Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Henning Jacob Jessen

vorgelegt dem Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

Hamburg, im Februar 2008

Wenn es klappt, ist es gut;
wenn es nicht klappt, ist es nicht gut.

Dr. Olaf Ludek

Meiner Großmutter
Margret Verhein zum 85. Geburtstag
und meinem Großvater
Dr. Claus Verhein †

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Februar 2005 bis Februar 2008 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Till Opatz

Herrn Prof. Dr. C. Meier danke ich für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung während der Arbeit und für die hervorragenden experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit sowie für zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Meier für das außerordentlich gute Arbeitsklima bedanken, die stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Insbesondere gilt dieser Dank meinen Mitstreitern vom Labor U515, Herrn Olaf Ludek, Herrn Jens Thomann, Herrn Ulf Görbig, Herrn Edwin Rios, Herrn Tillman Schulz, Frau Viktoria Tonn und Frau Svenja Warnecke.

Für die tatkräftige Unterstützung möchte ich mich weiterhin bei allen Praktikantinnen und Praktikanten bedanken, die im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten für mich durchgeführt haben. Dies gilt insbesondere für Tillman Schulz, Viktoria Tonn und Andjana Panicker.

Ein ganz herzliches Dankeschön ergeht hier erneut an Viktoria Tonn und Svenja Warnecke für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Arwyn Tomos Jones danke ich für die Einweisung und Unterstützung bei den analytischen Arbeiten am Fluoreszenzmikroskop und die überaus freundliche Aufnahme in Cardiff.

Herrn Prof. Dr. Jan Balzarini danke ich für die Durchführung der *in vitro* Zelltests und für die Bereitstellung von AZT, BVdU und Zellextrakten. Auch Prof. Dr. P. Wutzler und Dr. A. Meerbach gebührt Dank für die Durchführung von *in vitro* Zelltests.

Frau C. Christ und Frau Meiners möchte ich für die Messung zahlreicher Massenspektren danken.

Herrn Dr. V. Sinnwell, Herrn Dr. E. T. K. Haupt und ihren Teams danke ich für die Messung zahlloser NMR-Spektren.

Meinen Eltern und meiner Freundin Anne Wenzel gebührt besonderer Dank für die uneingeschränkte und beispiellose Unterstützung während meines gesamten Studiums und während dieser Arbeit, in welcher auch das Blut meiner Mutter steckt; vielen Dank für die Plasmaspende!

Abkürzungen und Symbole

δ	chemische Verschiebung (NMR)
Δ	Energie
λ	Wellenlänge
(B)AB	(Bis)-(4-Acetoxybenzyl)
(B)BB	(Bis)-(4-benzoyloxybenzyl)
(B)IB	(Bis)-(4-*iso*butyryloxybenzyl)
(B)OB	(Bis)-(4-octanoyloxybenzyl)
(B)PB	(Bis)-(4-pivaloyloxybenzyl)
Φ_f	Quantenausbeute
2-AP	2-Aminopurin
3TC	2´-Desoxy-3´-thiacytidin, Lamuvidin, Epivir®
A	Adenosin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABC	*carba*-2´,3´-Didesoxy-2´,3´-didehydro-6-cyclopropylamino-guanosin, Abacavir, Ziagen®
abs.	Absolut
ACV	Aciclovir
AIBN	Azaisobutyronitril
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AM	Acetoxymethyl
Äq.	Äquivalent
AZT	3´-Azido-2´,3´-didesoxythymidin, Zidovudin, Retrovir®
ber.	Berechnet
BVdU	(E)-5-(2-Bromvinyl)-2´-desoxyuridin, Brivudin, Zostex®
C	Cytidin
CC	Cytotoxische Konzentration
CD	Circulardichroismus
CEM / 0	humane Wildtyp T-Lymphozyten-Zell-Linie
cm++	Complete media + FCS + Antibiotika
*cyclo*Sal	*Cyclo*saligenyl
d	Dublett (NMR)

d	2´-Desoxy (Nucleoside/Nucleotide)
d4	2´,3´-Didesoxy-2´,3´-didehydro (Nucleoside/Nucleotide)
d4T	2´,3´-Didesoxy-2´,3´-didehydrothymidin, Stavudin, Zerit®
dA	2´-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett (NMR)
dd	2´,3´-Didesoxy (Nucleoside/Nucleotide)
ddA	2´,3´-Didesoxy-2´,3´-didehydroadenosin
ddC	2´,3´-Didesoxycytidin, Zalticabin, Hivid®
ddd	Dreifachdublett (NMR)
dddd	Vierfachdublett (NMR)
ddI	2´,3´-Didesoxyinosin, Didanosin, Videx®
ddM^5K	5-Methyl-pyrimidin-2-on-2´,3´-didesoxy-ribonucleosid
ddT	2´,3´-Didesoxythymidin
dest.	Destilliert
dG	2´-Desoxyguanosin
DIPA	Di*iso*propylamin
DIPEA	*N,N*-Diisopropylethylamin
dM^5K	5-Methyl-pyrimidin-2-on-2´-desoxy-ribonucleosid
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleicacid
dt	Doppeltriplett
dT	2´-Desoxythymidin
E.C.	Enzyme Comission
EBV	Epstein-Barr Virus
EBV	Epstein-Barr Virus
EC	effektive Konzentration
EI	Electron Impact
em	Emission
ESI^-	Electrospray Ionization; negativ
ESI^+	Electrospray Ionization; positiv

ex	Anregung
FAB	Fast atom bombardement
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
gef.	Gefunden
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HeLa	Cervix-Karzinom Zell-Linie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	high resolution
HS	Humanes Serum
HSV	Herpes Simplex Virus
ht	heptett (NMR)
i	Ipso
ib	Isobutyryl
im	Imaging media
IR	Infrarot
iso-A	*iso*-Adenosin
iso-ddA	*iso*-2´,3´-didesoxy-Adenosin
J	Skalare Kern-Kern Kopplungskonstante
m	Multiplett
m	Meta
M	mol/L
m^5K	5-Methyl-pyrimidin-2-on-ribonucleosid
max.	Maximum
MeCN	Acetonitril
MeOH	Holzgeist, Methanol
Mes	Mesitylen
min	Minute
Min.	Minimum
MP	Monophosphat

MS	Massenspektrometrie
n	Nano
n.d.	nicht detektierbar
NDP	Nucleosid-Diphosphat
n-IE	normierte Integrationseinheit
NMP	Nucleosid-Monophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTP	Nucleosid-Triphosphat
o	Ortho
p	Para
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLE	Carboxyesterase
POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	parts per million
PTAD	4-Phenyl-1*H*-1,2,4-triazol-3,5-dion
Py	Pyridin
rel.	Relativ
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleicacid
RP	Reversed Phase
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transcriptase
s	Singulett (NMR)
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR)
$t_{1/2}$	Hydrolysehalbwertszeit
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBDSM	*tert*-Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidin-Kinase

TK^-	Thymidin-Kinase Defizienz
TMS	Trimethylsilyl
t_R	Retentionszeit
TTMSS	tris-(Trimethylsilyl)silan
U	Unit (Aktivitätseinheit)
U	Uridin
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen / Volumen
vs	versus
VZV	Varizella Zoster Virus
XAO	Xanthinoxidase

1	**Einleitung**	1
2	**Kenntnisstand**	2
2.1	Nucleosidanaloga in der HIV-Therapie	2
2.1.1	Eigenschaften einiger Nucleosidanaloga	3
2.1.2	d4T	3
2.1.3	AZT	4
2.2	Nucleosidanaloga in der Herpes-Therapie	6
2.3	Das Prodrug Konzept	9
2.3.1	Bis-(POM)- und Bis-(POC)-Nucleotide	10
2.3.2	Bis-(AB)-Nucleotide	11
2.3.3	Das *cyclo*Sal-Konzept	14
2.4	Fluoreszenzmarkierte Nucleoside	17
2.5	Interkalationsfarbstoffe	18
2.6	Intrinsisch fluoreszierende Nucleoside	18
2.7	Fluoreszierende Basensubstitute	20
2.8	Markierung von Nucleosid-Analoga durch fluoreszierende Masken	20
3	**Aufgabenstellung**	21
4	**Intrazellulärer Einschluss von *cyclo*Sal-Pronucleotiden**	23
4.1	„Lock-in“-Konzept	24
4.1.1	Einfache Ester zur „lock-in“-Modifikation	25
4.1.2	Acylale zur „lock-in“-Modifikation	26
4.1.2.1	Zielverbindungen und Synthesestrategie	29
4.1.2.2	Synthese 3-Me-5-POM-funktionalisierter *cyclo*Sal-Pronucleotide	30
4.1.2.3	Charakterisierung der 3-Methyl-5-POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide	35
4.1.2.4	Antivirale Eigenschaften der 3-Methyl-5-POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide	46
4.1.3	Aminosäure-Ester zur „lock-in“-Modifikation	48
4.1.3.1	Zielverbindungen und Synthesestrategie	51
4.1.3.2	Synthese der Aminosäureester-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide	53

4.1.3.3	Charakterisierung der Aminosäureester-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide	64
4.1.3.4	Antivirale Eigenschaften der Aminosäure-Estern modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotide	77
4.2	Zusammenfassung	81
5	**Synthese von intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotiden zur Verfeinerung analytischer Methoden**	82
5.1	Entstehung von Fluoreszenz	83
5.2	Analytik	86
5.3	Zielsetzung	86
5.4	Zielverbindungen und Synthesestrategie	87
5.4.1	Synthese von intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotiden	92
5.4.2	Charakterisierung der intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotide	102
5.4.3	Antivirale Daten der intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotide	111
5.4.4	Fluoreszenzmikroskopie	112
5.4.5	Synthese eines intrinsisch fluoreszierenden Phosphoramidits	119
5.5	Zusammenfassung	121
6	**Synthese und Charakterisierung von NDP-Prodrugs**	123
6.1	Erläuterung des Konzeptes	124
6.2	Entwicklung eines NDP-Prodrugs auf Basis des *cyclo*Sal-Systems	125
6.2.1	Zielverbindungen und Synthesestrategie	126
6.2.2	Synthese und Charakterisierung von *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs	128
6.2.3	Synthese von substituierten *cyclo*Sal-Phosphorchloridaten	144
6.3	Entwicklung eines NDP-Prodrugs auf Basis des Bis-(AB)-Systems	147
6.3.1	Zielverbindungen und Synthesestrategie	149
6.3.2	Synthese von BAB-NDP-Prodrugs	152
6.3.3	Charakterisierung von BAB-NDP-Prodrugs	171
6.3.4	Antivirale Daten von BAB-NDP-Prodrugs	203
6.4	Zusammenfassung	206

7 Zusammenfassung 207

8 Summary 211

9 Ausblick 213

10 Experimentalteil 218

10.1 Allgemeines 218
10.1.1 Edukte und Reagenzien 218
10.1.2 Lösungsmittel 219
10.1.3 Absolute Lösungsmittel 219
10.1.4 Chromatographie: 220
10.1.5 Spektroskopie 223
10.1.6 Fluoreszenzmikroskopie 225
10.1.7 Zellkultur 225
10.2 Synthesen 226
10.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) 226
10.2.2 Synthese einiger Reagenzien 230
10.2.3 Synthesen von Salicylalkoholen 233
10.2.4 Synthesen von 4-Acyloxybenzylalkoholen 254
10.2.5 Synthese reaktiver Phosphorverbindungen 257
10.2.5.1 Synthese von Saligenylchlorphosphiten 257
10.2.5.2 Synthese von Saligenylphosphorchloridaten 261
10.2.5.3 Synthese von Phosphoramiditen 265
10.2.6 Synthese und Funktionalisierung von Nucleosiden 269
10.2.6.1 Synthese von *iso*-d4A und *iso*-ddA 269
10.2.6.2 Synthese eines *iso*-A-Phosphoramidits für die RNA-Festphasensynthese 277
10.2.6.3 Synthese carbocyclischer Nucleoside 282
10.2.6.4 Synthese von AZT 284
10.2.6.5 Versuch der Synthese von d4m^{5}K 288
10.2.6.6 Versuch der Synthese von BVdm^{5}K 291
10.2.6.7 Synthese von 3´-*O*-Acyl-BVdU-Derivaten 293
10.2.6.8 Synthese von N^2-Dimethoxytrityl-ACV 296
10.2.7 Synthese von Nucleotiden und Nucleotid-Derivaten 297

10.2.8 Synthese der Zielverbindungen 313
10.2.8.1 Synthese von *cyclo*Sal-Triestern 313
10.2.8.2 Synthese von *cyclo*Sal-Diphosphat-Prodrugs 341
10.2.8.3 Synthese von Bis(4-acyloxybenzyl)-diphosphat-Prodrugs 346
10.2.8.4 Isolierung von Hydrolyse-Intermediaten 362
10.3 Hydrolysestudien 364
10.4 U-Rohr-Diffusionsversuche 367
10.5 Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop 367
10.6 Reaktionsoptimierung 368
10.7 Bestimmung von LogP-Werten 370

11 Gefahrstoffverzeichnis 371

12 Literaturverzeichnis 375

13 Anhang

1 Einleitung

Die Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) ist eine der bedrohlichsten Infektionskrankheiten überhaupt. In einigen Ländern der „Dritten Welt“ sind große Teile der Bevölkerung mit dem Virus infiziert, und eine Verringerung der Infektionsrate ist nicht in Sicht. Dies hat schwerwiegende ökonomische, aber auch soziale Folgen für ein solches Land. Auch in den Industrienationen ist die Krankheit wieder auf dem Vormarsch, seit die Wahrnehmung der Gefahr nach anfänglichen Aufklärungserfolgen abgenommen hat. Insbesondere in den osteuropäischen Nationen nimmt die Infektionsrate dramatisch zu.

Verantwortlich für AIDS ist das HI-Virus, welches zur Gruppe der Retroviren gehört. HIV befällt in der Regel CD4-positive Zellen, d.h. solche, die den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Dies sind fast ausschließlich Zellen des Immunsystems, welches durch das massive Absterben insbesondere von T-Helferzellen soweit geschwächt wird, dass normalerweise unbedrohliche Infektionen zur tödlichen Gefahr werden.

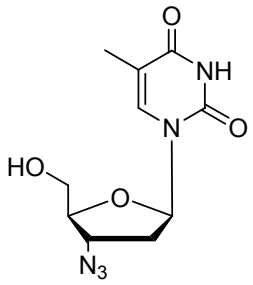
Inzwischen sind Therapieformen bekannt, welche die Proliferation des Virus unterdrücken. Tatsächlich ist aber kein einziges Medikament bekannt, welches das Virus vollständig aus dem Körper beseitigen könnte. Dies liegt an der hohen Mutationsrate von Retroviren, was deren rasche Anpassung bewirkt (Resistenzbildung) sowie der Integration der viralen DNA in die Zell-DNA.[1] Zudem treten bestimmte Zellen sowie das Gehirn als Reservoir für das Virus auf.[2] Auch führt die Medikation bei einigen Patienten zu unangenehmen Nebenwirkungen, wie z.B. Anämie.[3] Aus diesen Gründen besteht ein Interesse daran, neue Wirkstoffe zu finden und alte hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit zu verbessern. Insbesondere die Optimierung bereits vorhandener Wirkstoffe bringt einige Vorteile mit sich, da diese bereits ausführlich untersucht wurden. Gelingt es ein Medikament durch Optimierung der Eigenschaften niedriger dosieren zu können, sollten auch die Nebenwirkungen nur noch in abgeschwächter Form auftreten.

Diese Arbeit befasst sich mit Modifikationen zugelassener Medikamente, um bestimmte Transformationen der Wirkstoffe im Körper zu umgehen. Außerdem liegt das Augenmerk auf der gezielten Steuerung der Verteilung dieser Stoffe in unterschiedlichen biologischen Medien unter Verwendung empfindlicher analytischer Sonden.

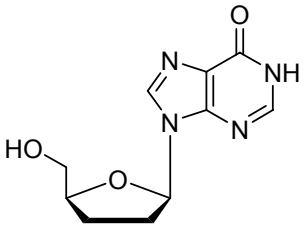
2 Kenntnisstand

2.4 Nucleosidanaloga in der HIV-Therapie

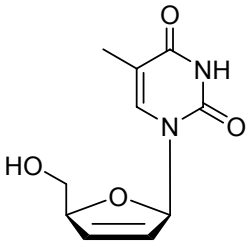
Natürliche Nucleoside wie auch antiviral aktive Nucleosidanaloga müssen zunächst durch bestimmte, mehr oder minder spezifische Enzyme in ihre Triphosphate überführt werden, wenn sie zur Kettenverlängerung in den DNA-Strang eingebaut werden. Nach dem Einbau wirken die antiviral aktiven Nucleosidanaloga als Kettenterminatoren, d.h. es findet keine weitere Elongation in 3´-Richtung statt.[4] In Abbildung 1 sind einige Beispiele für anti-HIV aktive Nucleosidanaloga aufgeführt. Ihnen allen ist das Fehlen der 3´-OH Gruppe gemein.



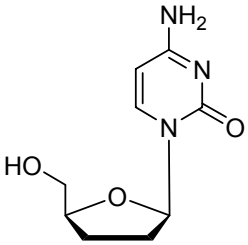
3´-Azido-2´,3´-didesoxythymidin
(AZT, Zidovudin, Retrovir(R)) **1**



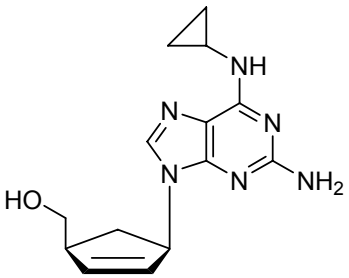
2´,3´-Didesoxyinosin
(ddI, Didanosin, Videx(R)) **2**



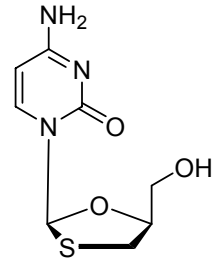
2´,3´-Didesoxy-2´,3´-didehydrothymidin
(d4T, Stavudin, Cerit(R)) **3**



2´,3´-Didesoxycytidin
(ddC, Zalticabin, Hivid(R)) **4**



ABC, Abacavir, Ziagen(R) **5**



2´-Desoxy-3´-thiacytidin
(3TC, Lamuvidin, Epivir(R)) **6**

Abb. 1: Einige antiviral aktive Nucleosid-Analoga

Da der Reversen Transkriptase (HIV-RT) des HI-Virus eine *proof-reading* Funktion fehlt, kommt es zum Einbau in den wachsenden viralen DNA-Strang und somit zur Kettentermination zusätzlich zur Inhibition des Polymerase-Enzyms. Humane DNA-Polymerasen erkennen und eliminieren das „falsche“ Nucleosid beim Einbau in

zelleigene DNA. Der eigentlich aktive Wirkstoff ist daher das Triphosphat (NTP) des Nucleosids und nicht das Nucleosid selbst.[5]

2.1.1 Eigenschaften einiger Nucleosidanaloga

AIDS tritt oft im Zusammenhang mit dem sogenannten AIDS related complex (ARC) oder auch AIDS-Demenz-Komplex auf.[6] Die Kombinationstherapie mit Nucleosidanaloga kann zwar häufig die Viruslast im Blut unter die Nachweisgrenze verringern, es sind aber einige Reservoirs für die Regeneration des Virus vorhanden. Eines davon scheint das Gehirn zu sein, da die Wirkstoffe zum Teil nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke (BBB; blood brain barrier) zu überwinden. Dies kann zum Auftreten von AIDS-bedingter Demenz führen.[2,3] Es ist daher wichtig, Wirkstoffe so zu gestalten oder dahingehend zu modifizieren, dass sie in der Lage sind, die BBB zu passieren. Einige Untersuchungen zeigten, dass die Diffusion über die BBB mit steigender Lipophilie der Medikamente zunimmt.[7] Eine Möglichkeit, die Lipophilie bekannter Medikamente zu erhöhen, liegt in der Verwendung von Prodrug-Systemen.

2.1.2 d4T

Die für die Phosphorylierung zuständigen Enzyme sind beim ersten Schritt die relativ substratspezifischen Nucleosid-Kinasen, bei der Diphosphorylierung die weniger spezifischen Nucleotidylat-Kinasen und schließlich bei der Triphosphorylierung die relativ unspezifischen Nucleosiddiphosphat-Kinasen. In der folgenden Abbildung ist der Anabolismus des Nucleosidanalogons d4T innerhalb der Zelle dargestellt.[6]

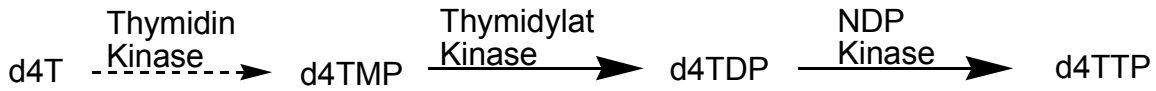


Abb. 2: d4T-Anabolismus

Nun ist im Fall des d4T die erste Phosphorylierung zum Monophosphat durch die Thymidinkinase gehemmt, so dass die Triphosphatbildung insgesamt sehr langsam wird.[4,8] Die nachfolgenden Reaktionen laufen dagegen ungehemmt ab. Es wäre also

von Vorteil, direkt das Monophosphat als Medikament zu verabreichen, da somit die gehemmte Reaktion umgangen würde (TK-Bypass). Diese Monophosphate liegen jedoch bei physiologischem pH-Wert als Dianion vor, was ihre Membrangängigkeit stark einschränkt.[9] Zudem existieren im Blut unspezifische Phosphatasen, welche die Dephosphorylierungsreaktion katalysieren.[10] Daher scheint die Anwendung von Prodrug-Systemen vielversprechend, welche intrazellulär d4TMP freisetzen.
d4TTP inhibiert HIV-RT vergleichbar mit AZTTP, zudem aber auch humane pol γ. Dennoch wird d4TTP präferentiell in die virale DNA inkorporiert, so dass eine Kettentermination eintritt.[6,11] Die 3´-5´-Exonuclease pol ε ist nicht in der Lage, d4TMP aus der zellulären DNA zu entfernen, wohingegen im Fall der Inkorporation von AZTTP eine Restaktivität von ca. 20% verbleibt.[12] d4T gelangt durch passive Diffusion in das Cytoplasma, die Aufnahme durch Transportsysteme wurde nicht beobachtet.[13] d4T inhibiert die mitochondrielle DNA-Synthese stärker, als AZT. Dies trägt durch Störung der Zellatmungsprozesse weiterhin zur Cytotoxizität von d4T bei[14]. Die Pharmakokinetik von d4T wurde ausführlich untersucht[15]. Es kann leicht durch orale Absorption in den Organismus gelangen, verteilt sich im Körper und gelangt zudem in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Etwa 40% des verabreichten d4T werden unverändert im Urin ausgeschieden. Als Nebenwirkung tritt hauptsächlich periphere Neuropathie (Schädigung der peripheren Nerven) auf.[16]

2.1.3 AZT

Einschränkungen in den sukzessiven Phosphorylierungen liegen auch bei anderen Nucleosidanaloga vor, z.B. ist bei AZT die zweite Phosphorylierung durch die Thymidylatkinase gehemmt.[6] Die Tertiärstruktur der TmpK umfasst fünf parallele β-Faltblätter, eine Höhle bildend, die von α-Helices umgeben ist. Zur Phosphorylierung muss das Nucleotid in einer Tasche gebunden werden, welche die Nucleobase durch Wechselwirkung mit Aminosäureresten erkennt. Des Weiteren muss der Phosphoryldonor ATP in einer Schleife der β-Faltblattregion (P-Loop) gebunden sein. Die Bindung der Substrate führt zu konformativen Änderungen des Enzyms, so dass Phosphoryldonor (ATP) und Phosphorylacceptor (dTMP, bzw. AZTMP) in räumliche Nähe gebracht werden. Bei der Konformationsänderung kommt ein als „lid“ (Deckel) bezeichneter Bereich des Enzyms über dem Phosphoryldonor zu liegen. Dies verhindert eine Hydrolyse von ATP. Bei diesem als „induced fit“ bezeichneten

Mechanismus werden katalytisch aktive Reste des Enzyms so angeordnet, dass eine selektive Phosphorylierung des Substrats stattfinden kann. Wenn keine Substrate gebunden sind, liegt das Enzym in der katalytisch inaktiven offenen Form vor.[17-20] Um die Bindungseigenschaften von AZTMP an das Enzym zu untersuchen, wurden vergleichende *steady state* Kinetiken von AZTMP und dTMP durchgeführt. Die dabei ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten K_M wiesen für beide Substrate ähnliche Werte auf (6 μM, bzw. 9 μM; in *cervisiae* TmpK), woraus gefolgert wurde, dass eine vergleichbar effektive Bindung von AZTMP in der aktiven Seite des Enzyms stattfindet.[21] Die vergleichsweise schlechte Phosphorylierung von AZTMP zu AZTDP wurde daher auf eine Störung des katalytischen Mechanismus zurückgeführt. Dies konnte durch Kristallisation von humaner TmpK mit AZTMP und einem hydrolysestabilen ATP-Analogon untermauert werden. Bei dem analysierten Enzym-Substrat-Komplex ist die P-Loop-Region aufgrund einer sterischen Wechselwirkung der 3´-Azidgruppe und Aspartat-14 (P-Loop) um 50 pm gegenüber der natürlichen Position verschoben.[22,23]

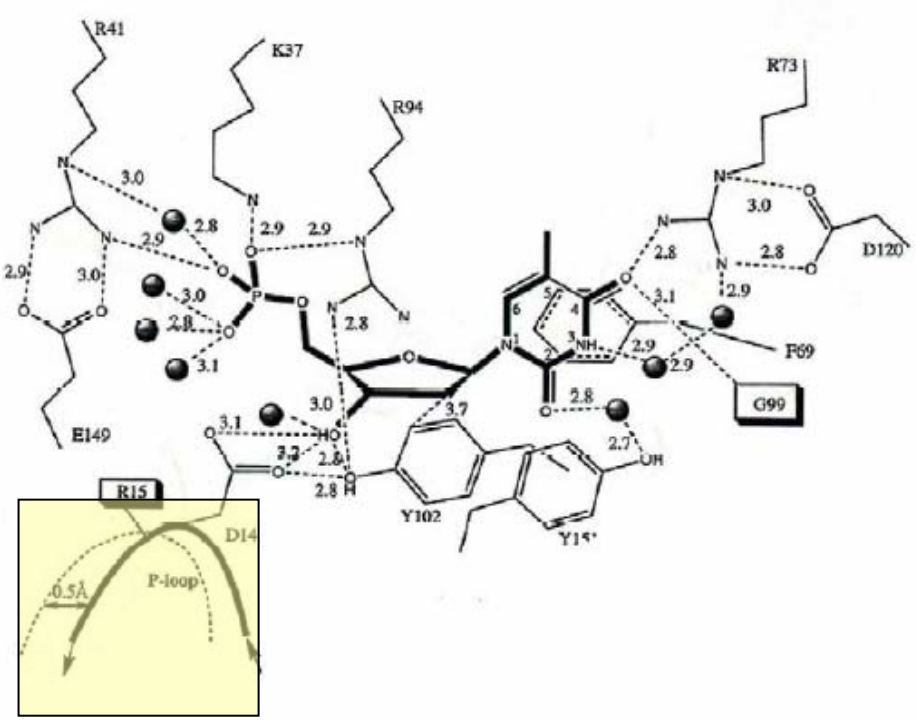


Abb. 3: Aktives Zentrum der TmpK mit dTMP bzw. AZTMP[23]

Diese sterische Wechselwirkung erschwert den Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation, wodurch eine höhere Aktivierungsenergie für den

Phosphorylgruppentransfer benötigt wird. Dies wiederum verlangsamt den Phosphorylierungsprozess.

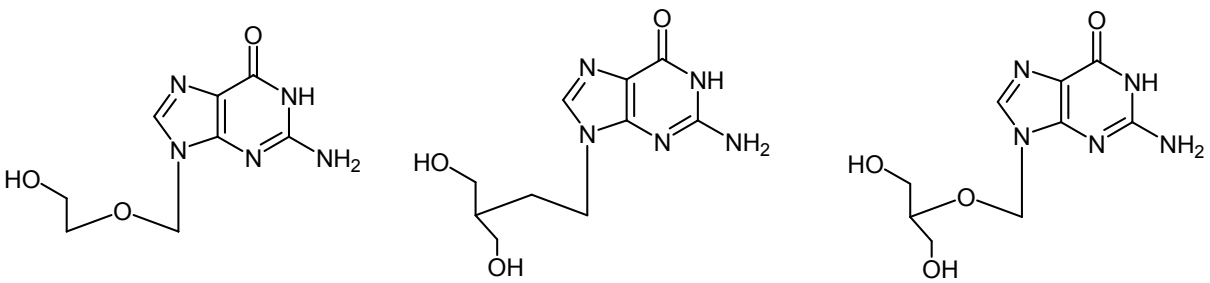
Die eben beschriebenen Prozesse führen zu einer intrazellulären Akkumulation von AZTMP. AZTTP ist ein kompetitiver Inhibitor der HIV-RT mit wesentlich geringerer Affinität zur humanen pol α. Allerdings führt die Anwesenheit von 2 μM AZTTP zu einer Inhibition der humanen pol γ von ca. 90% im Gegensatz zu 80% der HIV-RT.[11] Die hematopoietische Toxizität (Schädigung pluripotenter Stammzellen) von AZT wird der hohen intrazellulären Konzentration von AZTMP zugeordnet, welches in die humane DNA von Knochenmarkszellen eingebaut wird.[24] Eine weiterer Nebeneffekt von AZTMP scheint die Inhibition zellulärer 3´-Exonucleasen zu sein, so dass eine Reparatur AZTMP-terminierter DNA-Stränge nicht stattfinden kann.[25] Weiterhin scheinen hohe Konzentrationen von AZTMP eine Inhibition zellulärer Protein- und Fettglykosylierung zu verursachen.[26,27] Eine Vermeidung des Auftretens von AZTMP in Zellen ist daher ausgesprochen wünschenswert und könnte durch entsprechende Pronucleotidsysteme erreicht werden.

Die Pharmakokinetik von AZT wurde umfassend untersucht.[28,29] Nach oraler Gabe wird AZT schnell im Körper aufgenommen und verteilt sich extensiv bis in die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (cerebrospinal fluid; CSF). 20% des Wirkstoffes werden unverändert über die Nieren ausgeschieden. Der hauptsächliche Metabolit ist das 5´-*O*-Glucuronid. Zudem wurde in geringen Mengen eine Reduktion der Azidgruppe zum Amin beobachtet, welches als Monophosphat an der Inhibition von 3´-Exonucleasen teilnimmt.[30] Wegen der toxischen Effekte von AZT und dessen Metaboliten auf Knochenmarkszellen, sind die hauptsächlich beobachteten Nebenwirkungen Anämie und Neutropenie (Reduktion der neutrophilen Granulocyten).[3]

2.5 Nucleosidanaloga in der Herpes-Therapie

Auch gegen die Familie der Herpes-Viren, zu der u.a. das Herpes-Simplex- (HSV), das Varizella-Zoster- (VZV), das Epstein-Barr- (EBV) und das Cytomegalie-Virus (CMV) gehören, existieren therapeutisch wirksame Nucleosidanaloga. Im Unterschied zum HI-Virus handelt es sich bei Herpes-Viren um sogenannte DNA Viren. Ein vielversprechendes Zielenzym der antiviralen Therapie stellt die viruseigene DNA-Polymerase der Herpes-Viren dar. Zur Inhibition eignen sich

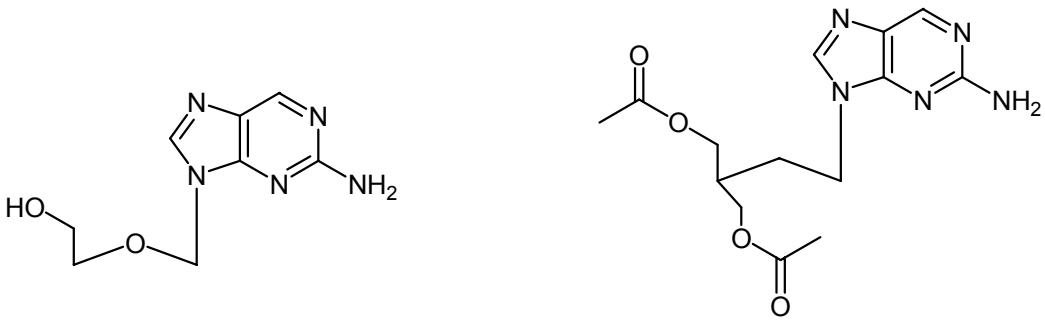
acyclische Nucleosidanaloga, wie Aciclovir (ACV), Penciclovir (PCV) und Ganciclovir (GCV).



