-Pentyl- CH_3), 32.56 (*neo*-Pentyl-C), 42.22 (*neo*-Pentyl- CH_2), 57.70 (OCH_3), 70.27 (Benzyl-C), 118.65 (C5), 124.88 (C1), 126.38 (C3), 127.01 (C4), 131.74 (C6), 153.44 (C2); DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.56

8.2.6.8.4 Synthese von 3-*neo*-Pentylsaligenylchlorphosphit **268**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 746 mg (3.84 mmol) 3-*neo*-Pentylsalicylalkohol **264**, 0.39 mL (0.61 g, 4.4 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.72 mL (0.71 g, 9.0 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 3.2 mL abs. Diethylether, und 35 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 833 mg eines noch verunreinigten gelblichen Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 993 mg)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 0.96 (s, 9H, *neo*-Pentyl- CH_3), 2.54 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.9$ Hz, *neo*-Pentyl-CH), 2.61 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.9$ Hz, *neo*-Pentyl-CH'), 5.03 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.5$ Hz, Benzyl-H), 5.48 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 2.6$ Hz, Benzyl-H'), 6.83-6.86 (m, 1H, H6), 7.03 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.09-7.12 (m, 1H, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 29.50 (*neo*-Pentyl- CH_3), 32.66 (*neo*-Pentyl-C), 42.12 (*neo*-Pentyl- CH_2), 61.30 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.2$ Hz, Benzyl-C), 121.16 (d, $^3J_{\text{CP}} = 12.5$ Hz, C1), 122.77 (C5), 123.60 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.2$ Hz, C6), 130.18 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.2$ Hz, C3), 132.22 (C4), 144.80 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.4$ Hz, C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3): 140.93

8.2.6.8.5 Synthese von 3-*neo*-Pentyl-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3-*neo*-Pentyl-*cycloSal*-d4TMP) 260

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.446 mmol) d4T **4**, 230 mg noch verunreinigtes 3-*neo*-Pentylsaligenylchlorphosphit **268** (gelöst in 1.4 mL abs. Acetonitril), 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.30 mL einer 5-6 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (≥ 1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 53 mg (0.11 mmol, 25 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 1.0 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 0.87 (s, 1 x 9H, 1 x *neo*-Pentyl- CH_3), 0.89 (s, 1 x 9H, 1 x *neo*-Pentyl- CH_3), 1.63 (s, 2 x 3H, 2 x Thymin- CH_3), 2.44 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.8$ Hz, 1 x *neo*-Pentyl- CH_2), 2.47 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.8$ Hz, 1 x *neo*-Pentyl- CH_2), 2.58 (d, 2 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.8$ Hz, 2 x *neo*-Pentyl- CH_2'), 4.25-4.36 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.95-4.99 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.38 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.3$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.40 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.2$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.45 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.6$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.49 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.8$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.02-6.05 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.40 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1 x H3'), 6.42 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1 x H3'), 6.81 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1 x H1'), 6.82 (ddd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1 x H1'), 7.11-7.23 (m, 2 x 4H, 2 x Aryl-H4, 2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6, 2 x Thymin-H6), 11.34 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.36 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.99 (1 x Thymin- CH_3), 12.07 (1 x Thymin- CH_3), 29.36 (1 x *neo*-Pentyl- CH_3), 29.38 (1 x *neo*-Pentyl- CH_3), 32.24 (1 x *neo*-Pentyl-C), 32.27 (1 x *neo*-Pentyl-C), 41.53 (1 x *neo*-Pentyl- CH_2), 41.54 (1 x *neo*-Pentyl- CH_2), 68.21 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.9$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.32 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, 1 x Benzyl-C), 69.44 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.4$ Hz, 1 x C5'), 69.60 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.6$ Hz, 1 x C5'), 84.61 (2 x C4'), 89.29 (1 x C1'), 89.53 (1 x C1'), 109.91 (2 x Thymin-C5), 121.41 (2 x Aryl-C1), 124.35 (2 x Aryl-C5), 127.48 (1 x C2'), 127.51 (1 x C2'), 128.65 (d, $^3J_{\text{CP}} = 4.2$ Hz, 2 x Aryl-C3), 132.60 (2 x Aryl-C6), 132.74 (2 x Aryl-C4), 132.96 (1 x C3'), 133.02 (1 x C3'), 135.84 (1 x Thymin-C6), 135.88 (1 x Thymin-C6), 148.51 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz,

2 x Aryl-C2), 150.87 (2 x Thymin-C2), 163.89 (2 x Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.33, -7.60; MS (FAB): ber.: 463.2 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 463.3 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.53; HPLC: t_R = 16.3 min. (Methode I)

8.2.6.8.6 Synthese von 3-Cyclohexylsalicylalkoholisopropylidenacetal 263

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Sauerstoff und Feuchtigkeit auszuschließen.

Es wurden 2.20 mL (2.93 g, 18.0 mmol) Cyclohexylbromid und 12 mL abs. Diethylether langsam zu 609 mg (25.1 mmol) Magnesium-Spänen gegeben. Die Grignard-Reaktion sprang erst nach Erhitzen und Zugabe von etwas 1,2-Dibromethan an und wurde durch anschließendes einstündiges Erhitzen unter Rückfluß vervollständigt.

Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung des Grignard-Regenzes wurde bei Raumtemperatur langsam zu einer Lösung von 2.00 g (8.23 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65** und 203 mg (0.249 mmol) des Katalysators (1,1'-(Bis-diphenylphosphino)-ferrocenyl)-palladium(II)-chlorid ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, Dichlormethan-Addukt) in 12 mL abs. THF gegeben. Bei der Zugabe wurde die Lösung erst dunkel, dann nacheinander rot, grün und gelb, schließlich fiel ein farbloser Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 50 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Nach Zugabe von Dichlormethan und Trennung der Phasen wurde die wäßrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des so erhaltenen dunklen Öls erfolgte zunächst durch Kieselgelfiltration (Dichlormethan) und dann am Chromatotron (Petrolether/Dichlormethan-Gradient (0-20 %)).

Ausbeute: 1.48 g (6.01 mmol, 73 %) eines gelblichen Öls

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.18-1.43 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 1.48 (s, 6H, Acetal- CH_3), 1.70-1.80 (m, 5H, H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 2.73-2.79 (m, 1H, H1'), 4.80 (s, 2H, Benzyl-H), 6.83-6.89 (m, 2H, H5, H6), 7.05 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H4); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 24.81

(Acetal-CH₃), 26.01 (C4'), 26.74 (C3', C5'), 32.54 (C2', C6'), 36.43 (C1'), 60.37 (Benzyl-C), 99.10 (Acetal-C), 119.26 (C1), 120.11 (C5), 122.42 (C6), 124.91 (C4), 134.79 (C3), 147.98 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 246 (M), gef.: 246 (M, 36 %), 188 (100), 173 (10), 159 (32), 145 (12), 120 (88), 107 (8), 91 (14), 77 (6), 43 (6); UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 226, 272, 279; DC: R_f-Wert (Petrolether/Dichlormethan 1 : 3 v/v): 0.48

Weitere Syntheseveruche

Es wurden Vorversuche zur Synthese von **263** unter verschiedenen Bedingungen im kleineren Maßstab durchgeführt.

mit 1.1 Äquiv. Cyclohexylbromid und THF als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit folgenden Mengen: 425 mg (1.75 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 0.24 mL (0.32 g, 2.0 mmol) Cyclohexylbromid, 65 mg (2.7 mmol) Magnesium-Späne, 43 mg (53 μ mol) des Katalysators Pd(dppf)Cl₂ (Dichlormethan-Addukt), 3 mL abs. THF für die Kreuzkupplung und 3 mL abs. THF für die Darstellung des Grignard-Reagenzes. Bei der Kreuzkupplungsreaktion wurde kein Ausfallen eines Niederschlags beobachtet.

Ausbeute: 401 mg eines gelblichen Öls, laut ¹H-NMR-Spektrum ein Gemisch aus 21 % **263** und 79 % des Edukts **65** (100 % Ausbeute: 431 mg)

mit 1.1 Äquiv. Cyclohexylbromid und THF/Diethylether 1 : 1 v/v als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit folgenden Mengen: 425 mg (1.75 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 0.24 mL (0.32 g, 2.0 mmol) Cyclohexylbromid, 64 mg (2.6 mmol) Magnesium-Späne, 43 mg (53 μ mol) des Katalysators Pd(dppf)Cl₂ (Dichlormethan-Addukt), 3 mL abs. THF für die Kreuzkupplung und 3 mL abs. Diethylether für die Darstellung des Grignard-Reagenzes.

Ausbeute: 368 mg eines gelblichen Öls, laut ¹H-NMR-Spektrum ein Gemisch aus 60 % **263** und 40 % des Edukts **65** (100 % Ausbeute: 431 mg)

mit 2.2 Äquiv. Cyclohexylbromid und THF/Diethylether 1 : 1 v/v als Lösungsmittel

Durchführung wie oben, aber mit folgenden Mengen: 508 mg (2.09 mmol) 3-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **65**, 0.60 mL (0.80 g, 5.0 mmol) Cyclohexylbromid, 153 mg (6.3 mmol) Magnesium-Späne, 55 mg (67 μ mol) des Katalysators Pd(dppf)Cl₂ (Dichlormethan-Addukt), 3 mL abs. THF für die Kreuzkupplung und 3 mL abs. Diethylether für die Darstellung des Grignard-Reagenzes.

Ausbeute: 407 mg (1.65 mmol, 79 %) eines schwach gelblichen Öls

Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

8.2.6.8.7 Synthese von 3-Cyclohexylsalicylalkohol **265** durch Entschützung von **263** mit TFA

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 aus Kapitel **8.2.1.4** durchgeführt.

Es wurden 1.41 g (5.72 mmol) 3-Cyclohexylsalicylalkoholisopropylidenacetal **263**, 7.30 mL einer 15 %-igen Lösung von TFA in Dichlormethan (14.2 mmol TFA) und 140 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 11 d.

Ausbeute: 544 mg (2.64 mmol, 46 %) eines schwach gelblichen Feststoffs

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 1.19-1.38 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 1.71-1.81 (m, 5H, H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 2.89-2.96 (m, 1H, H1'), 4.60 (d, 2H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, Benzyl-H), 5.47 (t, 1H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, Benzyl-OH), 6.78 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H5), 7.03 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H4, H6), 8.41 (s, 1H, Phenol-OH); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 26.05 (C4'), 26.80 (C3', C5'), 33.09 (C2', C6'), 36.19 (C1'), 60.67 (Benzyl-C), 119.46 (C5), 124.85 (C6), 125.09 (C4), 127.91 (C1), 134.26 (C3), 151.89 (C2); MS (EI, m/z): ber.: 206 (M), gef.: 206 (M, 75 %), 188 (86), 173 (19), 159 (70), 145 (42), 131 (39), 120 (100), 107 (25), 91 (48), 77 (26), 65 (12), 41 (16); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3443, 2926, 2850, 1454, 1340, 1223, 1018, 1002, 779, 748; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 224, 275; DC: R_F-Wert (Dichlormethan): 0.26

8.2.6.8.8 Synthese von 3-Cyclohexylsalicylalkohol **265** durch Entschützung von **263** mit saurem Ionentauscher

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 aus Kapitel **8.2.1.5** durchgeführt.

Es wurden 201 mg (0.816 mmol) 3-Cyclohexylsalicylalkoholisopropylidenacetal **263**, 22.4 g Dowex 50 X 8 und 24 mL Dichlormethan/Methanol 1 : 1 v/v eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 14 d.

Ausbeute: 26 mg (0.13 mmol, 16 %) von **265** als schwach gelblicher Feststoff und 140 mg (0.635 mmol, 78 %) des Nebenproduktes 1-O-Methyl-3-cyclohexylsalicylalkohol **267** als farbloses Öl

Daten zur Charakterisierung von **265**

Die spektroskopischen Daten entsprachen den in Kapitel **8.2.6.8.7** angegebenen.

Daten zur Charakterisierung von **267**

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 1.19-1.42 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 1.72-1.81 (m, 5H, H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 2.90-2.97 (m, 1H, H1'), 3.32 (s, 3H, OCH₃), 4.45 (s, 2H, Benzyl-H), 6.80 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H5), 7.03 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H6), 7.07 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H4), 8.20 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 26.01 (C4'), 26.76 (C3', C5'), 33.13 (C2', C6'), 36.22 (C1'), 57.80 (OCH₃), 70.23 (Benzyl-C), 119.63 (C5), 125.06 (C1), 125.82 (C4), 126.25 (C6), 134.66 (C3), 151.76 (C2); DC: R_f-Wert (Dichlormethan): 0.57

8.2.6.8.9 Synthese von 3-Cyclohexylsaligenylchlorphosphit **269**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel **8.2.1.6** durchgeführt.

Es wurden 536 mg (2.60 mmol) 3-Cyclohexylsalicylalkohol **265**, 0.26 mL (0.41 g, 3.0 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.49 mL (0.48 g, 6.1 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 2.1 mL abs. Diethylether, und 20 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 587 mg eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 704 mg)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.24-1.49 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 1.78-1.87 (m, 5H, H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 2.89-2.95 (m, 1H, H1'), 5.04 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 12.2$ Hz, Benzyl-H), 5.44 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.2$ Hz, Benzyl-H'), 6.81 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H6), 7.07 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H5), 7.20 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H4); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 26.22 (C4'), 26.86 (C3', C5'), 32.73 (C2'), 33.15 (C6'), 36.66 (C1'), 61.41 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, Benzyl-C), 121.25 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz, C1), 123.01 (d, $^4J_{\text{CP}} = 1.5$ Hz, C6), 123.72 (C5), 126.55 (C4), 137.88 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.0$ Hz, C3), 143.66 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.6$ Hz, C2); $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3): 141.61

8.2.6.8.10 Synthese von 3-Cyclohexyl-cycloSal-d4T-monophosphat (3-Cy-cycloSal-d4TMP) 261

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.446 mmol) d4T **4**, 242 mg noch verunreinigtes 3-Cyclohexylsaligenylchlorphosphit **269** (gelöst in 2.1 mL abs. Acetonitril), 0.16 mL (0.12 g, 0.93 mmol) DIPEA, 0.27 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 10 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 64 mg (0.13 mmol, 29 %) einer farblosen Watte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.9 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 1.21-1.46 (m, 2 x 5H, 2 x Cy-H2', 2 x Cy-H3', 2 x Cy-H4', 2 x Cy-H5', 2 x Cy-H6'), 1.62 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.63 (s, 1 x 3H, 1 x Thymin- CH_3), 1.69-1.81 (m, 2 x 5H, 2 x Cy-H2'', 2 x Cy-H3'', 2 x Cy-H4'', 2 x Cy-H5'', 2 x Cy-H6''), 2.79-2.86 (m, 2 x 1H, 2 x Cy-H1'), 4.25-4.33 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.96-5.00 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.36 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.4$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.39 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.7$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.45 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 10.1$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.47 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 9.8$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.02-6.06 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.40-6.43 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.81-6.85 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.12-7.19 (m, 2 x 2H,

2 x Aryl-H5, 2 x Aryl-H6), 7.21 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.26 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.30-7.33 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H4), 11.35 (s, 2 x 1H, 2 x NH); ^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 11.92 (1 x Thymin- CH_3), 12.04 (1 x Thymin- CH_3), 25.74 (1 x Cy-C4'), 25.78 (1 x Cy-C4'), 26.41 (1 x Cy-C3'), 26.48 (1 x Cy-C3'), 26.51 (1 x Cy-C5'), 26.53 (1 x Cy-C5'), 32.47 (1 x Cy-C2', 1 x Cy-C6'), 32.71 (1 x Cy-C2', 1 x Cy-C6'), 36.41 (1 x Cy-C1'), 36.45 (1 x Cy-C1'), 68.37 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.43 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x Benzyl-C), 68.73 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 1 x C5'), 68.86 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 84.35 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 2 x C4'), 89.25 (1 x C1'), 89.37 (1 x C1'), 109.83 (1 x Thymin-C5), 109.95 (1 x Thymin-C5), 121.93 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 122.03 (d, $^3J_{\text{CP}} = 2.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 123.87 (1 x Aryl-C5), 123.92 (1 x Aryl-C5), 124.59 (2 x Aryl-C6), 127.40 (1 x Aryl-C4), 127.43 (1 x Aryl-C4), 127.56 (1 x C2'), 127.61 (1 x C2'), 132.95 (1 x C3'), 133.01 (1 x C3'), 135.79 (1 x Thymin-C6), 135.88 (1 x Thymin-C6), 136.27 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz, 2 x Aryl-C3), 147.41 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C2), 150.88 (2 x Thymin-C2), 163.91 (1 x Thymin-C4), 163.94 (1 x Thymin-C4); ^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -6.79, -7.13; MS (FAB): ber.: 475.2 ($\text{M}+\text{H}^+$), gef.: 475.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.55; HPLC: $t_R = 17.8$ min. (Methode I)

8.2.6.9 Synthese der 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-substituierten *cycloSal*-Nucleotide 270,271

8.2.6.9.1 Synthese von 2,4-Bis-*tert*-butyl-5-fluorphenol 272^[149]

Es wurde Isobuten 5 min. unter Rühren bei 40°C durch 4.10 g (36.6 mmol) *m*-Fluorphenol geleitet. Anschließend wurden 0.18 mL (0.34 g, 3.5 mmol) konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig zugetropft und noch 1 h Isobuten unter Rühren bei 40°C eingeleitet, wobei das Volumen der Reaktionslösung stark zunahm. Nach vorsichtiger Zugabe von Wasser und Dichlormethan und Trennung der Phasen wurde die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/ Dichlormethan 4 : 1 v/v).