ACV **7** PCV **8** GCV **9**

Abb. 4: Acyclische Nucleosidanaloga

Zur Verbesserung der passiven Membranfunktion werden in der Therapie Prodrugs der oben abgebildeten Nucleosidanaloga appliziert, welche intrazellulär zu den entsprechenden Nucleosidanaloga metabolisiert werden, im Fall von Desciclovir durch enzymatische Oxidation (Xanthin-Oxidase, XAO) zu ACV, bei Famciclovir durch Deacetylierung (Esterase) und nachfolgende Oxidation (XAO) zu PCV.[31-33]



Desciclovir **10** Famciclovir **11**

Abb. 5: Prodrugs acyclischer Nucleosidanaloga

Zur Therapie von Herpes-Erkrankungen wird ebenfalls das cyclische Nucleosidanalogon BVdU **11** (Brivudin®) verwendet. Seine antivirale Wirksamkeit entfaltet es als BVdUTP, welches die virale DNA-Polymerase inhibiert. Bei einem Einbau in die DNA kommt es zudem durch Ausbildung von Quervernetzungen über die Bromvinyleinheit zu sogenannter „Nonsense-DNA“. Die Aktivierung von BVdU erfolgt im ersten Schritt durch eine virale Kinase zum Monophosphat, d.h. in nicht infizierten Zellen kann keine Umwandlung in das Triphosphat stattfinden. Gleiches gilt für ACV **7**, weswegen diese auch als selektive antivirale Verbindungen

bezeichnet werden.[34,35] Wegen des Verlustes der Selektivität scheinen diese Verbindungen daher auf den ersten Blick nicht geeignet für die Anwendung von Prodrug-Konzepten zu sein. Da im Fall von BVdU allerdings die zweite Aktivierung zum Diphosphat ebenfalls über eine virale Kinase stattfindet, ist ein Verlust der Selektivität für BVdU zunächst nicht zu befürchten.

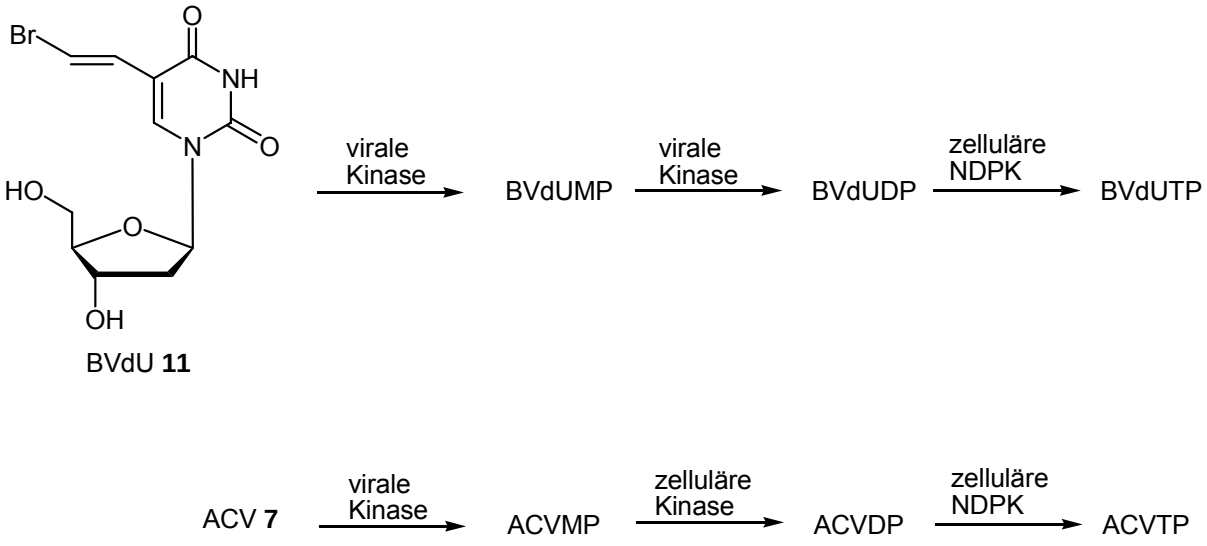


Abb. 6: BVdU-Anabolismus und ACV-Anabolismus

Ein Problem der Selektivität der ersten Phosphorylierung stellt das Auftreten von Resistenzen dar. Mutiert die virale Kinase, so dass die Monophosphorylierung nicht mehr stattfindet, verlieren die Wirkstoffe ihre Aktivität. Bei immunsupprimierten Patienten (z.B. bei zusätzlicher HIV-Infektion) treten in 5 bis 6% der Fälle ACV-resistente HSV-1 Stämme auf.[36] Ein weiterer Vorteil der Anwendung von Prodrug-Sytemen wird in der Erweiterung des antiviralen Spektrums von BVdU eindrucksvoll bewiesen. So ist BVdU gegen EBV inaktiv, in Form eines *cyclo*Sal-Prodrugs wird allerdings die erste Phosphorylierung umgangen. Dies führt zu einer deutlichen anti-EBV-Aktivität und zeigt zugleich den potentiellen Nutzen von Prodrug-Systemen auch bei selektiven antiviralen Verbindungen.[37]

2.3 Das Prodrug-Konzept

Das Problem der geringen Membrangängigkeit sowie der Dephosphorylierungen kann durch Verabreichung sogenannter „Prodrugs“ umgangen werden. Diese sind Wirkstoffvorläufer, welche den eigentlichen Wirkstoff erst später unter Abspaltung von Maskierungsfunktionen freisetzen. Voraussetzungen für ein solches Prodrug, in diesem Fall ein Pronucleotid, sind eine erhöhte Lipophilie, um Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke durchdringen zu können, eine ausreichende Stabilität im extrazellulären Medium und die Freisetzung nicht toxischer Masken.
Im Fall von NMP müssen zwei negativ geladene Sauerstoffatome lipophil maskiert werden.

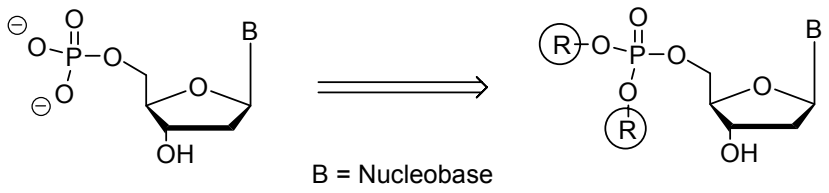


Abb. 7: Vom Nucleotid zum Pro-Nucleotid

Erste Versuche mit Dialkylphosphatestern bestätigten die Annahme einer Abspaltung der Maske durch nucleophile Reaktion am Phosphoratom. Allerdings behinderte die entstandene negative Ladung die Freisetzung des Wirkstoffes durch Spaltung des zweiten Esters.[38] Neuere Ansätze beruhen auf Masken, die durch Hydrolysekaskaden, ausgelöst z.B. durch eine enzymatische Reaktion, von dem Nucleotid abgespalten werden. Zu diesen neuartigen Masken zählen:

Bis(POM)-Nucleotide	[bis(**P**ivaloyl**o**xy**m**ethyl)-][39]
Bis(POC)-Nucleotide	[bis(*iso*-**P**ropyl**o**xy**c**arbonyloxymethyl)-][40]
Bis(SDTE)-Nucleotide	[bis-(***S***-(2-Hydroxyethylsulfidyl)-2-**t**hio**e**thyl)-][41]
Bis(SATE)-Nucleotide	[bis-(***S*-A**cyl-2-**t**hio**e**thyl**)**-][42]
Bis(AB)-Nucleotide	[bis-(4-**A**cetoxy**b**enzyl)-][43]
Phosphoramidat-Nucleoside[44,45]	

Mechanistisch betrachtet erfolgt für diese Prodrug-Systeme die Freisetzung des Nucleotids durch enzymatische Hydrolyse. Die selektive Freisetzung basiert auf der deutlich höheren Esteraseaktivität innerhalb von Zellen im Gegensatz zum Plasma. Ein weiteres Forschungsgebiet, welches durch Pronucleotidsysteme erschlossen wird, ist die selektive Freisetzung von Wirkstoffen innerhalb bestimmter Zelltypen. Die Aktivierung muss in diesen Fällen über Enzyme erfolgen, die für einen bestimmten Gewebetypus charakteristisch sind. Zellspezifisch sind folgende Pronucleotidsysteme:

HepDirect® [46]	Leber
DHP-Nucleotide (5´-**Dih**ydro**p**yridyl-Nucleotide)[47]	Gehirn

2.3.1 Bis-(POM)- und Bis-(POC)-Nucleotide

Zwei acyclische Phosphonat-Nucleotidanaloga werden in Form ihrer Prodrugs bereits in der klinischen antiviralen Therapie verwendet. Es handelt sich um Bis-(POM)-PMEA (Adefovir Dipivoxil, Hepsera®) und das Fumarsäuresalz von Bis-(POC)-PMPA (Tenofovir Disoproxil Fumarat, Viread®). In der folgenden Abbildung sind die Spaltungsmechanismen verallgemeinert dargestellt.

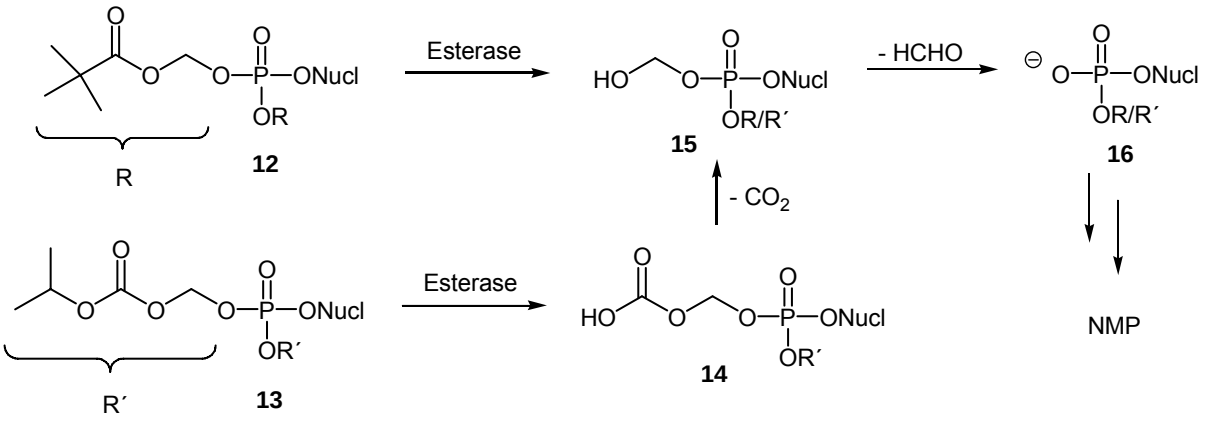


Abb. 8: Spaltung von Bis-(POM)- und Bis-(POC)-Nucleotiden (**12**, **13**)[48-50]

Die Freisetzung des NMP erfolgt für beide Systeme über die enzymatische Spaltung durch eine Carboxyesterase. Bei den Bis-POC-Nucleotiden **13** entsteht ein instabiler Kohlensäurehalbester **14**, welcher unter Abspaltung von CO_2 in das ebenfalls instabile halbacetalische Intermediat **15** übergeht. Bei Bis-POM-Nucleotiden **12**

erfolgt direkt die Freisetzung des halbacetalischen Intermediats **15**. Dieses zerfällt zu Formaldehyd und dem Mono-POM, bzw. Mono-POC-Diester **16**. Die Wiederholung des Kaskademechanismus liefert das entsprechende Nucleotid. Die zweite Spaltung erfolgt allerdings im Vergleich zur Ersten wesentlich langsamer, was auf die negative Ladung des Diesters **16** zurückgeführt wurde. Sie verursacht eine geringere Substrataffinität der Esterase. Um auch die zweite enzymatische Spaltung schnell zu gestalten, wurde bei unterschiedlichen Ansätzen die durch Esterase zu entfernende Gruppe über verschiedene Spacer von dem Phosphatrest räumlich entfernt. Einer dieser Ansätze ist das Bis-(AB)-Pronucleotidsystem.

2.3.2 Bis-(AB)-Nucleotide

Bis-(AB)-Nucleotide wurden von *S. Freeman et al.* beschrieben und von *A. Glazier et al.* modifiziert.[43,51] Um eine hinreichende Substrataffinität von Carboxyesterasen gegenüber dem intermediär auftretenden Diester zu erhalten, wurde als Spacer ein aromatisches System eingeführt. Die Hydrolysekaskade wird durch Spaltung der Acylgruppe von **17** eingeleitet. Dadurch findet eine Umpolung des zur Benzylgruppe *para*-ständigen Restes vom Elektronenacceptor zu einem Elektronendonator statt. Diese Umpolung labilisiert die Benzylesterbindung und führt zu einem spontanen Zerfall des Intermediats **18** in den AB-Diester **19** und ein mesomeriestabilisiertes 4-Chinonmethid **20**. Eine Wiederholung der Kaskade setzt das NMP frei.

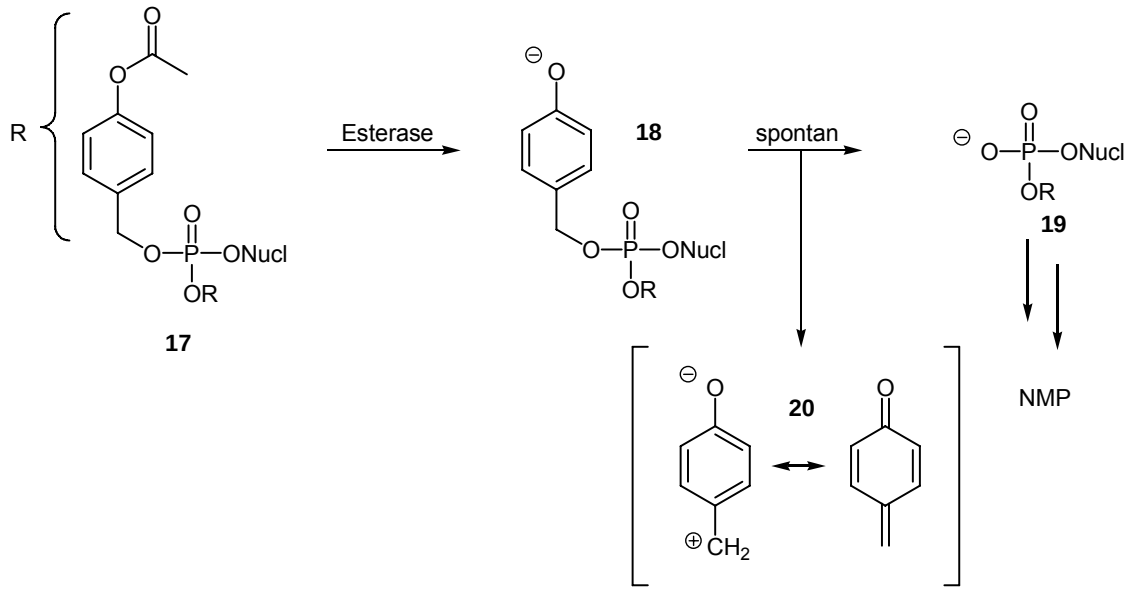


Abb. 9: Spaltungsmechanismus von Bis-(AB)-Nucleotiden

Das auf diese Weise freigesetzte Chinonmethid könnte ein Problem bei der Anwendung von Bis-(AB)-Nucleotiden darstellen, da die Entstehung in unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum des Enzyms stattfindet. Chinonmethide sind als alkylierende Reagenzien bekannt und könnten mit den Aminosäuren des Enzyms reagieren, was zu einer Verminderung der Enzymaktivität führen kann.[43,51] Zudem sind Reaktionen mit zellulären Nucleophilen wie DNA, Glutathion u.a. vorstellbar, was entscheidend zur Toxizität derartiger Verbindungen beitragen dürfte.

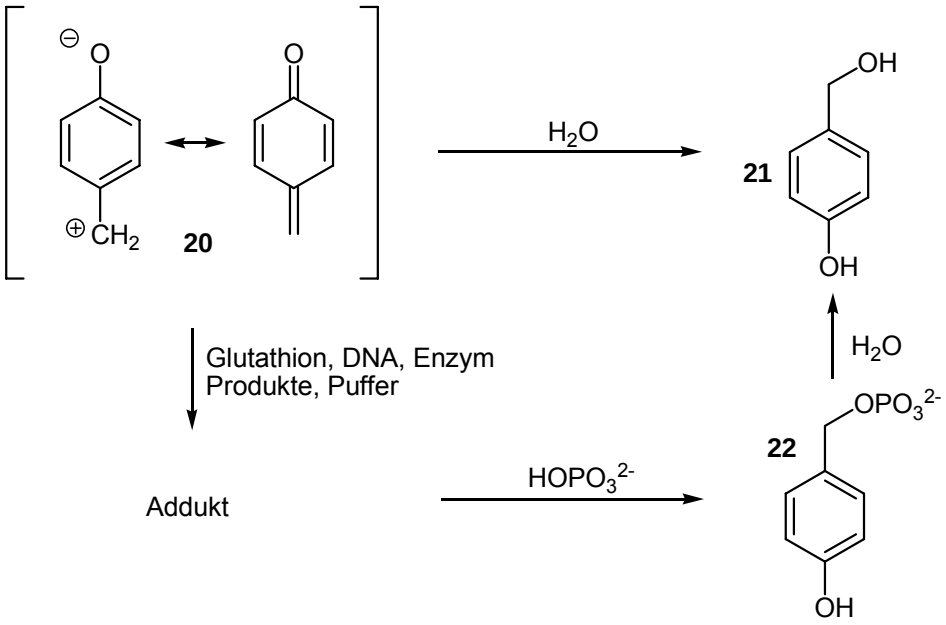


Abb. 10: Postulierte Umwandlungen eines Chinonmethids

Um den Verbleib des Chinonmethids **20** aufzuklären, wurden von *Freeman et al.* verschiedene Experimente durchgeführt. Bei der ^{1}H- und ^{31}P-NMR-spektroskopischen Verfolgung der Hydrolyse eines Bis-(4-Acetoxybenzyl)-Nucleotids bei pD 8.0 wurden als Spaltprodukte 4-Hydroxybenzylalkohol **21**, Acetat und NMP freigesetzt. Dabei wurde für die Primärspaltung eine Halbwertszeit von 55 h und für die Sekundärspaltung eine Halbwertszeit von 153 h festgestellt. Die Zugabe von Esterase beschleunigte die Hydrolyse auf 3 min für den ersten und 120 min für den zweiten Schritt. Das dabei freigesetzte Chinonmethid **20** reagiert zunächst nur zu ca. 30% mit Wasser, der weitaus größte Teil alkyliert das im Puffer vorhandene Phosphatsalz zu **22**, welches nachfolgend mit einer Halbwertszeit von 60 min zu Phosphat und 4-Hydroxybenzylalkohol **21** hydrolysiert. Da keine Abnahme der Enzymaktivität beobachtet wurde, erscheint eine Reaktion mit dem Enzym als unwahrscheinlich.

Die *in vitro* ermittelte antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 von Bis-(4-Acetoxybenzyl)-AZTMP war der von AZT vergleichbar, allerdings wurde eine um den Faktor 20 erhöhte Cytotoxizität festgestellt. Unter der Annahme, dass diese Toxizität von dem Chinonmethid verursacht wurde, entwickelten *Glazier et al.* eine Modifikation des Bis-(AB)-Konzeptes, bei welchem das Chinonmethid durch eine intramolekulare Reaktion eliminiert werden sollte. Zu diesem Zweck wurde eine Methoxycarbonylmethyl-Gruppe in der Benzylposition der Maske eingeführt (MCM-Nucleotide **23**).

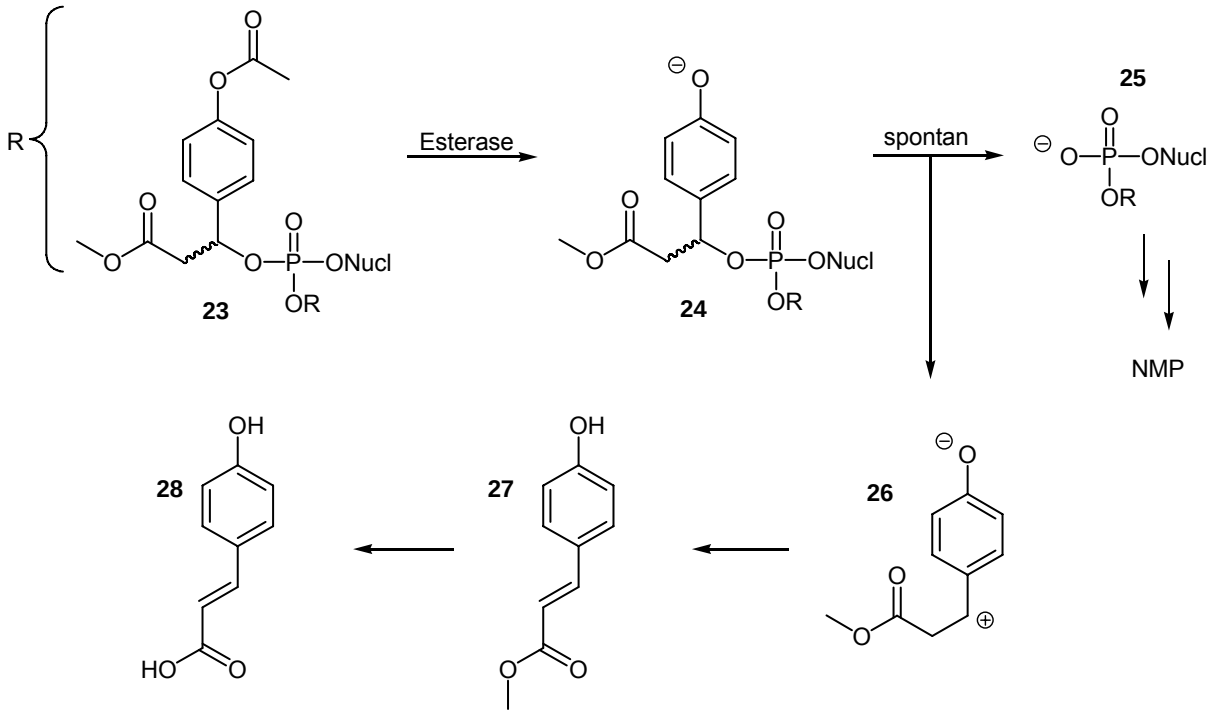


Abb. 11: Spaltungsmechanismus von MCM-Nucleotiden

Der Mechanismus verläuft analog der oben beschriebenen Spaltung. In diesem Fall wird jedoch ein Chinonmethid **26** erhalten, welches durch Eliminierung in den 4-Hydroxyzimtsäuremethylester **27** und durch nachfolgende Hydrolyse in die 4-Hydroxyzimtsäure **28** übergehen kann. Mit Bis-(4-acetoxy-α-methoxycarbonyl-methylbenzyl)ACVMP (MCM-ACVMP) als Modellverbindung konnte nachgewiesen werden, dass neben Methanol, Essigsäure und ACVMP 4-Hydroxyzimtsäure **28** als Reaktionsprodukt auftritt. Zudem wurden für die eben genannte Komponente nur geringe toxische Wirkungen *in vitro* festgestellt.[52] Untersuchungen von C. Meier *et al.* mit dem von Glazier entwickelten MCM-Konzept angewendet auf d4T zeigten allerdings eine deutlich gesteigerte Cytotoxizität *in vitro* (CC_{50}= 19 μM) gegenüber

einer moderaten Cytotoxizität von Bis(AB)-d4TMP (CC_{50}= 58 μM). Es ist daher nicht abschließend geklärt, ob der gesteigerte Syntheseaufwand zur Darstellung der MCM-Nucleotide tatsächlich gerechtfertigt ist.[53,54] Zudem könnte sich das Auftreten zusätzlicher asymmetrischer Kohlenstoffatome als nachteilig erweisen.

Ein genereller Nachteil enzymatisch angesteuerter Pronucleotid-Systeme ist die Abhängigkeit vom aktivierenden Enzym selbst. Zellen, die das notwendige Enzym nicht oder nur wenig exprimieren, werden von dem Wirkstoff nicht erreicht. Ein weiteres Pronucleotidsystem stellt die von C. Meier *et al.* entwickelte cyclische Maske dar, welche von Enzymen unabhängig ist und durch chemische Hydrolyse abgespalten wird. Zudem wird bei diesem Prozess nur eine Maske entfernt, was die Verträglichkeit eines solchen Medikamentes erhöhen sollte. Es handelt sich um *cyclo*Saligenyl-Nucleosid-Monophosphate (*cyclo*Sal-NMP).[55-58]

2.3.3 Das *cyclo*Sal-Konzept

Ein *cyclo*Sal-Pronucleotid besteht aus dem Nucleotid sowie einer cyclischen, bidenten Maske in Form eines substituierten Salicylalkohols. Eine Besonderheit dieser Maske ist die selektiv verlaufende chemische Hydrolyse der Phosphatester-Bindungen, bedingt durch die unterschiedlichen Stabilitäten der Benzyl-, Phenyl- und Alkylphosphatesterbindungen.

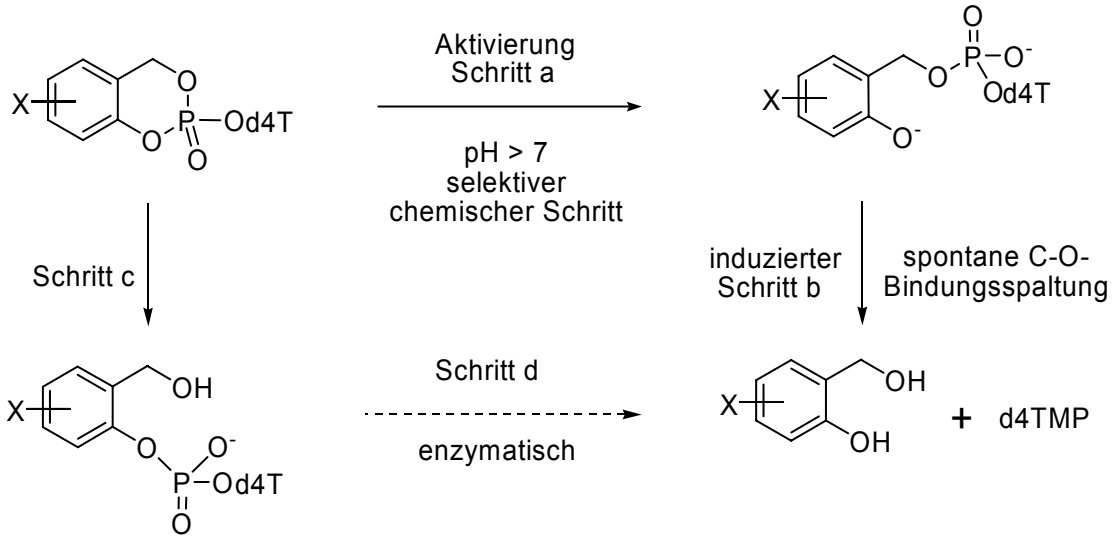


Abb. 12: Chemische Hydrolyse von *cyclo*Sal-NMP

In einem ersten Hydrolyseschritt wird die Phenylesterbindung des *cyclo*Sal-NMPs gespalten, wenn ein leicht alkalisches Medium vorliegt (physiologische pH-Bedingungen), da diese die labilste der Esterbindungen ist. Es bildet sich ein mesomeriestabilisierter (2-Hydroxybenzyl)-phosphat-d4T-diester (Schritt a). Die andere denkbare Hydrolyse führte zu einem (2-Hydroxymethylphenyl)-d4T-phosphatdiester (Schritt c). Dieser Schritt wird durch die in *ortho*-Stellung befindliche schwache Donator-Phosphatgruppe stark verlangsamt, so daß es zu einer selektiven chemischen Hydrolyse kommen kann.[59] Mit der Spaltung geht eine Umpolung des schwachen Donatorsubstituenten (Phosphatgruppe) in einen starken Donatorsubstituenten (phenolische OH-Gruppe) einher, welche die spontane Freisetzung des Wirkstoffes d4TMP und der Maske (Salicylalkoholderivat) induziert. Die Freisetzung des Wirkstoffes ist abhängig von dem Substitutionsmuster am aromatischen Ring und kann gezielt beeinflusst werden. So wurden zahlreiche Pronucleotide mit unterschiedlichem Substitutionsmuster dargestellt. Es stellte sich heraus, dass Alkylgruppen an der Maske von Vorteil sind, da sie sich stabilisierend auswirken und die Halbwertszeit erhöhen. Das 3-Methyl-*cyclo*Sal-d4TMP hat z.B. im Vergleich zur unsubstituierten Maske eine um etwa 5 Stunden verlängerte Halbwertszeit. Der *cyclo*Sal-Pronucleotid-Ansatz ist erfolgreich. Die Aktivität einiger Wirkstoffe wird durch diese Art der Maskierung beträchtlich erhöht und z.B. für das 3-Methyl-*cyclo*Sal-d4TMP bleibt die Aktivität des Wirkstoffes auch in Thymidin-Kinase defizienten Zellen (TK^-) erhalten.[58] Die Aktivität von Pronucleotiden in TK^--Zellen ist ausgesprochen interessant. Sie gibt zum einen Aufschluss über den effektiven Wirkstofftransport über die Zellmembran, zum anderen ist bekannt, dass Viren Resistenzen gegen Nucleosidanaloga durch Herabregulierung der TK-Aktivität entwickeln können.[60]

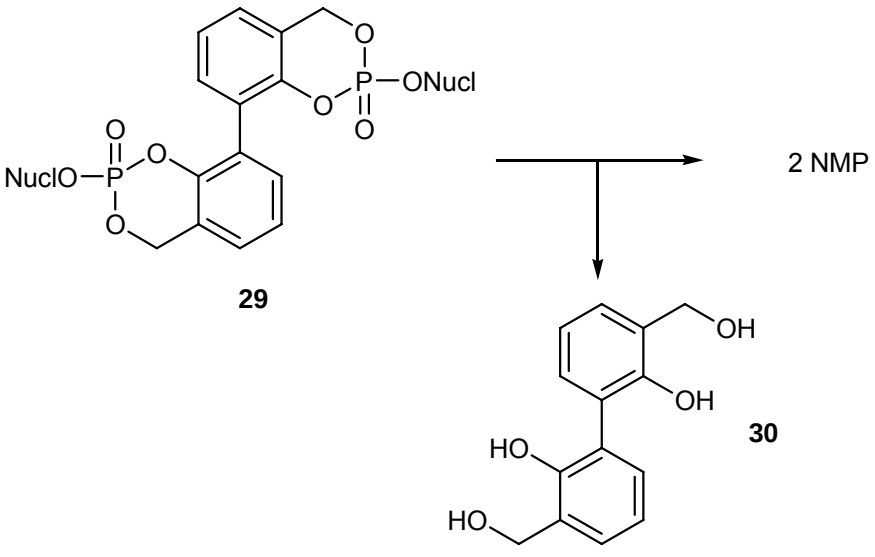
Wegen der vielversprechenden Ergebnisse der Anwendung des *cyclo*Sal-Konzeptes auf d4T wurden auch andere Nucleosidanaloga untersucht. Die folgende Auflistung soll einen Überblick über die breite Anwendbarkeit geben.

- d4T **3** (TK-Bypass)[61]
- ddA und d4A (ADA-Bypass)[62]
- acyclische Nucleosidanaloga, z.B. ACV **7**[63]
- ABC **5** und Carbovir[64]
- BVdU **11** (erstmalige Darstellung anti-EBV-aktiver BVdU-Derivate)[65]

Das *cyclo*Sal-Konzept hat inzwischen einige beträchtliche Erweiterungen erfahren, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

Da bei der rein chemischen Hydrolyse zum Salicylalkohol und dem NMP die Einstellung eines Diffusionsgleichgewichts über die Zellmembran zu erwarten ist, wurden *cyclo*Sal-Pronucleotide der zweiten Generation entwickelt. Hierbei wurde darauf gezielt, das Diffusionsgleichgewicht zu stören und zugunsten einer intrazellulären Akkumulation zu verschieben.[66-68] Die Optimierung solcher Pronucleotide ist ein Teil dieser Arbeit, daher soll an entsprechender Stelle näher darauf eingegangen werden. Auch die Umwandlung des ursprünglich rein chemisch ablaufenden Hydrolysemechanismus in einen enzymatisch aktivierten Prozess konnte inzwischen vollzogen werden.[69] In diesem Fall wird von *cyclo*Sal-Pronucleotiden der dritten Generation gesprochen.

Da ein unbestrittener Vorteil von *cyclo*Sal-Pronucleotiden das Verhältnis von Maske zu Wirkstoff ist, wurden weiterhin Anstrengungen unternommen, dieses Verhältnis noch zu verbessern, was zu der Entwicklung von Bis-*cyclo*Sal-Nucleotiden **29** führte. Das hierbei erhaltene Wirkstoff-Maske-Verhältnis von 2:1 ist auf dem Gebiet der Pronucleotide einmalig.[70]



29 **30**

Abb. 13: Hydrolyse von Bis-*cyclo*Sal-NMP **29** zu zwei NMP und Maske **30**

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass *cyclo*Sal-Nucleotide auch für synthetische Zwecke als aktivierte Phosphatdonatoren nützlich sind. Neben der einfachen Hydrolyse von *cyclo*Sal-NMP zu den entsprechenden NMP kann auch eine

Umsetzung mit anderen Nucleophilen als Wasser durchgeführt werden. Auf diese Weise lassen sich aus dem Pronucleotid **31** ebenso die Di- und Triphosphate **32**,**33** freisetzen. Zudem erhält man durch Umsetzung mit Pyranose-1-Phosphaten **34** die biologisch interessanten Nucleosiddiphosphat-Pyranosen **35** in zuverlässig guten Ausbeuten und mit definierter Stereochemie am anomeren Kohlenstoffatom.[71]

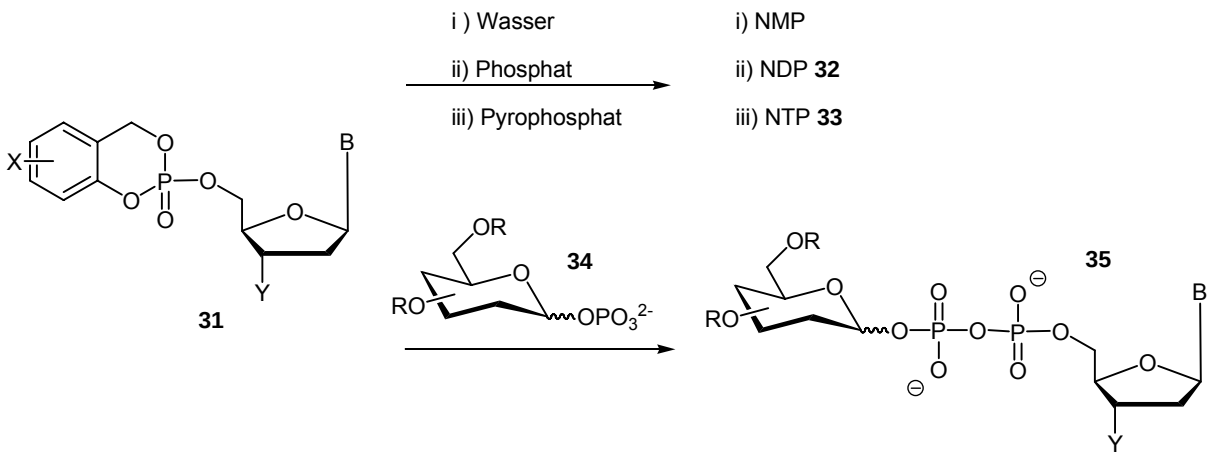


Abb. 14: Synthetische Anwendung von *cyclo*Sal-NMP **31**

2.4 Fluoreszenzmarkierte Nucleoside

Nucleoside können an ihren verschiedenen funktionellen Gruppen mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern kovalent verknüpft werden. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass der Fluorophor aus einer großen Palette relativ frei gewählt werden kann, so dass die Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie weitere Eigenschaften dem jeweils untersuchten System angepasst werden können. Ein gravierender Nachteil besteht darin, dass die Fluoreszenzmarker meist von beträchtlicher Größe sind und die so erhaltenen Moleküle oft nicht vergleichbare Eigenschaften mit denen der Stammverbindungen aufweisen. Es kann z.B. durch eine Fluoreszenzmarkierung die Basenpaarungsfähigkeit vollständig eingebüßt werden. Möchte man Diffusionseigenschaften untersuchen, ist eine solche Markierung auch nicht zuträglich, da sie offensichtlich die Lipophilie gravierend beeinflusst. Ein prominentes Anwendungsbeispiel fluoreszenzmarkierter Nucleotide ist die Sequenzbestimmung durch die Sanger-Methode, bei welcher unterschiedliche Fluoreszenzmarker gewählt werden. Im Folgenden sind einige fluoreszenzmarkierte Nucleoside dargestellt.[72] Dabei handelt es sich der Reihe nach um eine Modifikation

der exocyclischen Aminogruppe mit Fluorescein (**36**), eine Modifikation an der 2´-Position mit einem Dansyl-Marker (**37**) und eine Modifikation an der 3´-Position mit einem Pyren-Marker (**38**).

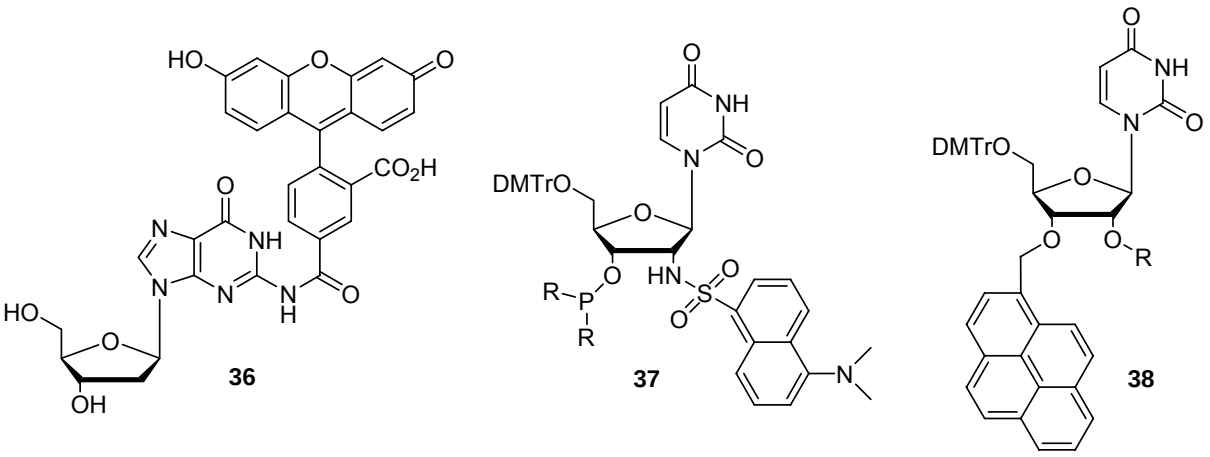


Abb. 15: Einige fluoreszenzmarkierte Nucleoside

2.5 Interkalationsfarbstoffe

Interkalationsfarbstoffe bieten die Möglichkeit der DNS-Visualisierung ohne kovalente Verknüpfung des Farbstoffes mit den Nucleobasen. Als wohl prominentestes Beispiel sei an dieser Stelle Ethidiumbromid **39** genannt, welches bei Gelelektrophoresen verwendet wird.

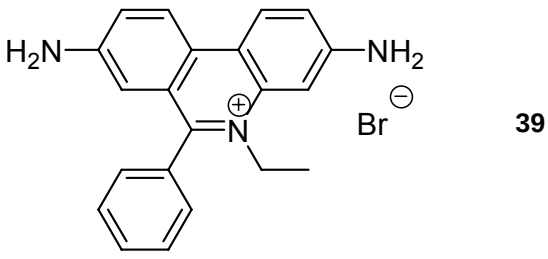


Abb. 16: Ethidiumbromid

2.6 Intrinsisch fluoreszierende Nucleoside

Als intrinsisch fluoreszierende Nucleoside werden solche bezeichnet, bei denen die Nucleobase selbst die fluorophore Gruppe ist. Dies kann teilweise durch geringe Veränderungen der fünf Nucleobasen A, T, G, C oder U erreicht werden. Der Vorteil

ist hierbei, dass diese intrinsisch fluoreszierenden Nucleoside sich nur geringfügig von ihren Stammverbindungen unterscheiden und somit stark ähnliche Eigenschaften haben sollten. Es ist z.B. *iso*-A in der Lage, normale H-Brücken mit T auszubilden. Ein Unterschied zu A ist, dass auch H-Brücken zu C gebildet werden können (s. Abbildung 17), was bei DNA-Inkorporation zu Mutationen führen kann.[73]

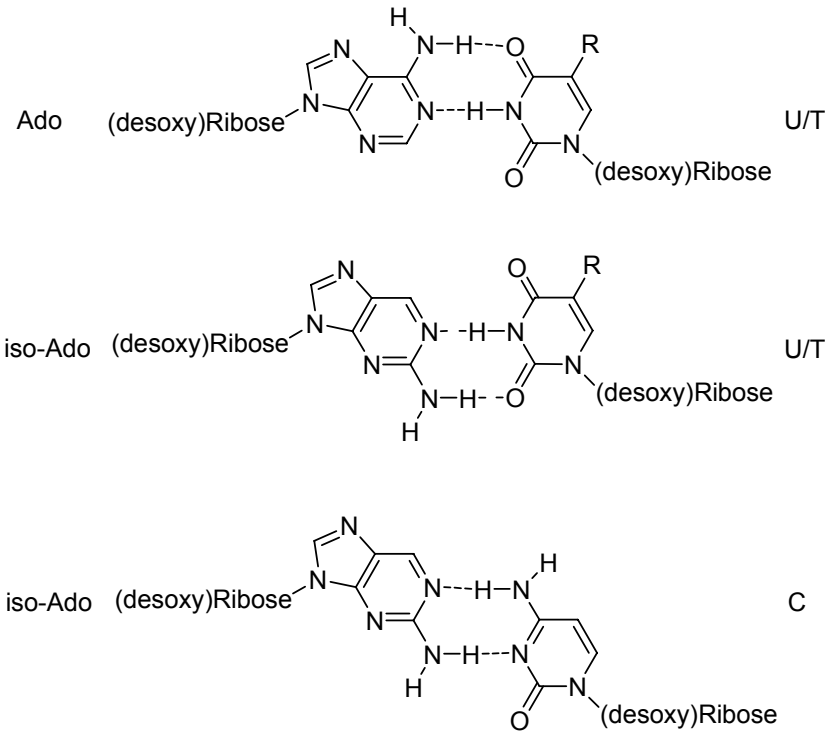
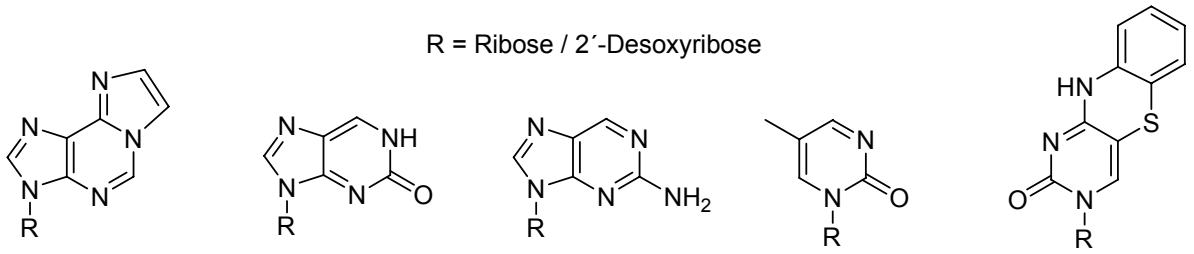


Abb. 17: Basenpaarung von Ado und dessen fluoreszierenden Analogons *iso*-Ado

Von Nachteil ist, dass die Nucleobasen nicht unbedingt hohe Quantenausbeuten besitzen. Außerdem kann die Emissionswellenlänge nicht frei gewählt werden. In Abbildung 18 sind einige intrinsisch fluoreszierende Nucleoside dargestellt.



1,N^6-Etheno adenosin **40**

iso-Inosin **41**

iso-Adenosin **42**

m^5K **43**

1-β-**D**-2´-Desoxyribofuranosyl-3,5-diaza-4-oxopheothiazin **44**

Abb. 18: Einige intrinsisch fluoreszierende Nucleosid-Analoga

2.7 Fluoreszierende Basensubstitute

Zuletzt ist es möglich, die Nucleobase durch einen fluoreszierenden, unpolaren aromatischen Rest zu ersetzen, welcher über eine C-glykosidische Bindung an den Zucker gebunden und welcher nicht in der Lage ist, Wasserstoffbrücken auszubilden. Im Folgenden sind einige Beispiele für eine solche Vorgehensweise abgebildet.[72]

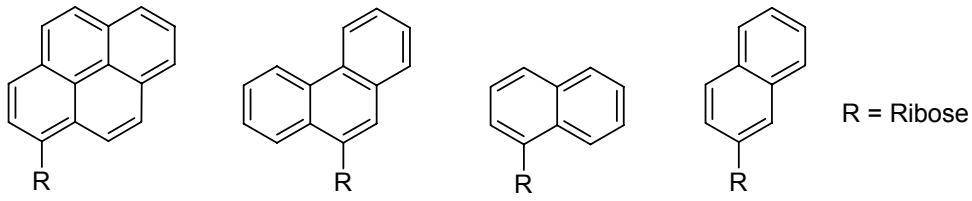
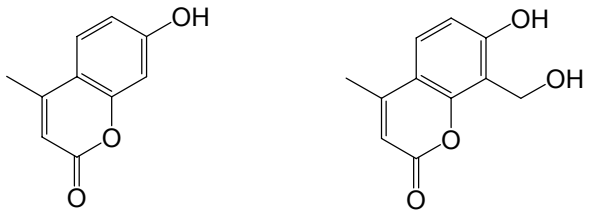


Abb. 19: Einige fluoreszierende Basensubstitute

2.8 Markierung von Nucleosid-Analoga durch fluoreszierende Masken

Durch die Verwendung einer *cyclo*Sal-Einheit als Maskierungsfunktion ergibt sich prinzipiell noch eine andere Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung: Die Maskierung mit einer fluoreszierenden *cyclo*Sal-Einheit. Dieser Ansatz wurde bereits mit einem *cyclo*Sal-Derivat des fluoreszierenden 4-Methyl-umbelliferon **45** verfolgt.[74] Leider verläuft die Hydrolyse des Prodrugs nicht zu dem gewünschten Monophosphat, so dass in dieser Arbeit nun die analytischen Möglichkeiten mit intrinsisch fluoreszierenden Nucleosiden vertiefend ausgelotet werden sollten.



45 **46**

Abb. 20: 4-Methyl-Umbelliferon **45** und dessen Salicylalkoholderivat **46**

3 Aufgabenstellung

1. „lock-in“-Modifikation von *cyclo*Sal-Pronucleotiden
2. Synthese intrinsisch fluoreszierender Nucleosidanaloga
3. Entwicklung eines Diphosphat-Prodrug Konzeptes

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese von “lock-in”-modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden. Dabei sollten die Hydrolysehalbwertszeiten bereits dargestellter POM-funktionalisierter *cyclo*Sal-NMP erhöht werden.[66,67] Zudem wurde eine Modifikation von *cyclo*Sal-Pronucleotiden durch Verknüpfung mit Aminosäurestern angestrebt. Diese Erweiterung des *cyclo*Sal-Konzeptes zielt auf einen intrazellulären Einschluss der Verbindungen, um einen Efflux über die Zellmembran zu unterbinden. Die Maskierungen sollten für analytische Zwecke nicht nur an antiviral aktive Nucleosidanaloga, sondern ebenso an strukturell verwandte intrinsisch fluoreszierende Nucleosidanaloga geknüpft werden.[75] Für diese Zwecke mussten nicht nur die Maskierungen, sondern auch Nucleobase und Zucker entsprechend umgewandelt werden. Die Effektivität der Prodrugs sollte durch Auswertung der antiviralen Profile erfolgen. Der Membrantransport sollte aus den antiviralen Daten abgeleitet werden. Zudem sollten die intrinsisch fluoreszierenden Nucleoside mittels Fluoreszenzmikroskopie in Zelltests untersucht werden. Alle Verbindungen sollten hinsichtlich ihrer Hydrolyseeigenschaften in biologischen Medien und Puffersystemen untersucht werden. In der folgenden Abbildung ist eine Zusammenfassung der Zielverbindungen dieses Themenbereiches angegeben.

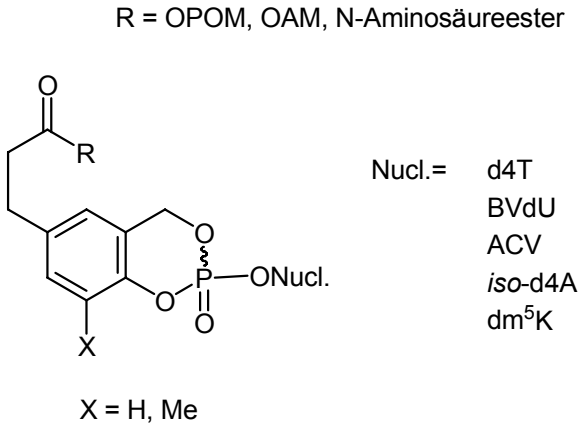


Abb. 21: „lock-in“-modifizierte *cyclo*Sal-Triester

Die erstmalige Entwicklung und Evaluierung eines NDP-Prodrug Systems waren das andere Ziel dieser Arbeit. Hierzu sollten Nucleosiddiphosphate reversibel maskiert werden, um einen Transport über die Zellmembran zu ermöglichen. Innerhalb der Zelle sollte dann das entsprechende NDP effektiv freigesetzt werden. Die Bestimmung der Stabilität und der Hydrolyseeigenschaften sollte in verschiedenen biologischen Medien und Puffersystemen erfolgen. Die passive Diffusion über Zellmembranen und die effektive Freisetzung der Wirkstoffe innerhalb der Zelle sollte anhand von antiviralen Daten und durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Die folgende Abbildung zeigt die zu untersuchenden Verbindungen.

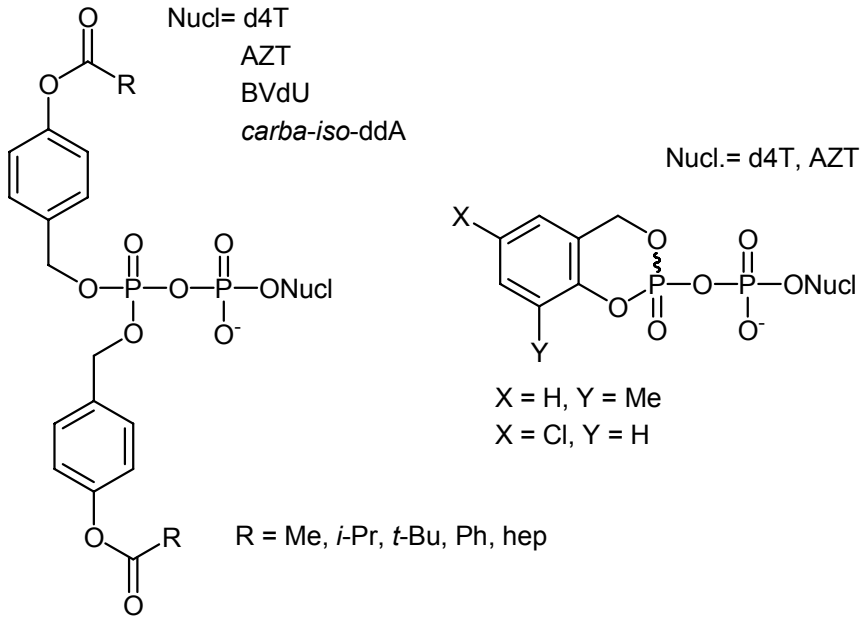


Abb. 22: Bis-(4-Acyloxybenzyl)NDP-prodrugs und *cyclo*Sal-NDP-prodrugs

4

Intrazellulärer Einschluss von *cyclo*Sal-Pronucleotiden

4.1 „Lock-in“-Konzept

Dieses Kapitel handelt von *cyclo*Sal-Pronucleotiden der zweiten Generation, welche derart modifiziert sind, dass die Einstellung eines Diffusionsgleichgewichts der Prodrugs über die Zellmembran zugunsten einer intrazellulären Akkumulation gestört wird. Eine solche Verschiebung kann durch Anbringen eines Restes gelingen, welcher empfindlich auf intrazellulär aktive Enzyme reagiert. Dadurch wird die Verbindung dem Gleichgewicht entzogen. Zudem sollte es möglich sein, diese enzymatische Reaktion so zu gestalten, dass das lipophile Prodrug in ein deutlich polareres Prodrug überführt wird, um die Rückdiffusion in die extrazelluläre Matrix zu erschweren oder zu unterbinden.

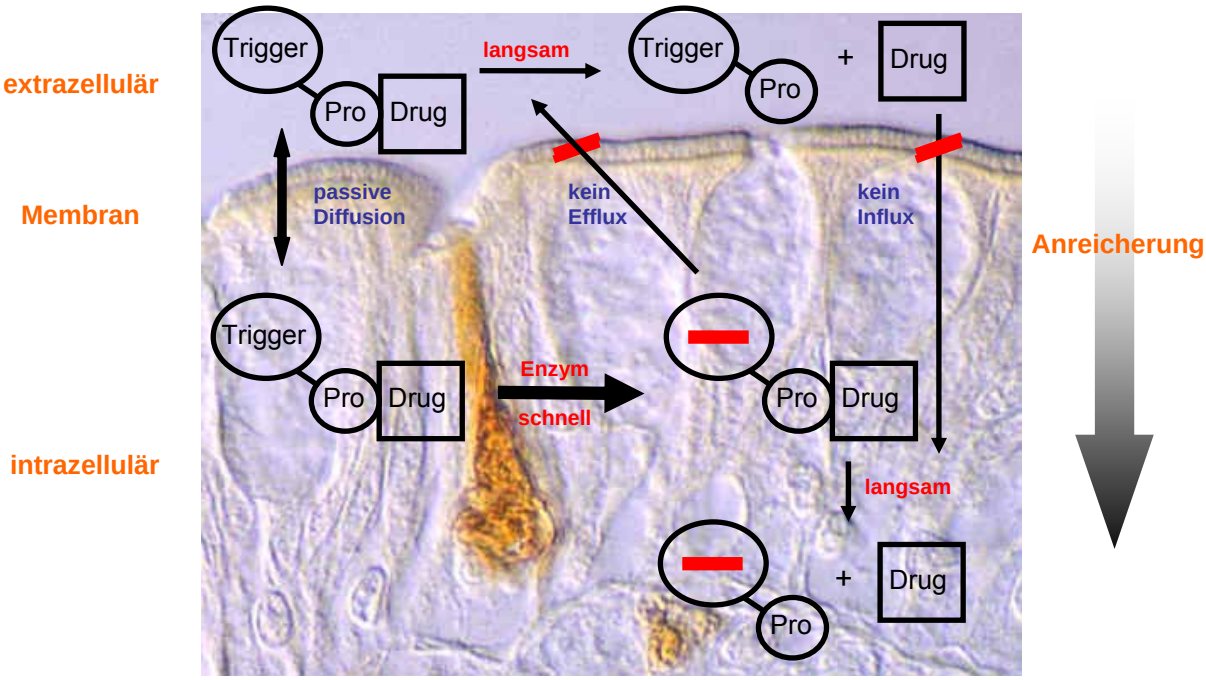


Abb. 23: Konzept des intrazellulären Einschlusses von *cyclo*Sal-Pronucleotiden („lock-in“-Pronucleotide)

Die Synthese solcher Verbindungen wurde in unserer Arbeitsgruppe mit unterschiedlichen Ansätzen vorangetrieben. In den folgenden Abschnitten sollen diese kurz beschrieben und miteinander verglichen werden. Die enzymatische Aktivierung von *cyclo*Sal-Pronucleotiden der dritten Generation wird hier nicht diskutiert.

4.1.1 Einfache Ester zur „lock-in“-Modifikation

Eine Herangehensweise an das oben beschriebene Problem ist das Anfügen einfacher Estergruppierungen an das *cyclo*Sal-Ringsystem.[76,77] Um die zusätzlichen funktionellen Gruppen von dem Aromaten zu isolieren, wurde ein Spacer verwendet, dessen Standardlänge zunächst zwei C-Atome betrug. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass der C_2-Spacer die funktionelle Gruppe vermutlich nicht vollständig vom Aromaten isoliert, so dass auch längere Spacer untersucht wurden. Als Referenznucleosid wurde d4T verwendet. Die folgend abgebildeten Verbindungen **47a-d**, **48a,b** und die Referenzverbindungen **49,50** mit C_2-Spacer wurden zunächst dargestellt.

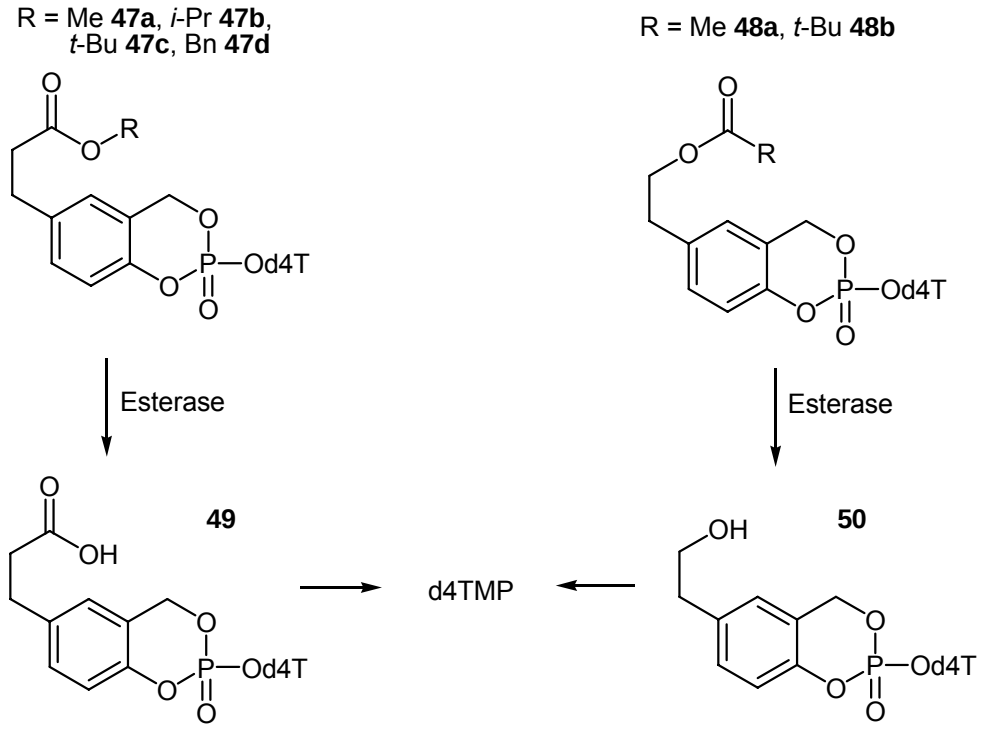


Abb. 24: Potentielle „lock-in“-Modifikationen von *cyclo*Sal-Pronucleotiden

Untersuchungen in humanem CEM/0-Zellextrakt ergaben für die Verbindungen **47a-d** nicht das gewünschte Resultat, da eine Spaltung des Esters zu der Säure **49** nicht beobachtet wurde. Die Verbindungen **48a,b** hingegen setzten unter gleichen Bedingungen den Alkohol **50** frei. Aus den antiviralen Daten der Verbindungen gegen HIV-1 und HIV-2 in CEM/0 und CEM/TK^- wurden folgende Schlüsse abgeleitet:

1. Alle modifizierten Pronucleotide gelangen über die Zellmembran.

2. Die Säure **49** passiert die Zellmembran nicht (Inaktiv in TK-defizienten Zellen). Würde sie freigesetzt, hätte man daher den intrazellulären Einschluss erreicht.
3. Der Alkohol **50** zeigt Aktivität in TK$^-$-Zellen. Ein Einschluss des Triesters kann auf diese Wiese folglich nicht erreicht werden.

Um die Spaltung eines Esters zur Freisetzung einer Säurefunktion am *cyclo*Sal-d4TMP durch Esterasen zu ermöglichen, wurde der Spacer verlängert. Zu diesem Zweck wurde von D. Vukadinovic-Tenter eine neue Syntheseroute, basierend auf Suzuki-Kreuzkupplungen, entwickelt.[78] Dies ermöglicht die flexible Einführung von Spacern.

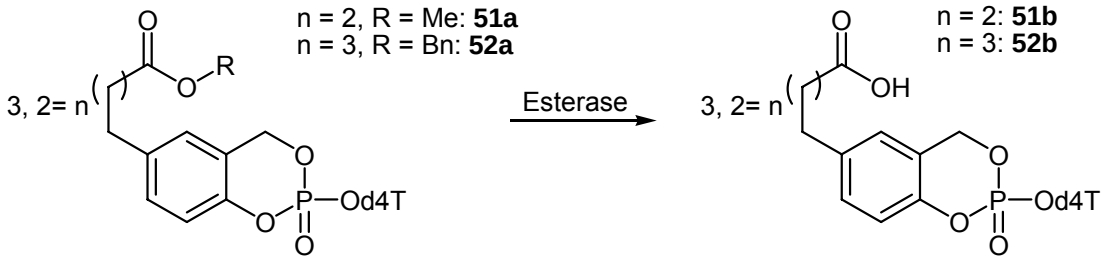


Abb. 25: Potentielle „lock-in"-Modifikationen mit variablem Spacer

Untersuchungen der Verbindungen **51a,b** in CEM/0-Zellextrakt deuteten auf keine Spaltung der Esterfunktion hin. In Mausleberextrakt konnte hingegen mit einer Halbwertszeit von 0.1 h die enzymatische Hydrolyse von **52a** zu **52b** beobachtet werden. Die chemische Hydrolyse (PBS, pH= 7.3) von **52a** zu d4TMP findet im Vergleich mit einer Halbwertszeit von 4.0 h statt. Dies bedeutet eine 40fache Beschleunigung im zellulären Medium. Unglücklicherweise zeigte Verbindung **52a** keine Aktivität in CEM/TK$^-$. Da durch die Einführung verlängerter Spacer keine hinreichende Enzymaffinität der Pronucleotide in CEM/0-Zellen erreicht werden konnte, wurde die Einführung komplexer Ester untersucht. Diese Vorgehensweise wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.1.2 Acylale zur „lock-in"-Modifikation

Wie im Kenntnisstand bereits beschrieben (s.S. 10), können Acylale zur enzymatisch reversiblen Maskierung von Säuren verwendet werden. Dieses Konzept wurde nun auf *cyclo*Sal-Triester angewendet. Zur Untersuchung der „lock-in"-Eigenschaften

wurden die folgenden Pronucleotide **53a-c** dargestellt. Die Abbildung gibt zudem Aufschluss über den postulierten Hydrolysemechanismus der Verbindungen.

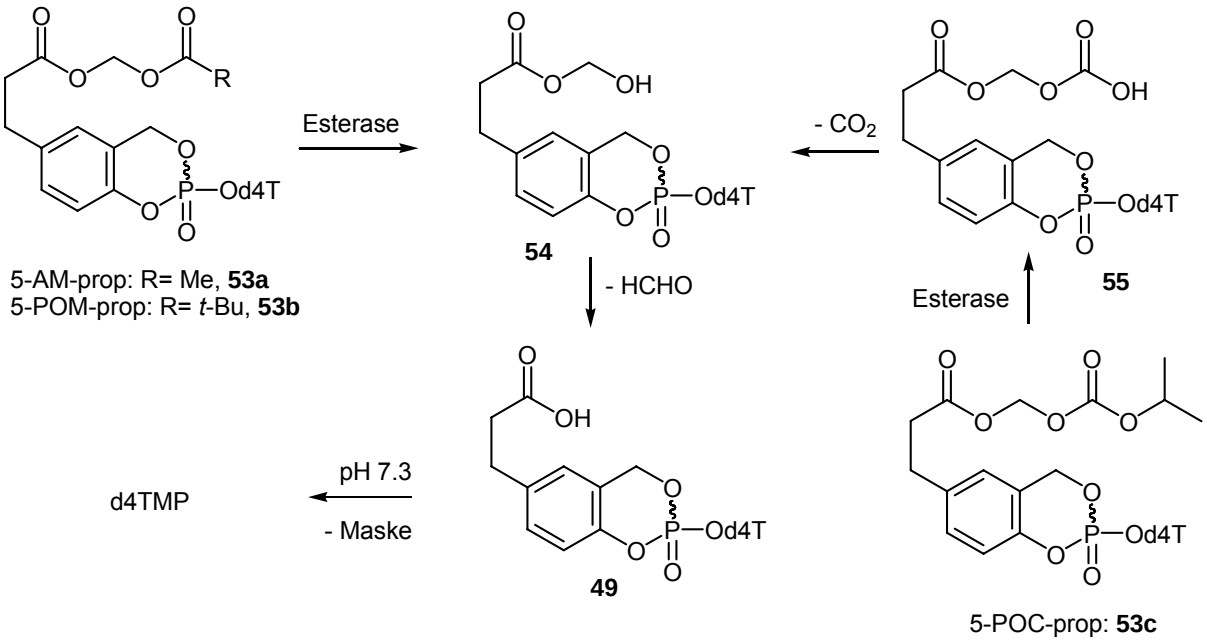


Abb. 26: Postulierter Hydrolysemechanismus für Acylal-modifizierte *cyclo*Sal-Pronucleotide

Sowohl das POM- als auch das AM-Acylal **53a,b** werden durch Esterase in das instabile Intermediat **54** überführt. Das POC-Acylal **53c** durchläuft einen zusätzlichen Schritt über die Freisetzung eines Kohlensäurehalbesters **55**, der durch spontanen Zerfall in CO_2 und Intermediat **54** übergeht. Dieses instabile Intermediat setzt Formaldehyd und die Säure **49** frei, welche bei physiologischem pH-Wert deprotoniert vorliegen sollte. Aus der Säure **49** kann nun durch chemische Hydrolyse d4TMP entstehen. Die oben abgebildeten Verbindungen **53a-c** konnten erfolgreich dargestellt werden.[58] Es konnte durch HPLC-Analytik nachgewiesen werden, dass aus den Verbindungen in humanem CEM/0 Zellextrakt die Säure **49** mit $t_{1/2}$= 0.25 h für **53a**, $t_{1/2}$= 0.38 h für **53b** und $t_{1/2}$= 0.9 h für **53c** entsteht. Die chemische Hydrolysehalbwertszeit bei pH= 7.3 liegt hingegen bei 4.5 h. Somit konnte ein deutlicher Unterschied zwischen chemischer und enzymatischer Stabilität erzeugt werden, eine Voraussetzung für den erfolgreichen intrazellulären Einschluss. Als weitere Voraussetzung sei die Stabilität im extrazellulären Medium genannt. Tritt hier ebenso eine merkliche Spaltung des Acylals auf, wird das Medikament am Zelleintritt gehindert, also genau der gegenteilige Effekt des Angestrebten erzeugt. Daher wurden die Verbindungen **53a-c** hinsichtlich ihrer Stabilität in humanem Blutserum

(5%, pH= 6.8) untersucht. Eine Spaltung der AM-, POM- und POC-Acylale wurde unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Gerade im Bezug auf POM- und POC-Acylale ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da solche Maskierungen bereits in der klinischen antiviralen Therapie verwendet werden (Hepsera®, Viread®). Von den Verbindungen **53a**-**c** wurden die antiviralen Aktivitäten gegen HIV-1 und HIV-2 sowie deren Cytotoxizitäten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, ermittelt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die erhaltenen Daten.