Ausbeute: 5.73 g (25.5 mmol, 70 %) eines farblosen Öls

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 1.37 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 1.42 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 4.76 (s, 1H, OH), 6.39 (d, 1H, $^3J_{\text{HF}} = 13.0$ Hz, H6), 7.19 (d, 1H, $^4J_{\text{HF}} = 9.7$ Hz, H3); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 29.78 (2-*t*-Bu-CH₃), 30.19 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 4-*t*-Bu-CH₃), 33.88 (d, $^3J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 4-*t*-Bu-C), 34.39 (2-*t*-Bu-C), 104.90 (d, $^2J_{\text{CF}} = 27.0$ Hz, C6), 125.39 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7.1$ Hz, C3), 128.08 (d, $^2J_{\text{CF}} = 11.2$ Hz, C4), 130.83 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.6$ Hz, C2), 152.72 (d, $^3J_{\text{CF}} = 10.2$ Hz, C1), 159.86 (d, $^1J_{\text{CF}} = 246.7$ Hz, C5); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, CDCl_3): -113.34; MS (FAB-HR): ber.: 224.1576 (M), gef.: 224.1559 (M); UV (MeOH): λ_{max} [nm]: 226, 274; DC: R_F-Wert (Petrolether/Dichlormethan 4 : 1 v/v): 0.14

8.2.6.9.2 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsalicylalkohol 273

Es wurden 5.55 g (24.7 mmol) 2,4-Bis-*tert*-butyl-5-fluorphenol **272** und 1.18 g (27.5 mmol) Natriumhydroxid in 15 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 5.9 mL einer 37%-igen wässrigen Formaldehyd-Lösung (79 mmol Formaldehyd) zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v) und schließlich durch Eingießen in Wasser sowie vorsichtiges Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4-5 abgebrochen. Das resultierende Gemisch wurde fünfmal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde aus Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 4.49 g (17.7 mmol, 72 %) eines farblosen kristallinen Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 1.34 (d, 9H, $^4J_{\text{HF}} = 1.0$ Hz, 5-*t*-Bu-CH₃), 1.41 (s, 9H, 3-*t*-Bu-CH₃), 5.02 (s, 2H, Benzyl-H), 7.14 (d, 1H, $^4J_{\text{HF}} = 9.9$ Hz, H4), 7.92 (s, 1H, Phenol-OH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 29.95 (3-*t*-Bu-CH₃), 30.48 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 5-*t*-Bu-CH₃), 34.28 (d, $^3J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 5-*t*-Bu-C), 34.95 (3-*t*-Bu-C), 58.13 (d, $^3J_{\text{CF}} = 10.2$ Hz, Benzyl-C), 112.89 (d, $^2J_{\text{CF}} = 17.3$ Hz, C1), 124.64 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.1$ Hz, C4), 126.94 (d, $^2J_{\text{CF}} = 12.2$ Hz, C5), 131.88 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, C3), 154.67 (d, $^3J_{\text{CF}} = 5.1$ Hz, C2), 156.86 (d, $^1J_{\text{CF}} = 252.2$ Hz, C6); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm]

(471 MHz, CDCl₃): -119.74; MS (FAB-HR): ber.: 254.1682 (M), gef.: 254.1681 (M); IR (KBr): ν [cm⁻¹]: 3442, 3216, 2994, 2964, 2910, 2871, 1615, 1485, 1466, 1448, 1413, 1364, 1249, 1226, 1202, 1058, 993; UV (MeOH): λ_{\max} [nm]: 226, 277; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.80

8.2.6.9.3 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsaligenylchlorphosphit 274

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 aus Kapitel 8.2.1.6 durchgeführt.

Es wurden 1.01 g (3.97 mmol) 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsalicylalkohol **273**, 0.42 mL (0.66 g, 4.8 mmol) Phosphor(III)-chlorid, 0.74 mL (0.73 g, 9.2 mmol) abs. Pyridin, gelöst in 4 mL abs. Diethylether, und 30 mL abs. Diethylether eingesetzt.

Ausbeute: 1.11 g eines noch verunreinigten gelben Öls als Gemisch von 2 Enantiomeren (100 % Ausbeute: 1.27 g)

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 1.33 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 1.35 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 5.17-5.27 (m, 2H, Benzyl-H), 7.17 (d, 1H, ⁴J_{HF} = 9.5 Hz, H4); ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 29.83 (3-*t*-Bu-CH₃), 29.92 (d, ⁴J_{CF} = 3.1 Hz, 5-*t*-Bu-CH₃), 34.22 (d, ³J_{CF} = 3.1 Hz, 5-*t*-Bu-C), 34.63 (3-*t*-Bu-C), 56.95 (dd, ³J_{CF} = 11.2 Hz, ²J_{CP} = 3.1 Hz, Benzyl-C), 110.96 (C1), 123.65 (d, ³J_{CF} = 8.1 Hz, C4), 130.91 (d, ²J_{CF} = 11.2 Hz, C5), 134.38 (C3), 142.88 (C2), 155.20 (d, ¹J_{CF} = 247.2 Hz, C6); ¹⁹F-NMR: δ [ppm] (471 MHz, CDCl₃): -119.94; ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃): 135.84

8.2.6.9.4 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-*cycloSal*-d4T-monophosphat (3,5-Bis-*t*-Bu-6-F-*cycloSal*-d4TMP) 270

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante I aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt.

Es wurden 119 mg (0.531 mmol) d4T **4**, 340 mg noch verunreinigtes 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsaligenylchlorphosphit **274** (gelöst in 5 mL abs. Acetonitril), 0.19 mL (0.14 g, 1.1 mmol) DIPEA, 0.33 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.8 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 12 mL abs. Acetonitril eingesetzt.

Ausbeute: 164 mg (0.310 mmol, 58 %) einer farblosen Wasse als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.8 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.32 (s, 1 x 9H, 2 x *t*-Bu-CH₃), 1.34 (s, 2 x 9H, 2 x *t*-Bu-CH₃), 1.35 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 1.61 (s, 2 x 3H, 2 x Thymin-CH₃), 4.32-4.41 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 4.98-5.02 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 5.41 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.47 (d, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1 x Benzyl-H), 5.53 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.6$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 5.56 (dd, 1 x 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.2$ Hz, 1 x Benzyl-H'), 6.03-6.08 (m, 2 x 1H, 2 x H2'), 6.42-6.45 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 6.81-6.85 (m, 2 x 1H, 2 x H1'), 7.22 (s, 1 x 1H, 1 x Thymin-H6), 7.23 (q, 1 x 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1 x Thymin-H6), 7.26 (d, 2 x 1H, $^4J_{\text{HF}} = 9.5$ Hz, 2 x Aryl-H4), 11.36 (s, 1 x 1H, 1 x NH), 11.37 (s, 1 x 1H, 1 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 12.07 (2 x Thymin-CH₃), 29.83 (1 x 3-*t*-Bu-CH₃), 29.86 (1 x 3-*t*-Bu-CH₃), 29.99 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 2 x 5-*t*-Bu-CH₃), 34.30 (d, $^3J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 2 x 5-*t*-Bu-C), 34.62 (1 x 3-*t*-Bu-C), 34.67 (1 x 3-*t*-Bu-C), 68.78-63.95 (m, 2 x Benzyl-C), 69.34 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 69.45 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, 1 x C5'), 84.44 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.0$ Hz, 1 x C4'), 84.51 (d, $^3J_{\text{CP}} = 3.0$ Hz, 1 x C4'), 89.49 (1 x C1'), 89.66 (1 x C1'), 109.98 (1 x Thymin-C5), 110.07 (1 x Thymin-C5), 111.27 (dd, $^2J_{\text{CF}} = 9.2$ Hz, $^3J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 111.47 (dd, $^2J_{\text{CF}} = 9.2$ Hz, $^3J_{\text{CP}} = 4.1$ Hz, 1 x Aryl-C1), 125.21 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7.1$ Hz, 2 x Aryl-C4), 127.71 (1 x C2'), 127.75 (1 x C2'), 131.62 (d, $^2J_{\text{CF}} = 10.2$ Hz, 2 x Aryl-C5), 133.08 (1 x C3'), 133.16 (1 x C3'), 133.65-133.76 (m, 2 x Aryl-C3), 136.05 (2 x Thymin-C6), 147.32 (2 x Aryl-C2), 151.08 (2 x Thymin-C2), 155.11 (d, $^1J_{\text{CF}} = 248.2$ Hz, 2 x Aryl-C6), 164.05 (1 x Thymin-C4), 164.10 (1 x Thymin-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, DMSO- d_6): -117.37, -117.50; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.71, -9.07; MS (FAB-HR): ber.: 523.2009 (M+H⁺), gef.: 523.2092 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.50; HPLC: t_R = 20.2 min. (Methode I)

8.2.6.9.5 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluor-cycloSal-BVDU-monophosphat (3,5-Bis-*t*-Bu-6-F-cycloSal-BVDUMP) 271

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 Variante II aus Kapitel 8.2.1.7 durchgeführt. Es wurden 121 mg (0.363 mmol) BVDU **15**, 170 mg noch verunreinigtes 3,5-Bis-*tert*-butyl-6-fluorsaligenylchlorphosphit **274** (gelöst in 1.4 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v), 0.13 mL (96 mg, 0.74 mmol) DIPEA, 0.22 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan (1.2 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) und 3 mL abs. DMF/THF 2 : 1 v/v eingesetzt.

Ausbeute: 96 mg (0.15 mmol, 41 %) einer farblosen Warte als Gemisch von 2 Diastereomeren im Verhältnis 0.8 : 1.0

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 1.34 (s, 3 x 9H, 3 x *t*-Bu-CH₃), 1.36 (s, 1 x 9H, 1 x *t*-Bu-CH₃), 2.16-2.27 (m, 2 x 2H, 2 x H2'), 3.95-4.01 (m, 2 x 1H, 2 x H4'), 4.24-4.32 (m, 2 x 1H, 2 x H3'), 4.32-4.50 (m, 2 x 2H, 2 x H5'), 5.41-5.60 (m, 2 x 3H, 2 x Benzyl-H, 2 x OH), 6.18 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.20 (dd, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1 x H1'), 6.87 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H7), 6.90 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H7), 7.26 (d, 2 x 1H, $^4J_{\text{HF}} = 9.0$ Hz, 2 x Aryl-H4), 7.29 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.31 (d, 1 x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, 1 x BVU-H8), 7.83 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 7.84 (s, 1 x 1H, 1 x BVU-H6), 11.63 (s, 2 x 1H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 29.65 (1 x 3-*t*-Bu-CH₃), 29.67 (1 x 3-*t*-Bu-CH₃), 29.80 (d, $^4J_{\text{CF}} = 2.0$ Hz, 2 x 5-*t*-Bu-CH₃), 34.07 (1 x 3-*t*-Bu-C), 34.09 (1 x 3-*t*-Bu-C), 34.48 (d, $^3J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 2 x 5-*t*-Bu-C), 39.95 (2 x C2'), 63.78-64.04 (m, 2 x Benzyl-C), 68.25 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C5'), 68.45 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C5'), 69.75 (1 x C3'), 69.84 (1 x C3'), 84.57 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C4'), 84.68 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, 1 x C4'), 84.90 (2 x C1'), 107.06 (1 x BVU-C8), 107.11 (1 x BVU-C8), 110.28 (1 x BVU-C5), 110.30 (1 x BVU-C5), 111.45 (d, $^2J_{\text{CF}} = 19.4$ Hz, 2 x Aryl-C1), 124.94 (d, $^3J_{\text{CF}} = 4.1$ Hz, 1 x Aryl-C4), 124.98 (d, $^3J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C4), 129.88 (2 x BVU-C7), 131.31 (d, $^2J_{\text{CF}} = 8.1$ Hz, 1 x Aryl-C5), 131.37 (d, $^2J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, 1 x Aryl-C5), 133.34-133.43 (m, 2 x Aryl-C3), 139.42 (1 x BVU-C6), 139.47 (1 x BVU-C6), 147.01 (2 x Aryl-C2), 149.34 (1 x BVU-C2), 149.37 (1 x BVU-C2), 154.93 (d, $^1J_{\text{CF}} = 248.2$ Hz, 2 x Aryl-C6), 161.75 (2 x BVU-C4); $^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (471 MHz, DMSO- d_6): -117.26, -117.31; $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.92, -9.25; MS (FAB-HR): ber.: 631.1220 (M+H⁺), gef.: 631.1248 (M+H⁺); UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 250, 291; DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9 : 1 v/v): 0.76; HPLC: t_R = 22.1 min. (Methode I)

8.3 Hydrolysestudien an den *cycloSal*-Nucleotiden

8.3.1 Chemische Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer bei pH 7.3

Es wurde eine 50 mM Stammlösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids in DMSO angesetzt. Von dieser Stammlösung wurden 11.4 μL mit 288.6 μL eines

DMSO/Wasser-Gemisches (Verhältnis 1 : 2 v/v für eher hydrophile Verbindungen, 2 : 1 v/v für eher lipophile Verbindungen, reines DMSO für stark lipophile Verbindungen) verdünnt, um so die 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösung zu bilden. Diese wurde mit 5 µL des internen Standards (AZT-Lösung) versetzt und die Hydrolyse anschließend durch Zugabe von 300 µL des zuvor auf 37°C temperierten 50 mM Phosphatpuffers (pH 7.3) sowie Durchmischen (Vortex) gestartet. Die finalen Konzentrationen betragen somit 0.94 mM (*cycloSal*-Nucleotid) und 24.8 mM (Puffersalze). Sofort nach Zugabe der Pufferlösung wurde ein erstes Aliquot (60 µL) entnommen, auf 2-3 Tropfen konzentrierte Essigsäure pipettiert und bei -196°C (flüssiger Stickstoff) eingefroren. Anschließend wurde die Kinetiklösung bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Mit den entnommenen Proben (jeweils 60 µL) wurde analog zu der Nullprobe verfahren. Die einzelnen Proben wurden HPLC-analytisch untersucht (Methode I), wobei jeweils 40 µL bzw. 13 µL im Falle stark absorbierender Verbindungen injiziert wurden. Für jedes *cycloSal*-Nucleotid wurden zwei Bestimmungen durchgeführt. Bei potentiell säurelabilen *cycloSal*-Nucleotiden wurden die einzelnen Proben nicht auf Essigsäure pipettiert, sondern direkt bei -196°C eingefroren und erst direkt zu der HPLC-analytischen Untersuchung wieder aufgetaut.