	EC_{50}[a] [μM]			CC_{50}[b] [μM]
	CEM/0		CEM/TK$^-$	CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	**HIV-2**	
5-(AM-prop) **53a**	0.20 ± 0.11	0.53 ± 0.39	25.0 ± 19.1	81.1 ± 1.4
5-(POM-prop) **53b**	0.23 ±0.04	0.33 ± 0.11	0.70 ± 0.08	23.8 ± 4.0
5-(POC-prop) **53c**	0.26 ± 0.20	0.60 ± 0.00	1.73 ± 1.97	73.6 ± 12.0
Säure **49**	0.14 ± 0.10	0.80 ± 0.20	50.0 ± 30.0	73.6 ± 0.0
d4T **3**	0.19 ± 0.13	0.48 ± 0.32	7.5 ± 6.1	112 ± 15

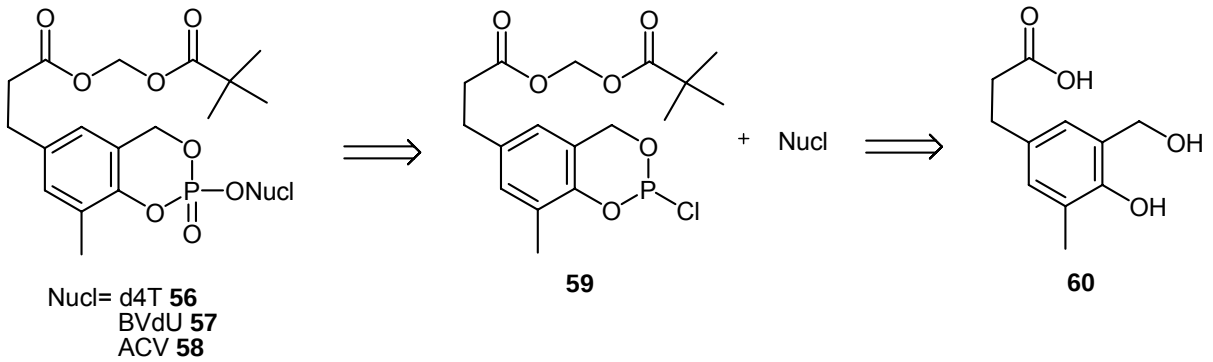
[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration
Tab. 1: Antivirale Profile von **53a**-**c** und der Referenzverbindungen **49** und **3**

Die Deutung dieser Daten ist aufgrund der teilweise extremen Standardabweichungen nicht einfach. Sie wurden aber dahingehend interpretiert, dass **53b** als einzige der Verbindungen einen effektiven TK-Bypass erzeugt.[79] Dies bedeutet für die anderen Verbindungen eine nur geringe Permeation der Zellmembran, was schließlich auf die Spaltung des AM- und POC-Acylals unter den Bedingungen des Inkubationsmediums zurückgeführt werden konnte. Für beide Acylale zeigte sich eine deutliche Verkürzung von $t_{1/2}$ im RPMI-Medium (+10% hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum; FCS) unter anteiliger Freisetzung der Säure **49**. Das POM-Acylal war hingegen unter diesen Bedingungen stabil und konnte daher effektiv d4TMP in der Zelle freisetzen. Aus der Tabelle lässt sich nun allerdings ein weiteres Problem ablesen: die vergleichsweise hohe Cytotoxizität des Pronucleotids **53b**. Ein Problem bei der Verwendung von POM-Acylalen stellt die

Entstehung von Pivalinsäure dar, welche nicht metabolisiert wird und somit innerhalb der Zellen akkumuliert. Dies trägt zur erhöhten Toxizität der Verbindungen bei. Ein weiteres Problem der oben beschriebenen Acylale **53a**-**c** ist die geringe chemische Stabilität mit einer Halbwertszeit von etwa 4.5 h, welche am unteren Rand der für *cyclo*Sal-Pronucleotide erforderlichen Stabilität bei pH= 7.3 liegt. Es war daher ein Ziel dieser Arbeit, die chemische Stabilität zu erhöhen, gleichzeitig aber die enzymatische Hydrolyse nicht zu behindern. Ein weiteres Ziel war die Vermeidung der Freisetzung von Pivalinsäure, um die Cytotoxizität zu verringern. Im Folgenden soll zunächst auf die Erhöhung der chemischen Stabilität eingegangen werden.

4.1.2.1 Zielverbindungen und Synthesestrategie

Um die Stabilität der POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide zu erhöhen, bieten sich generell zwei unterschiedliche Vorgehensweisen an. So besteht die Möglichkeit, Spacer und POM-Acylal über die 3-Position des Aromaten mit dem Pronucleotid zu verknüpfen. Da aber erste Versuche mit der Funktionalisierung der 3-Position nicht sehr erfolgversprechend verliefen, wurde die zweite Möglichkeit verfolgt: Die Einführung einer Methylgruppe in 3-Position unter gleichzeitiger Belassung der „lock-in"-Modifikation in 5-Position. Dieses Vorgehen bewirkt eine höhere Elektronendichte im aromatischen System des *cyclo*Sal-Restes, was die Stabilität der phenolischen Phosphatester-Bindung erhöht, so dass die Hydrolyse insgesamt verlangsamt wird. Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die Zielstrukturen **56**-**58** und deren retrosynthetische Analyse.



Nucl= d4T **56**
BVdU **57**
ACV **58**

59 **60**

Abb. 27: Retrosynthetische Analyse der Zielverbindungen **56-58**

Um das „lock-in"-Konzept auch auf andere Nucleoside anwenden zu können, ist eine Einführung der POM-Funktionalisierung vor der Kupplung mit dem Nucleosid

wünschenswert. Die prinzipielle Möglichkeit eines solchen Vorgehens wurde in vorangegangenen Arbeiten aufgezeigt.[75] Um eine möglichst breite Anwendbarkeit des Konzepts zu demonstrieren, sollten die Zielverbindungen 3-Me-5-(POM-prop)*cyclo*Sald4TMP **56**, 3-Me-5-(POM-prop)*cyclo*SalBVdUMP **57** und 3-Me-5-(POM-prop)*cyclo*SalACVMP **58** dargestellt werden. Im Fall von BVdU **11** liegt eine 3´-OH-Gruppe vor, bei ACV **7** handelt es sich um ein acyclisches Purin-Nucleosid. Zudem könnte es aufschlussreich sein, das Hydrolyseverhalten der unterschiedlichen Verbindungen zu vergleichen. Zur Synthese der Verbindungen war somit das Saligenylchlorphosphit **59** erforderlich, welches aus dem Salicylalkoholderivat **60** erhalten werden sollte. Dies wiederum ist eine literaturbekannte Verbindung.[80]

4.1.2.2 Synthese 3-Me-5-POM-funktionalisierter *cyclo*Sal-Pronucleotide

Als Ausgangsmaterial wurde der kommerziell erhältliche 4-Hydroxy-3-methylbenzaldehyd **61** verwendet. Die in der Literatur beschriebene Synthese ließ sich problemlos nachvollziehen.[80]

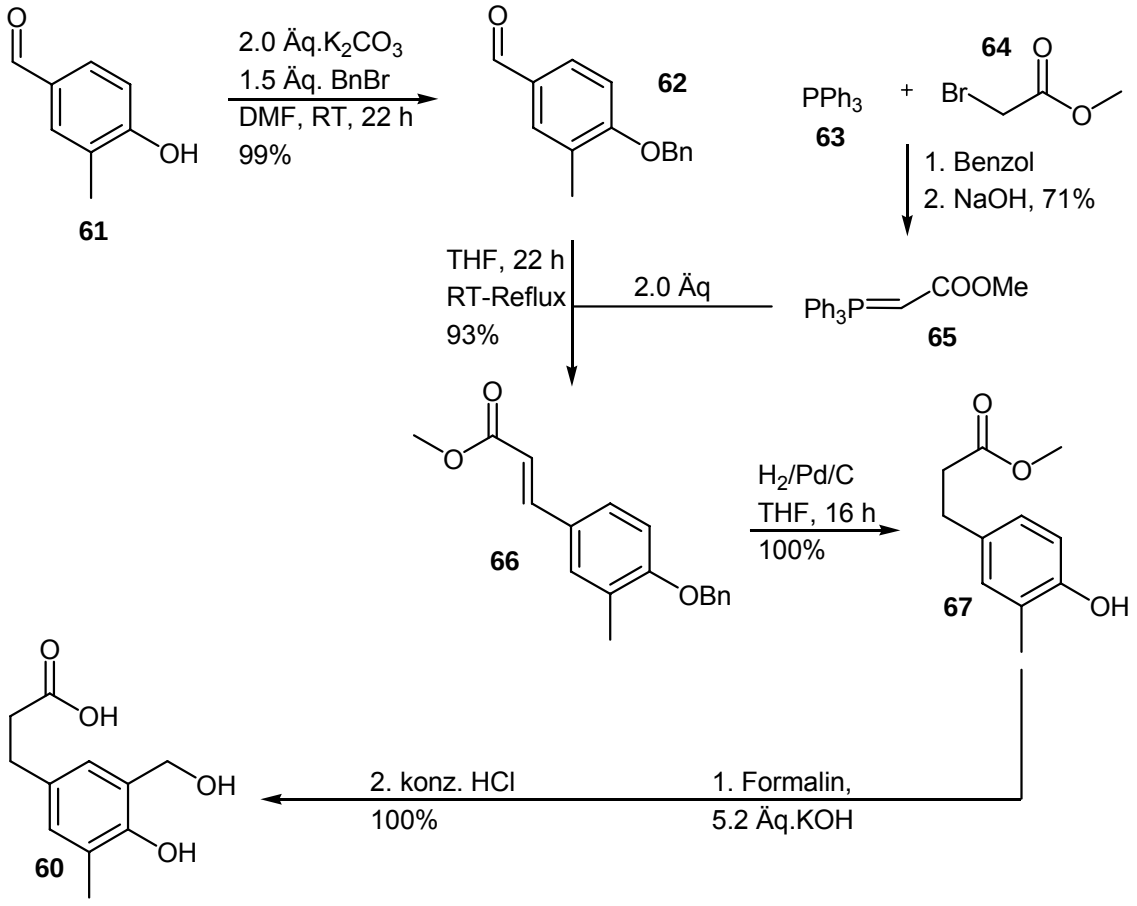


Abb. 28: Synthese des Salicylalkohols **60**

Zunächst wurde in DMF eine Schützung der phenolischen OH-Gruppe als Benzylether vorgenommen, um den Aldehyd **62** für die nachfolgende Wittig-Reaktion zu erhalten. Die Synthese verlief problemlos in quantitativer Ausbeute und ließ sich auch in größerem Maßstab (ca. 1 g **61**) durchführen. Das Wittig-Reagenz **65** konnte in großen Mengen durch Umsetzung von Triphenylphosphin **63** mit Bromessigsäuremethylester **64** und abschließender Neutralisation mit NaOH unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator dargestellt und kristallisiert werden. Nach Umsetzung von **65** mit dem Aldehyd **62** wurde *E*-selektiv (*J*= 16 Hz) das Methylacrylat **66** in 93%iger Ausbeute erhalten. Bei größeren Ansätzen (3 g Aldehyd **62**) wurde die Reinigung durch beträchtliche Mengen Triphenylphosphinoxid erschwert. Die Abtrennung gelang durch wiederholtes Ausfällen des Nebenprodukts aus Petrolether/Ethylacetat-Gemischen und Filtration. Allerdings verringerte sich die Ausbeute durch dieses Vorgehen auf 65%. Zur Vereinfachung der Reinigung könnte auf die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zurückgegriffen werden, um ein wasserlösliches Nebenprodukt zu erhalten. Da die Fällung von Triphenylphosphinoxid aber noch zu einer relativ guten Ausbeute führte, wurde die HWE-Reaktion im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Zur Entfernung der Benzylschutzgruppe bei gleichzeitiger Hydrierung der Doppelbindung wurde das Methylacrylat **66** mit Wasserstoff unter Palladium/Kohle-Katalyse umgesetzt. Die Reaktion erfolgte quantitativ und ließ sich auch mit größeren Mengen Edukt **66** durchführen. Zur Einführung der Hydroxymethylgruppe konnte der Phenol **67** im Basischen mit Formalinlösung umgesetzt werden. Das Phenolat-Anion aktiviert die *ortho*- und *para*-Positionen. Da im Fall des Phenols **67** nur eine *ortho*-Position für die elektrophile aromatische Substitution in Frage kommt, wird selektiv der Salicylalkohol **60** erhalten, da zudem durch die basischen Reaktionsbedingungen gleichzeitig der Methylester gespalten wird. Diese Umsetzung gelang für kleinere Mengen von ca. 100 mg Edukt **67** quantitativ, bei größeren Ansätzen (ca. 1 g **67**) wurde die Reinigung durch das Auftreten von Formaldehyd-Polymeren erschwert, so dass Ausbeuteverluste von etwa 10% auftraten. Insgesamt bleibt für diese Syntheseroute aber festzuhalten, dass sie einfach, mit hervorragenden Ausbeuten und durch gekoppelte Umsetzungen in nur vier Schritten zum Salicylalkohol **60** führt.

Der Salicylalkohol **68a** konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich in Verbindung **68d** umgewandelt werden.[58] Dazu wurden zunächst die alkoholischen

OH-Gruppen als cyclisches Benzylidenacetal **68b** geschützt, um dann die POM-Gruppe mit POM-Iodid und DIPEA als Base einzuführen (Weg b). Wegen der schlechten chromatographischen Eigenschaften von **68b** wurde die Reaktion auch als Eintopfreaktion durchgeführt. Dieses Vorgehen verbesserte die Gesamtausbeute von **68c** auf 68% (Weg a). Nachfolgende Entschützung durch HCl-Katalyse in der Siedehitze ergab **68d** in 79%iger Ausbeute.

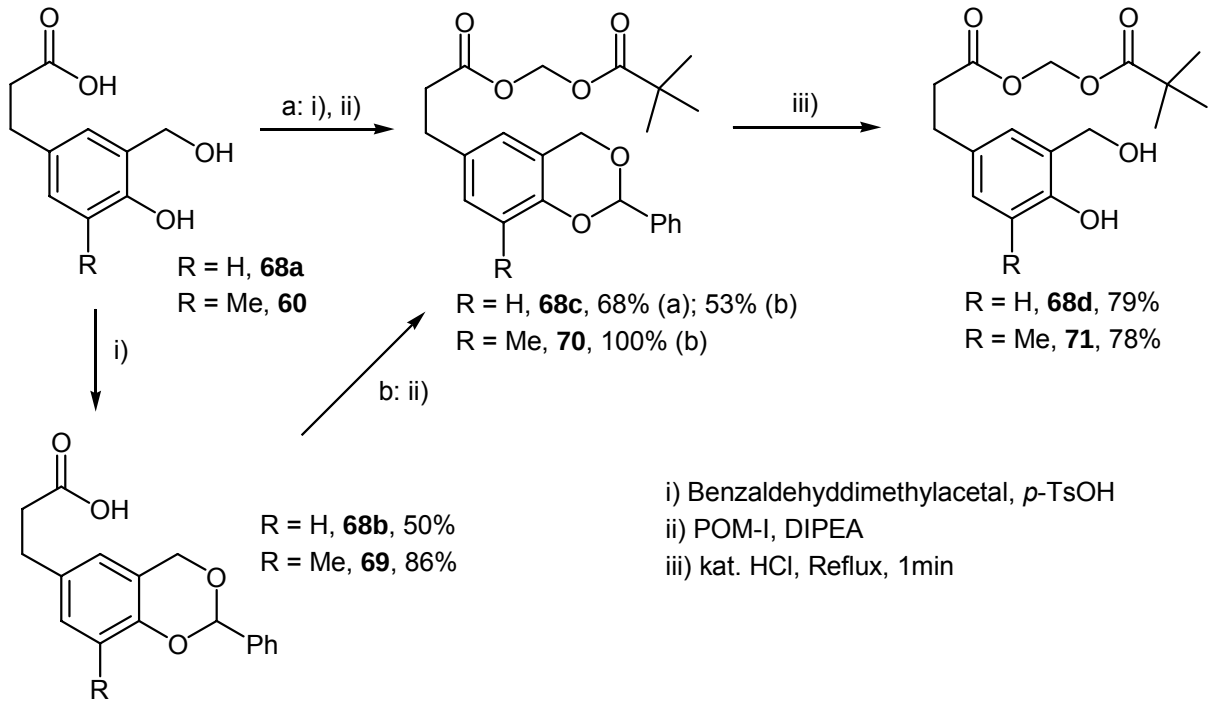


Abb. 29: POM-Funktionalisierung von Salicylalkoholen **68a**, **60**

Es wurde davon ausgegangen, dass eine Methylgruppe in 3-Position keine Störung des Syntheseverlaufs zur Darstellung von **71** hervorrufen sollte. Daher wurde analog der bekannten Umsetzung vorgegangen. Zunächst wurden die alkoholischen OH-Gruppen des Salicylalkohols **60** für die nachfolgende Funktionalisierung der Säuregruppe inaktiviert, was durch Synthese des cyclischen Benzylidenacetals **69** mit einer Ausbeute von 86% gelang. Wegen der besseren chromatographischen Eigenschaften von **69** gegenüber **68b** wurde auf die Durchführung der Eintopfreaktion (Weg a) verzichtet. Beide Verbindungen sind potentielle Synthesebausteine für weitergehende Funktionalisierungen, weswegen ihre Isolierung ausgesprochen interessant ist (s. S. 53, Abb. 51). Um die POM-Gruppe effektiv einführen zu können, ist es ratsam, POM-Iodid aus dem kommerziell verfügbaren POM-Chlorid durch Finkelstein-Reaktion darzustellen. Diese Umsetzung

verläuft quantitativ, und das Produkt kann durch Vakuumrektifikation in hoher Reinheit erhalten werden. Nach Umsetzung des Acetals **69** mit POM-I zum Syntheseintermediat **70** in quantitativer Ausbeute, wurde das Acetal durch HCl-Katalyse in der Siedehitze zum Salicylalkohol **71** gespalten. An dieser Stelle sei hervorgehoben, dass die Umsetzung zum Salicylalkohol **71** ausgehend von dem Aldehyd **61** in sieben Stufen mit einer Gesamtausbeute von 62% gelingt.

Um zu den „lock-in"-modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden **56**-**58** zu gelangen, musste der Salicylalkohol **71** in das cyclische Saligenylchlorphosphit **59** umgewandelt werden. Die Synthese wurde in Diethylether durchgeführt, um bei der Reaktion entstehendes Pyridiniumchlorid auszufällen. Nach Filtration und Evaporation des Lösungsmittels wurde **59** als Rohprodukt in 85%iger Ausbeute erhalten und direkt für die weiteren Synthesen verwendet.

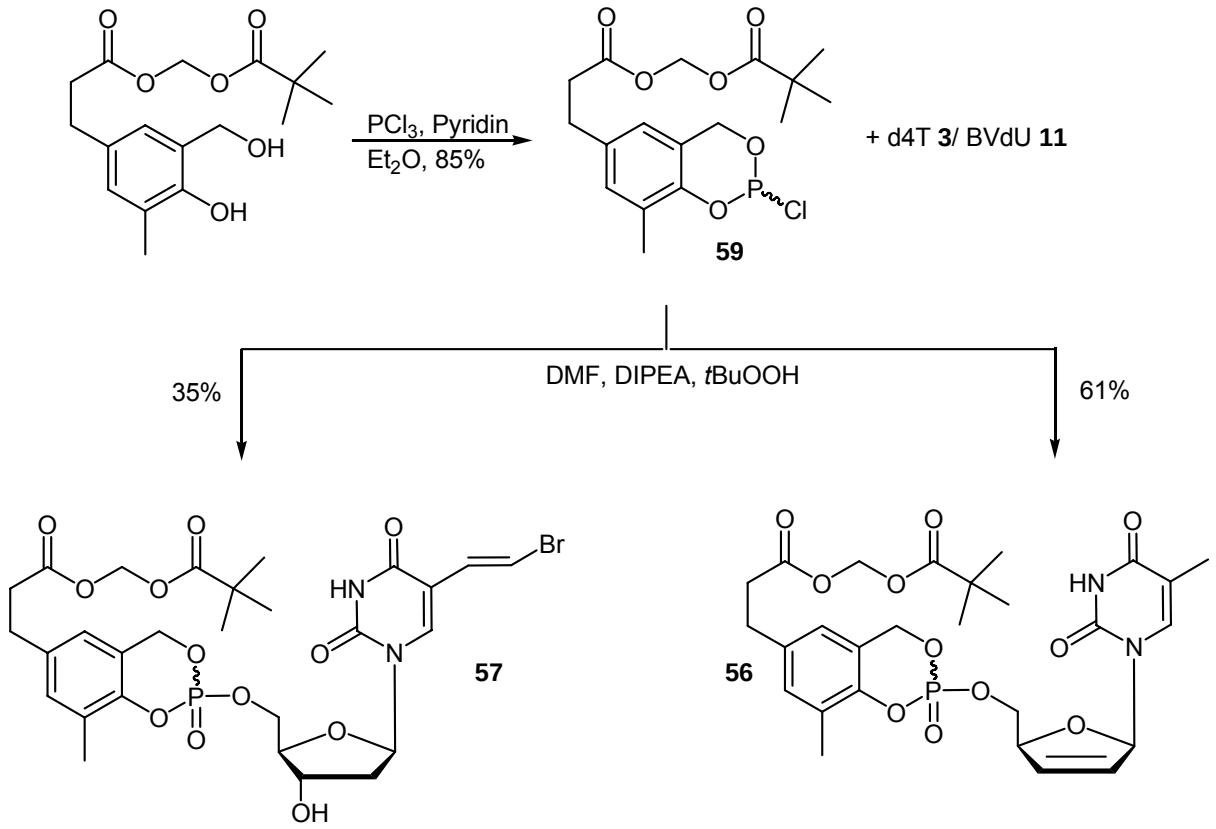


Abb. 30: Synthese der Zielverbindungen **56**, **57**

Die Kupplungen von **59** mit d4T **3** und BVdU **11** wurden auf gleiche Weise durchgeführt. Dazu wurden 1.5 Äq. der Nucleoside durch mehrfaches Coevaporieren mit Toluol getrocknet und dann in wenig DMF gelöst. Nun wurden 1.5 Äq. DIPEA

zugegeben und bei -20 °C 1.0 Äq. des Chlorphosphits **59**, gelöst in Acetonitril, über 15 min zugetropft. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde erneut auf -20 °C gekühlt und das P(III)-Intermediat durch Zugabe von 2.6 Äq. *t*-BuOOH oxidiert. Nach vollständiger Oxidation wurde die Reaktionslösung mit einem großen Überschuss Dichlormethan (angesäuert mit Essigsäure) vermischt und mit Wasser gewaschen. Ohne die Extraktion zersetzte sich das Zielmolekül bei Entfernung der Lösungsmittel. Nach chromatographischer Reinigung konnten die Zielverbindungen **56** und **57** mit 61%, bzw. 35% Ausbeute isoliert werden. Die Ausbeute für das BVdU-Derivat **57** fällt vermutlich wegen der zusätzlichen 3´-OH-Gruppe geringer aus. Insgesamt sind die Ausbeuten, insbesondere für d4T, zur Darstellung dieser komplexen Moleküle jedoch sehr gut. Für ACV **7** versagte die Synthese, ein Umstand, der auf die geringe Löslichkeit von ACV **7** in DMF und generell in organischen Lösungsmitteln zurückgeführt werden konnte. Daher musste zur Darstellung von Zielverbindung **58** ein alternativer Syntheseweg beschritten werden. So sollte zunächst ACV **7** in eine löslichere Form übergeführt werden. Hierzu bietet sich die Schützung der exocyclischen Aminogruppe mit DMTr-Chlorid an. Man erhält zunächst das doppelt DMTr-geschützte ACV-Derivat **72**. Nachfolgend kann chemoselektiv die *O*-DMTr-Schutzgruppe abgespalten werden.[81]

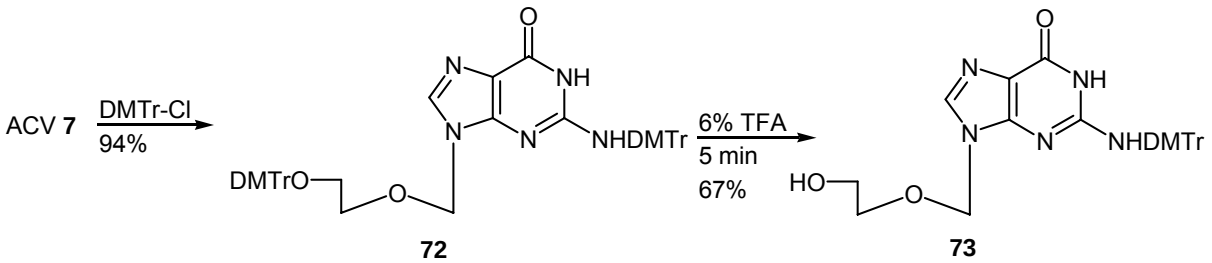


Abb. 31: Darstellung von ACV^{DMTr} **73**

Mit Verbindung **73** wurde nun die Kupplungsreaktion mit dem Chlorphosphit **59** erneut durchgeführt. Hierzu wurden 1.5 Äq. ACV^{DMTr} **73** mit Toluol coevaporiert und in wenig DMF aufgenommen. Nach Kühlung auf -20 °C wurden 2.0 Äq. DIPEA zugegeben und das Chlorphosphit **59**, gelöst in THF, über 10 min zugetropft. Die Reaktionslösung wurde nun 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Oxidation mit 2.6 Äq. *t*-BuOOH bei -20 °C wurde die Lösung mit viel DCM verdünnt und mit Wasser gewaschen. Nach Chromatographie konnte der N^2-DMTr-geschützte *cyclo*Sal-

Triester **74** in 36% Ausbeute erhalten werden. Die Schutzgruppe wurde mit 10% Trifluoressigsäure in Ethanol entfernt. Erneute Chromatographie lieferte die Zielverbindung **58** in quantitativer Ausbeute.

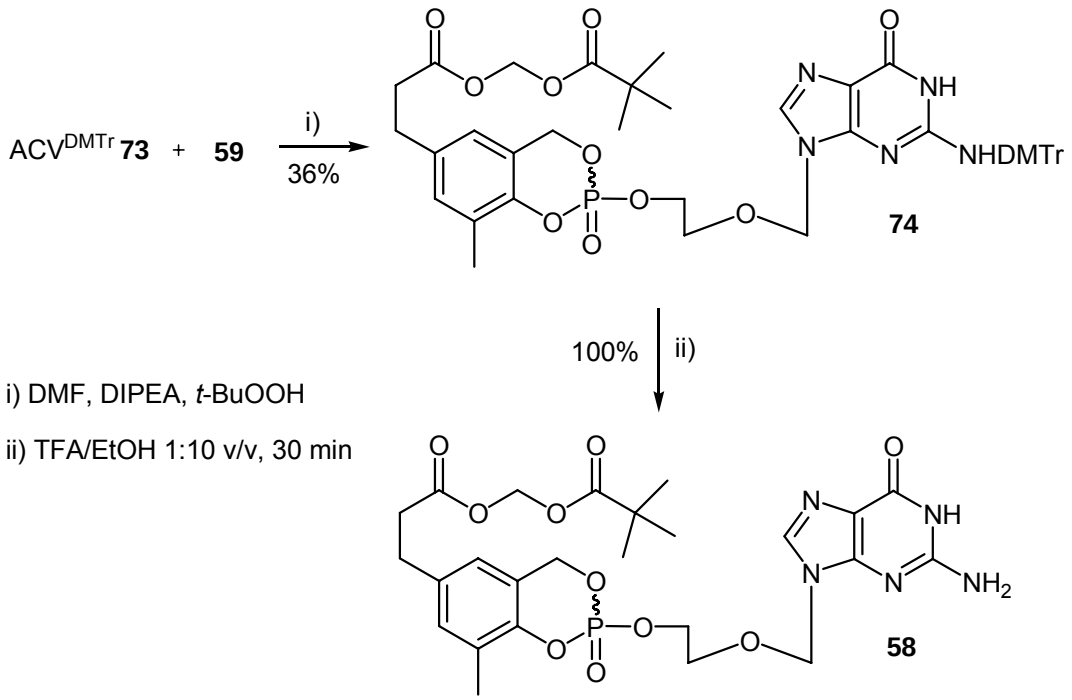
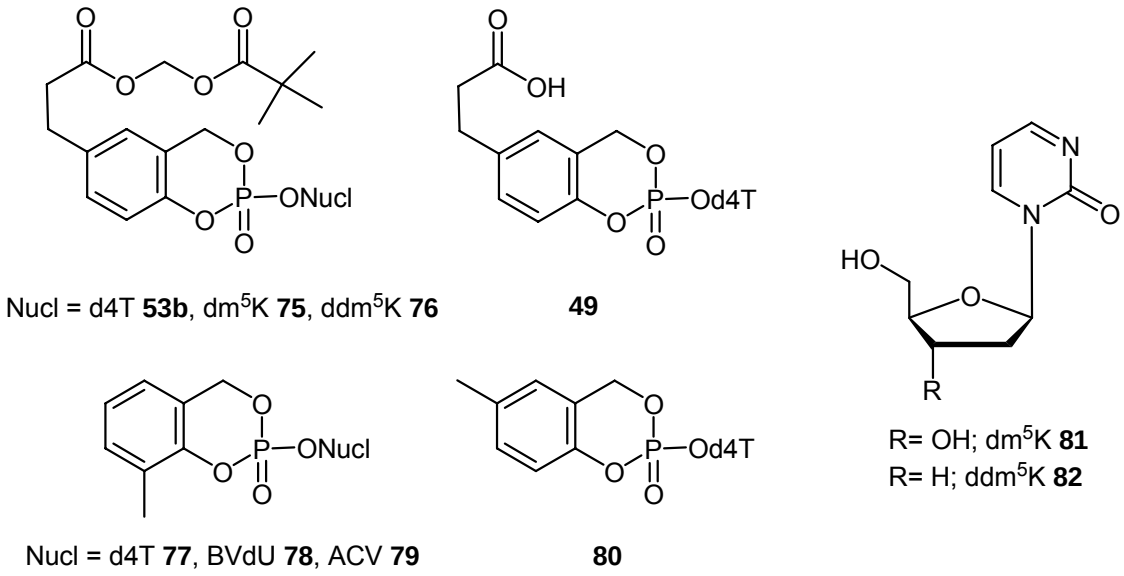


Abb. 32: Synthese der Zielverbindung **58**

Auf diese Weise konnten alle Zielverbindungen **56**-**58** in Ausbeuten von 61%, 35% und 36% dargestellt werden. Komplexe POM-funktionalisierte Verbindungen können folglich zur Maskierung von unterschiedlichen Nucleosidanaloga verwendet werden.

4.1.2.3 Charakterisierung der 3-Methyl-5-POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide

Um den Mechanismus der Hydrolyse in unterschiedlichen Medien aufzuklären und die gewonnenen Daten zu deuten, sollen neben der Analyse der Verbindungen **56**-**58** auch noch andere *cyclo*Sal-Triester zur Interpretation herangezogen werden (s. Abb. 33). Bei der Synthese von 5-(POM-prop)*cyclo*Sal-d4TMP **53b** konnte die Synthese z.B. derart gestaltet werden, dass der *cyclo*Sal-Triester **49** als Zwischenverbindung auftritt. Diese Synthese wird auf S. 52 ausführlich geschildert. Bei der im letzten Abschnitt diskutierten Syntheseroute treten die freien Säuren der Triester hingegen nicht auf.



Nucl = d4T **53b**, dm^{5}K **75**, ddm^{5}K **76** **49**

Nucl = d4T **77**, BVdU **78**, ACV **79** **80**

Abb. 33: Referenzverbindungen

Die chemischen Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ (pH = 7.3) der Zielverbindungen **56**-**58** sowie **49**, **53b** und **75**-**80** wurden nach einem standardisierten Verfahren ermittelt (s. Experimentalteil), wobei die zeitliche Abnahme der Konzentration des jeweiligen Triesters bestimmt wird. Für die Verbindungen **56**-**58** wurde bei der Aufnahme von HPL-Chromatogrammen TBAH-Ionenpufferlösung verwendet, um den Mechanismus der Hydrolyse detaillierter aufklären zu können. Zunächst sollen die ermittelten Werte für die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ in einem Säulendiagramm verglichen werden.

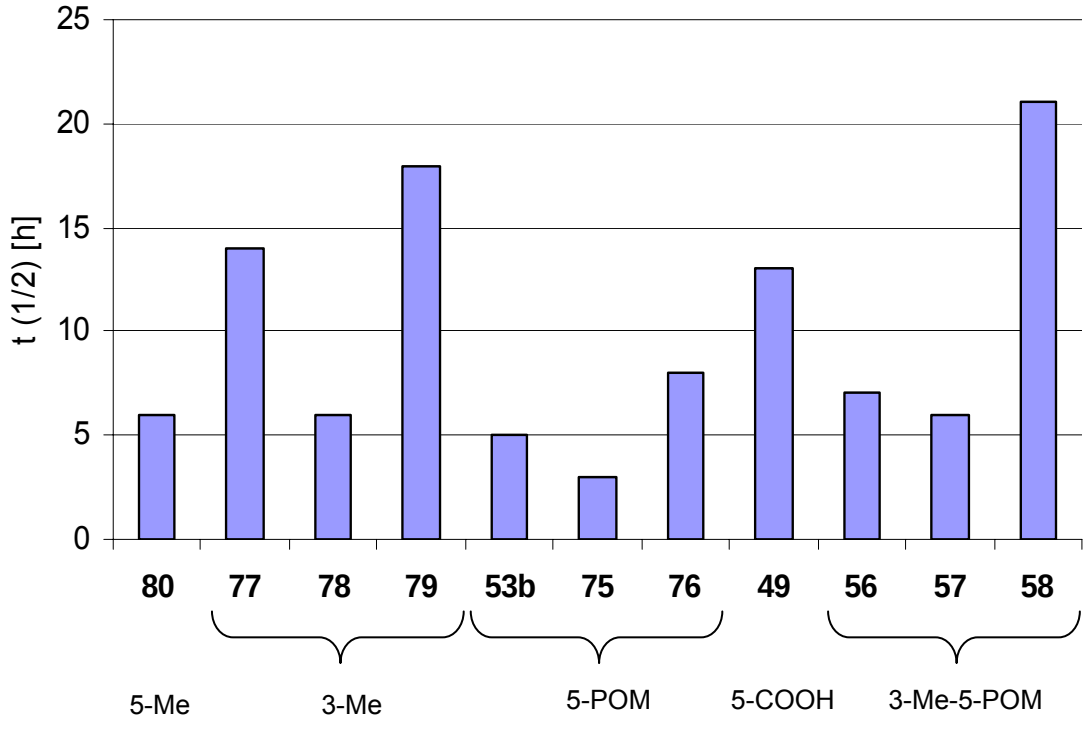


Diagramm 1: Vergleich der chemischen Stabilität in PBS pH= 7.3

Es soll nun ein Phänomen diskutiert werden, das bislang für alle *cyclo*Sal-Pronucleotide gefunden wurde: die Verminderung der Stabilität bei Anwesenheit einer 3´-OH-Gruppe. So hydrolysiert z.B. der 3-Methyl-*cyclo*Sal-Triester von BVdUMP **78** gegenüber dem 3-Methyl-*cyclo*Sal-Triester von d4TMP **77** unter Freisetzung von BVdUMP um den Faktor zwei schneller. Das gleiche Verhalten ist für den „lock-in"-modifizierten Phosphattriester von dm^{5}KMP **75** gegenüber dem „lock-in"-modifizierten Triester von ddm^{5}KMP **76** zu erkennen. Beide Verbindungen unterscheiden sich lediglich in der An- bzw. Abwesenheit einer 3´-OH-Gruppe. Aus diesen Daten kann folgender Schluss gezogen werden: Die 3´-OH-Gruppe von Pyrimidin-Nucleosiden beschleunigt die chemische Hydrolyse um etwa das Doppelte. Mechanistisch kann dieses Verhalten durch einen assistierenden Effekt bei der Hydrolyse erklärt werden.

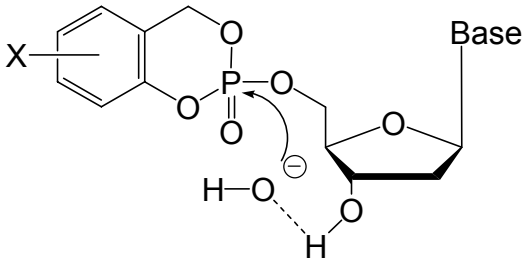


Abb. 34: Postulierter assistierender Effekt bei der Hydrolyse von *cyclo*Sal-Pronucleotiden

Weiterhin fällt durch Vergleich der Halbwertszeiten von **80** und **77** auf, dass eine Methylgruppe in 5-Position des *cyclo*Sal-Ringsystems weniger stabilisierend wirkt, als eine Methylgruppe in 3-Position. Dies war letztlich auch der Grund dafür, bei der Synthese der Zielverbindungen **56**-**58** die Methylgruppe in 3-Position zu platzieren. Weiterhin erkennt man, dass der 3-Methyl-*cyclo*Sal-Triester **79** des Purin-Nucleosids ACV gegenüber den Triestern der Pyrimidin-Nucleoside eine deutlich erhöhte Halbwertszeit hat. Auch dies ist ein genereller Trend, der bei vielen anderen Purin-Nucleosiden bestätigt wurde. Bislang wurde davon ausgegangen, dass dieses Verhalten auf die Hydrathülle der Moleküle zurückgeführt werden kann. Es gibt inzwischen Hinweise, dass sich die Unterschiede auf verschiedene konformative Eigenschaften zurückführen lassen. Dies soll im Folgenden nur kurz diskutiert werden, da wirklich verlässliche Daten noch nicht vorhanden sind. *Cyclo*Sal-Triester liegen als Diastereomeren- oder Enantiomerengemische vor. In manchen Fällen lassen sich diese Gemische trennen, man erhält die Diastereomere mit definierter Konfiguration am Phosphoratom. Die Kristallisation eines solchen Diastereomers

zeigte eine π-stacking-Wechselwirkung des *cyclo*Sal-Rings mit dem Pyrimidin der Nucleobase T.[82] Da das andere Diastereomer nicht kristallisierte, ist nicht bekannt, ob diese Wechselwirkung auch hier vorliegt. Zudem ist bekannt, dass die Halbwertszeit der chemischen Hydrolyse für die einzelnen Diastereomere unterschiedlich ist und zwar um ca. den Faktor 2 (s.S. 65). Weiterhin treten bei *cyclo*Sal-Triestern von intrinsisch fluoreszierenden Pyrimidin-Nucleosiden erhebliche Quenching-Effekte in Lösung bei der Fluoreszenzemission auf, nicht aber bei intrinsisch fluoreszierenden Purin-Nucleosiden (s. S. 103). Die Annahme soll nun sein, dass die chemische Hydrolyse von *cyclo*Sal-Pronucleotiden dann beschleunigt ist, wenn eine konformative Fixierung durch eine π-π-Wechselwirkung der aromatischen Systeme vorliegt.

Es ist in Diagramm 1 außerdem zu erkennen, dass die Säure **49** ebenfalls eine deutlich erhöhte Halbwertszeit aufweist. Dies scheint erneut ein genereller Trend zu sein, der für andere Triester mit freier Säurefunktion bestätigt wurde (s.S. 65, Diagramm 4). Da diese Säuren bei pH= 7.3 deprotoniert vorliegen, könnte eine repulsive Wechselwirkung mit Hydroxidionen die verlangsamte Hydrolyse erklären.

Es sollen nun die Eigenschaften der Zielverbindungen diskutiert werden. Besonders der ACV-Triester **58** zeigt eine hohe chemische Stabilität ($t_{1/2}$= 21 h). Er ist sogar noch stabiler, als 3-Methyl-*cyclo*SalACVMP **79** ($t_{1/2}$= 18 h). Eigentlich überrascht dieses Verhalten nicht, da zusätzlich zur 3-Methylgruppe durch die Modifikation in der 5-Position des Aromaten die Elektronendichte im System erhöht wird, wodurch die Phenylphosphatesterbindung stabilisiert wird. Dieses Verhalten ist bereits bei 3,5-Dimethyl-substituierten *cyclo*Sal-Triestern beobachtet worden. Für die beiden Zielverbindungen **56** und **57** kann eine Erhöhung von $t_{1/2}$ gegenüber den 5-POM-funktionalisierten Referenzverbindungen **53b** und **75** ohne 3-Methylgruppe festgestellt werden. Sie liegt aber für **56** ($t_{1/2}$= 7 h) bei weitem nicht in dem Bereich von 3-Methyl-*cyclo*Sal-d4TMP **77** ($t_{1/2}$= 14 h) und erreicht auch für **57** lediglich den Wert von etwa 6 h, welcher ebenso für den 3-Methyl-BVdU-Triester **78** gefunden wurde. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass eventuell noch ein weiterer Faktor die Hydrolyse der Verbindungen beeinflusst, der bei steigender chemischer Stabilität der Phenylphosphatesterbindung zunehmend ins Gewicht fällt. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die möglicherweise stattfindenden Abbaumechanismen. Anschließend soll der postulierte Mechanismus mit den HPL-Chromatogrammen verifiziert werden.

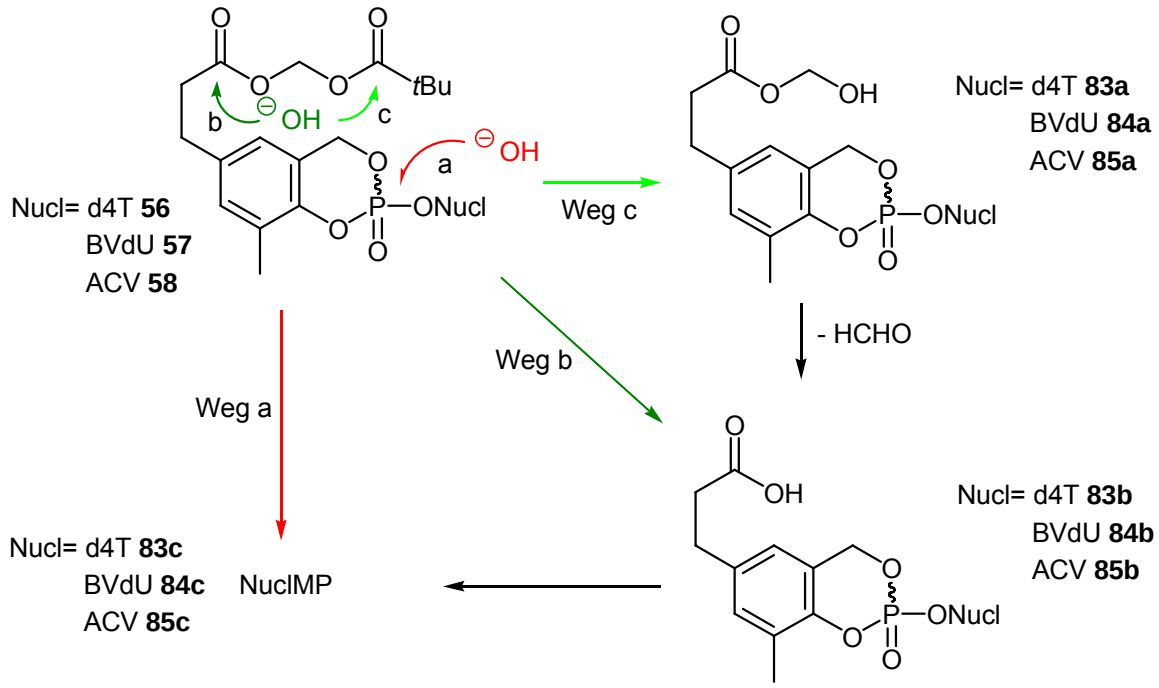


Abb. 35: Postulierte Hydrolysemechanismen für **56**-**58**

Für die Triester **56**-**58** beschreibt Weg a die direkte Hydrolyse des Triesters durch eine S_NP-Reaktion unter Freisetzung der NMP **83c**-**85c**. Diese folgt dem Standardmechanismus, welcher für *cyclo*Sal-Pronucleotide umfassend untersucht wurde (s. Kenntnisstand S. 14). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Spaltung der POM-Gruppe durch Hydrolyse einer der Estergruppen. Dabei führt Weg b direkt zu den freien Säuren **83b**-**85b**. Die anschließende Hydrolyse liefert erneut die Monophosphate **83c**-**85c**. Bei Weg c erfolgt die Spaltung der POM-Funktion unter Freisetzung der instabilen Intermediate **83a**-**85a**, welche in Formaldehyd und die freien Säuren **83b**-**85b** zerfallen. Sowohl bei Weg b, als auch bei Weg c sollten als Hydrolyseintermediate die freien Säuren **83b**-**85b** auftreten. Da diese generell höhere Halbwertzeiten $t_{1/2}$ bei pH 7.3 besitzen, als die korrespondierenden Triester **56**-**58**, sollten sie in den HPL-Chromatogrammen nachweisbar sein. Weil die freien Säuren **83b**-**85b** im Syntheseverlauf nicht erhalten wurden, wurden sie gezielt durch Inkubation der Triester **56**-**58** mit Schweineleber-Esterase (PLE) als Referenzverbindungen dargestellt. Im Folgenden ist ein Chromatogramm des ACV-Triesters **58** nach 80 min Inkubation mit 0.9 U PLE bei pH= 7.3 unter Ionenpaarbedingungen (TBAH-Ionenpuffer) dargestellt.

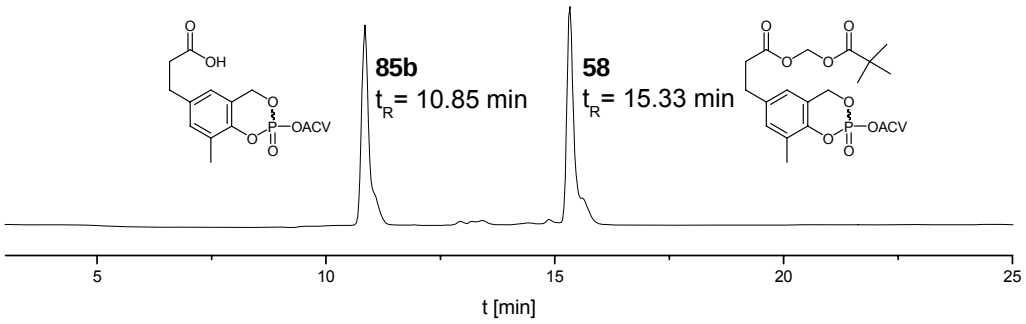


Abb. 36: Bestimmung der Retentionszeit von **85b** (Methode 2) durch Inkubation von **58** mit PLE

Auf diese Weise konnten die in den Chromatogrammen der chemischen Hydrolyse auftretenden Peaks den „lock-in“-Triestern **56**-**58**, den freien Säuren **83b**-**85b** und den NMP **83c**-**85c** zugeordnet werden. Dies sei im Folgenden am Beispiel des BVdU-Triesters **57** diskutiert.

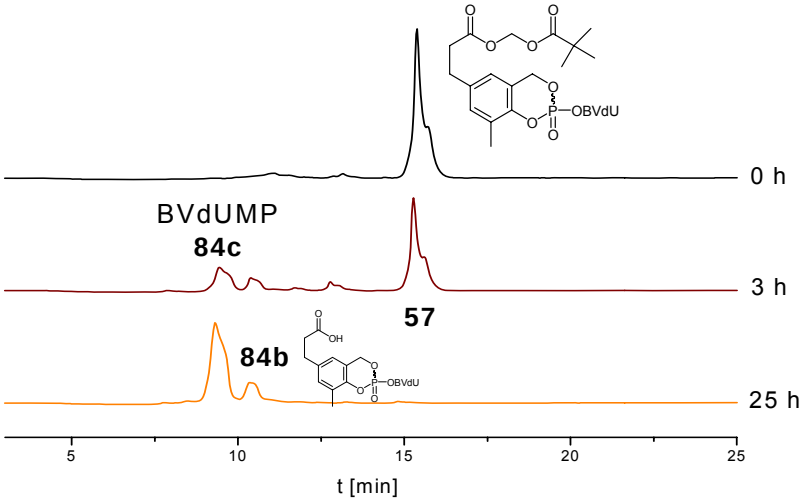


Abb. 37: Chemische Hydrolyse von **57** bei pH= 7.3 (Methode 3)

Man erkennt deutlich, dass bei erhöhter chemischer Stabilität der Phenylphosphatesterbindung nun auch eine Spaltung des Acylals über Weg b und c zu **84b** stattfindet, so dass insgesamt die Stabilität nicht in dem Maße erhöht ist, wie ohne eine Spaltung des Acylals zu erwarten wäre. Da die chemische Stabilität für den ACV-Triester **58** deutlich höher liegt, als für vergleichbare Pyrimidin-Nucleoside, sollte hier die Spaltung des Acylals noch signifikanter ausfallen. Dies konnte mit den Chromatogrammen der chemischen Hydrolyse bewiesen werden.

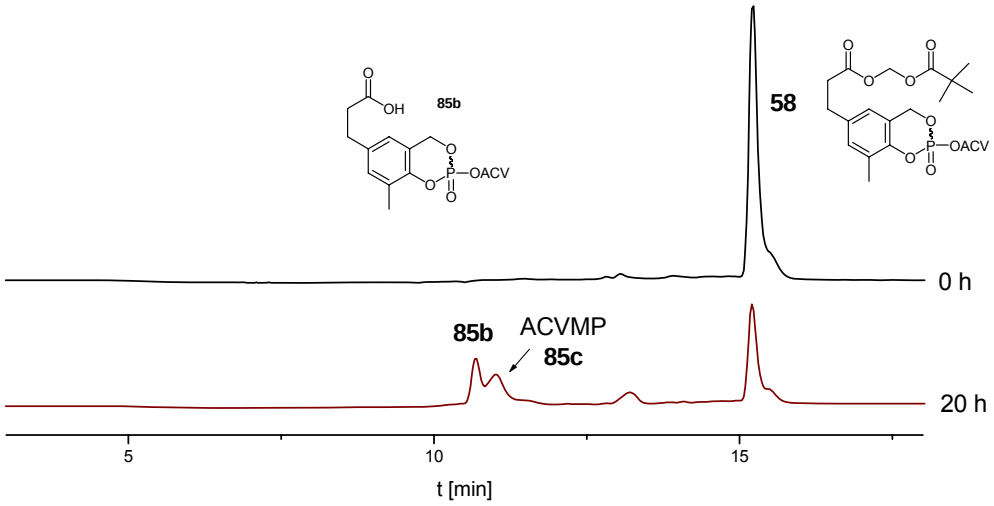


Abb. 38: Chemische Hydrolyse von **58** bei pH= 7.3 zu **85b** und ACVMP **85c** (Methode 2)

Am Beispiel des d4T-Triesters **56** soll ein weiteres Phänomen bei der Hydrolyse von *cyclo*Sal-Triestern diskutiert werden, welches bereits auf S. 17, Abb. 14 vorgestellt wurde. Es handelt sich dabei um die Umsetzung des Triesters in PBS-Puffer mit Phosphationen in Konkurrenz zur Reaktion mit Hydroxidionen. Auf diese Weise wird neben d4TMP **83c** auch d4TDP **83d** freigesetzt.

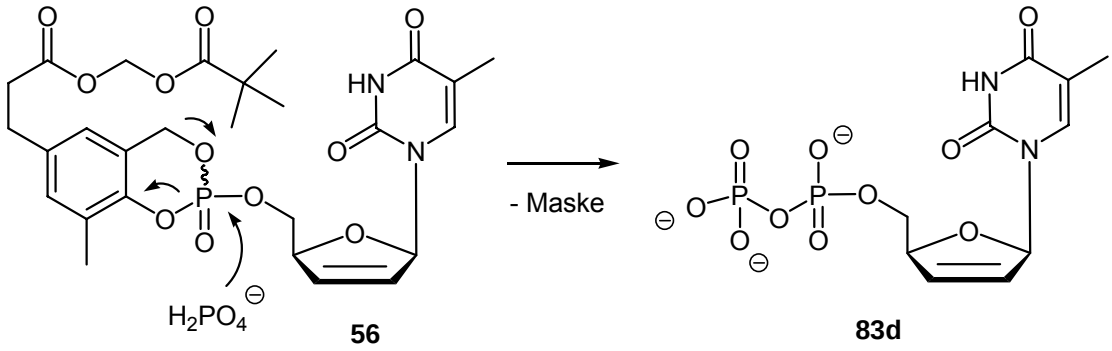


Abb. 39: Zersetzung von **56** zu d4TDP **83d**

Im Chromatogramm der chemischen Hydrolyse vom d4T-Triester **56** erkennt man nach sehr langer Inkubationsdauer (77 h) die Endprodukte der Reaktion. Unter Annahme gleicher Absorptionskoeffizienten der Verbindungen lässt sich eine Aussage über die freigesetzten Mengen an d4TMP **83c** und d4TDP **83d** ausgehend von dem d4T-Triester **56** treffen. Es zeigt sich, dass etwa 88% d4TMP und 12% d4TDP entstehen. Zudem lässt sich ableiten, dass die intermediär auftretende Säure **83b** tatsächlich weiter zu d4TMP **83c** hydrolysiert.

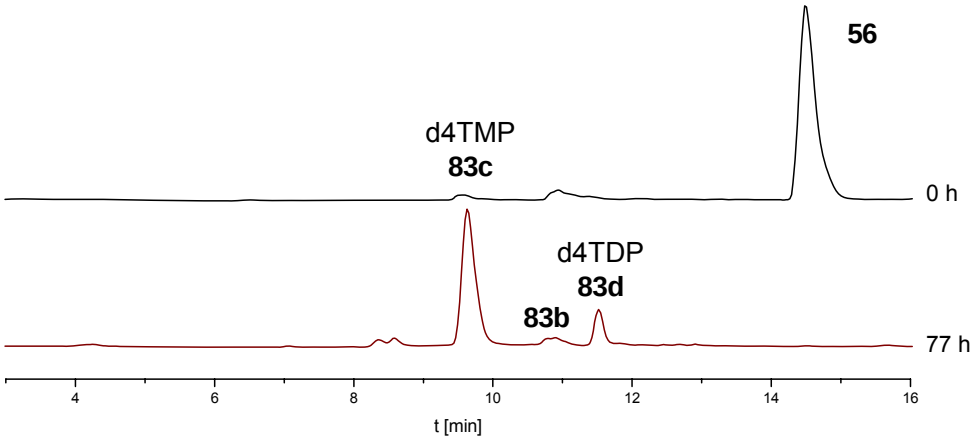


Abb. 40: Endprodukte der chemischen Hydrolyse von **56** (Methode 3)

Die tatsächliche Bildung von d4TDP **83d** wurde nicht durch Coinjektion bewiesen, kann aber durch Verfolgung der chemischen Hydrolyse mittels ^{31}P-NMR-Spektroskopie bewiesen werden. Dazu wurden die Verbindungen in 0.35 mL 50 mM PBS (pH= 7.3) und 0.35 mL DMSO-d_6 gelöst und in Abständen von Tagen und Wochen ^{31}P-NMR-spektroskopisch analysiert. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse des Experimentes mit **56**.

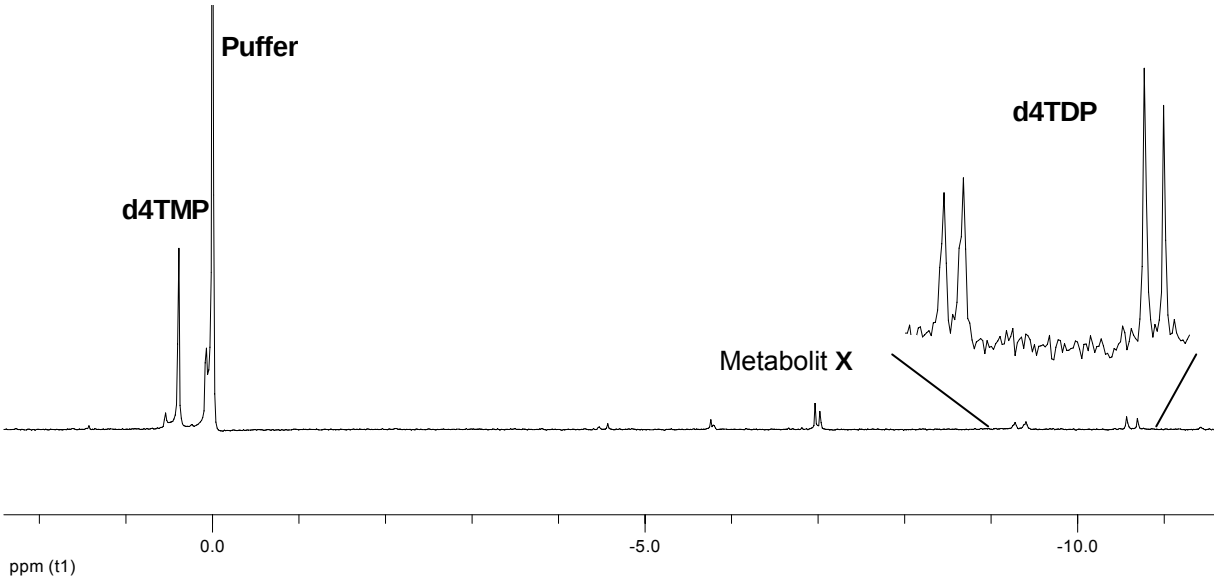


Abb. 41: ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von **56** (Endpunkt)

Auch hier erkennt man die Freisetzung von d4TDP. Die Integration ergab eine Menge von etwa 14%, also eine gute Übereinstimmung mit den durch HPL-Chromatographie erhaltenen Werten. Bei Metabolit X könnte es sich um geringe Mengen der Säure **83b** handeln, die nur sehr langsam weiter hydrolysiert.

Mit den vorgestellten Experimenten lässt sich ein detailliertes Bild des chemischen Hydrolysemechanismus von POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden zeichnen, welches im Wesentlichen in Abb. 35 wiedergegeben ist und das nur um die Freisetzung von d4TDP **83d** aus den einzelnen Triestern ergänzt werden müsste. Es bleibt allerdings ungeklärt, ob die Hydrolyse des POM-Acylals über Weg b oder Weg c abläuft. Da bei beiden Möglichkeiten allerdings ohnehin die Säuren **83b**-**85b** entstehen, wurden keine weiteren Mühen zur Aufklärung unternommen. Es könnte aber die Hydrolyse in ^{18}O angereichertem Wasser und nachfolgende massenspektrometrische Analyse der Lösung ein abschließendes Ergebnis liefern.

Nachdem der chemische Hydrolysemechanismus nun hinreichend aufgeklärt wurde, soll im Folgenden auf das Verhalten der Pronucleotide **56**-**58** in biologischen Medien eingegangen werden. Da bereits gezeigt wurde, dass AM- und POC-Acylale in dem RPMI-FCS-Kulturmedium an Stabilität einbüßen, POM-Acylale hingegen weitgehend stabil sind, wurde für die neuen POM-funktionalisierten Pronucleotide mit Methylgruppe in 3-Position ein ähnliches Verhalten angenommen. Daher wurden Hydrolysestudien in RPMI-FCS nicht durchgeführt. Die Stabilität der Verbindungen soll im nächsten Abschnitt vielmehr aus der TK^--Aktivität abgeleitet werden.
Die Stabilität der Verbindungen **56** und **57** wurde zunächst in humanen CEM/0-, bzw. P3HR1-Zellextrakten untersucht (Durchführung s. Experimentalteil). Für das d4T-Prodrug **56** wurde CEM/0-Extrakt verwendet, da dies der Zelltyp war, in dem auch die antiviralen Daten *in vitro* ermittelt wurden. P3HR1-Extrakt wurde aus gleichem Grund für das BVdU-Prodrug **57** verwendet. Im nachfolgenden Säulendiagramm sollen die Halbwertszeiten der enzymatischen Hydrolyse einiger Verbindungen verglichen werden.

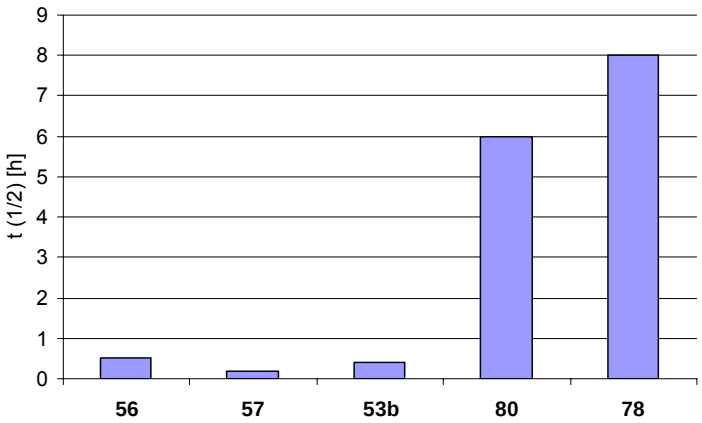


Diagramm 2: Vergleich der enzymatischen Stabilität

Da 5-Methyl-*cyclo*Sal-d4TMP **80** keine enzymatisch spaltbaren Gruppen besitzt, bleibt auch die Stabilität im Vergleich zur chemischen Hydrolyse konstant. 5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP **53b** verliert hingegen dramatisch an Stabilität ($t_{1/2}$(PBS)= 5 h vs $t_{1/2}$(CEM/0)= 0.4 h). Der direkte Vergleich mit dem d4T-Triester **56** zeigt, dass die Methylgruppe in 3-Position keinen Einfluss auf diese rasche enzymatische Hydrolyse nimmt ($t_{1/2}$(PBS)= 7 h vs $t_{1/2}$(CEM/0)= 0.5 h). Für den BVdU-Triester **57** wurde sogar nur eine enzymatische Halbwertszeit von 10 min in P3HR1-Extrakt ermittelt, gegenüber der Referenzverbindung 3-Me-*cyclo*Sal-BVdUMP **78** mit $t_{1/2}$= 8 h. Diese Ergebnisse zeigen, dass die „lock-in"-modifizierten Triester **56**, **57** und **53b** hervorragende Substrate für Esterasen darstellen. Die folgende Abbildung zeigt die HPL-chromatographische Analyse der enzymatischen Hydrolyse des BVdU-Triesters **57** nach verschiedenen Inkubationsdauern.