Zur Auswertung der Kinetiken wurde für jede Probe der Quotient aus den Peakflächen des Prodrugs und des internen Standards gebildet (= normierte Integrationseinheit; normierte IE) und gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) graphisch aufgetragen. Durch die experimentell bestimmten Meßpunkte wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes exponentielle Ausgleichskurven gelegt, so daß sich Werte für die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten *k* der Hydrolyse ergaben. Aus den so erhaltenen Werten für *k* konnten gemäß der Formel

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

die Hydrolyse-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet werden, die dann gemittelt wurden.

50 mM Phosphatpuffer (pH 7.3, nach Sørensen)

Es wurden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat mit Wasser auf 100 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde

kontrolliert und gegebenenfalls mit verdünnter Phosphorsäure und 1 M Natronlauge eingestellt.

Interner Standard (AZT-Lösung)

Es wurden 5 mg AZT 1 mit 500 μL Wasser versetzt.

8.3.2 Hydrolysekinetiken in humanem Zellextrakt

Durch Verdünnen von 15 μL der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 235 μL DMSO wurde eine 3.0 mM DMSO-Lösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids angesetzt. Für die Hydrolyselösungen wurden 100 μL Zellextrakt (CEM/0-Zellextrakte, pH 6.8, für d4T-Derivate) mit 20 μL einer 70 mM Magnesiumchlorid-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde durch anschließende Zugabe von 20 μL der 3.0 mM DMSO-Lösung und Durchmischen (Vortex) gestartet. Es wurden separate Kinetiklösungen für Proben mit verschiedenen Reaktionszeiten angesetzt, die jeweils bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert wurden. Die Wahl der Reaktionszeiten erfolgte gemäß der zu erwartenden Stabilität des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids. Zum Stoppen der Hydrolyse wurde die jeweilige Kinetiklösung mit 300 μL essigsäurem Methanol (20 mL Methanol plus 1 mL konzentrierte Essigsäure, reiner Methanol bei potentiell säurelabilen *cycloSal*-Nucleotiden) versetzt, 5 min. bei 0°C aufbewahrt und anschließend 10 min. bei 13000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Einmal-Filter (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 μm) filtriert und HPLC-analytisch untersucht (Methode III, 90 μL Injektion).

Zur Auswertung wurden die Absolutflächen des jeweiligen Phosphatresters gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) graphisch aufgetragen. Die Ermittlung der mittleren Hydrolyse-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ erfolgte analog zu dem in Kapitel 8.3.1 für die chemischen Hydrolysekinetiken beschriebenen Verfahren. Die Zuordnung der Peaks zu den Hydrolyse-Produkten erfolgte auf Basis der Retentionszeiten der Reinsubstanzen.

8.3.3 Hydrolysekinetiken in humanem Blutserum

Die Durchführung erfolgte analog zu den Hydrolysekinetiken in humanem Zellextrakt (vergl. Kapitel 8.3.2), aber unter Verwendung einer 5 %-igen Lösung von humanem

Blutserum in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6.8) statt des humanen Zellextraktes. Zusätzlich zu der Nullprobe mit der Serum-Lösung wurde auch eine Nullprobe mit 100 μ L reinem Phosphatpuffer (pH 6.8) angesetzt, um zu untersuchen, ob es zu unspezifischer Proteinbindung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids kommt.

50 mM Phosphatpuffer (pH 6.8, nach Sørensen)

Es wurden 199 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 490 mg Kaliumdihydrogenphosphat mit Wasser auf 100 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit verdünnter Phosphorsäure und 1 M Natronlauge eingestellt.

8.3.4 Hydrolysekinetiken in Kulturmedium

Die Durchführung erfolgte analog zu den Hydrolysekinetiken in humanem Zellextrakt (vergl. Kapitel 8.3.2), aber unter Verwendung von Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10 % hitzedeaktiviertem fötalen Kälber-Serum (FCS)) statt des humanen Zellextraktes. Zusätzlich zu der Nullprobe und der 8 h-Probe mit dem Kulturmedium wurden auch entsprechende Proben mit 100 μ L reinem RPMI 1640 (ohne FCS) angesetzt, um die Rolle der im FCS enthaltenen Proteine bei der Hydrolyse des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids zu untersuchen.

8.3.5 pH-Stabilitätsuntersuchungen

Durch Verdünnen von 20 μ L der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 180 μ L DMSO wurde eine 5.0 mM DMSO-Lösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids angesetzt. Von dieser 5.0 mM Lösung wurden 10 μ L abgenommen, mit 20 μ L DMSO verdünnt und durchmischt (Vortex). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μ L eines Citrat-Salzsäure-Puffers (pH 2.0) gestartet und das resultierende Gemisch 30 min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Für den Nullwert wurde Wasser statt Puffer verwendet. Nach der Reaktion wurde die Probe bei -196°C (flüssiger Stickstoff) eingefroren. Für jede Substanz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden HPLC-analytisch untersucht (Methode III, 40 μ L Injektion). Die Absolutflächen des jeweiligen Phosphatriesters wurden bestimmt, gemittelt und mit den gemittelten Absolutflächen der Nullproben ins Verhältnis gesetzt.

Citrat-Salzsäure-Puffer (pH 2.0, nach Sørensen)

Es wurden 30.6 mL einer 0.1 M wässrigen Citronensäure-Lösung und 69.4 mL 0.1 M Salzsäure gemischt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 M Salzsäure und 1 M Natronlauge eingestellt.

8.3.6 ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien

Es wurden etwa 7 μmol des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids in ein Eppendorf-Cap eingewogen und mit 500 μL DMSO- d_6 sowie 500 μL eines 50 mM Imidazol-Salzsäure-Puffers (pH 7.3) versetzt. Für besonders lipophile Verbindungen wurden 750 μL DMSO- d_6 und 250 μL Puffer verwendet. Die Kinetiklösungen wurden in NMR-Röhrchen überführt und sofort ^{31}P -NMR-spektroskopisch (^1H -entkoppelt, 202 MHz, 512 Scans) vermessen. Die NMR-Proben wurden bei 25°C aufbewahrt (37°C für sehr hydrolysestabile Verbindungen) und in Abständen von Tagen oder Wochen erneut ^{31}P -NMR-spektroskopisch (^1H -entkoppelt, 202 MHz, 512 Scans) untersucht.

8.4 Cholinesterase-Assay

8.4.1 Allgemeines

Humanes Blutserum wurde sofort nach Erhalt aliquotiert (je 250 μL) und bei -80°C eingefroren. Es wurden nur die gerade benötigten Mengen frisch aufgetaut.

Die folgenden Enzyme wurden von der Fa. Sigma bezogen:

- gereingte humane BChE, Charge Sigma C-9971, 25 Units
Durch Zugabe von 1.00 mL Wasser und anschließendes Verdünnen wurde eine gebrauchsfertige Lösung von 4 Units/mL angesetzt, die aliquotiert (je 250 μL) und bei -80°C eingefroren wurde. Es wurden nur die gerade benötigten Mengen frisch aufgetaut.
- gereingte AChE aus *electrophorus electricus*, 0.5 mg, mindestens 60 % Protein, 1170 Units/mg Feststoff, 830 Units/mg Protein, also ca. 585 Units
Durch Zugabe von 5.85 mL Wasser wurde eine Stammlösung von 100 Units/mL angesetzt, die aliquotiert (je 100 μL) und bei -80°C eingefroren wurde. Es wurden nur die gerade benötigten Mengen frisch aufgetaut.

- gereinigte humane AChE, Charge Sigma C-1682, 170 µg Protein, 2390 Units/mg Protein, also ca. 406 Units

Durch Zugabe von 4.06 mL Wasser wurde eine Stammlösung von 100 Units/mL angesetzt, die aliquotiert (je 100 µL) und bei -80°C eingefroren wurde. Es wurden nur die gerade benötigten Mengen frisch aufgetaut.

Die folgenden Lösungen wurden gebrauchsfertig von der Fa. Sigma bezogen:

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

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

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

Für die verwendeten Lösungen der jeweiligen *cycloSal*-Nucleotide in DMSO wurden 10 µL der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 190 µL DMSO verdünnt, um so eine 2.5 mM DMSO-Lösung zu erhalten. Alle weiteren Lösungen wurden durch entsprechendes Verdünnen der 2.5 mM DMSO-Lösung erhalten.

8.4.2 Assay nach Balzarini

Es wurden 40 µL Natriumchlorid-Lösung, 370 µL *m*-Nitrophenol-Lösung, 40 µL Acetylcholinchlorid-Lösung, 20 µL einer Lösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids in DMSO sowie 430 µL Wasser in eine Quarzküvette pipettiert. Die Konzentrationen der Prodrug-Lösungen betragen 5 µM, 25 µM, 50 µM, 250 µM, 500 µM, 1.5 mM und 2.5 mM, um so finale Inhibitor-Konzentrationen von 0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 30 µM und 50 µM in der Gesamtmischung einzustellen. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 µL der Cholinesterase-Quelle und Durchmischen gestartet. Die Küvetten wurden sofort in das zuvor auf 25°C temperierte UV-Spektrometer gestellt und die Extinktion bei 420 nm

(Zweistrahlmodus, gegen Wasser als Referenz) in Abständen von 1 min. über einen Zeitraum von maximal 17 min. gemessen. Ein Reaktionsansatz mit reinem DMSO lieferte als Referenzwerte eine Abnahme der Extinktion von etwa 0.16 nach 5 min. und von etwa 0.32 nach 15 min. Reaktionszeit.

Stellte die getestete Substanz einen Cholinesterase-Inhibitor dar, so wurde zur Auswertung die Abnahme der Extinktion bei der jeweiligen Inhibitor-Konzentration nach 5 bzw. 15 min. ermittelt. Diese Werte wurden graphisch gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Die so erhaltenen empirischen Kurven zeigten einen pseudolinearen Bereich, in dem mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes eine lineare Regression erfolgte. Aus der so erhaltenen Regressionsgeraden ließ sich der entsprechende IC_{50} -Wert, repräsentiert durch eine Extinktionsabnahme von etwa 0.08 nach 5 min. bzw. etwa 0.16 nach 15 min., ablesen bzw. berechnen.

mit humanem Blutserum

Humanes Blutserum wurde als Quelle für BChE-Aktivität verwendet.

mit gereinigter humaner BChE

Die gebrauchsfertige BChE-Lösung (4 Units/mL) wurde als Quelle für BChE-Aktivität verwendet.

*mit gereinigter AChE aus *electrophorus electricus**

Ein Aliquot der Stammlösung wurde aufgetaut und mit 900 μ L Wasser auf eine Konzentration von 10 Units/mL verdünnt. Die so erhaltene gebrauchsfertige Lösung wurde als Quelle für AChE-Aktivität verwendet. Sie wurde für die Dauer der Tests bei 0°C gelagert, um eine Denaturierung des empfindlichen Enzyms zu vermeiden. Für jede so erhaltene AChE-Charge wurde ein neuer Nullwert bestimmt.

mit gereinigter humaner AChE

Die Durchführung erfolgte analog zu den Tests mit gereinigter AChE aus *electrophorus electricus*.

8.4.3 Assay nach Rappaport et al.

Aufstellen der Kalibrationskurve

Es wurden 2.0 mL humanes Blutserum und 2.0 mL Natriumchlorid-Lösung vermischt und für 10 min. bei 60°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert, um das Enzym zu denaturieren. Anschließend wurden 7 Proben nach dem in der Tabelle 18 wiedergegebenen Pipettierschema angesetzt. Dort sind auch die „Cholinesterase-Aktivitäten“ der Proben in RU/mL angegeben, die sie aufgrund der Zugabe von Essigsäure formal besaßen.

Probe Nr.	<i>m</i> -Nitro-phenol-Lsg. [mL]	inaktiviertes Serum [mL]	Wasser [mL]	Essigsäure-Lösung [mL]	„Aktivität“ [RU/mL]
1	2.0	0.4	3.2	0	0
2	2.0	0.4	3.0	0.2	20
3	2.0	0.4	2.8	0.4	40
4	2.0	0.4	2.6	0.6	60
5	2.0	0.4	2.4	0.8	80
6	2.0	0.4	2.2	1.0	100
7	2.0	0.4	2.0	1.2	120

Tab. 18 Pipettierschema für die Proben zur Aufstellung der Kalibrationskurve

Für jede Probe wurde im zuvor auf 25°C temperierten UV-Spektrometer die Extinktion bei 420 nm gemessen (Zweistrahlmodus, gegen Wasser als Referenz) und von der Extinktion der Probe 1 abgezogen. Die so erhaltenen ΔE -Werte wurden graphisch gegen die formale Cholinesterase-Aktivität der Proben in RU/mL aufgetragen und bildeten auf diese Weise die Kalibrationskurve für den Assay.

Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität des Serums

Es wurden 200 μ L des humanen Blutserums mit 10 μ L DMSO versetzt und für 30 min. bei 37°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert.

In zwei Eppendorf-Caps wurden je 40 μL Natriumchlorid-Lösung und mit DMSO präinkubiertes Blutserum pipettiert und durchmischt (Vortex). Ein Cap wurde 10 min. bei 60°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert und anschließend mit kaltem Wasser gekühlt (Blindwert). In beide Caps wurden 600 μL Wasser und 400 μL *m*-Nitrophenol-Lösung gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μL Acetylcholinchlorid-Lösung und anschließendes Durchmischen (Vortex) gestartet. Die Reaktionslösungen wurden in Quarzküvetten überführt und für exakt 30 min. im zuvor auf 25°C temperierten UV-Spektrometer inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen bei 420 nm bestimmt (Zweistrahlmodus, gegen Wasser als Referenz). Es wurden insgesamt je vier Bestimmungen durchgeführt.

Zur Auswertung wurde die Extinktion der Testlösung vom jeweiligen Blindwert abgezogen. Aus der Kalibrationskurve ließen sich die diesen ΔE -Werten entsprechenden Cholinesterase-Aktivitäten in RU/mL ablesen. Die Werte für die Aktivität wurden gemittelt und die empirische Standardabweichung bestimmt.

Durchführung der Tests mit den cycloSal-Nucleotiden

Es wurden 200 μL des humanen Blutserums mit 10 μL einer 20 μM Lösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids in DMSO versetzt und für 30 min. bei 37°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert.

In vier Eppendorf-Caps wurden je 40 μL Natriumchlorid-Lösung und präinkubiertes Blutserum pipettiert und durchmischt (Vortex). Ein Cap wurde 10 min. bei 60°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert und anschließend mit kaltem Wasser gekühlt (Blindwert). In alle Caps wurden 600 μL Wasser und 400 μL *m*-Nitrophenol-Lösung gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μL Acetylcholinchlorid-Lösung und anschließendes Durchmischen (Vortex) gestartet. Die Reaktionslösungen wurden in Quarzküvetten überführt und für exakt 30 min. im zuvor auf 25°C temperierten UV-Spektrometer inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen bei 420 nm bestimmt (Zweistrahlmodus, gegen Wasser als Referenz).

Zur Auswertung wurde die Extinktion der jeweiligen Testlösung vom Blindwert abgezogen. Aus der Kalibrationskurve ließen sich die diesen drei ΔE -Werten entsprechenden Cholinesterase-Aktivitäten in RU/mL ablesen. Die drei Werte für die Aktivität wurden gemittelt und die empirische Standardabweichung bestimmt.

Um die Werte aus verschiedenen Meßreihen vergleichen zu können, wurde die Enzym-Aktivität als die nach der Inkubation verbliebene Enzym-Aktivität, also

prozentual relativ zur Aktivität des reinen Serums, angegeben. Der Fehler dieser Größe ergab sich aus den empirischen Standardabweichungen der einzelnen Aktivitäten gemäß dem Fehlerfortpflanzungsgesetz.

9 Literaturverzeichnis

- [1] T. Baier; Gefahr aus dem Großstadt-Dschungel; *Süddeutsche Zeitung* Nr. 37 vom 15.2.2005.
- [2] <http://www.hiv.net/2010/drugs.htm>, **2004**, letzter Zugriff: 6.12.2004.
- [3] S. Modrow, D. Falke; Molekulare Virologie; *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg **1998**, 613.
- [4] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox; Prinzipien der Biochemie; 2. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg **1994**, 1004.
- [5] E. De Clercq; Towards Improved Anti-HIV Chemotherapy: Therapeutic Intervention with HIV Infections; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2491-2517.
- [6] D. O. White, F. J. Fenner; Medical Virology; 4th Edition, *Academic Press*, San Diego/London **1994**, 320-323.
- [7] S. Modrow, D. Falke; Molekulare Virologie; *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg/Berlin/Oxford **1997**, 442-443.
- [8] M. R. Harnden, R. L. Jarvest, M. R. Boyd, D. Sutton, R. A. Vere Hodge; Prodrugs of the Selective Antivirus Agent 9-[4-(Hydroxymethyl)but-1-yl]guanine (BRL 39123) with Improved Gastrointestinal Absorption Properties; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1738-1743.
- [9] R. A. Vere Hodge; Famciclovir and Penciclovir. The Mode of Action of Famciclovir Including Its Conversion to Penciclovir; *Antiviral Chem. Chemother.* **1993**, *4*, 67-84.
- [10] R. C. Blackley, A. S. Jones, R. T. Walker; Incorporation of 5-Substituted Uracil Derivatives into Nucleic Acids. III. Synthesis of 5-Substituted Uracils Derived from 5-Acetyluracil; *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2795-2797.
- [11] R. T. Walker, P. J. Barr, E. De Clercq, J. Descamps, A. S. Jones, P. Serafinowski; The Synthesis and Properties of Some Antiviral Nucleosides; *Nucleic Acids Res. Publ.* **1978**, *4*, 103-105.
- [12] J. D. Fissekis, F. Sweet; The Chemistry of Some 5-(2-Hydroxyalkyl)uracil Derivatives and a Synthesis of 5-Vinyluracil; *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1963-1970.
- [13] E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer, P. J. Barr, A. S. Jones, R. T. Walker; (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a Potent and Selective Anti-Herpes Agent; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 2947-2951.

- [14] E. De Clercq, J. Descamps, G. Verhelst, R. T. Walker, A. S. Jones, P. F. Torrence, D. Shugar; Comparative Efficacy of Antiherpes Drugs Against Different Strains of Herpes Simplex Virus; *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563-574.
- [15] S. Shigeta, T. Yokota, T. Iwabuchi, M. Baba, K. Konno, M. Ogata, E. De Clercq; Comparative Efficacy of Antiherpes Drugs Against Various Strains of Varicella-Zoster Virus; *J. Infect. Dis.* **1983**, *147*, 576-584.
- [16] C. A. Smith, B. Wigdahl, F. Rapp; Synergistic Antiviral Activity of Acyclovir and Interferon on Human Cytomegalovirus; *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 325-332.
- [17] E. De Clercq; Potential of Bromovinyldeoxyuridine in Anticancer Chemotherapy; *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 549-556.
- [18] <http://www.aerztezeitung.de/docs/2000/12/18/228a0403.asp?cat=>, **2004**, letzter Zugriff: 6.12.2004.
- [19] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq; Differential Patterns of Intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, Two Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Compounds; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.
- [20] S. Freeman, K. C. Ross; Prodrug design for phosphates and phosphonates; *Progress Med. Chem.* **1997**, *34*, 111-147.
- [21] a) D. Farquhar, D. N. Srivastava, N. J. Kattesch, P. P. Saunders; Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups; *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 324-325.
b) R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y.-F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland; Pivaloyloxymethyl Esters of Acyclic Nucleoside Phosphonates; *Int. Antiviral News* **1994**, *2*, 53-55.
- [22] J. K. Sastry, P. N. Nehete, S. Khan, B. J. Nowak, W. Plunkett, R. B. Arlinghaus, D. Farquhar; Membrane-Permeable Dideoxyuridine 5'-Monophosphate Analogue Inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection; *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 441-445.
- [23] A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Khan, D. Farquhar; Decomposition Pathways of the Mono-(Pivaloyloxymethyl) and Bis-(Pivaloyloxymethyl) Esters of Azidothymidine-5'-Monophosphate in Cell Extract and in Tissue-Culture Medium - An Application of the Online Isrp-Cleaning HPLC Technique; *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 91-98.

- [24] R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y.-F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland; Metabolism and in vitro Antiretroviral Activities of Bis(Pivaloyloxymethyl)-Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphates; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2247-2250.
- [25] D. Farquhar, R. Chen, S. Khan; 5'-[4-(Pivaloyloxy)-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl]-2'-deoxy-5-fluorouridine: A Membrane-Permeating Prodrug of 5-Fluoro-2'-deoxyuridic Acid (FdUMP); *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 488-495.
- [26] M. N. Arimilli, C. U. Kim, J. Dougherty, A. Mulato, R. Oliyai, J. P. Shaw, K. C. Kundy, N. Bischofberger; Synthesis, *in vitro* biological evaluation and oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) prodrugs; *Antiviral Chem. Chemother.* **1997**, *8*, 557-564.
- [27] A. Fridland, B. L. Robbins, R. V. Srinivas, M. Arimilli, C. Kim, N. Bischofberger; Antiretroviral Activity and Metabolism of bis(POC)PMPA, An Oral Bioavailable Prodrug of PMPA; *Antiviral Res.* **1997**, *34*, A49-27.
- [28] C. Perigaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Minireview: From the Pronucleotide Concept to the SATE Phosphate Protecting Groups; *Curr. Top. Med. Chem.* **1997**, *2*, 15-29.
- [29] I. Lefebvre, C. Perigaud, A. Pompon, A.-M. Aubertin, J.-L. Girardet, A. Kim, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Mononucleoside Phosphotriester Derivates with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-Protecting Groups: Intracellular Delivery of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3941-3950.
- [30] J.-L. Girardet, C. Perigaud, A.-M. Aubertin, G. Gosselin, A. Kim, J.-L. Imbach; Increase of the anti-HIV Activity of d4T in Human T-Cell Culture by the use of the SATE Pronucleotide Approach; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2981-2984.
- [31] C. Perigaud, A.-M. Aubertin, S. Benzaria, H. Pelicano, J.-L. Girardet, G. Maury, G. Gosselin, A. Kim, J.-L. Imbach; Equal Inhibition of the Replication of Human Immunodeficiency Virus in Human T-Cell Culture by ddA Bis(SATE)Phosphotriesters and 3'-Azido-2',3'-Dideoxythymidine; *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 11-14.
- [32] S. Peyrottes, D. Egron, I. Lefebvre, G. Gosselin, J.-L. Imbach, C. Perigaud; SATE pronucleotide approaches: an overview; *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.

- [33] N. Schlienger, C. Perigaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Synthesis and Studies of Mononucleoside Glucosyl Phosphotriester Derivatives; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7216-7221.
- [34] S. Peyrottes, G. Cousot, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, G. Gosselin, A.-M. Aubertin, C. Perigaud; S-Acyl-2-Thioethyl Aryl Phosphotriester Derivatives of AZT: Synthesis, Antiviral Activity, and Stability Study; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 782-793.
- [35] C. McGuigan, M.-J. Camarasa, H. Egberink, K. Hartmann, A. Karlsson, C. F. Perno, J. Balzarini; Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Nucleotide Prodrugs as Inhibitors of HIV Replication; *Int. Antiviral News* **1997**, *5*, 19-21.
- [36] C. McGuigan, D. Cahard, H. M. Sheeka, E. De Clercq; Aryl Phosphoramidate Derivatives of d4T Have Improved anti-HIV Efficiency in Tissue Culture and May Act by the Generation of a Novel Intracellular Metabolite; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1748-1753.
- [37] C. McGuigan, R. N. Pathirana, J. Balzarini, E. De Clercq; Intracellular Delivery of Bioactive AZT Nucleotides by Aryl Phosphate Derivates of AZT; *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048-1052.
- [38] J. Balzarini, O. M. Wedgewood, J. Kruining, H. Pelemans, R. Heijtkink, E. De Clercq, C. McGuigan; anti-HIV and anti-HBV Activity and Resistance Profile of 2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) and its Arylphosphoramidate Derivate; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225*, 363-369.
- [39] J. Balzarini, J. Kruining, O. M. Wedgewood, C. Pannecouque, S. Aquaro, C.-F. Perno, L. Naesens, M. Witvrouw, R. Heijtkink, E. De Clercq, C. McGuigan; Conversion of 2',3'-Dideoxyadenosine (ddA) and 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxyadenosine (d4A) to their Corresponding Aryloxyphosphoramidate Derivatives Markedly Potentiates their Activity Against Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus; *FEBS Letters* **1997**, *410*, 324-328.
- [40] C. McGuigan, O. M. Wedgewood, E. DeClercq, J. Balzarini; Phosphoramidate Derivates of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxyadenosine (d4A) Have Markedly Improved anti-HIV Potency and Selectivity; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2359-2362.

- [41] C. Ballatore, C. McGuigan; E. De Clercq, J. Balzarini; Synthesis and evaluation of novel amidate prodrugs of PMEA and PMPA; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1053-1056.
- [42] K. S. Gudmundsson, S. M. Daluge, L. C. Johnson, R. Jansen, R. Hazen, L. D. Condreay, C. McGuigan; Phosphoramidate protides of 2',3'-dideoxy-3'-fluoroadenosine and related nucleosides with potent activity against HIV and HBV; *Nucleosides Nucleotides* **2003**, *22*, 1953-61.
- [43] D. Cahard, C. McGuigan, J. Balzarini; Aryloxy phosphoramidate triesters as protides; *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 371-381.
- [44] G. J. Fries, H. Bundgaard; Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic α -acyloxyalkyl ester derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups; *Eur. J. Pharm. Sci.* **1996**, *4*, 49-59.
- [45] M. D. Erion, K. R. Reddy, S. H. Boyer, M. C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R. H. Lemus, B. G. Ugarkar, T. J. Colby, J. Schanzer, P. D. van Poelje; Design, Synthesis, and Characterization of a Series of Cytochrome P₄₅₀ 3A-Activated Prodrugs (HepDirect Prodrugs) Useful for Targeting Phosph(on)ate-Based Drugs to the Liver; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.
- [46] M. D. Erion, P. D. van Poelje, D. A. MacKenna, T. J. Colby, A. C. Montag, J. M. Fujitaki, D. L. Linemeyer, D. A. Bullough; Liver-Targeted Drug Delivery Using HepDirect Prodrugs; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 554-560.
- [47] J. E. Starrett Jr., D. R. Tortolani, M. J. M. Hitchcock, J. C. Martin, M. M. Mansuri; Synthesis and *in vitro* evaluation of a phosphonate prodrug: bis(pivaloyloxymethyl) 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine; *Antiviral Res.* **1992**, *19*, 267-273.
- [48] R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y.-F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland; Metabolism and *in vitro* Antiretroviral Activities of Bis(Pivaloyloxymethyl)-Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2247-2250.
- [49] L. Naesens, J. Balzarini, N. Bischofberger, E. De Clercq; Antiretroviral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis(pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-adenine; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 22-28.

- [50] N. Tanaji, K. Tanaji, N. Kabham, G. S. Markowitz, A. Bell, V. D. D'Agati; Adefovir nephrotoxicity: possible role of mitochondrial DNA depletion; *Human Pathol.* **2001**, 32, 734-740.
- [51] <http://www.gilead.com>, **2004**, letzter Zugriff: 6.12.2004.
- [52] M. N. Arimilli, C. U. Kim, J. Dougherty, A. Mulato, R. Oliyai, J. P. Shaw, K. C. Cundy, N. Bischofberger; Synthesis, *in vitro* biological evaluation and oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) prodrugs; *Antiviral Chem. Chemother.* **1997**, 8, 557-564.
- [53] B. L. Robbins, V. L. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, A. Fridland; Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9-*R*-(2-Phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 612-617.
- [54] S. N. Farrow, A. S. Jones, A. Kumar, R. T. Walker, J. Balzarini, E. De Clercq; Synthesis and Biological Properties of Novel Phosphotriesters: A New Approach to the Introduction of Biologically Active Nucleotides into Cells; *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1400-1406.
- [55] P. Herdewijn, R. Charubala, E. De Clercq, W. Pfeleiderer; Synthesis of 2'-5' Connected Oligonucleotides. Prodrugs for Antiviral and Antitumoral Nucleosides; *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 1739-1748.
- [56] S. A. Harris, C. McGuigan, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini; Synthesis and antiviral evaluation of phosphoramidate derivatives of (*E*)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine; *Antiviral Chem. Chemother.* **2001**, 12, 293-300.
- [57] C. Meier; 4*H*-[1.3.2]-Benzodioxaphosphorin-2-nucleosyl-2-oxide - A New Concept for Lipophilic, Potential Prodrugs of Biologically Active Nucleoside Monophosphates; *Angew. Chem.* **1996**, 108, 77-79.
- [58] C. Meier; Pro-Nucleotides - Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates; *Synlett* **1998**, 233-242.
- [59] C. Meier; *cycloSal*-Pronucleotides - Design of Chemical Trojan Horses; *Mini. Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 219-234.
- [60] C. Meier, L. W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq; 5',5'-Di-O-nucleosyl-O'-benzylphosphotriesters as Potential Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate; *Liebigs Ann.* **1995**, 2203-2208.