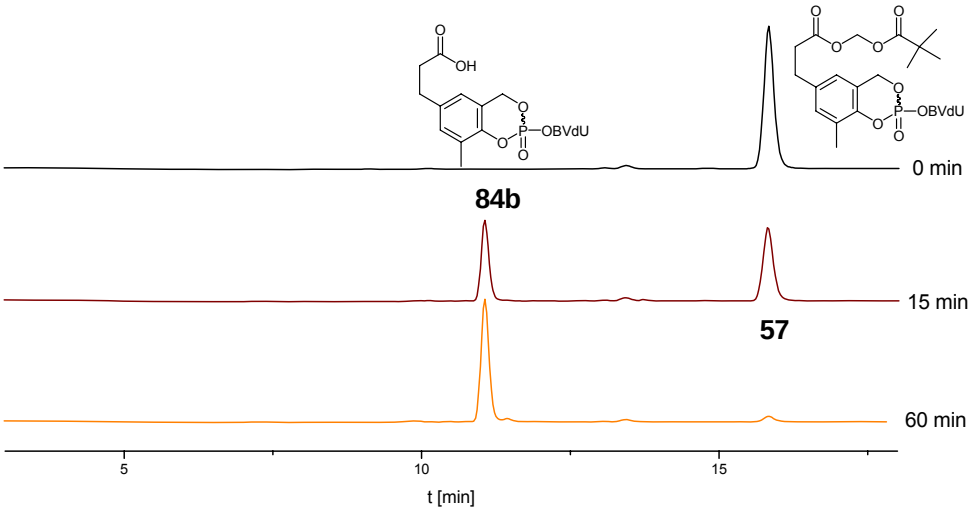


Abb. 42: Hydrolyse von **57** in P3HR1 (Methode 3)

Aus den in Abb. 42 gezeigten Chromatogrammen geht deutlich die selektive Überführung von **57** in die Säure **84b** durch enzymatische Spaltung des POM-Acylals hervor. Weiterhin erkennt man die Polaritätszunahme, die mit dieser Spaltung einhergeht. Für das d4T-Derivat **56** und das ACV-Derivat **58** wurde exakt das gleiche Verhalten gefunden, weswegen die Chromatogramme hier nicht mehr abgebildet werden sollen. Von synthetischem Interesse zur Darstellung der freien Säuren ist die Inkubation mit PLE in wässrigem Medium. Für das ACV-Derivat **58** wurde nach 150 min Inkubation mit 4 U PLE eine vollständige Transformation zur Säure **85b** festgestellt. Auf eine Isolierung wurde allerdings verzichtet.

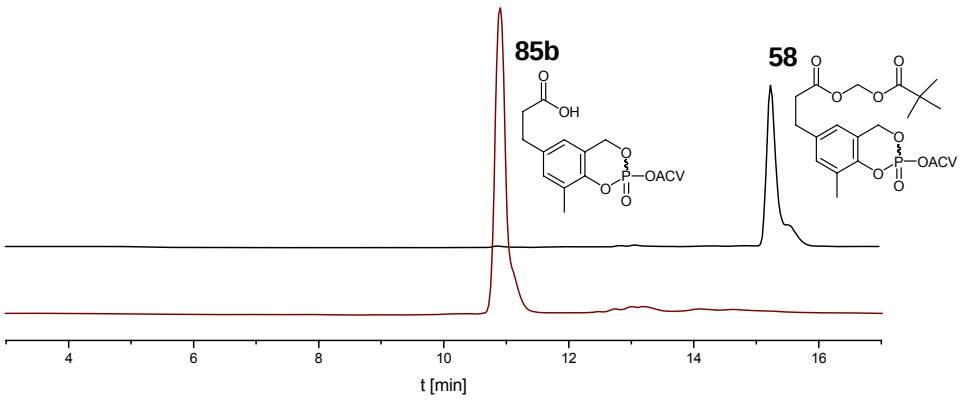


Abb. 43: Synthese von **85b** aus **58** durch enzymatische Hydrolyse mit PLE

Bislang erfüllten die dargestellten „lock-in“-Pronucleotide **56**-**58** die an sie gestellten Anforderungen. Dazu zählen eine erhöhte chemische Stabilität im Vergleich mit **53b** und eine rasche Spaltung der POM-Modifikation durch vermehrt intrazellulär vorkommende Esterasen. Es blieb daher letztendlich nur noch zu klären, ob eine beschleunigte Spaltung in humanem Blutserum auftreten würde. Um dies herauszufinden, wurde der BVdU-Triester **57** exemplarisch in 10% humanem Serum bei pH= 6.8 inkubiert (Für Details s. Experimentalteil). Die ermittelte Halbwertszeit unter diesen Bedingungen lag für **57** bei ca. 8 h, also leicht erhöht gegenüber $t_{1/2}$ bei pH= 7.3 ($t_{1/2}$= 7 h). Das kann darauf zurückgeführt werden, dass bei erniedrigtem pH-Wert die chemische Hydrolyse langsamer abläuft, so dass sich insgesamt keine enzymatische Spaltung der POM-Gruppe in humanem Serum ableiten lässt.

Nachfolgend sollen noch einmal die ermittelten Hydrolysewege zur Freisetzung der Nucleosidmonophosphate in unterschiedlichen Medien dargestellt werden. Die gestrichelten Pfeile deuten eine nur geringe Zersetzung auf dem entsprechenden Weg an, die durchgängigen Pfeile stehen für die hauptsächliche Umwandlung.

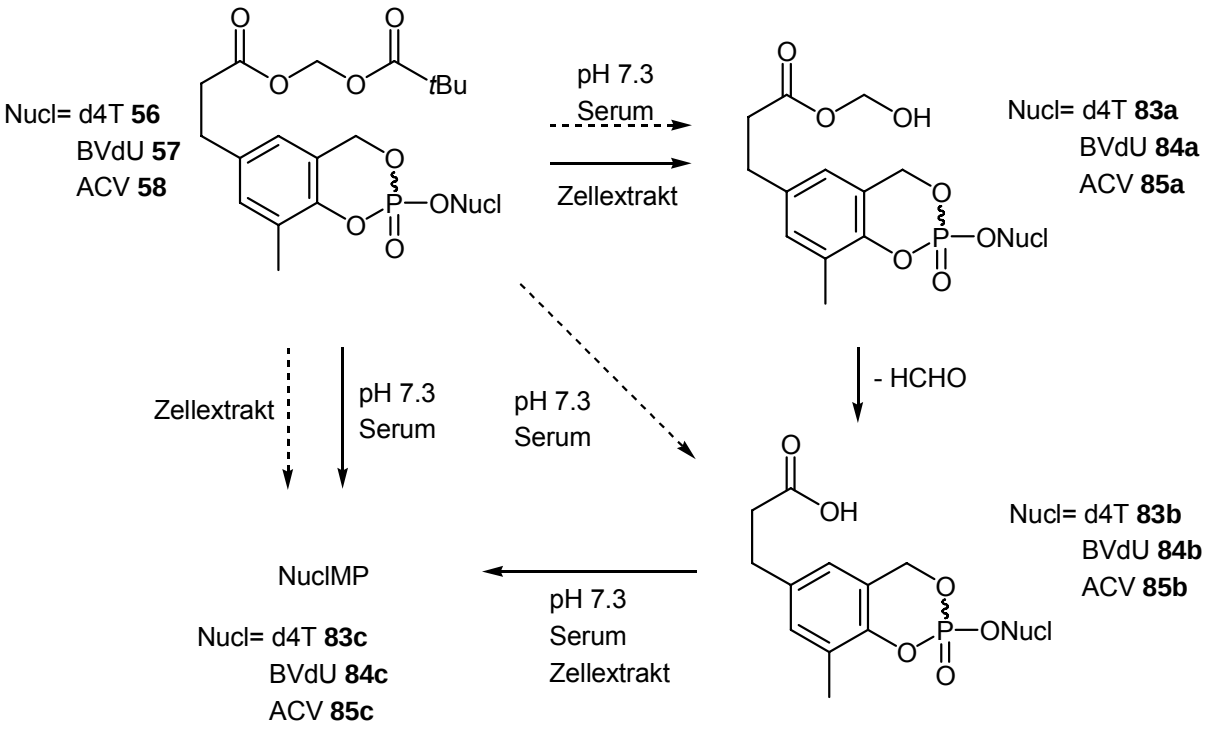


Abb. 44: Zusammenfassung der Freisetzung von Nucleosidmonophosphaten aus **56**-**58**

Es konnten also mit der 3-Methyl-5-POM-*cyclo*Sal-Maskierung alle an das System gestellten Anforderungen erfüllt werden. Außerdem wurde das „lock-in"-Konzept auf andere Nucleoside mit verschiedenen funktionellen Gruppen und deutlich unterschiedlicher Struktur erweitert. Im folgenden Abschnitt sollen nun die antiviralen Eigenschaften der Verbindungen diskutiert werden.

4.1.2.4 Antivirale Eigenschaften der 3-Methyl-5-POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, und mit Dr. Astrid Meerbach, Universitätsklinikum Jena, wurden die antiviralen Eigenschaften *in vitro* ermittelt. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt die anti-EBV- und anti-HSV-Daten für das BVdU-Prodrug **57** und das ACV-Prodrug **58** nicht vorlagen, können für diese Verbindungen keine Aussagen getroffen werden. Zum Vergleich wurden noch der nur in 5-Position modifizierte Triester **53b**, die Säure **49** und das Stammnucleosid d4T **3** in der Tabelle aufgenommen. Vor der Diskussion soll noch eine Feststellung getroffen werden: Büßt ein Pronucleotid seine Wirkung in TK-defizienten Zellen ein, ist dies ein direkter Hinweis darauf, dass es entweder die Zellmembran nicht

penetriert oder nur äußerst schlecht das NMP freisetzt, z.B. aufgrund einer zu hohen Halbwertszeit. Wenn man davon ausgeht, dass die Freisetzung von d4TMP effektiv verläuft, verbleibt nur eine verminderte Membranpermeabilität. In einem solchen Fall hydrolysiert das Pronucleotid außerhalb der Zelle und setzt dort d4TMP frei. Da dieses auch nicht in der Lage ist, über die Zellmembran zu gelangen, sollte auch keine antivirale Wirkung in TK^+-Zellen auftreten. Da diese Aktivität aber oftmals gefunden wurde, muss davon ausgegangen werden, dass Phosphatasen in dem Kulturmedium d4TMP zu d4T dephosphorylieren, welches dann wiederum in die Zelle gelangen kann und zum d4TTP anabolisiert wird. Solche Prozesse erklären daher die Wirksamkeit von Pronucleotiden, auch wenn keine Aktivität in TK-defizienten Zellen vorliegt.
Als weitere Anmerkung sei vorweggeschickt, dass die Ergebnisse für d4T **3** aus der Testreihe stammen, die zusammen mit Prodrug **56** ermittelt wurde. Daher ist ein quantitativer Vergleich mit **53b** und **49** nicht möglich. Man kann aber qualitative Feststellungen z.B. in Bezug auf die TK^--Aktivität treffen.

	EC_{50}[a] [μM]			CC_{50}[b] [μM]
	CEM/0		CEM/TK$^-$	CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	**HIV-2**	
3-Me-5-(POM-prop) **56**	0.65 ± 0.07	0.70 ± 0.21	12.5 ± 3.5	54.6 ± 6.2
5-(POM-prop) **53b**	0.23 ± 0.04	0.33 ± 0.11	0.70 ± 0.08	23.8 ± 4.0
Säure **49**	0.14 ± 0.10	0.80 ± 0.20	50.0 ± 30.0	73.6 ± 0.0
d4T **3**	0.70 ± 0.14	0.50 ± 0.14	58.3 ± 38.2	> 250

[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration
Tab. 2: Antivirale Profile von **56** und der Referenzverbindungen **53b**, **49** und d4T **3**

Trotz der geringen strukturellen Veränderung von **56** im Vergleich zu **53b** wurde ein fast vollständiger Verlust der TK^--Aktivität gemessen, einhergehend mit einer geringeren Cytotoxizität. Die Aktivität in CEM/0 entspricht hingegen der von d4T **3**. Obwohl die Testergebnisse oft erheblichen Schwankungen unterliegen, ist dieses Ergebnis doch eindeutig: Das Pronucleotid **56** passiert entweder die Zellmembran nicht effektiv oder die freie Säure **83b** weist eine zu große chemische Stabilität auf,

was zu einer nur sehr langsamen Freisetzung von d4TMP führt. Eine weitere Ursache könnte in der geringen Wasserlöslichkeit von **56** liegen, die gegenüber der von **53b** nochmals verringert ist. Dies wird durch die reduzierte Cytotoxizität angedeutet. Alle Faktoren zusammengenommen könnten den deutlichen Verlust an TK^--Aktivität erklären. Die hohe Aktivität in CEM/0 müsste dann aus der vergleichsweise schnellen chemischen Hydrolyse von **56** (gegenüber **83b**) im Kulturmedium zu d4TMP und den nachfolgend bereits erläuterten Prozessen stammen. In diesem Zusammenhang wären insbesondere die Daten des ACV-Derivates **58** interessant, welches eine bessere Wasserlöslichkeit aufwies.

Abschließend zu diesem Thema bleibt zu sagen, dass es trotz deutlicher Erhöhung der chemischen Stabilität von POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden unter Erhalt der intrazellulären enzymatischen Spaltung nicht zu einer Verbesserung der antiviralen Daten gekommen ist. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit könnten die AM-Acylale zwar synthetisiert werden, wegen der verminderten Stabilität im Kulturmedium scheinen hier eher keine Fortschritte erzielbar zu sein. Der vorangegangene Satz wirft allerdings ein grelles Licht auf die Frage, ob es überhaupt sinnvoll ist, Verbindungen auf ihre Stabilität in *in vitro* Testsystemen zu optimieren, da sie am Ende mit der Realität wenig gemein haben.

Um die Probleme zu umgehen, die im Zusammenhang mit Acylal-funktionalisierten Pronucleotiden auftraten, sollte ein neues „lock-in“-System entwickelt werden, welches weder toxische Substanzen wie Pivalinsäure freisetzt, noch im Kulturmedium gespalten wird. Zudem sollten die Verbindungen eine höhere Wasserlöslichkeit aufweisen, als z.B. der Triester **56**. Als ein erfreulich flexibles System zur Umgehung der oben beschriebenen Probleme hat sich die Modifikation des *cyclo*Sal-Systems mit Aminosäurestern herausgestellt. Dies soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

4.1.3 Aminosäureester zur „lock-in“-Modifikation

In Abschnitt 4.1.1 wurde das Konzept der Estermodifikation bereits diskutiert. Dabei hatte sich gezeigt, dass eine Spaltung der Esterfunktion bei einem C_2-Spacer nicht stattfindet und auch eine Verlängerung des Linkers um zwei weitere

Methylengruppen nur in Leberextrakten zu dem gewünschten Ergebnis führte. Allerdings bewirkt das Einfügen weiterer Methylengruppen in den Spacer eine deutliche Zunahme der Lipophilie und mithin eine Abnahme der Wasserlöslichkeit. Eine Verlängerung des Linkers ist hingegen sehr einfach denkbar durch Peptidkupplung der Säuregruppe des C_2-Spacers mit einem Aminosäureester. Dies führt zu der in der folgenden Abbildung gezeigten Leitstruktur, die in ihrem Aufbau höchst flexibel ist.

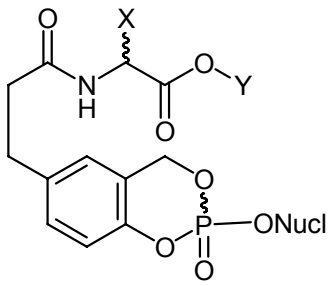
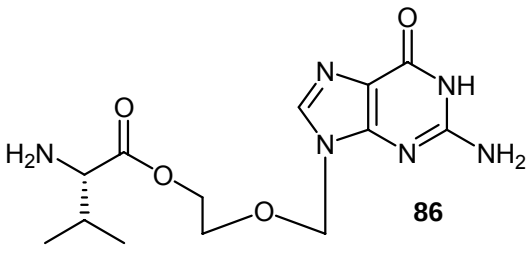


Abb. 45: Neuartige „lock-in"-modifizierte *cyclo*Sal-Pronucleotide

Bei diesem System lassen sich verschiedene Ester Y einführen und auf ihre Eignung als Substrate für Carboxyesterasen untersuchen. Zudem können unterschiedliche Aminosäuren (X) mit verschiedener Stereochemie untersucht werden. Durch die flexible Einführung von Aminosäuren lässt sich auch die Wasserlöslichkeit beeinflussen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass Pronucleotidsysteme unter Verwendung von Aminosäuren und Aminosäurestern bereits von anderen Arbeitsgruppen teils mit großem Erfolg untersucht wurden. Hierzu zählen die Phosphoramidat-Nucleotide (Aminosäureester am Phosphoratom) von C. McGuigan *et. al.*, die zur intrazellulären Freisetzung von NMP geeignet sind[45], aber auch einfache Aminosäuremodifikationen von Nucleosiden zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit. Als Beispiel sei hier das Valaciclovir **86** genannt, ein Wirkstoff, der in der klinischen Therapie von HSV und VZV angewendet wird.[83]



86

Abb. 46: Valaciclovir (VACV)

Die Modifikation mit L-Valin führt zu einer durch den Peptidtransporter hPEPT1 vermittelten Aufnahme im großen Intestinum. Nachfolgende enzymatische Hydrolyse liefert ACV **7**.[84] Durch diesen Mechanismus ist die Bioverfügbarkeit von ACV erhöht, so dass deutlich geringere Mengen VACV verabreicht werden müssen.

Lässt man einmal die prinzipielle Möglichkeit einer rezeptorvermittelten Aufnahme von Aminosäureestern außer acht, die bislang ohnehin nur für Ester mit freier Aminogruppe gefunden wurde, so ergeben sich für den intrazellulären Einschluss von *cyclo*Sal-Triestern, welche auf diese Weise modifiziert wurden, verschiedene hydrolytische Mechanismen, die zur Freisetzung verschiedener Intermediate führen. Allen Intermediaten ist gemein, dass sie gegenüber der Startverbindung eine erhöhte Polarität besitzen und zudem in der Lage sein sollten, das entsprechende NMP freizusetzen. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die potentiellen Demaskierungsreaktionen am Beispiel von d4T **3**.

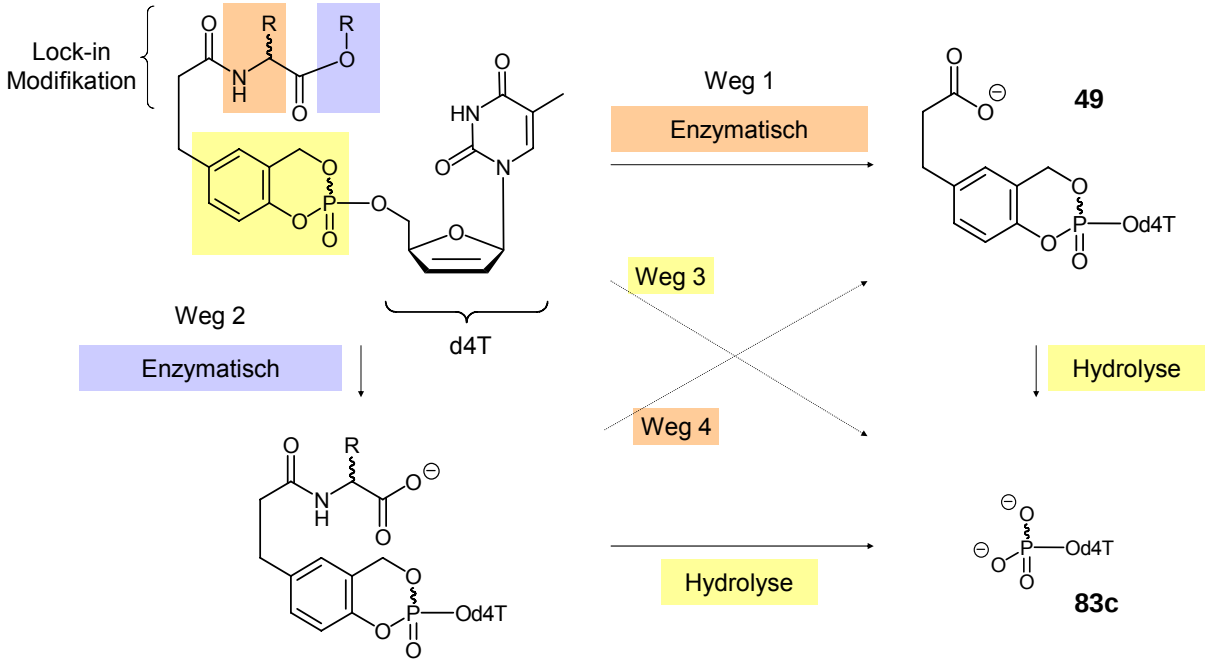


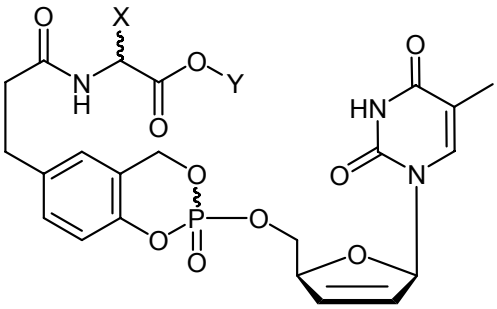
Abb. 47: Potentielle Hydrolysemechanismen für *cyclo*Sal-Pronucleotide mit Aminosäure-Ester-Modifikation

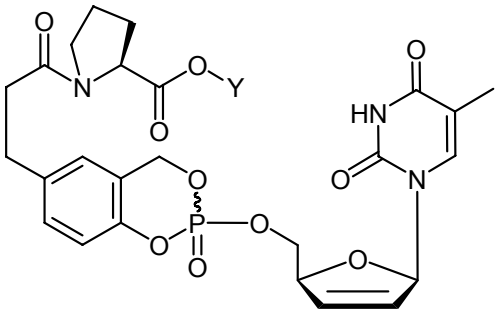
Weg 1 gibt die enzymatische Hydrolyse zur Säure **49** durch z.B. eine Peptidase wieder. Eine pH-abhängige Hydrolyse scheint wegen der großen Stabilität der Peptidbindung unwahrscheinlich. Das geladene Intermediat kann dann durch

chemische Hydrolyse d4TMP **83c** freisetzen. Weg 2 beschreibt die enzymatische Hydrolyse durch eine Esterase, welche zum geladenen Peptid als Intermediat führt. Ausgehend von diesem Intermediat könnte durch eine Peptidase erneut die Säure **49** entstehen (Weg 4) oder, durch direkte chemische Hydrolyse, d4TMP **83c**. Weiterhin sollte die langsame chemische Hydrolyse direkt d4TMP **83c** freisetzen (Weg 3). Es galt nun zu untersuchen, auf welchem Weg die Hydrolyse stattfindet, ob durch schnelle enzymatische Reaktion ein effektiver intrazellulärer Einschluss erreicht werden kann und ob die Cytotoxizität solcher Verbindungen gegenüber den POM-Acylalen vorteilhaft ist. Dazu jedoch mussten zunächst die Verbindungen synthetisiert werden.

4.1.3.1 Zielverbindungen und Synthesestrategie

Es sollten Zielverbindungen dargestellt werden, die an allen potentiellen Positionen unterschiedliche Modifikationen aufweisen, um die möglichen Einflüsse zu untersuchen. Um eine zum intrazellulären Einschluss befähigte Maske zu erhalten, sollte das neue System zunächst an d4T **3** als Referenznucleosid untersucht werden. Die nachfolgende Abbildung gibt eine Übersicht über die Strukturen.





X= H; Y= Me; 5-(GlyOMe) **87a**
X= H, Y= Bn; 5-(GlyOBn) **87b**
X= Me, Y= Me; 5-(L-AlaOMe) **88a**
X= Me, Y= Me; 5-(D-AlaOMe) **88b**
X= Me, Y= Bn; 5-(L-AlaOBn) **88c**
X= Me, Y= *t*Bu; 5-(L-AlaO*t*Bu) **88d**
X= Me, Y= H; 5-(L-Ala) **88e**
X= BnO(O)CCH$_2$, Y= Bn; 5-(L-Asp-diOBn) **89a**

Y= Me; 5-(L-ProOMe) **90a**
Y= Bn; 5-(L-ProOBn) **90b**

Abb. 48: Mit Aminosäure-Estern modifizierte *cyclo*Sal-d4TMP

Zur Darstellung dieser Pronucleotide eignet sich hervorragend die Kupplung der Säure **49** mit verschiedenen Aminosäure-Estern. Die retrosynthetische Analyse zeigt eine Syntheseroute auf, die zur Darstellung von **49** bereits erprobt wurde.[58]

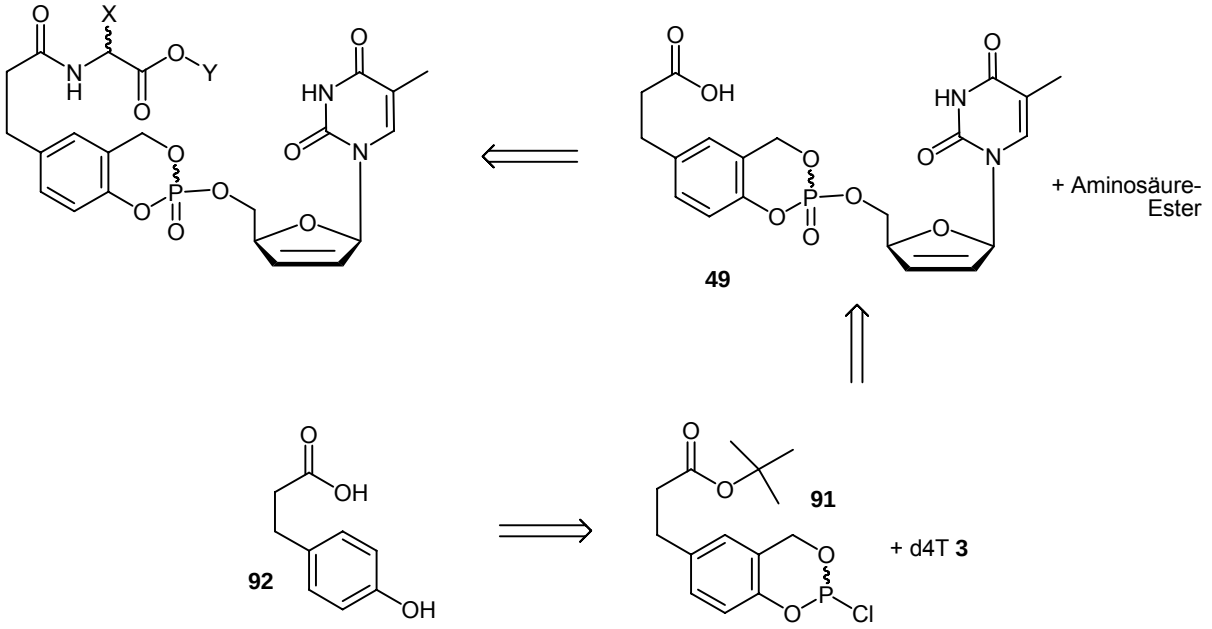
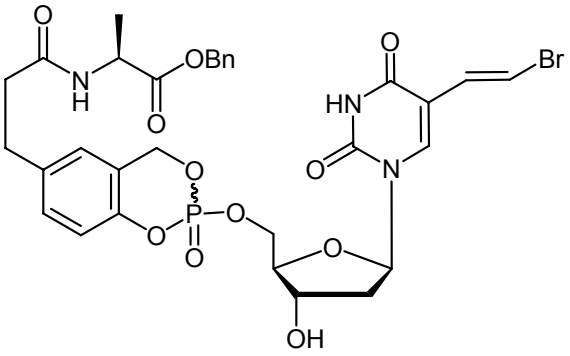


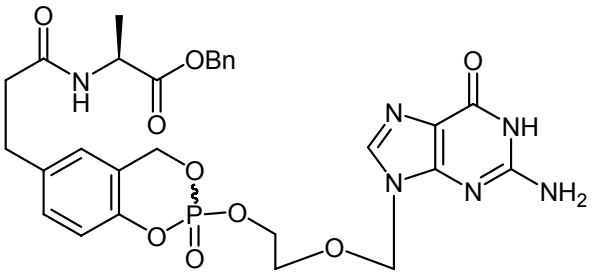
Abb. 49: Retrosynthetische Analyse von *cyclo*Sal-Pronucleotiden mit Aminosäure-Ester-Modifikation

Zur Darstellung von **49** eignet sich die Kupplung des Chlorphosphits **91** mit d4T **3**, gefolgt von einer *in situ* Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid. Anschließend kann mit Trifluoressigsäure die Spaltung des *tert*-Butylesters durchgeführt werden. Dabei ist es wichtig, einen sauer spaltbaren Ester zu verwenden, da eine basische Hydrolyse auch den Phosphorsäuretriester zersetzen würde. Das Chlorphosphit **91** kann über eine mehrstufige Synthese aus der kommerziell verfügbaren 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **92** dargestellt werden.

Zur Anwendung des Konzepts auf andere Nucleoside sollte nachfolgend die Syntheseroute verallgemeinert werden, indem der Aminosäure-Ester bereits vor der Kupplung mit dem Nucleosid eingeführt wurde. Erneut sollte gezeigt werden, dass auch BVdU **11** und ACV **7** prinzipiell auf diese Weise maskiert werden können. Vorausgreifend sei hier erwähnt, dass sich die 5-(L-AlaOBn)-Modifikation als geeignet für einen „lock-in“-Mechanismus erwies. Daraus folgen die unten abgebildeten Zielstrukturen.



5-((L-AlaOBn)prop)*cyclo*Sal-BVdUMP; **93a**



5-((L-AlaOBn)prop)*cyclo*Sal-ACVMP; **94a**

Abb. 50: Zielverbindungen **93a** und **94a**

Zur Einführung der Aminosäure-Ester-Modifikation vor der Kupplung eignen sich die in Abbildung 29 gezeigten Salicylalkohole **68b** und **69**. Die folgende retrosynthetische Analyse soll diese Möglichkeit für **68b** noch einmal aufzeigen.

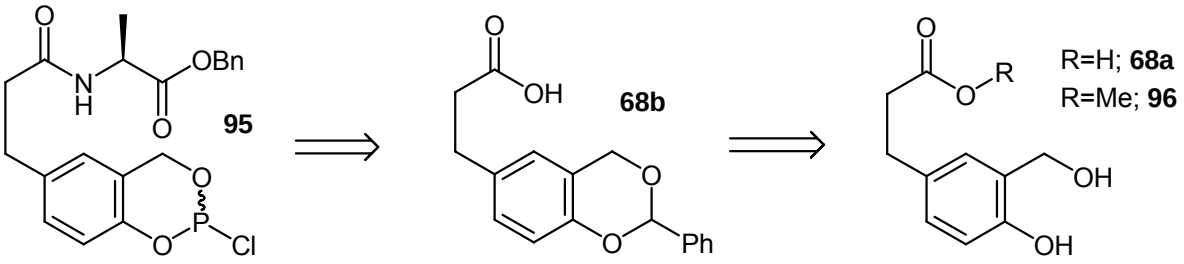


Abb. 51: Retrosynthetische Analyse des Chlorphosphits **95**

Zur Durchführung der Peptidkupplung schien es sinnvoll, zunächst die OH-Gruppen des Salicylalkohols zu inaktivieren, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Daher sollte die Kupplung ausgehend von der Säure **68b** durchgeführt werden. Diese Verbindung ist, wie bereits beschrieben, ausgehend von dem Salicylalkohol **68a** darstellbar. Wegen der schlechten chromatographischen Eigenschaften der Säure **68b** sollte zudem eine alternative Syntheseroute, ausgehend vom Methylester **96**, erprobt werden.

4.1.3.2 Synthese der Aminosäureester-funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotide

Da für die Synthese der in Abb. 48 gezeigten Pronucleotide eine große Menge der Säure **49** notwendig sein würde, sollte zunächst die Phosphitylierungsreaktion zur

Darstellung von *cyclo*Sal-Pronucleotiden optimiert werden. Da sich insbesondere die Reinigung als teilweise zeitaufwendig darstellte, wurden die Ausbeuten bei Variation unterschiedlicher Parameter HPLC-analytisch bestimmt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Synthese von 3-Methyl-*cyclo*Sal-dTMP untersucht.