- [61] S. N. Farrow, A. S. Jones, A. Kumar, R. T. Walker, J. Balzarini, E. De Clercq; Synthesis and Biological Properties of Novel Phosphotriesters: A New Approach to the Introduction of Biologically Active Nucleotides into Cells; *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1400-1406.
- [62] C. Meier, J. Renze, C. Ducho, J. Balzarini; *CycloSal*-d4TMP Pronucleotides - Structural Variations, Mechanistic Insights and Antiviral Activity; *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1109-1119.
- [63] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T) - A New Pro-Nucleotide Approach; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99-104.
- [64] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; *CycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- [65] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; ADA-Bypass by Lipophilic *cycloSal*-ddAMP Pro-Nucleotides - A Second Example of the Efficiency of the *cycloSal*-Concept; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1577-1582.
- [66] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; *cycloSal*-Pro-Nucleotides (*cycloSal*-NMP) of 2',3'-dideoxyadenosine (ddA) and 2',3'-didehydroadenosine (d4A): Synthesis and antiviral evaluation of a highly efficient nucleotide delivery system; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1604-1614.
- [67] C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, E. De Clercq, J. Balzarini; *cycloSal*-Pro-Nucleotides of 2'-fluoro-*ara*- and 2'-fluoro-*ribo*-2',3'-dideoxyadenosine (F-*ara*- and F-*ribo*-ddA) as a strategy to bypass a metabolic blockade; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1615-1624.
- [68] C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, E. De Clercq, J. Balzarini; *cycloSal*-2'-*ara(ribo)*-Fluoro-2',3'-Dideoxyadenosine Monophosphates - an Effort to Solve the Structure-Activity Relationship of 2'-Fluoro-ddA; *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 907-912.
- [69] C. Meier, L. Habel, F. Haller, P. Wutzler; Chemistry and properties of *cycloSal*igenyl-nucleotides (*cycloSal*-NMP) of acyclic nucleoside analogues as potential anti-HSV agents; *Antiviral Res.* **1998**, *37*, A75.

- [70] A. Meerbach, R. Klöcking, C. Meier, P. Wutzler; Inhibitory effect of *cycloSaligenyl-nucleoside monophosphates (cycloSal-NMP)* of acyclic nucleoside analogues on HSV-1 and EBV; *Antiviral Res.* **1998**, *37*, A76.
- [71] C. Meier, L. Habel, F. Haller-Meier, A. Lomp, M. Herderich, R. Klöcking, A. Meerbach, P. Wutzler; Chemistry and anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Evaluation of *cycloSal-Nucleotides* of acyclic Nucleoside Analogues; *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 389-402.
- [72] A. Meerbach, R. Klöcking, C. Meier, A. Lomp, B. Helbig, P. Wutzler; Inhibitory effect of *cycloSaligenyl-nucleoside monophosphates* of acyclic nucleoside analogues on HSV-1 and EBV; *Antiviral Res.* **2000**, *45*, 69-77.
- [73] J. Balzarini, F. Haller-Meier, E. De Clercq, C. Meier; Antiviral activity of *cycloSaligenyl prodrugs* of acyclovir, carbovir and abacavir; *Antiviral Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 301-306.
- [74] A. Meerbach, P. Wutzler, A. Lomp, C. Meier; Synthesis, properties and anti-EBV activity of a new series of 3'-modified *cycloSal-BVDUMP* pronucleotides; *Antiviral Res.* **2000**, *46*, A82 150.
- [75] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler; *cycloSal-BVDUMP* Pronucleotides - from an Antivirally Inactive Nucleoside Analogue to a Potential anti-EBV Active Drug; *ChemBioChem* **2001**, *2*, 283-285.
- [76] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler; *CycloSal-BVDUMP* pronucleotides: how to convert an antiviral-inactive nucleoside analogue into a bioactive compound against EBV; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5157-5172.
- [77] J. Balzarini, L. Naesens, S. Aquaro, T. Knispel, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; Intracellular Metabolism of *CycloSaligenyl-3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate*, a Prodrug of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine (Zidovudine); *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 1354-1361.
- [78] J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; *CycloSaligenyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate*: Efficient Intracellular Delivery of d4TMP; *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 928-935.
- [79] J. Renze, M. Plath, C. Ducho, J. Balzarini, E. De Clercq, C. Meier; Benzyl-functionalized *cycloSal-d4T* monophosphates; *Nucleosides Nucleotides* **2001**, *20*, 931-934.

- [80] J. Renze, M. Plath, C. Ducho, J. Balzarini, E. De Clercq, C. Meier; Hydrolysis behaviour of Benzyl-functionalized *cycloSal*-d4TMPs; *Antiviral Res.* **2001**, *50*, A47.
- [81] C. Meier, J. T. Renze, J. Balzarini, E. De Clercq; D4TMP delivery from 7-substituted *cycloSal*-d4TMPs; *Nucleosides Nucleotides* **2003**, *22*, 825-827.
- [82] H. C. Müller; *Dissertation* **2003**, Universität Hamburg.
- [83] U. Görbig; *Diplomarbeit* **2004**, Universität Hamburg.
- [84] M. Lorey, C. Meier; A New Cyclic Phosphoramidate d4T Prodrug Approach: *cycloAmb*-d4T-Phosphoramidates; *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 947-948.
- [85] U. Muus, C. Kranz, T. Marquardt, C. Meier; *cycloSal*igenyl-mannose-1-monophosphates as a new strategy in CDG-Ia therapy: hydrolysis, mechanistic insights and biological activity; *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1228-1235.
- [86] C. Müller, C. Meier, J. Balzarini, E. De Clercq, J. Reinstein; Novel synthetic route towards cyclic and acyclic analogues of AZT Monophosphate (AZTMP); *Antiviral Res.* **2001**, *50*, A46.
- [87] H. C. Müller, C. Meier, J. Balzarini, J. Reinstein; Novel nucleotide analogues as potential substrates for TmpK - a key enzyme in the metabolism of AZT; *Nucleosides Nucleotides* **2003**, *22*, 821-823.
- [88] C. Ducho; *Diplomarbeit* **2001**, Universität Hamburg.
- [89] J. S. Amato, S. Karady, M. Sletzinger, L. M. Weinstock; A new preparation of chloromethyl methyl ether free of bis(chloromethyl) ether; *Synthesis* **1979**, 970-971.
- [90] J. R. Johnson, S. W. Tompkins; *n*-Butyl Borate; *Org. Synth.* **1933**, *13*, 106-107.
- [91] F. R. Bean, J. R. Johnson; Derivatives of Phenylboric Acid, Their Preparation and Action upon Bacteria. II. Hydroxyphenylboric Acids; *J. Amer. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 4415-4425.
- [92] M. M. Mansuri, J. E. Starrett Jr., I. Ghazzouli, M. J. M. Hitchcock, R. Z. Sterzycki, V. Brankovan, T. S. Lin, E. M. August, W. H. Prusoff, J.-P. Sommaridossi, J. C. Martin; 1-(2,3-Dideoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymine. A highly potent and selective anti-HIV agent; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 461-466.
- [93] M. Lorey; *Dissertation* **2000**, Universität Würzburg.

- [94] L. A. Agrofoglio, F. Girard, F. Fleury, S. Leonce; Synthesis of 5'-thioalkyl, sulfoxide and sulfone pyrimidine nucleosides; *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 599-600.
- [95] M. Ruppel; *Dissertation* **2003**, Universität Hamburg.
- [96] Y.-Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann; Simple Synthesis of 4-Thiothymidine, 4-Thiouridine and 6-Thiodeoxyguanosine; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2817-2820.
- [97] W. Nagata, K. Okada, T. Aoki; *ortho*-Specific α -Hydroxyalkylation of Phenols with Aldehydes. An Efficient Synthesis of Saligenol Derivatives; *Synthesis* **1979**, 365-368.
- [98] L. Gattermann, J. A. Koch; Eine Synthese aromatischer Aldehyde; *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 1622-1624.
- [99] A. Vilsmeier, A. Haack; Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer *p*-Alkylamino-benzaldehyde; *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 119-122.
- [100] H. Gross, A. Rieche, G. Matthey; Neue Verfahren zur Darstellung von Phenolaldehyden; *Chem. Ber.* **1962**, *96*, 308-313.
- [101] A. Rieche, H. Gross, E. Höft; Synthesen aromatischer Aldehyde mit Dichlormethylalkylethern, *Chem. Ber.* **1959**, *93*, 88-94.
- [102] G. Casiraghi, G. Casnati, G. Paglia, G. Sartori, G. Terenghi; Selective Reactions Between Phenols and Formaldehyd. A Novel Route to Salicylaldehyds; *J. Chem. Soc. Perkin I* **1980**, 1862-1865.
- [103] A. H. Bratt; The Fries Reaction; *Org. React.* **1942**, *1*, 342-369.
- [104] H. Wynberg; The Reimer-Tiemann Reaction; *Chem. Rev.* **1960**, *60*, 169-184.
- [105] T. Sala, M. V. Sargent; Depsidone Synthesis. Part 19. Some β -Orcinol Depsidones; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1981**, 877-882.
- [106] P. K. Choudhury, J. Almena, F. Foubelo, M. Yus; New Homologation of 2-Hydroxy and 2-Mercapto Benzylic Alcohols; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 17373-17382.
- [107] H. E. Katz, D. J. Cram; Host-Guest Complexation. 30. Quinquaryl and Bis(urea) Binders; *J. Amer. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4977-4987.
- [108] J. M. Shackelford; Ultraviolet Spectra of 1,2,3-Trisubstituted Aromatic Compounds; *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4908-4911.

- [109] M. Seki, T. Shimizu, K. Matsumoto; Stereoselective Synthesis of β -Benzyl- α -alkyl- β -amino Acids from L-Aspartic Acid; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1298-1304.
- [110] M. R. Caira, R. Hunter, L. R. Nassimbeni, A. T. Stevens; Resolution of albuterol acetonide; *Tetrahedron Assymetry* **1999**, *10*, 2175-2189.
- [111] C. Ducho, J. Balzarini, L. Naesens, E. De Clercq, C. Meier; Aryl-substituted and benzo-annulated *cycloSal*-derivatives of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphate - correlation of structure hydrolysis properties and anti-HIV activity; *Antiviral Chem. Chemother.* **2002**, *13*, 129-141.
- [112] H.-C. Zhang, W.-S. Huang, L. Pu; Biaryl-Based Macrocyclic and Polymeric Chiral (Salophen)Ni(II) Complexes: Synthesis and Spectroscopic Study; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 481-487.
- [113] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura; Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.
- [114] T. Ishiyama, Y. Itoh, T. Kitano, N. Miyaura; Synthesis of Arylboronates *via* the Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Tetra(alkoxy)diborons with Aryl Triflates; *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3447-3450.
- [115] A. Giroux, Y. Han, P. Prasit; One Pot Biaryl Synthesis *via in situ* Boronate Formation; *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3841-3844.
- [116] K.-T. Wong, Y.-Y. Chien, Y.-L. Liao, C.-C. Lin, M.-Y. Chou, M.-K. Leung; Efficient and Convenient Nonaqueous Workup Procedure for the Preparation of Arylboronic Esters; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1041-1044.
- [117] T. Bell, G. Lein, H. Nakamura, D. Cram; Host-Guest Complexation. 25. Effects on the Complexing Properties of Chorrands; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4728-4734.
- [118] K. Koenig, G. Lein, P. Stuckler, T. Kaneda, D. Cram; Host-Guest-Complexation. 16. Synthesis and Cation Binding Characteristics of Macrocyclic Polyethers Containing Convergent Methoxyaryl Groups; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3553-3566.
- [119] L. Anschütz, W. Marquardt; Phosphorigsäureester des 3,4-Dihydroxy-toluols und des 2,2'-Dihydroxy-biphenyls; *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 1119-1123.
- [120] C. Wolf, W. A. König, C. Roussel; Influence of Substituents on the Rotational Energy Barrier of Atropisomeric Biphenyls - Studies by Polarimetry and Dynamic Gas Chromatography; *Liebigs Ann.* **1995**, 781-786.

- [121] C. Wolf, D. H. Hochmuth, W. A. König, C. Roussel; Influence of Substituents on the Rotational Energy Barrier of Axially Chiral Biphenyls, II; *Liebigs Ann.* **1996**, 357-363.
- [122] F. Mugnier, C. Meier; Phosphoramidite Chemistry for the Synthesis of *cycloSal*-Pro-Nucleotides; *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 941-942.
- [123] E. E. Nifantiev, S. B. Khrebtova, Y. V. Kulikova, D. A. Predvoditelev, T. S. Kukhareva, P. V. Petrovskii, M. Rose, C. Meier; Formation of Benzooxaphosphole Oxide Heterocyclic System by the Ring-Contractive Arbuzov-Michaelis Isomerization of Alkoxy-Substituted Benzodioxaphosphorins; *Phosphorus Sulfur Silicon* **2002**, *177*, 251-259.
- [124] M. Sefkow, H. Kaatz; Selective Protection of Either the Phenol or the Hydroxy Group in Hydroxyalkyl Phenols; *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 6561-6562.
- [125] J. Renze, *Dissertation* **2002**, Universität Hamburg.
- [126] C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinovic, J. Balzarini; Second Generation of *cycloSal*-Pro-Nucleotides with Esterase-Cleavable Sites: The „Lock-In“-Concept; *Nucleosides Nucleotides* **2004**, *23*, 89-115.
- [127] C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinovic, J. Balzarini; „Lock-in“-*cycloSal*-pronucleotides - a new generation of chemical Trojan horses?; *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 383-394.
- [128] W. v. Daehne, E. Frederiksen, E. Gundersen, F. Lund, P. Morch, H. J. Petersen, K. Roholt, L. Tybring, W. O. Godfredsen; Acyloxymethyl Esters of Ampicilin; *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 607-612.
- [129] D. Voet, J. G. Voet; Biochemistry; 2nd Edition, *John Wiley & Sons*, New York **1995**, 390-391, 1296-1300.
- [130] L. Stryer; Biochemie; 4. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg/Berlin/Oxford **1996**, 205-208, 314-315.
- [131] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, L. Varon, L. Toker, A. H. Futerman, I. Silman; Purification and Crystallization of a Dimeric Form of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica* Subsequent to Solubilization with Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C; *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 821-823.
- [132] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman; Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein; *Science* **1991**, *253*, 872-879.

- [133] C.-G. Zhan, F. Zheng, D. W. Landry; Fundamental Reaction Mechanism for Cocaine Hydrolysis in Human Butyrylcholinesterase; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2462-2474.
- [134] S. Loudwig, Y. Nicolet, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, S. Bon, F. Nachon, M. Goeldner; Photoreversible Inhibition of Cholinesterases: Catalytic Serine-Labeled Caged Butyrylcholinesterase; *ChemBioChem* **2003**, *4*, 762-767.
- [135] H. Johnson, R. A. Kenley, C. Rynard; QSAR for Cholinesterase Inhibition by Organophosphorus Esters and CNDO/2 Calculations for Organophosphorus Ester Hydrolysis; *Quant. Struct. Act. Relat.* **1985**, *4*, 172-180.
- [136] E. Elhanany, A. Ordentlich, O. Dgany, D. Kaplan, Y. Segall, R. Barak, B. Velan, A. Shafferman; Resolving Pathways of Interaction of Covalent Inhibitors with the Active Site of Acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS Analysis of Various Nerve Agent Phosphyl Adducts; *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 912-918.
- [137] X. Barril, M. Orozco, F. J. Luque; Towards Improved Acetylcholinesterase Inhibitors: A Structural and Computational Approach; *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 255-266.
- [138] A. Castro, A. Martinez; Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in Treatment of Alzheimer's Disease; *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 267-272.
- [139] L. Savini, A. Gaeta, C. Fattorusso, B. Catalanotti, G. Campiani, L. Chiasserini, C. Pellerano, E. Novellino, D. McKissic, A. Saxena; Specific Targeting of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Recognition Sites. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent Cholinesterase Inhibitors; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1-4.
- [140] D. M. Wong, H. M. Greenblatt, H. Dvir, P. R. Carlier, Y.-F. Han, Y.-P. Pang, I. Silman, J. L. Sussman; Acetylcholinesterase Complexed with Bivalent Ligands Related to Huperzine A: Experimental Evidence for Species-Dependent Protein-Ligand Complementarity; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 363-373.
- [141] A. Hirashama, I. Ishaaya, R. Ueno, Y. Ichiyama, S.-Y. Wu, M. Eto; Biological Activity of Optically Active Salithion and Salioxon; *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 175-178.

- [142] T. Shiotsuki, R. Takeya, M. Eto, T. Shono; Characteristics of Houseflies Selected by Fenitrothion and Diethyl Fenitrothion; *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2191-2196.
- [143] F. Rappaport, J. Fischl, N. Pinto; An Improved Method for the Estimation of Cholinesterase Activity in Serum; *Clin. Chim. Acta* **1959**, *4*, 227-230.
- [144] C. Pannecouque, F. Vandendriessche, J. Rozenski, G. Janssen, R. Busson, A. Van Aerschot, P. Claes, P. Herdewijn; Synthesis, Enzymatic Stability And Physicochemical Properties Of Oligonucleotides Containing A N-Cyano-guanidine Linkage; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7231-7246.
- [145] T. Wada, A. Mochizuki, Y. Sato, M. Sekine; Functionalization of Solid Supports with *N*-Unprotected Deoxyribonucleosides; *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 5593-5596.
- [146] T. Knispel; *Dissertation* **2001**, Universität Hamburg.
- [147] M. C. Carreno, J. L. G. Ruano, G. Sanz, M. A. Toledo, A. Urbano; *N*-Bromo-succinimide as a Regioselective Nuclear Monobrominating Reagent for Phenols and Naphthols; *Synlett* **1997**, 1241-1242.
- [148] M. A. Zhuravel, S. T. Nguyen; Preparation of 3-aryl-substituted salicylaldehydes via Suzuki coupling; *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 7925-7928.
- [149] B. Rickborn, D. May, A. Thelen; Highly Substituted Aromatics. The Synthesis and Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of 2,4,6-Tri-*t*-butyl-3-fluorophenol; *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 91-93.
- [150] H. Jessen; *Diplomarbeit* **2005**, Universität Hamburg.

Anhang

Anhang I: Vergleichende Übersicht über *cycloSal*-Nucleotide, die im BChE-Assay (humanes Serum) nach dem Rappaport- und nach dem Balzarini-Verfahren getestet wurden

Verbindung	Rappaport-Methode	Balzarini-Methode	
	verbliebene Enzym-Aktivität [%]	IC ₅₀ [µM] (5')	IC ₅₀ [µM] (15')
3-Ph- <i>cycloSal</i> -d4TMP 89	5 ± 0	0.35	0.18
5-Ph- <i>cycloSal</i> -d4TMP 90	6 ± 3	4.4	2.9
5-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 131	48 ± 2	4.6	2.9
3-(HOOC-Et)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 138	66 ± 4	> 50	34
5-(HOOC-Et)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 142	100 ± 0	> 50	> 50
3-Me- <i>cycloSal</i> -dTMP 171	31 ± 5	36	23
3-Me- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 183	82 ± 4	> 50	36
3-Me- <i>cycloSal</i> -FdUMP 184	95 ± 5	> 50	> 50
3-Me- <i>cycloSal</i> -AZTMP 189	55 ± 3	40	21
3-Me- <i>cycloSal</i> -3'-O-Propionyl-BVDUMP 190	89 ± 6	> 50	> 50
3-Me- <i>cycloSal</i> -3'-O-(D-Ala)-BVDUMP 191	89 ± 5	> 50	> 50
3-Me- <i>cycloSal</i> -3'-O-(D-Phe)-BVDUMP 192	97 ± 3	> 50	> 50
3-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 196	5 ± 2	1.2	0.71
Benzo[a]- <i>cycloSal</i> -d4TMP 206	0 ± 0	0.25	0.084
Benzo[b]- <i>cycloSal</i> -d4TMP 207	3 ± 0	0.41	0.27
Benzo[c]- <i>cycloSal</i> -d4TMP 208	14 ± 2	3.9	2.6

Verbindung	Rappaport-Methode	Balzarini-Methode	
	verbliebene Enzym-Aktivität [%]	IC ₅₀ [µM] (5')	IC ₅₀ [µM] (15')
6-Cl- <i>cycloSal</i> -d4TMP 210	6 ± 3	0.57	0.13
6-Cl-7-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 211	18 ± 2	1.8	0.56
6-Cl-7-Bu- <i>cycloSal</i> -d4TMP 212	71 ± 8	13	5.1
6-Cl-7-ECM- <i>cycloSal</i> -d4TMP 213	62 ± 4	> 50	22
3-Me-7-ECM- <i>cycloSal</i> -d4TMP 214	98 ± 2	> 50	> 50
7-(CH ₂ Cl)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 215	14 ± 7	3.9	2.8
7-(CHCl ₂)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 216	68 ± 11	26	13
7-(CCl ₃)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 217	95 ± 5	27	17
3-Ph- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 232 mix	74 ± 4	13	6.2
3-Ph- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 232 fast	100 ± 0	> 50	> 50
3-Ph- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 232 slow	63 ± 3	3.7	2.8
Benzo[a]- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 233	8 ± 2	0.87	0.54

Anhang II: *cycloSal*-Nucleotide, die gegen AChE aus *electrophorus electricus* getestet wurden

3-Ph- <i>cycloSal</i> -d4TMP 89	3-Ph- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 232 mix
5-Ph- <i>cycloSal</i> -d4TMP 90	3-Ph- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 232 fast
5-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 131	3-Ph- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 232 slow
3-(Me-Pr)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 135	Benzo[a]- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 233
3-(Bn-Pr)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 137	
3-(HOOC-Et)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 138	
5-(Me-Pr)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 139	
5-(Bn-Pr)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 141	
5-(HOOC-Et)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 142	
3-Me- <i>cycloSal</i> -dTMP 171	
3-Me- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 183	
3-Me- <i>cycloSal</i> -FdUMP 184	
3-Me- <i>cycloSal</i> -AZTMP 189	
3-Me- <i>cycloSal</i> -3'-O-Propionyl-BVDUMP 190	
3-Me- <i>cycloSal</i> -3'-O-(D-Ala)-BVDUMP 191	
3-Me- <i>cycloSal</i> -3'-O-(D-Phe)-BVDUMP 192	
3-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 196	
Benzo[a]- <i>cycloSal</i> -d4TMP 206	
Benzo[b]- <i>cycloSal</i> -d4TMP 207	
Benzo[c]- <i>cycloSal</i> -d4TMP 208	
6-Cl- <i>cycloSal</i> -d4TMP 210	
6-Cl-7-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 211	
6-Cl-7-Bu- <i>cycloSal</i> -d4TMP 212	
6-Cl-7-ECM- <i>cycloSal</i> -d4TMP 213	
3-Me-7-ECM- <i>cycloSal</i> -d4TMP 214	
7-(CH ₂ Cl)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 215	
7-(CHCl ₂)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 216	
7-(CCl ₃)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 217	

Anhang III: *cycloSal*-Nucleotide, die gegen humane AChE getestet wurden

cycloSal-d4TMP **85**

3-Ph-*cycloSal*-d4TMP **89**

5-Ph-*cycloSal*-d4TMP **90**

3-(Bn-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **137**

5-(Bn-Pr)-*cycloSal*-d4TMP **141**

3-Me-*cycloSal*-ddAMP **179**

3-Me-*cycloSal*-BVDUMP **183**

3-Me-*cycloSal*-d4TMP **196**

3-Me-*cycloSal*-ACVMP **199**

3-Me-*cycloSal*-GCVMP **200 fast**

3-Me-*cycloSal*-GCVMP **200 slow**

Benzo[a]-*cycloSal*-d4TMP **206**

Benzo[b]-*cycloSal*-d4TMP **207**

Benzo[c]-*cycloSal*-d4TMP **208**

3-Ph-*cycloSal*-BVDUMP **232 fast**

3-Ph-*cycloSal*-BVDUMP **232 slow**

6-F-*cycloSal*-d4TMP

Gefahrstoffliste

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	Xi, F	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	Xn, F	11-20/21/22-36	16-36/37
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	9-16-26-45
Acetylcholinchlorid	Xi	36/37/38	26-36/37
Ammoniumchlorid	Xn, Xi	22-36	22
Ammoniumfluorid	T	23/24/25	26-45
Benzophenon	Xi, N	36/37/38-50/53	26-36-60-61
Biphenyl-2,2'-diol	Xi	36/37/38	26-36
Bis-(pinacolato)-dibor	nicht geprüft	nicht geprüft	nicht geprüft
Bortribromid 1 M in Dichlormethan	T+, C	14-26/28-35-40	9-23-26-28- 36/37/39-45
Brom	T+, C, N	26-35-50	26-45-61-7/9
Brombenzol	Xi, N	10-38-51/53	61
Brommethylacetat	Xi	36/37/38	26-36
2-Brom-4-methylanisol	Xi	36/37/38	26-36
2-Brom-4-methylphenol	Xi	36/37/38	26-37/39
<i>ortho</i> -Bromphenol	Xn, Xi	10-22-36/37/38	16-36/37/39
5-Bromsalicylaldehyd	Xi	36/37/38	26-36
<i>N</i> -Bromsuccinimid	C	22-34	26-36/37/39-45
<i>n</i> -Butanol	Xn, Xi	10-22-37/38-41- 67	13-26-37/39-46- 7/9
<i>tert</i> -Butanol	Xn, F	11-20	9-16
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	C, O	7-10-20/21/22- 34-65	14.1-26-3/7- 36/37/39-45-62

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
<i>n</i> -Butyllithium 1.6 M in Hexan	F, C, N	11-15-17-34-48/20-51/53-62-65-67	16-26-36/37/39-43.11-45-61-62
<i>ortho-tert</i> -Butylphenol	T	21/22-23-34	26-36/37/39-45
3- <i>tert</i> -Butylsalicylaldehyd	Xi	36/37/38	26-36
5- <i>tert</i> -Butylsalicylaldehyd	nicht geprüft	nicht geprüft	nicht geprüft
<i>iso</i> -Butyrylchlorid	F, C	11-35	16-23-26-36-45
Calciumchlorid	Xi	36	22-24
Calciumhydrid	F	15	24/25-43.12-7/8
Chlormethylpivalat	Xn, Xi	10-20/21/22-36/37/38	16-26-36
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Citronensäure	Xi	41	26-39
Cyclohexylbromid	-----	-----	23-24/25
2'-Desoxyadenosin	-----	-----	-----
2'-Desoxycytidin	-----	-----	-----
2'-Desoxyguanosin	-----	-----	22-24/25
2'-Desoxythymidin	-----	-----	22-24/25
Deuteriumoxid	-----	-----	-----
3,5-Dibromsalicylsäure	-----	-----	22-24/25
1,2-Dichlorethan	T, F	45-11-22.1-36/37/38	53.1-45
Dichlormethan	Xn	40	23-24/25-36/37
Diethylamin	F, C	11-20/21/22-35	16-26-29-36/37/39-45
Diethylether	Xn, F+	12-19-22-66-67	9-16-29-33

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Dinatriumhydrogenphosphat	-----	-----	-----
1,2-Dimethoxyethan	Xn	10-19-20	24/25
Dimethoxymethan	Xi, F	11-19-36	16-26-33-7/9
2,2-Dimethoxypropan	Xi, F	11-36-66	9-16-26
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Xn, F	1-11-22	35
DIPA	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
DIPEA	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-60
DMAP	T	25-27-36/37/38	26-28.2-36/37/39-45
DMF	T	61-20/21-36	53.1-45
DMF-dineopentylacetal	Xi	36/37/38	26-36
DMSO	-----	-----	-----
Dowex 50 X 8	Xi	36/37/38	26-36
Eisen(III)-acetylacetonat	Xn, Xi	22-36	26
Essigsäure	C	10-35	26-36/37/39-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	Xi, F	11-36-66-67	16-26-33
Ethylenglycol	Xn	22	-----
FdU	Xn	22	22-36
<i>m</i> -Fluorphenol	Xn	20/21/22	28.2-36/37
Formaldehyd 37 %	T	23/24/25-34-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
<i>para</i> -Formaldehyd	C	20/22-34-40-43	26-36/37/39-45

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
<i>n</i> -Hexan	Xn, F, N	11-38-48/20- 51/53-62-65-67	9-16-29-33- 36/37-61-62
2-Hydroxybiphenyl	Xi, N	36/37/38-50	22-61
3-(2-Hydroxyphenyl)- propionsäure	Xi	36/37/38	26-36
3-(4-Hydroxyphenyl)- propionsäure	Xi	36/37/38	26-36
Imidazol	C	22-34	26-36/37/39-45
Isobuten	F+	12	9-16-33
Kaliumacetat	-----	-----	-----
Kalium- <i>tert</i> -butanolat	F, C	11-14-35	16-26-36/37/39- 43.12-45-7/9
Kaliumcarbonat	Xn, Xi	22-36/37/38	26-36
Kaliumdihydrogenphosphat	-----	-----	-----
<i>o</i> -Kresol	T	24/25-34	36/37/39-45
Lithiumaluminiumhydrid	F	15	24/25-43.12-7/8
Magnesium	-----	-----	-----
Magnesiumchlorid	-----	-----	-----
Mesitylensäurechlorid	C	34	22-26-27- 36/37/39-45
Mesylchlorid	T	24/25-26-34-37	26-28.1- 36/37/39-45
Methanol	T, F	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
<i>N</i> -Methylpyrrolidin	F, C	11-22-34	16-26-36/37/39- 45
3-Methylsalicylsäure	Xn, Xi	22-37/38-41	26-36/39

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Natrium	F, C	14/15-34	8-43.12-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumhydrid 60 % in Öl	Xi, F	15-36	24/25-26-43.11-7/8
Natriumhydrogencarbonat	-----	-----	-----
Natriumiodid	Xi	36/38	26
Natriumsulfat	-----	-----	-----
Natronlauge 1 M	C	34	26-37/39-45
<i>m</i> -Nitrophenol	Xn, Xi	22-38-41	26-36/37
Palladium/Kohle 5 %	-----	-----	14.1-22
Pd(dppf)Cl ₂	nicht geprüft	nicht geprüft	nicht geprüft
<i>neo</i> -Pentylbromid	Xi, F	11-36/37/38	16-26-36
Petrolether 50/70	Xn, F+	12-65	9-16-29-33-62
Phenylboronsäure	Xn	22	22-24/25
Phosphor(III)-chlorid	T+, C	14-26/28-29-35-48/20	26-36/37/39-45-7/8
Phosphor(V)-oxid	C	35	22-26-45
Propionsäure	C	34	26-36/37/39-45
Pyridin	Xn, F	11-20/21/22	26/28
Pyridinhydrochlorid	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Quecksilber(II)-nitrat	T+, N	26/27/28-33-50/53	13-28-45-60-61
Raney-Nickel	Xn, F	17-40-43	15-22-36
Salicylsäure	Xn	22-41	26-39
Salzsäure 2 N	C	34-37	26-36/37/39-45