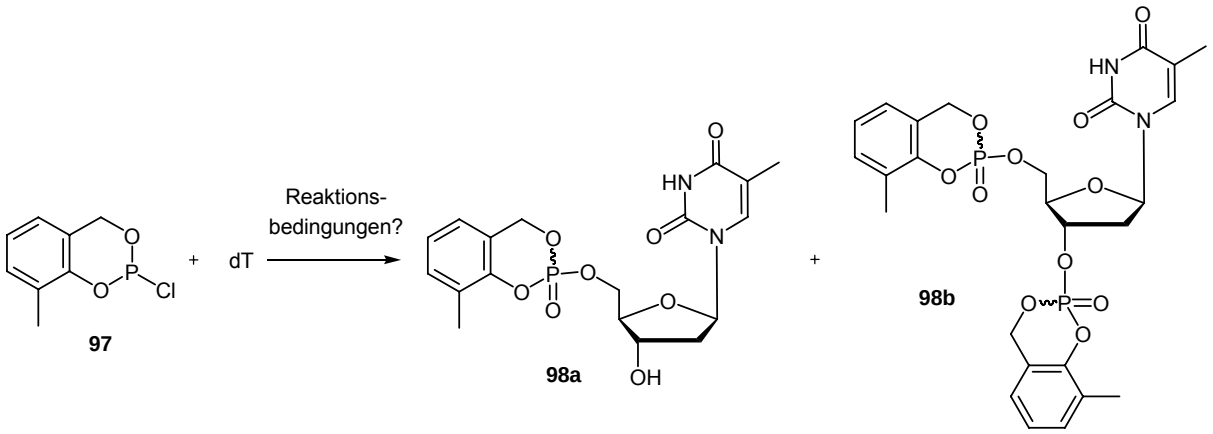


Abb. 52: Modellreaktion zur Optimierung der Synthese von *cyclo*Sal-Pronucleotiden

dT wurde verwendet, um die Ergebnisse auch auf andere Nucleoside mit 3´-OH-Gruppe anwenden zu können. Chlorphosphit **97** schien geeignet, da es leicht in großen Mengen darstellbar und durch Kugelrohrdestillation in hoher Reinheit zu erhalten ist. Als Parameter der Optimierung wurden unterschiedliche Lösungsmittel, Temperaturen und Äquivalentmengen der einzelnen Reaktionspartner untersucht. Der Reaktionsablauf war folgender:

1. Lösen von dT in abs. DMF
2. Zugabe von 2 Äquivalenten DIPEA
3. Kühlung auf Temperatur T_1
4. Zugabe von X Äquivalenten **97** (destilliert und nicht destilliert), gelöst in verschiedenen Lösungsmitteln. Rühren über einen Zeitraum t_1 bei Temperatur T_2
5. Kühlung auf -20 °C
6. Oxidation mit Y Äquivalenten *t*-BuOOH. Rühren über 1 h bei Temperatur T_3

Zur Auswertung der Ausbeuten wurde zunächst eine Kalibrierfunktion durch eine Verdünnungsreihe mit **98a** an der HPLC erstellt. Zur Erstellung der Kalibrierfunktion wurden aus einer 50 mM DMSO-Stammlösung zwei 1.0 mM Stammlösungen von 3-

Methyl-*cyclo*Sal-dTMP in H_2O angesetzt. Von jeder Lösung wurden 40 µL an der HPLC analysiert. Von den Stammlösungen wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt, um auf diese Weise 0.75, 0.6, 0.5, 0.4, …, 0.1 mM Lösungen zu erhalten. Von allen Lösungen wurde ein HPL-Chromatogramm angefertigt. Die entsprechenden Integrale beider Verdünnungsreihen wurden gemittelt und gegen die Konzentration (bzw. Ausbeute in %) aufgetragen. In dem untersuchten Bereich zeigte die Kalibrierfunktion Linearität bei hoher Präzision.

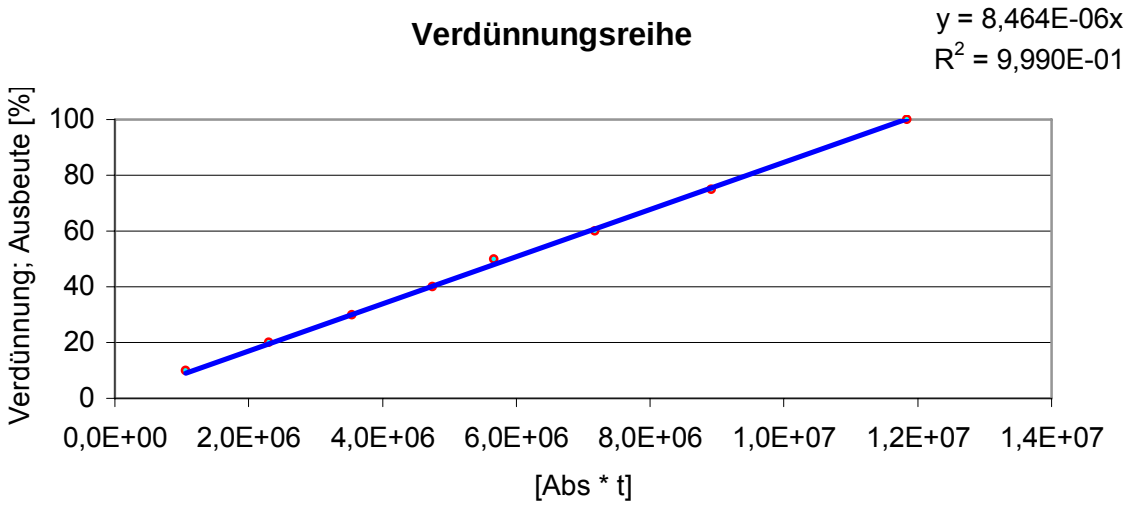


Diagramm 3: Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Ausbeute

Es wurden nun Synthesen der Zielverbindung unter Stickstoff als Inertgas wie oben beschrieben mit je 49 mg dT (202 µmol, 1.0 Äq.) durchgeführt. Zum Ende der Reaktion wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt lyophillisiert. Zur Analyse der Testansätze wurde wie folgt vorgegangen: Das lyophillisierte Rohprodukt wurde in 10 mL eines 1:1 Gemisches von Wasser/Acetonitril aufgenommen und somit zu einer maximalen Produktkonzentration von 20.2 mM verdünnt. Von dieser Lösung wurden 5 µL entnommen und mit 95 µL deionisiertem Wasser auf eine maximale Konzentration von 1.0 mM verdünnt. 40 µL dieser Lösung wurden an der HPLC analysiert. Aus der Verdünnungsreihe konnte somit die Ausbeute abgelesen, bzw. berechnet werden. Sie entsprach der jeweiligen Verdünnung.

Details zu den Experimenten sind im Experimentalteil in tabellarischer Form zu finden. Es soll an dieser Stelle nur zusammengefasst werden, welche Schlüsse aus den Ergebnissen gezogen werden konnten. Um eine vollständige Umsetzung des Edukts zu erhalten, mussten 1.5 Äq. von Chlorphosphit **97** zugegeben werden. Damit stieg aber gleichsam die Umsetzung zum doppelt phosphorylierten Produkt **98b**.

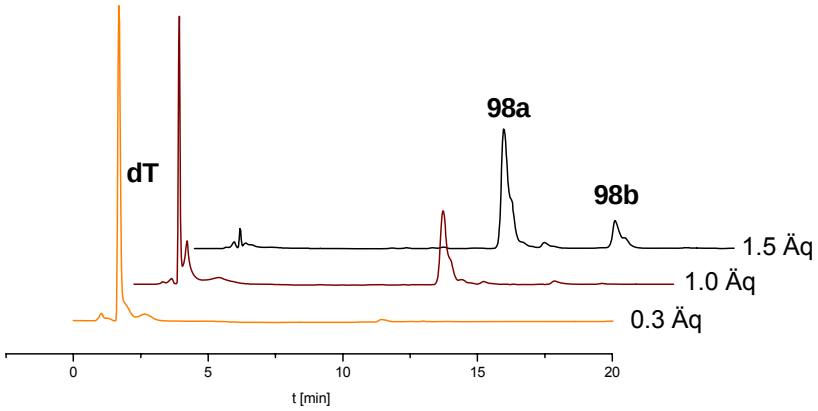


Abb. 53: Umsetzung von dT bei Zugabe unterschiedlicher Mengen von Chlorphosphit **97** und nachfolgender Oxidation

Die Zugabe von 1.0 Äq. führte nicht zur Bildung des doppelt phosphorylierten Produktes **98b**, allerdings verblieb so auch eine größere Menge an nicht umgesetztem dT in dem Reaktionsgemisch. Die Reaktion mit 0.3 Äq. zeigte keinerlei Produktbildung, so dass hier von einer Reaktion des Chlorphosphits mit dem Kristallwasser des Nucleosids ausgegangen wurde. Als optimale Menge wurden 1.2 Äq. Chlorphosphit gefunden. Die Verwendung von destilliertem Chlorphosphit **97** zeigte keine deutliche Verbesserung der Ausbeuten an, so dass man sich den Umstand einer Kugelrohrdestillation sparen kann. Als Lösungsmittel für das Chlorphosphit sollten Toluol oder THF verwendet werden. *t*-BuOOH ist ein geeignetes Oxidationsmittel für die Reaktion. Allerdings ist hier die Ursache für die teilweise unbefriedigenden Ausbeuten bei der Darstellung von *cyclo*Sal-Pronucleotiden zu finden. Die Zugabe von 1.2 Äquivalenten *t*-BuOOH, bei Verwendung von 1.2 Äq. **97** zeigt im DC keine vollständige Oxidation des P(III)-Intermediats an. Erst bei der erneuten Zugabe von 1.2 Äq. schien die Oxidation abgeschlossen. Bei der Entfernung der Lösungsmittel wird dieser Überschuss allerdings stark konzentriert und führt zur teilweisen Zersetzung der Produkte. Wenn man jedoch insgesamt nur 1.2 Äq. *t*-BuOOH zugibt, vervollständigt sich die Oxidationsreaktion bei der Entfernung des Lösungsmittels.

Somit waren die optimalen Parameter für die Reaktion gefunden:

T_1= -20 °C; X= 1.2; t_1= 1 h; T_2= 25 °C; Y= 1.2; T_3= 25 °C

Unter Anwendung dieser Parameter konnten für die Umsetzung von dT mit **97** Ausbeuten um 70% reproduzierbar erhalten werden. Bei chromatographischer Isolierung des Produkts **98a** traten keine Verluste auf.

Es sollte nun die Säure **49** auf der in der nachfolgenden Abbildung gezeigten Weise dargestellt werden.

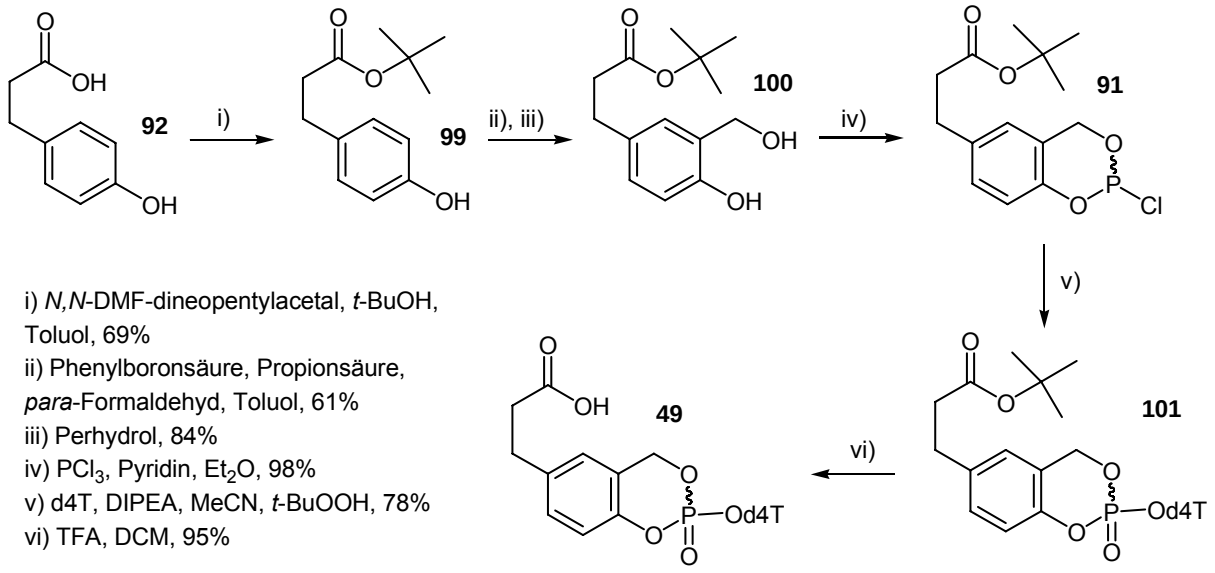
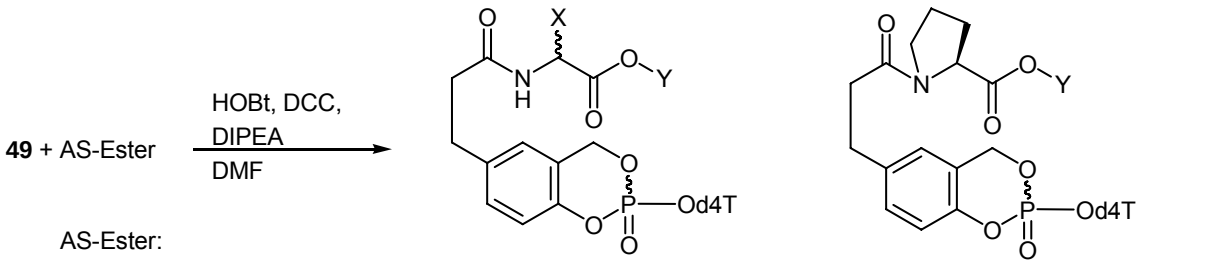


Abb. 54: Synthese der freien Säure **49**

Die Sequenz begann mit der Veresterung von kommerziell erhältlicher 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **9** mit *N,N*-DMF-dineopentylacetal in Anwesenheit von *tert*-Butanol. Man erhielt den *tert*-Butylester **99**, welcher sich nach einer von *Nagata et. al.* beschriebenen Reaktion über zwei Stufen regioselektiv hydroxymethylieren ließ und den Salicylalkohol **100** in 51%iger Ausbeute lieferte.[74] Die nachfolgende Cyclisierung mit PCl_3 verlief problemlos mit 98% Ausbeute. Unter Verwendung der oben beschriebenen Kupplungsbedingungen mit d4T konnte der *tert*-Butylester **101** in einer hervorragenden Ausbeute von 78% isoliert werden. Offensichtlich lassen sich die gefundenen Kupplungsbedingungen auch auf andere Nucleoside übertragen und ergeben bei Abwesenheit einer 3´-OH-Gruppe sogar noch leicht verbesserte Ausbeuten. Die Spaltung des Esters **101** mit einem großen Überschuss an TFA

verlief schnell und unproblematisch, so dass von der Säure **49** auf diese Weise größere Mengen (ca. 350 mg) dargestellt werden konnten. Für die nachfolgenden Peptidkupplungen wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet. Es stellte sich am Ende heraus, dass die Reaktion denkbar einfach durch Zusammenfügen aller benötigten Komponenten unter Inertgas in guten Ausbeuten verlief. Zuvor war ein Protokoll verwendet worden, in dem unterschiedliche Lösungen der Einzelkomponenten bei 0°C zusammengeführt wurden.



AS-Ester:

GlyOMe*HCl
L-AlaOMe*HCl
D-AlaOMe*HCl
L-ProOMe*HCl
GlyOBn*pTsOH
L-AlaOBn*pTsOH
L-ProOBn*HCl
L-Asp-diOBn*pTsOH
L-AlaO*t*Bu*HCl

X= H; Y= Me; 5-(GlyOMe) **87a**; 83%
X= H, Y= Bn; 5-(GlyOBn) **87b**; 78%
X= Me, Y= Me; 5-(L-AlaOMe) **88a**; 94%
X= Me, Y= Me; 5-(D-AlaOMe) **88b**; 36%
X= Me, Y= Bn; 5-(L-AlaOBn) **88c**; 88%
X= Me, Y= *t*Bu; 5-(L-AlaO*t*Bu) **88d**; 70%
X= $BnO(O)CCH_2$, Y= Bn; 5-(L-Asp-diOBn) **89a**; 85%

Y= Me; 5-(L-ProOMe) **90a**; 82%
Y= Bn; 5-(L-ProOBn) **90b**; 83%

Abb. 55: Synthese der Zielverbindungen durch Peptidkupplung

Alle Verbindungen ließen sich in guten Ausbeuten um 80% darstellen. Die einzige Ausnahme bildete 5-((D-AlaOMe)prop)*cyclo*Sald4TMP **88b** mit lediglich 36%. Es ist aber eher anzunehmen, dass bei dieser Reaktion aufgrund der geringen verwendeten Mengen an Edukten ein Fehler auftrat. Wegen der geringen eingesetzten Mengen an **49** (ca. 0.1 mmol) in den Reaktionen traten nur geringe Probleme bei der Abtrennung von Dicyclohexylharnstoff auf, es zeichnete sich allerdings ab, dass bei größeren Ansätzen die Reinigung aufwendiger werden würde. Alle Verbindungen wurden als Diastereomerengemische im Verhältnis von ca. 1.0:0.9 erhalten. Für die Prolinderivate **90a**,**b** wurden zusätzlich Rotamere erhalten, wie man an den ^{31}P-NMR-Spektren erkennt. Exemplarisch ist das ^{31}P-NMR-Spektrum der Verbindung **90a** gezeigt.

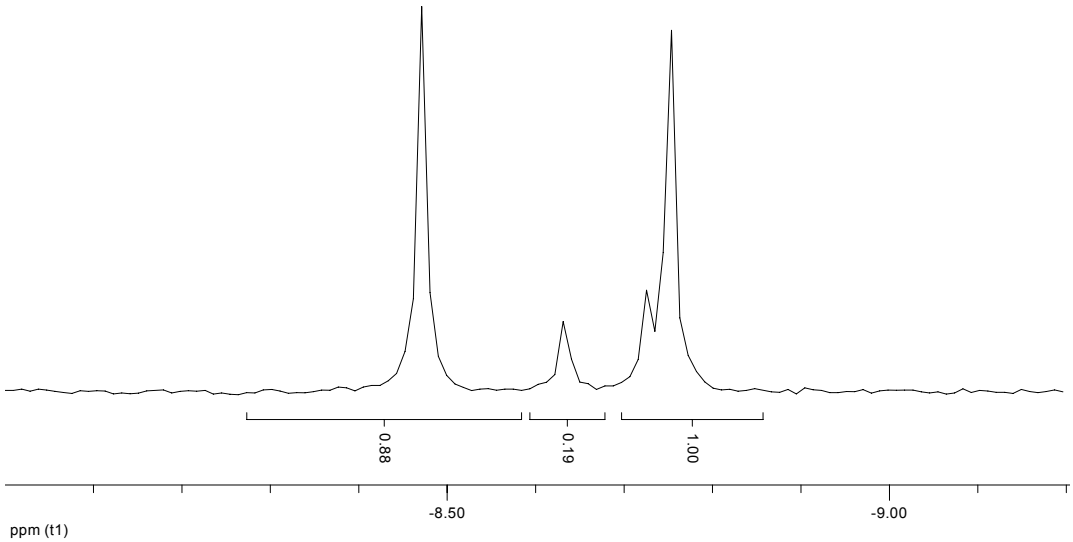


Abb 56: ^{31}P-NMR-Spektrum von **90a**; zwei Diastereomere mit E/Z-Isomeren

Um zu beweisen, dass es sich hierbei nicht um Verunreinigungen handelte, wurden temperaturabhängige ^{1}H-NMR-Spektren aufgenommen. Ein geeignetes Signal zur Bestimmung der Koaleszenz lieferte die Methylgruppe der Nucleobase T.

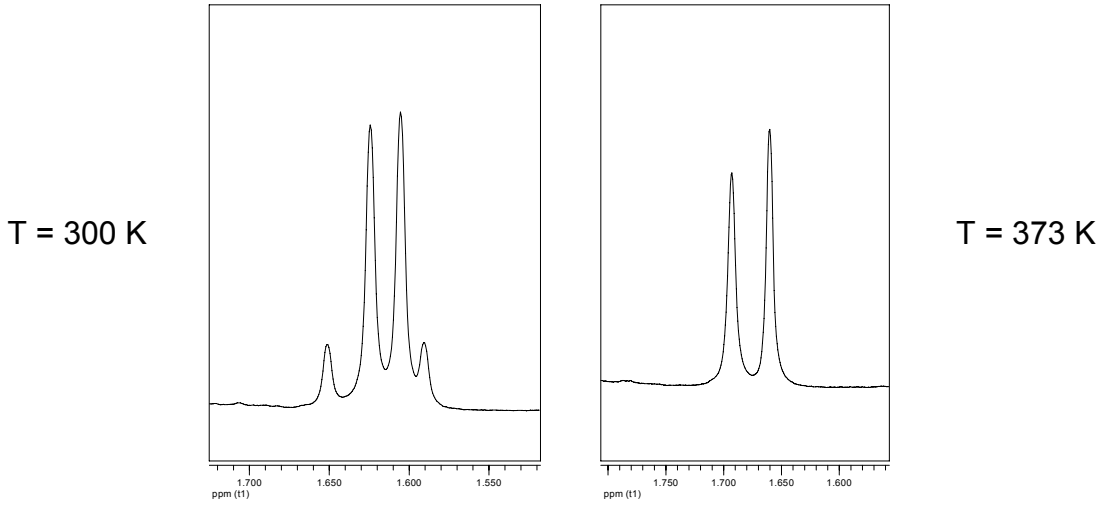


Abb. 57: Koaleszenz von **90a**

Da ein Ziel die Aufklärung des Hydrolysemechanismus der Verbindungen war, sollte exemplarisch von einer der Verbindungen der Aminosäureester selektiv gespalten werden, um eine weitere Referenzverbindung zu erhalten. Dafür bot sich erneut der *tert*-Butylester an, denn die Spaltungsbedingungen waren zuvor ja bereits zur Darstellung von der Säure **49** erfolgreich eingesetzt worden. Durch die sauren Reaktionsbedingungen sollte also weder der Triester zersetzt werden, noch war eine schnelle Racemisierung der Aminosäure zu befürchten.

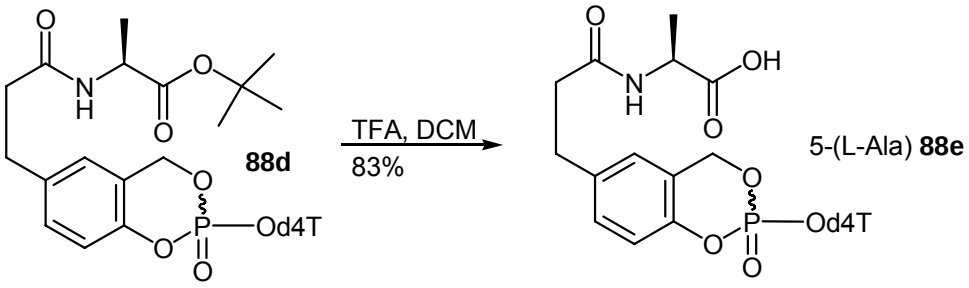


Abb. 58: Saure Spaltung von **88d** zu Zielverbindung **88e**

Damit waren für die Bestimmung des Hydrolysemechanismus (s. Abb. 47) zumindest der L-Ala-Reihe alle benötigten Referenzverbindungen (**49**, **88a**-**e**, d4TMP **83c**) vorhanden. Die Ergebnisse sollten sich aber auf die anderen Verbindungen übertragen lassen. Zusätzlich zur Bestimmung der Eigenschaften der Diastereomerengemische war auch das Verhalten der einzelnen Diastereomere von Interesse. Eine Anreicherung gelang für das Gemisch von 5-(L-AlaOBn-prop)*cyclo*Sald4TMP **88c** an der präparativen HPLC. Die Anreicherung wurde für beide Stereoisomere bis zu einem Verhältnis von ca. 9:1 erreicht.

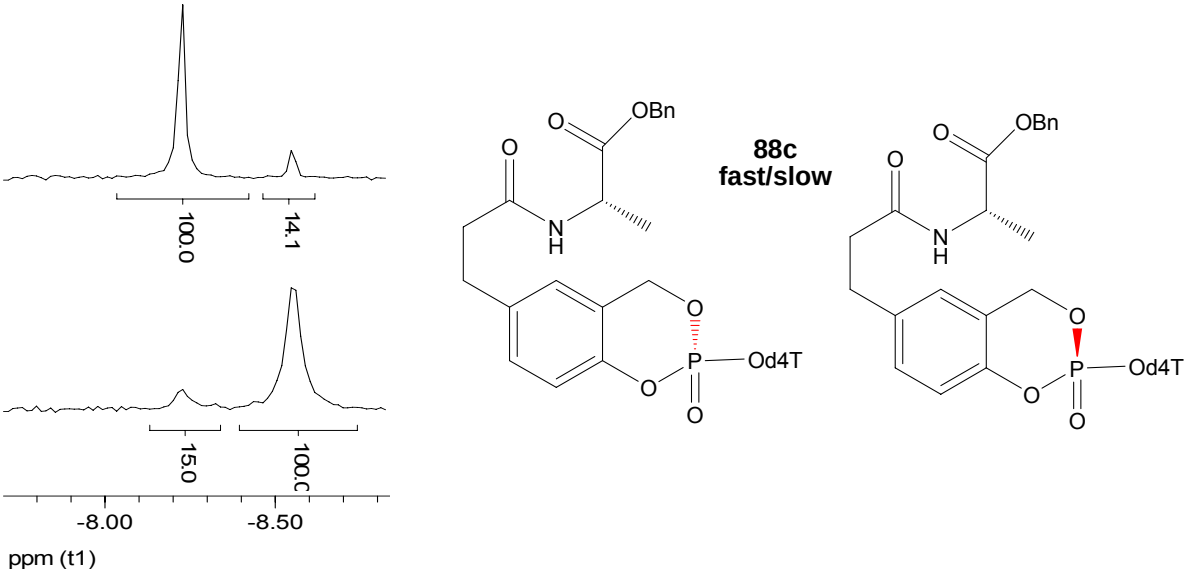


Abb. 59: Anreicherung der Diastereomere von **88c fast/slow** durch präparative HPLC

Es wurde versucht, eine Bestimmung der Konfiguration am Phosphoratom durchzuführen. Dazu sollte zunächst die CD-Spektroskopie verwendet werden. Da beide Verbindungen aber die gleichen CD-Spektren aufwiesen, konnten hierdurch keine Rückschlüsse gezogen werden. Auch die Aufnahme von NOESY-Spektren lieferte keine überzeugende Möglichkeit der Zuordnung, so dass im Folgenden die Unterscheidung der Verbindungen nur durch deren chromatographisches Verhalten

erfolgen kann. Das zuerst eluierende Stereoisomer soll daher als **88c-fast**, das Andere als **88c-slow** bezeichnet werden.

Nachdem nun recht erfolgreich eine breite Vielfalt verschiedener Aminosäure-Ester-modifizierter d4T-Triester synthetisiert werden konnte, galt das Augenmerk der Darstellung solcher Triester unter Verwendung anderer Nucleoside. Hierzu sollte die Modifikation vor der Kupplung zum Triester eingeführt werden. Die folgende Abbildung gibt die durchgeführte Synthesesequenz wieder.

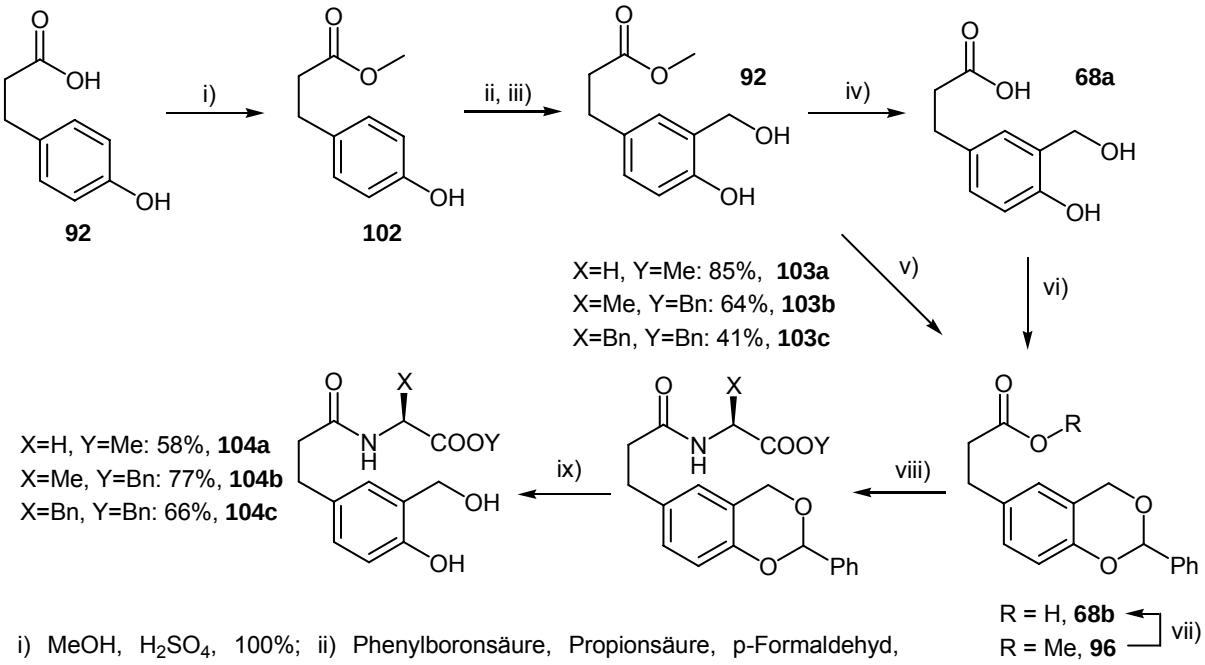


Abb. 60: Synthesesequenz zur Darstellung der modifizierten Salicylalkohole **104a**-**c**

Erneut wurde die kommerziell verfügbare Säure **92** als Ausgangsmaterial verwendet. Diese wurde durch Refluxieren in Methanol mit katalytischen Mengen Schwefelsäure in den Methylester **102** umgewandelt. Die Umsetzung erfolgte quantitativ, einfache Extraktion reichte zur Reinigung aus. Nun wurde erneut eine Hydroxymethylierung nach *Nagata* durchgeführt, welche über beide Reaktionsschritte regioselektiv den Salicylalkohol **92** in 68%iger Ausbeute lieferte. Prinzipiell gab es nun zwei Möglichkeiten fortzufahren: Die Spaltung des Methylesters unter Freisetzung der Säure **68a** oder die Einführung eines Benzylidenacetals zum Acetal **96**. Es ist bereits diskutiert worden, dass die Verbindung **68b**, die auf beiden Wegen als

Zwischenprodukt auftritt, ausgesprochen schwierig zu chromatographieren ist. Führt man aber die Synthese über die Schritte iv) und vi) durch, so ist eine Chromatographie unvermeidbar. Ausgehend vom Methylester **92** gelang daher die Synthese von **68b** auch nur mit einer Gesamtausbeute von 40%. Wenn man **92** hingegen zunächst acetalisiert (v) und dann den Methylester spaltet (vii), kann man die Säure **68b** durch simple Extraktion reinigen. Die Gesamtausbeute lag in diesem Fall dann auch bei deutlich besseren 70%. Ausgehend von der Säure **68b** konnten nun die Peptidkupplungen durchgeführt werden. Sie gelangen in Ausbeuten von 41% bis 85%. Im Fall des L-Phenylalaninbenzylesters (41%) wurde die Säure **68b** allerdings schon in deutlich gealtertem Zustand eingesetzt, so dass eine anteilige Zersetzung vor der Kupplung eingetreten sein mag. Die Spaltung der Acetale **103a**-**103c** gelang in zufriedenstellenden Ausbeuten. Insgesamt ist die Reaktionssequenz geeignet, größere Mengen der Salicylalkohole **104a**-**c** verlässlich darzustellen.

Nach den erfolgreichen Synthesen der Salicylalkohole zeigte sich, dass die nachfolgenden Synthesen der Chlorphosphite mit erheblichen Problemen behaftet waren. Dies lag an der geringen Löslichkeit der Edukte **104a**-**c** in Diethylether. Der Salicylalkohol **104a** war zwar in THF löslich, kristallisierte aber bereits beim Abkühlen auf -5 °C aus.

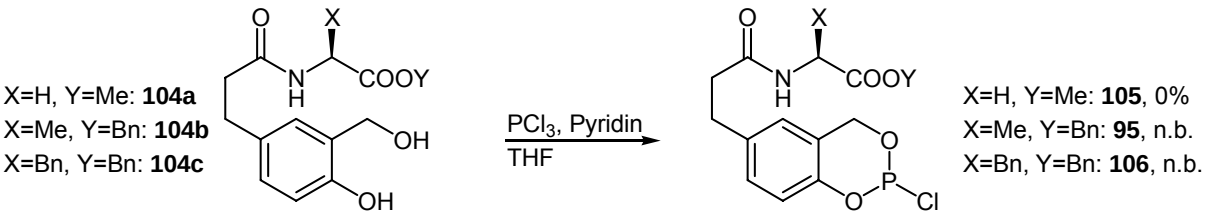


Abb. 61: Synthese der Saligenylchlorphosphite **95**, **105**, **106**

Ein Problem bei der Synthese von Chlorphosphiten in THF ist die Löslichkeit von Pyridiniumchlorid, welches durch Schlenkfiltration nicht mehr vollständig abgetrennt werden kann. Die Verbindungen wurden daher mit deutlichen Mengen verunreinigender Salze isoliert. Das Chlorphosphit **105** konnte im ^{31}P-NMR-Spektrum nicht nachgewiesen werden, die anderen beiden Chlorphosphite wurden als Diastereomerengemische erhalten.