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Schwefelsäure konz.	C	35	26-30-45
TBAF 1 M in THF	F, C	11-19-34	16-26-36/37/39-45
TBAH 40 % in Wasser	C	34	26-36/37/39-45
TBDMS-Chlorid	F, C	11-35-37	16-26-36/37/39-45
TBDPS-Chlorid	C	14-34-37	26-36/37/39-45
Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0)	-----	-----	22-24/25
THF	Xi, F	11-19-36/37	16-29-33
Thioessigsäure	F, C	11-34	9-16-26-36/37/39-45
TMS-Chlorid	F, C	11-14-20/21-35-37	16-26-36/37/39-45
Toluol	Xn, F	11-20	16-25-29-33
<i>para</i> -Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	26-36/37/39-45
Trimethylborat	Xn	10-21	23-23.2
Wasserstoff	F+	12	9-16-33
Wasserstoffperoxid 30 %	C	34	28.1-36/39-45

Lebenslauf

Christian Ducho

geboren am 14. September 1976 in Hamburg, Deutschland

ledig, keine Kinder

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschule Turmweg, Hamburg
1987 - 1996 Sophie-Barat-Schule, Hamburg (staatlich anerkanntes katholisches Gymnasium)
06/1996 Abitur

Studium

10/1996 - 09/1998 Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg
09/1998 Vordiplom in Chemie
10/1998 - 09/2001 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg
03/2001-09/2001 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg. Titel: "Aryl-substituierte und Benzo-anellierte *cycloSal*-Nucleotide"
09/2001 Diplom in Chemie
seit 11/2001 Doktorand in Organischer Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier an der Universität Hamburg
06/2002-12/2004 Assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 464 „Glycokonjugate“

Lehrerfahrung

1999 - 2001 Verschiedene Lehrtätigkeiten am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg: Tutorium in Anorganischer Chemie für Studierende der Biologie, Assistent im Chemischen Praktikum für Studierende der Medizin (Anorganische und Organische Chemie), Übungen in Mathematik für Studierende der Chemie
04/2004-09/2004 Assistent im Grundpraktikum in Organischer Chemie für Studierende der Chemie

seit 10/2004 Assistent im Fortgeschrittenenpraktikum in Organischer Chemie sowie im Integrierten Synthesepraktikum in Anorganischer und Organischer Chemie (für Studierende der Chemie im Hauptstudium)

Stipendien und Auszeichnungen

11/1996 - 09/2001 Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes
4/2002 - 03/2004 Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie
12/2002 Auszeichnung für die beste Diplomarbeit des Studienjahres 2001/2002 in Chemie an der Universität Hamburg
03/2003 Auszeichnung mit zwei Preisen bei der "Euregionale" in Dresden: Erster Preis für den Vortrag und dritter Preis für die Poster-Präsentation im Bereich "life sciences"
04/2004 Strem Chemicals Award for outstanding oral presentation auf der Northeastern Student Chemistry Research Conference (NSCRC) in Boston/MA, USA
04/2004 Aventis [i]lab award (Reisestipendium für die Teilnahme an einer Konferenz in Minneapolis/MN, USA)

Berufstätigkeit

seit 05/2005 Befristetes Praktikum in der Firma Sanofi-Aventis, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Arbeitsbereich Parallelsynthese

Sonstiges

04/2001-03/2004 Regionalgruppensprecher der Jungchemikerforums (JCF) Hamburg

Publikationsliste

1. C. Ducho, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier; Novel *cycloSal* Nucleotides with Reduced Inhibitory Potency towards Human Butyrylcholinesterase; *Nucleosides Nucleotides* **2005**, zur Veröffentlichung angenommen.
2. C. Meier, C. Ducho, U. Görbig, R. Esnouf, J. Balzarini; Interaction of *cycloSal*-Pronucleotides with Cholinesterases from Different Origins. A Structure-Activity Relationship; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2839-2852.
3. C. Ducho, S. Wendicke, U. Görbig, J. Balzarini, C. Meier; 3,5-Di-(*tert*-butyl)-6-fluoro-*cycloSal*-d4TMP - a pronucleotide with a considerably improved masking group; *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4786-4791.
4. C. Ducho, J. Balzarini, C. Meier; Non-inhibition of Acetylcholinesterase by *cycloSal* Nucleotides; *Nucleosides Nucleotides* **2003**, *22*, 841-843.
5. C. Ducho, J. Balzarini, C. Meier; Interaction of Cholinesterases with *cycloSal* Nucleotides; *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 51 A54.
6. C. Ducho, J. Balzarini, L. Naesens, E. De Clercq, C. Meier; Aryl-substituted and Benzo-annulated *cycloSal*-derivatives of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate – Correlation of Structure, Hydrolysis Properties and Anti-HIV Activity; *Antiviral Chem. Chemother.* **2002**, *13*, 129-141.
7. C. Meier, J. Renze, C. Ducho, J. Balzarini; *cycloSal*-d4TMP Pronucleotides - Structural Variations, Mechanistic Insights and Antiviral Activity; *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1111-1121.
8. J. Renze, M. Plath, C. Ducho, J. Balzarini, E. De Clercq, C. Meier; Hydrolysis Behaviour of Benzyl-functionalized *cycloSal*-d4TMPs; *Antiviral Res.* **2001**, *50*, A47.
9. J. Renze, M. Plath, C. Ducho, J. Balzarini, E. De Clercq, C. Meier; Benzyl-functionalized *cycloSal*-d4T Monophosphates; *Nucleosides Nucleotides* **2001**, *20*, 931-934.

Eidesstattliche Erklärung

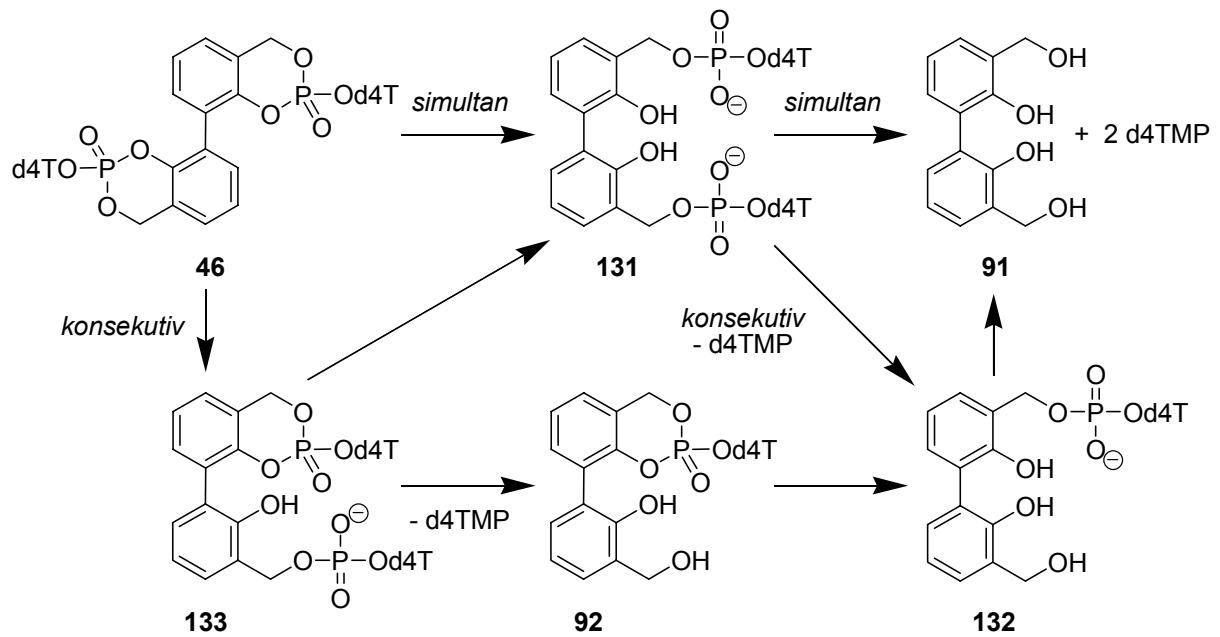
Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation „*cycloSal*-Nucleotide - Ansätze zur Optimierung eines Wirkstoffsystems“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

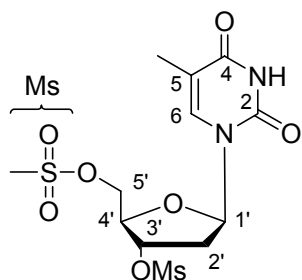
Christian Ducho

Hamburg, den 10.6.2005

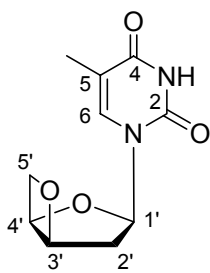
Hydrolyse von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) 46

Detaillierte Darstellung der möglichen Hydrolysewege von Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **46**
(Abbildung 103)

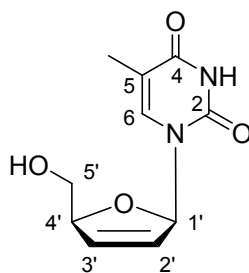
Verbindungsliste



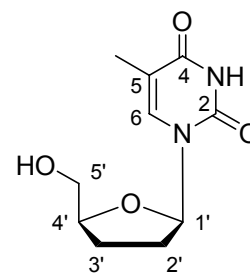
55



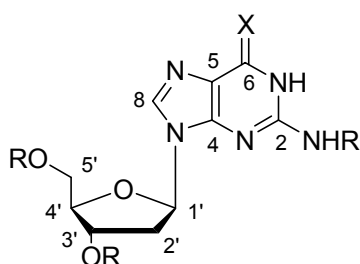
56



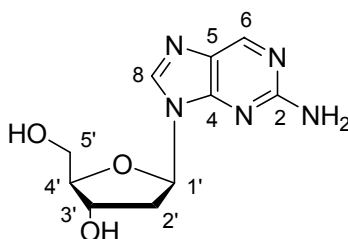
4



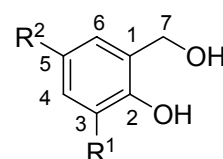
57



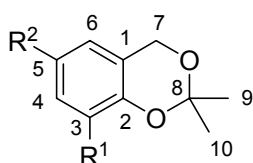
R = *i*-Bu, X = O **59**
 R = *i*-Bu, X = S **60**
 R = H, X = S **61**



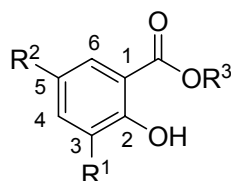
58



R¹ = Br, R² = H **70**
 R¹ = H, R² = Br **73**
 R¹ = R² = Br **74**
 R¹ = Br, R² = Me **114**
 R¹ = Ph (1'-6'), R² = H **121**
 R¹ = Me, R² = H **175**
 R¹ = Me, R² = Br **222**
 R¹ = R² = Ph **238**
 (1'-6' und 1''-6'')
 R¹ = *t*-Bu, R² = H **245**
 R¹ = H, R² = *t*-Bu **246**

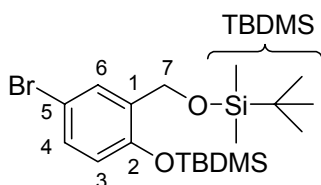


R¹ = Br, R² = H **65**
 R¹ = H, R² = Br **66**
 R¹ = R² = Br **67**
 R¹ = Butyl, R² = H **103**
 R¹ = D, R² = H **104**
 R¹ = B(OH)₂, R² = H **108**
 R¹ = R² = Ph **237**

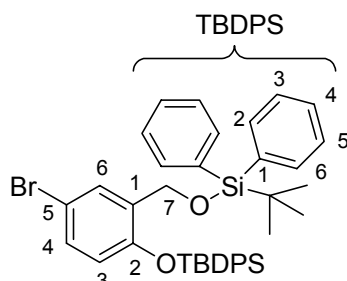


R¹ = Br, R² = R³ = H **72**
 R¹ = R² = Br, R³ = Me **75**
 R¹ = Me, R² = Br, R³ = H **224**
 R¹ = Me, R² = H, R³ = Me **225**
 R¹ = Me, R² = Br, R³ = Me **226**
 R¹ = R² = Ph, R³ = Me **240**

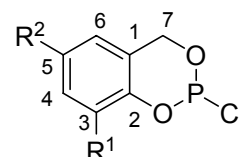
(1'-6' und 1''-6'')
 R¹ = *neo*-Pentyl, R² = H **262**
 R¹ = Cy (1'-6'), R² = H **263**



68

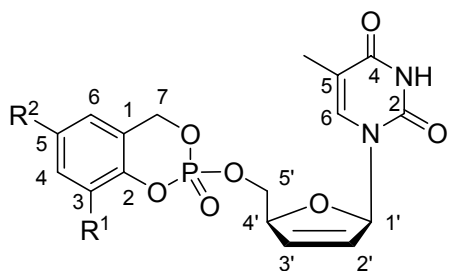


69

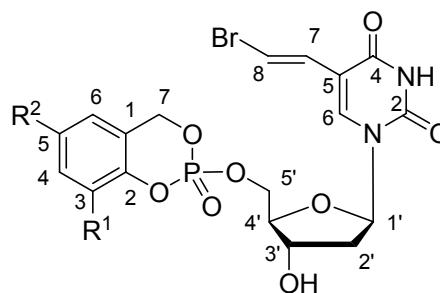


R¹ = Br, R² = H **76**
 R¹ = H, R² = Br **77**
 R¹ = R² = Br **78**
 R¹ = Ph (1'-6'), R² = H **119**
 R¹ = Me, R² = H **174**
 R¹ = Me, R² = Br **227**
 R¹ = R² = Ph **239**
 (1'-6' und 1''-6'')
 R¹ = *t*-Bu, R² = H **248**
 R¹ = H, R² = *t*-Bu **249**
 R¹ = R² = *t*-Bu **253**
 R¹ = *neo*-Pentyl, R² = H **268**
 R¹ = Cy (1'-6'), R² = H **269**

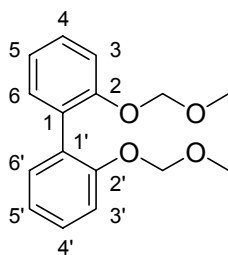
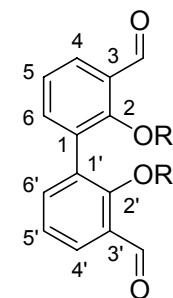
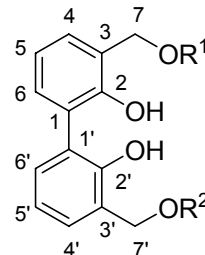
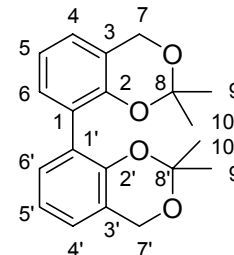
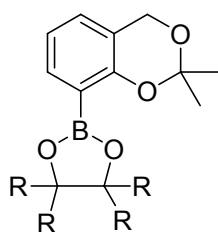
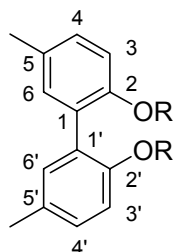
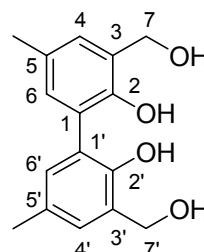
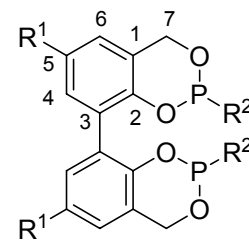
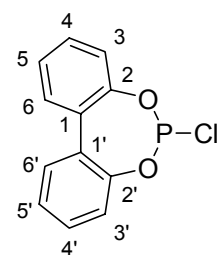
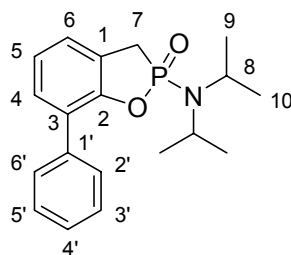
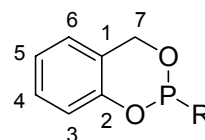
Verbindungsliste (Fortsetzung)

R¹ = Br, R² = H **79**R¹ = H, R² = Br **80**R¹ = R² = Br **81**R¹ = R² = H **85**R¹ = Me, R² = Br **220**R¹ = R² = Ph **235**

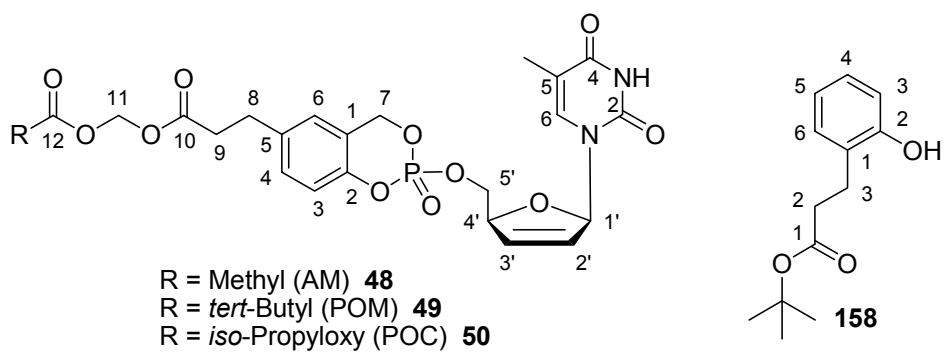
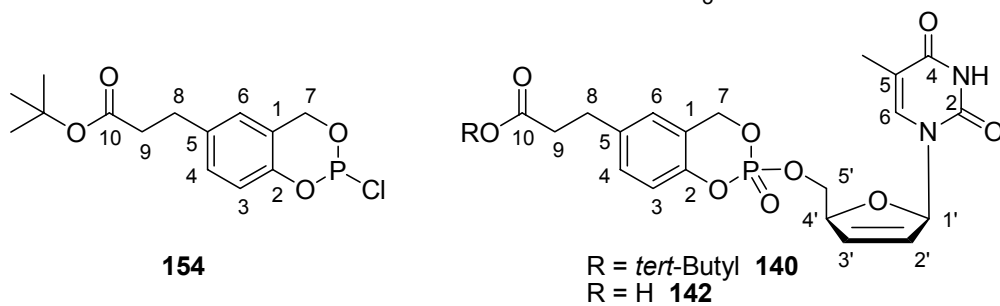
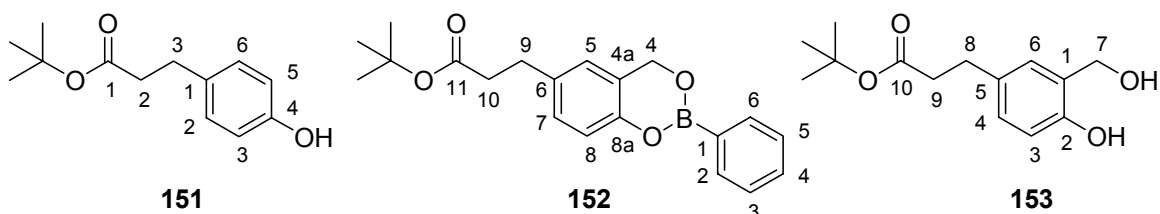
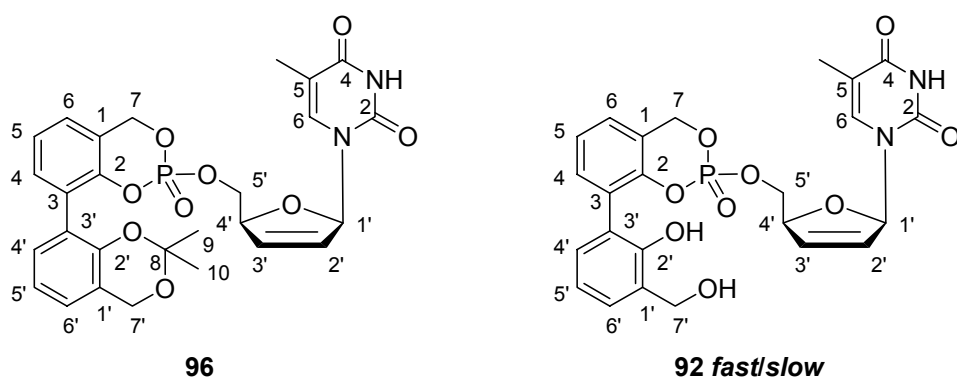
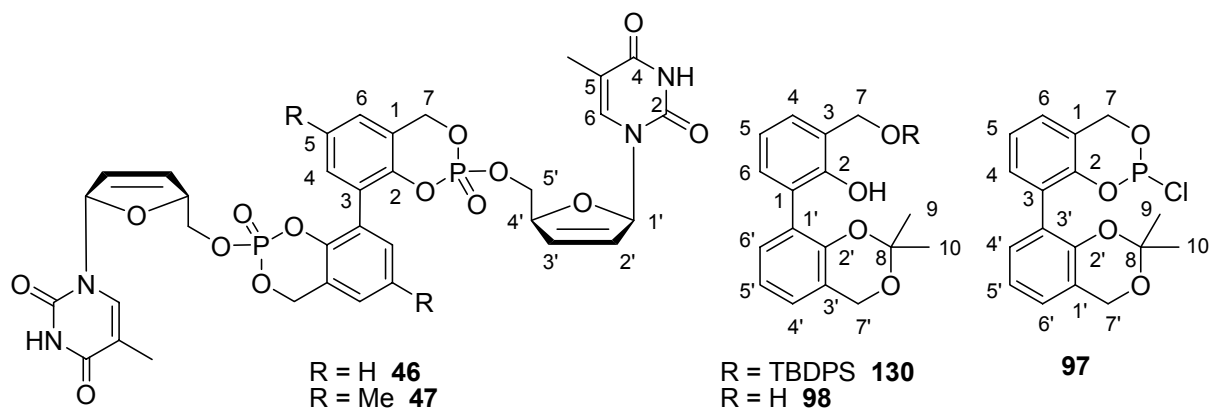
(1'-6' und 1''-6'')

R¹ = *t*-Bu, R² = H **242**R¹ = H, R² = *t*-Bu **243**R¹ = R² = *t*-Bu **250**R¹ = *neo*-Pentyl,R² = H **260**R¹ = Cy (1'-6'),R² = H **261**R¹ = Br, R² = H **82**R¹ = H, R² = Br **83**R¹ = R² = Br **84**R¹ = Me, R² = Br **221**R¹ = R² = Ph **236**

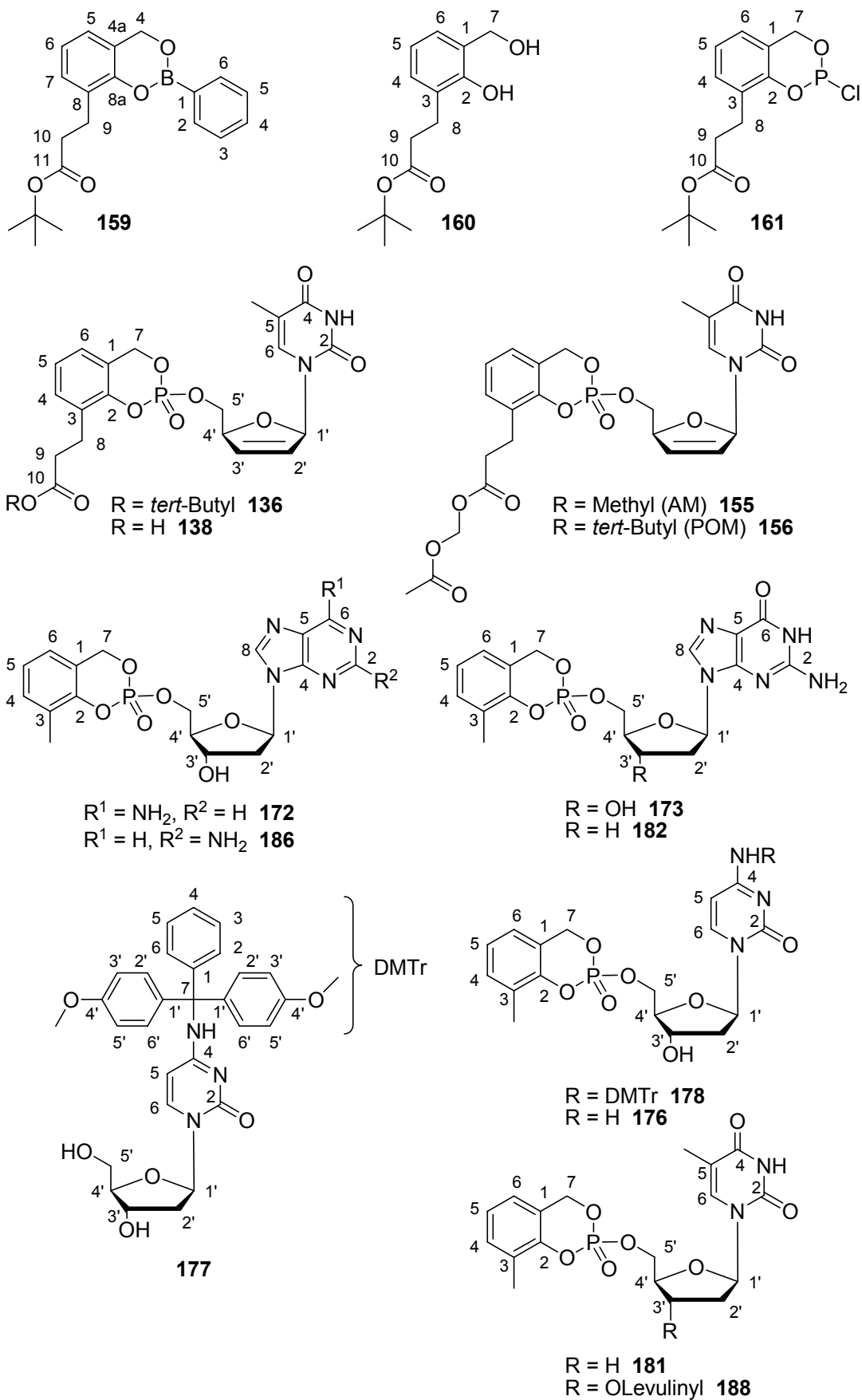
(1'-6' und 1''-6'')

R¹ = *t*-Bu, R² = H **234**R¹ = H, R² = *t*-Bu **244**R¹ = R² = *t*-Bu **253****100**R = Methoxymethyl **101**
R = H **99**R¹ = R² = H **91**R¹ = Me, R² = H **105**R¹ = TBDPS, R² = H **128**R¹ = R² = TBDPS **129****102**R = Me **109**R = H **110**R = Me **112**R = H **111****95**R¹ = H, R² = Cl **93**R¹ = H, R² = N(*i*-Pr)₂ **126**R¹ = H, R² = NEt₂ **127**R¹ = Me, R² = Cl **94****118****123**R = Cl **124**R = N(*i*-Pr)₂ **125**

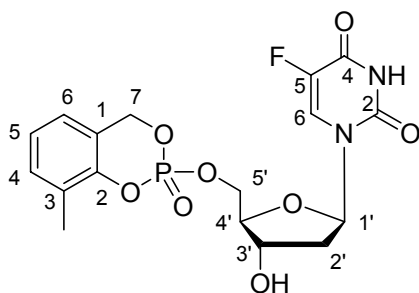
Verbindungsliste (Fortsetzung)



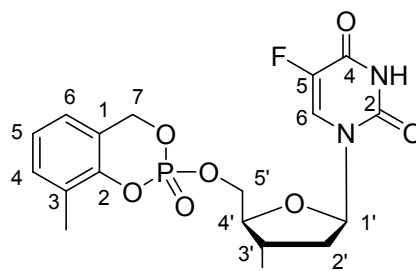
Verbindungsliste (Fortsetzung)



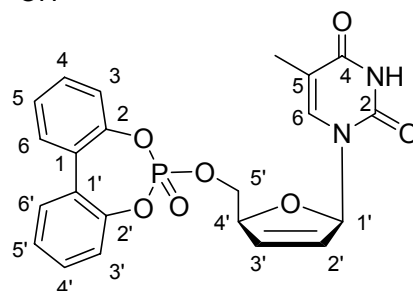
Verbindungsliste (Fortsetzung)



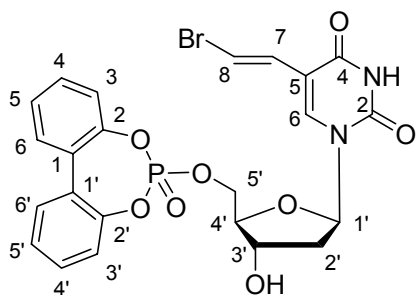
184



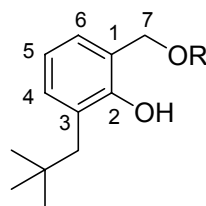
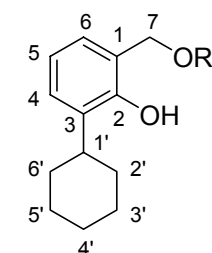
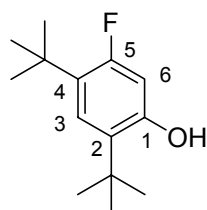
185



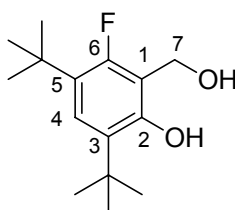
230



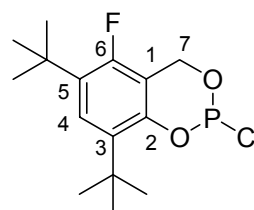
231

R = H 264
R = Me 266R = H 265
R = Me 267

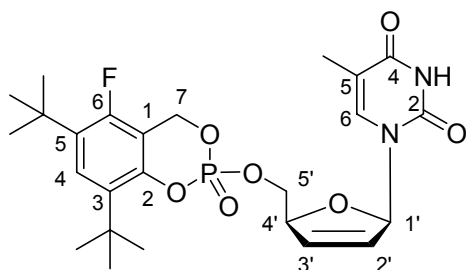
272



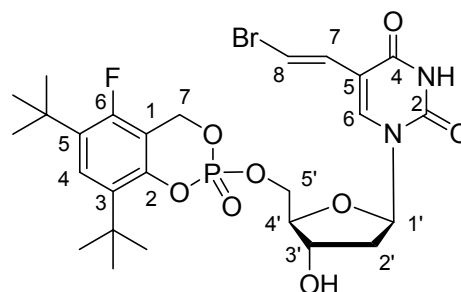
273



274



270



271