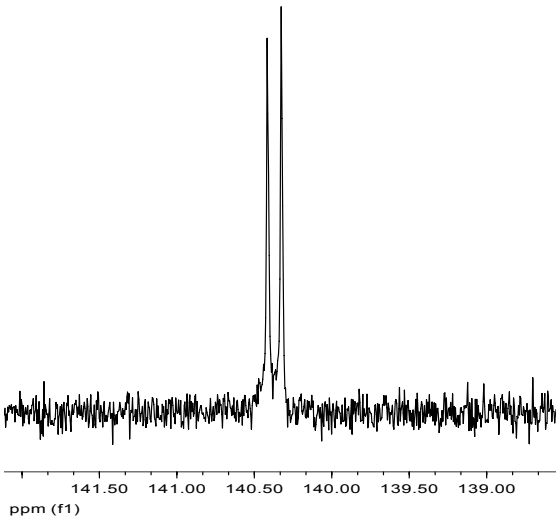


Abb. 62: Ausschnitt aus dem ^{31}P-NMR-Spektrum von dem Chlorphosphit **95**

Wegen des geringen Wissens über Art und Umfang der Verunreinigungen wurden für die nachfolgenden Kupplungsreaktionen Stammlösungen der Chlorphosphite angefertigt und von einem Umsatz von 100% ausgegangen. Diese Schätzung erwies sich als hinnehmbar, dennoch waren die Ausbeuten der Triestersynthesen nicht gut. Im Gegensatz zur Synthese der POM-funktionalisierten *cyclo*Sal-Triester, mussten die Produkte nach der Reaktion nicht erst durch Extraktion von den Reagenzien befreit werden, um eingeengt werden zu können. Um die Umsetzung zum ACV-Triester **94a** erfolgreich durchführen zu können, wurde wiederum auf das in DMF lösliche N^2-DMTr-geschützte ACV **73** zurückgegriffen. Die Reaktion gelang mit 24%. Nachfolgend wurde die Schutzgruppe mit TFA in quantitativer Ausbeute entfernt und so der ACV-Triester **94a** freigesetzt. Die Synthese des BVdU-Triesters **93a** gelang in 25%iger Ausbeute.

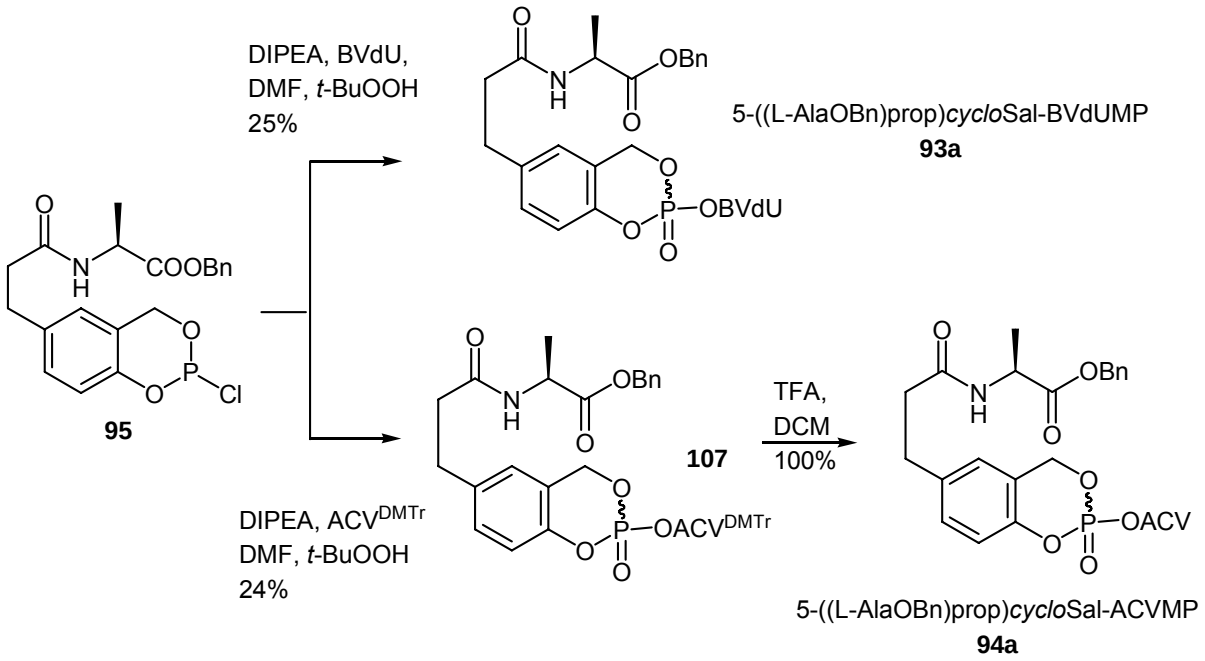


Abb. 63: Synthese der Zielverbindungen **93a** und **94a**

Auf die in diesem Kapitel beschriebene Weise gelang es also, eine große strukturelle Vielfalt verschiedener d4T-Triester zu erzeugen, um diese hinsichtlich der am besten geeigneten Maske zu untersuchen. Gegenüber den Acylal-modifizierten Verbindungen erscheint dies als deutlicher Vorteil. Zudem konnte eine der Masken sowohl an BVdU, als auch an ACV gekuppelt werden, was die breite Einsetzbarkeit der entwickelten Syntheseroute unterstreicht.

4.1.3.3 Charakterisierung der mit Aminosäure-Estern modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotide

In diesem Kapitel soll erneut anhand der Chromatogramme und durch Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten nach standardisierten Verfahren der Mechanismus der Hydrolyse detailliert aufgeklärt werden. Das folgende Diagramm gibt die Stabilität in PBS bei pH= 7.3 sowie die Stabilität in humanem CEM/0 Zellextrakt für die unterschiedlichen d4T-Triester zum direkten Vergleich wieder.

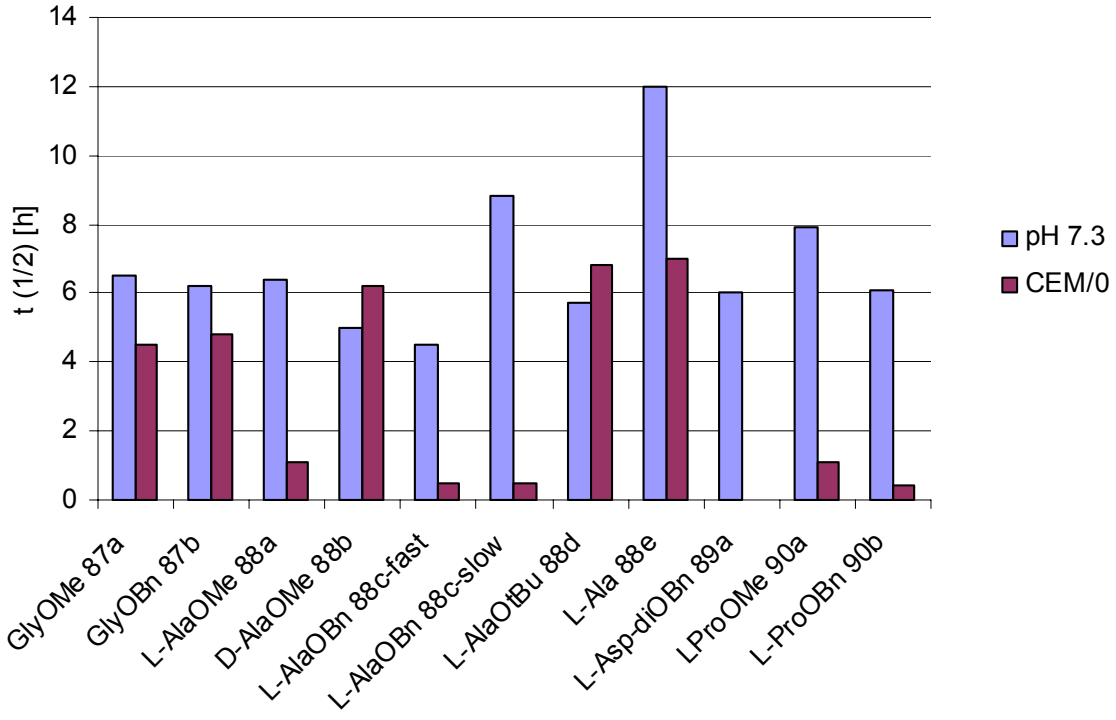


Diagramm 4: Hydrolysehalbwertszeiten der d4T-Triester **87**-**90**

Zunächst einmal sollen anhand dieser Daten einige generelle Feststellungen getroffen werden. Die Hydrolysehalbwertszeit der meisten dargestellten Diastereomerengemische in PBS-Puffer liegt bei ca. 6 h. Es konnte also auf diese Weise bereits eine deutliche Stabilisierung gegenüber den 5-Acylal-modifizierten Triestern **53a**-**c** ($t_{1/2} \approx 4.5$ h) erzielt werden, ein Umstand der sich vermutlich auf die erhöhte Stabilität der Amid- und Esterbindung sowie deren Elektronenreichtum im Vergleich zum Acylal zurückführen lässt. Die erhöhte hydrolytische Stabilität der Säure **88e** wurde bereits für die Säure **49** gefunden und könnte mit einer repulsiven Wechselwirkung gegenüber Hydroxidionen in Verbindung gebracht werden. Für die getrennten Diastereomere bleibt festzuhalten, dass sich die Halbwertszeiten deutlich unterscheiden, im Mittel aber wiederum 6 h ergeben. Dies könnte ein Grund für die oft gefundenen unterschiedlichen antiviralen Aktivitäten diastereomerenreiner *cyclo*Sal-Triester sein. Eine zu geringe chemische Stabilität für eines der Diastereomere könnte zu einer nicht effektiven intrazellulären Freisetzung von d4TMP führen. Die Untersuchung der Stabilität der Verbindungen gegenüber enzymatischer Spaltung sollte das potentielle „lock-in“-Verhalten aufzeigen. Einzig für Verbindung **89a** konnte die Halbwertszeit nicht ermittelt werden. Ursprünglich war der Gedanke, dass die Einführung zweier spaltbarer Benzylester eine noch größere

Beschleunigung der enzymatischen Hydrolyse hervorrufen sollte. Die erhaltenen Chromatogramme waren allerdings derart komplex, dass eine vernünftige Auswertung nicht durchgeführt werden konnte. Es bleibt lediglich festzustellen, dass **89a** in CEM/0 Extrakt zu Folgeprodukten gespalten wird.

Den Daten kann weiterhin entnommen werden, dass die Glycin-Triester **87a**,**b** in CEM/0 gegenüber der chemischen Hydrolyse zwar beschleunigt zersetzt werden, diese Beschleunigung allerdings geringfügig ist. Im direkten Vergleich werden z.B. die Alanin-Triester **88a**, **88c fast/slow** sowie die Prolin-Triester **90a**,**b** wesentlich effizienter gespalten und zwar offensichtlich unabhängig von der Stereochemie am Phosphoratom. Ein Wechsel der Stereochemie der Aminosäure von L-Ala zu D-Ala führt hingegen zu einem vollständigen Ausbleiben der enzymatischen Spaltung von **88b**. Dies gilt gleichsam für den *tert*-Butylester **88d**. Die beschleunigte Hydrolyse der Säure **88e** in CEM/0 gegenüber PBS soll später noch anhand der Chromatogramme analysiert werden. Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle folgendes aus den Daten ableiten:

1. 5-Aminosäure-Ester-funktionalisierte *cyclo*Sal-d4TMP weisen generell eine chemische Halbwertszeit von etwa 6 h auf.
2. Die enzymatische Stabilität wird beeinflusst durch die verschiedenen Ester. Dabei gilt folgende Reihung: Bn > Me > *t*-Bu.
3. Die enzymatische Stabilität wird beeinflusst durch die Aminosäure. Dabei scheint Glycin zur Erkennung durch das Enzym schlecht, Alanin und Prolin hingegen gut geeignet.
4. Die enzymatische Stabilität wird massiv beeinflusst durch die Stereochemie der Aminosäure.
5. Sie wird nicht beeinflusst durch die Stereochemie am Phosphoratom.

Aus diesen Erkenntnissen ließ sich eine generelle Struktur „lock-in“-funktionalisierter Masken ableiten. Wenn man eine möglichst große Differenzierung zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Stabilität erreichen will, sollten Aminosäuren der L-Reihe verwendet werden, die einen Benzylester tragen. Glycin scheint als Aminosäure für dieses Ziel wenig geeignet. Da bei Prolin-Derivaten stets auch Rotamere auftraten, wurde zur Vereinfachung die 5-(L-AlaOBn)-Maske für die

Synthese des BVdU-Triesters **93a** und des ACV-Triesters **94a** verwendet. Das folgende Diagramm gibt die Stabilitäten dieser beiden Triester wieder.

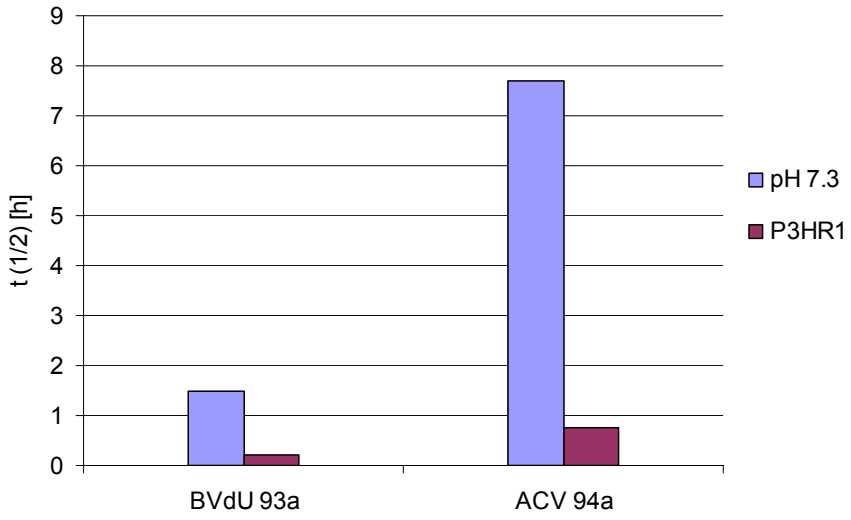


Diagramm 5: Vergleich der Hydrolysestabilitäten von **93a** und **94a**

5-((L-AlaOBn)prop)*cyclo*Sal-ACVMP **94a** zeigt auf den ersten Blick das erwartete Verhalten; eine chemische Stabilität von ca. 8 h und eine beschleunigte enzymatische Hydrolyse mit $t_{1/2}$ = 45 min. Gerade aber diese relativ große Halbwertszeit im Vergleich zu den sonst erhaltenen Werten bei der Spaltung von Benzylestern gibt Anlass zur Verwunderung. Schaut man sich einmal die erhaltene Kurve an, die eine exponentielle Abnahme beschreiben sollte, fällt die extreme Ungenauigkeit deutlich ins Auge.

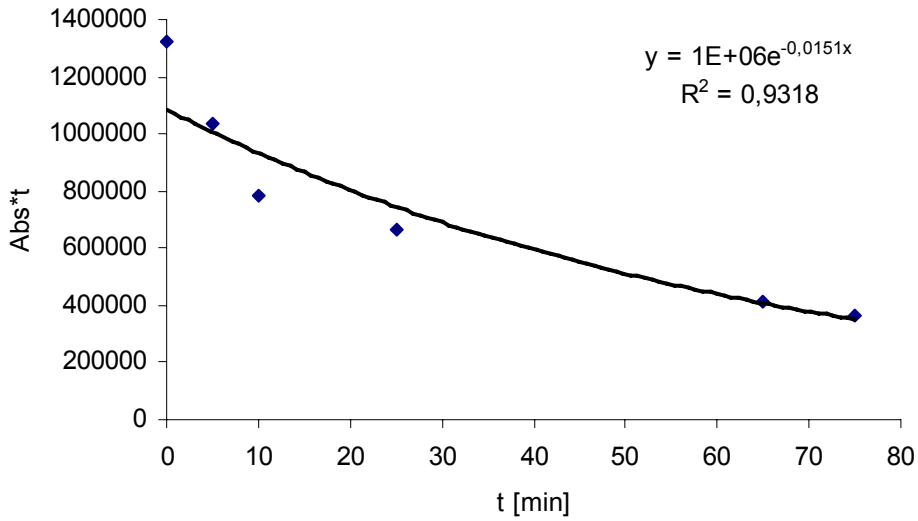


Diagramm 6: Exponentielle Ausgleichskurve zur Bestimmung von $t_{1/2}$ von **94a** in P3HR1

Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass die Datenpunkte scheinbar in zwei Bereiche zerfallen; eine anfänglich schnelle Abnahme, die ab ca. 20 min von einer deutlich langsameren Abnahme überlagert wird. Dies ist im folgenden Diagramm dargestellt.

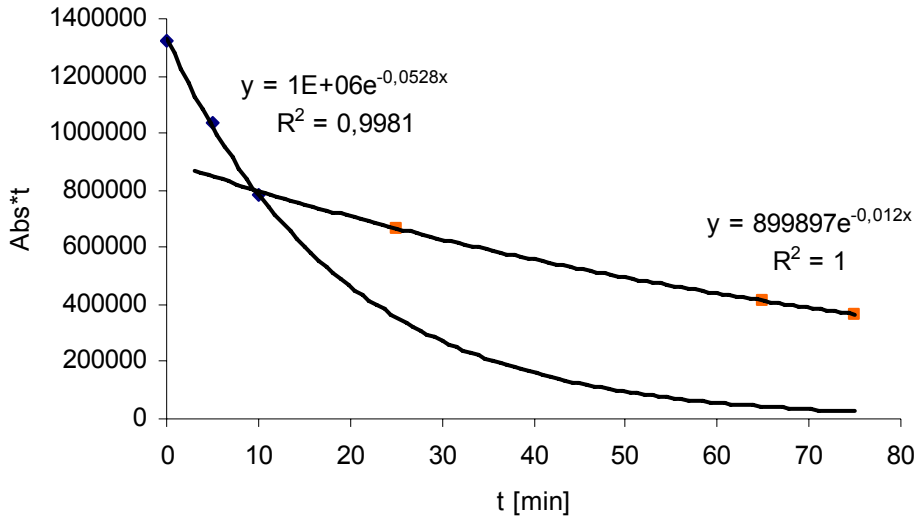


Diagramm 7: Überlagerte Graphen zweier verschiedener Hydrolyseprozesse von **94a**

Diese Ausgleichskurven weisen deutlich bessere R^2-Werte auf, man muss daher annehmen, dass zwei verschiedene Hydrolysegeschwindigkeiten für **94a** vorliegen, eine mit $t_{1/2} \approx 15$ min, die andere mit $t_{1/2} \approx 60$ min. Es erscheint nun ausgesprochen wahrscheinlich, dass dieses Verhalten von den unterschiedlichen Diastereomeren verursacht wird, was in diesem Fall also eine Beeinflussung der Hydrolyse durch die Konfiguration am Phosphoratom anzeigt. Eine weitere Möglichkeit wäre das Auftreten unspezifischer Proteinbindung, bei welcher zuerst eine rasche Adsorption des Moleküls an verschiedene Proteine stattfindet. Nachfolgend dient das Protein als Reservoir für die langsame Freisetzung des Triesters. Dieses Phänomen konnte aber durch das nachfolgende Experiment als relativ unwahrscheinlich dargestellt werden, denn interessanterweise konnte das Verhalten der anfangs beschleunigten Hydrolyse für den 3-Me-5-POM-modifizierten ACV-Triester **58** bei Verwendung von 0.9 U PLE reproduziert werden, so dass sich hier die Möglichkeit einer kinetischen Racematspaltung ergab. Das Experiment wurde allerdings ohne Isolierung der Hydrolyseprodukte durchgeführt.

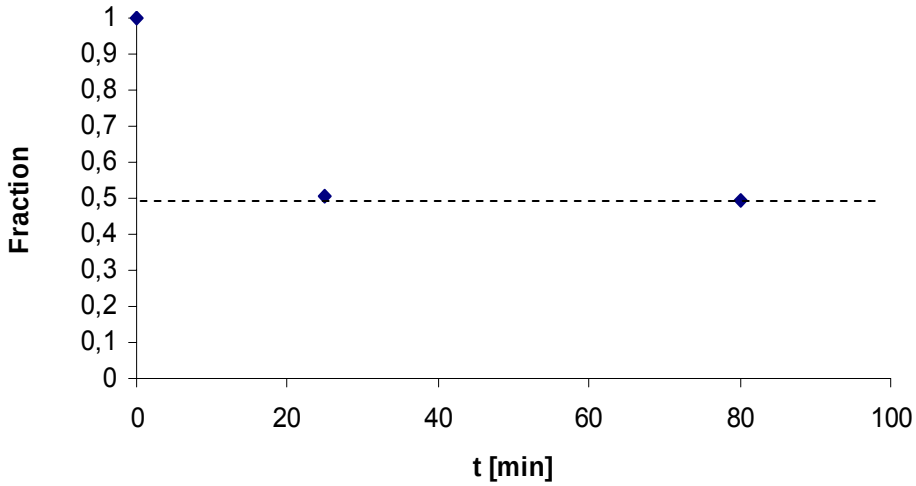


Diagramm 8: Kinetische Racematspaltung von **58** durch Inkubation mit 0.9 U PLE

In dem Experiment wurde ein Enantiomer zur Säure **85b** hydrolysiert, das andere Enantiomer des 3-Me-5-POM-modifizierten ACV-Triesters **58** blieb unter diesen Bedingungen stabil. Die gestrichelte Linie zeigt die 50%-Marke. Bereits nach 25 min war die Verbindung zur Hälfte abgebaut. Danach fand keine wesentliche Hydrolyse im untersuchten Zeitraum mehr statt.

Die in Diagramm 5 gezeigten Daten für 5-((L-AlaOBn)prop)*cyclo*Sal-BVdUMP **93a** weisen ebenfalls eine Besonderheit auf, diesmal allerdings bei der chemischen Hydrolyse. So ist der Wert von $t_{1/2}$ = 1.5 h wesentlich geringer als erwartet und lässt sich mit dem assistierenden Effekt der 3´-OH-Gruppe nur unbefriedigend deuten. Die Chromatogramme der chemischen Hydrolyse von **93a** sollen unter Zuhilfenahme eines Chromatogramms aus der Hydrolyse in P3HR1 diskutiert werden, da im letzteren Fall die Entstehung der Säure **93b** sehr wahrscheinlich ist. Man sollte daher erkennen, ob eine Spaltung der Esterfunktion auch in der chemischen Hydrolyse auftritt.

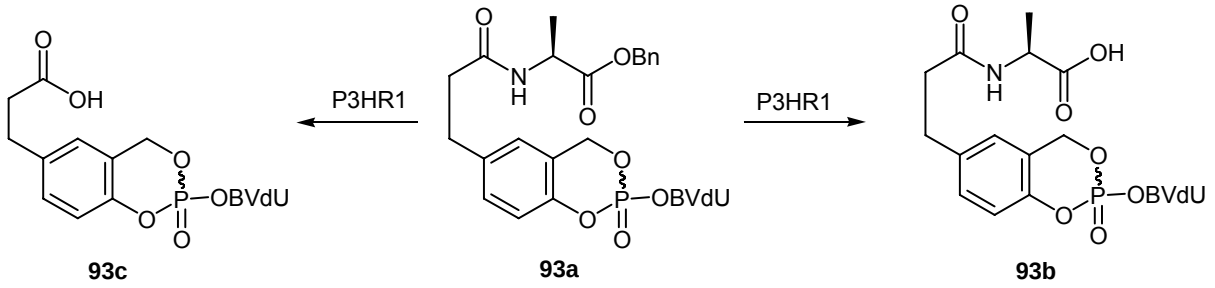


Abb. 64: Zwei mögliche Hydrolyseprodukte von **93a** in P3HR1

Die Freisetzung von **93b** ist im blauen Chromatogramm gezeigt (P3HR1 40 min). Es ist zumindest sehr wahrscheinlich, dass es sich um **93b** handelt, da für die d4T-Derivate nur die Spaltung des Esters und nicht der Amidbindung (s.u.) nachgewiesen wurde. Man erkennt, dass unter chemischen Bedingungen eine Spaltung zu der Säure **93b** nicht stattfindet. Des Weiteren tritt im Chromatogramm nach 4 h ein Intermediat X auf, welches nach 22 h verschwunden ist. Am Ende der Hydrolyse nach 22 h liegen zwei Hauptprodukte vor. Erfahrungsgemäß würde man den Peak bei t_R = 8.3 min BVdUMP zuordnen. Für den anderen Peak bliebe als Möglichkeit z.B. die Säure **93c**. Ein Blick auf die Struktur würde aber eher vermuten lassen, dass **93c** polarer als **93b** sein und deswegen im Chromatogramm eher links von **93b** eluieren sollte. Eine weitere Möglichkeit könnte die Entstehung von BVdUDP mit einem Anteil von 24% sein. Das wäre überraschend viel, normalerweise liegt dieser Anteil zwischen 5 bis 10%. Es wird jedoch noch gezeigt werden, dass bei vielen Aminosäure-Ester funktionalisierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden große Mengen Nucleosiddiphosphat entstehen.

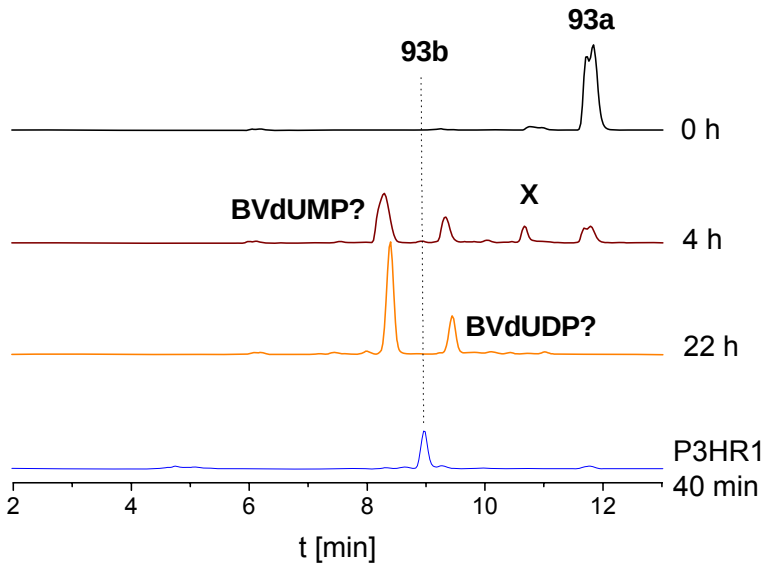


Abb. 65: Hydrolyse von **93a** (Methode 4)

Aus den vorliegenden Daten lässt sich der Mechanismus leider nicht aufklären. Die beschleunigte Hydrolyse könnte allerdings mit dem Intermediat X zusammenhängen.

Es sollen nun die d4T-Derivate **87**-**90** weiter untersucht werden, um den Spaltungsmechanismus an der Aminosäurefunktion aufzuklären. Dabei soll zumindest für die L-Ala-Reihe **88a**-**e** gezeigt werden, dass die enzymatische Spaltung am Ester und nicht an der Amidbindung stattfindet. Dazu musste zunächst

eine HPLC-Methode gefunden werden, in welcher die Säuren **49** und **88e** unterscheidbar wären. Ein Problem bei der verwendeten Ionenpaarchromatographie an einer RP-18 Umkehrphase stellte das in den Vordergrund Treten der negativen Ladung am System als Haupteinfluss auf das Elutionsverhalten dar. Es konnte daher unter Ionenpaarbedingungen mit TBAH keine Separation von **49** und **88e** erreicht werden. Auf der anderen Seite neigten beide Säuren bei Standardbedingungen (Wasser mit Acetonitril-Gradient) ohne Ionenpuffer zu einem stark ausgeprägten Fronting der Peaks über mehrere Minuten, so dass auch hier keine wirklich genaue Zuordnung bei der Analyse von Zellextrakthydrolysen hätte getroffen werden können. Ein nicht besonders schöner aber wohl überzeugender Ausweg, der gefunden wurde, lag in der Verwendung eines Wasser-Methanol-Gradienten bei erhöhter Flussrate (Methode 7). Dabei ergab Verbindung **88e** einen scharfen Peak, die Säure **49** hingegen eine Art Hügel, mit überlappender Retentionszeit, aber aufgrund der Form doch deutlich unterscheidbar.

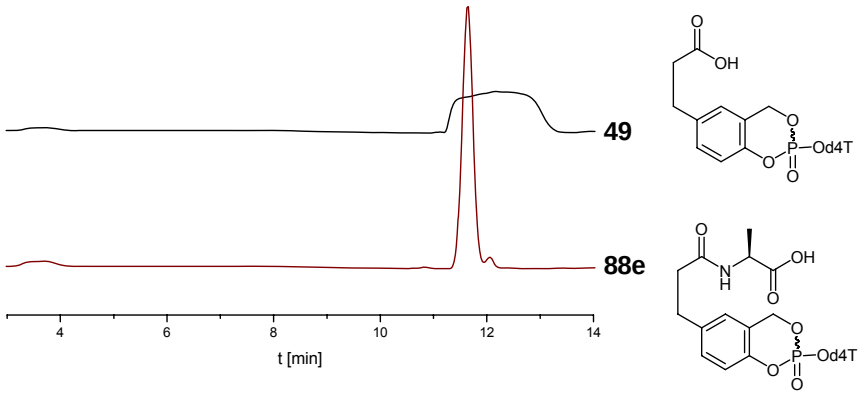


Abb. 66: Referenzverbindungen **49** und **88e** (Methode 7)

Es wurde nun mit dem Diastereomerengemisch **88c fast/slow** eine CEM/0 Zellextraktstudie unter Verwendung der oben beschriebenen HPLC-Methode durchgeführt. Bei dem nach 30 min erhaltenen Wert wurde zusätzlich die Referenz **88e** coinjiziert. Aus den Chromatogrammen wird ersichtlich, dass die freie Säure **49** nicht entsteht, andererseits ist nicht klar, ob **88e** durch die größere Verdünnung in den Zellextraktstudien auf der RP-18-Säule in die Diastereomere angetrennt wurde oder ob noch eine weitere unbekannte Verbindung bei der enzymatischen Hydrolyse entstanden war. Dieses potentielle Nebenprodukt ist mit einem X gekennzeichnet. Dafür, dass es sich um eine Antrennung handelt, spricht, dass beide Peaks zu etwa gleichen Anteilen entstehen. Andererseits sollte dann auch **88c** angetrennt vorliegen.

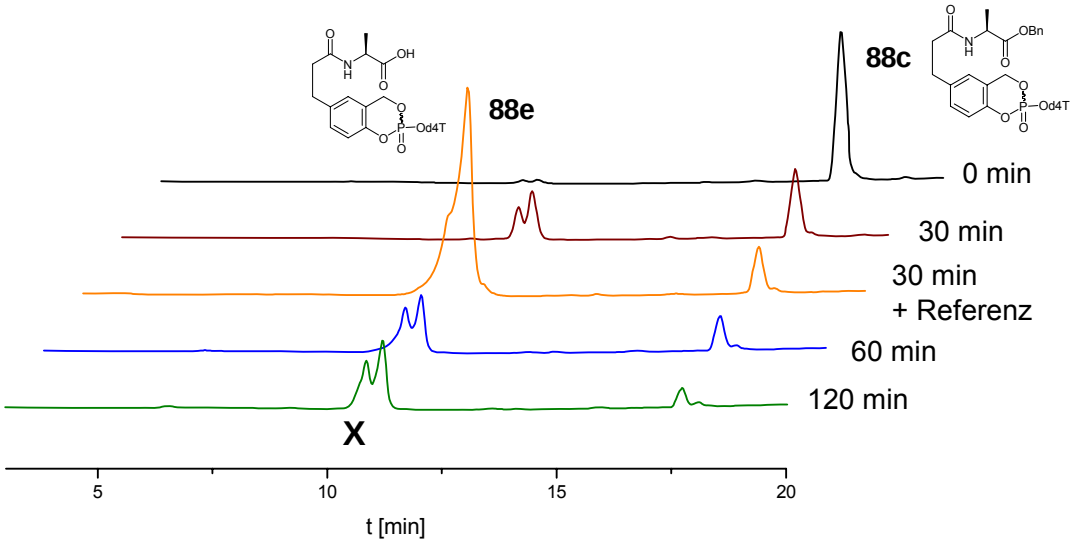


Abb. 67: Hydrolyse von **88c** in CEM/0 (Methode 7)

Um diese Frage zu klären, wäre sicherlich LC-MS-Technik ausgesprochen nützlich. Da aber zum Zeitpunkt der Durchführung der Analysen diese Methodik nicht zur Verfügung stand, wurde, da ja nun bewiesen war, dass die Säure **49** nicht entsteht, eine Analyse des Inkubationsgemisches in CEM/0 nach 20 min mit einer Ionenpaarmethode durchgeführt. Das nachfolgende Chromatogramm zeigt recht deutlich, dass neben der Säure **88e** Nebenprodukte entstanden, die, ihren UV-Spektren nach zu urteilen, Nucleosid-haltig waren. Ein eindeutiges Produkt entsteht also bei der enzymatischen Hydrolyse über den beobachteten Zeitraum von 2 h nicht. Dennoch ist **88e** das Hauptprodukt.

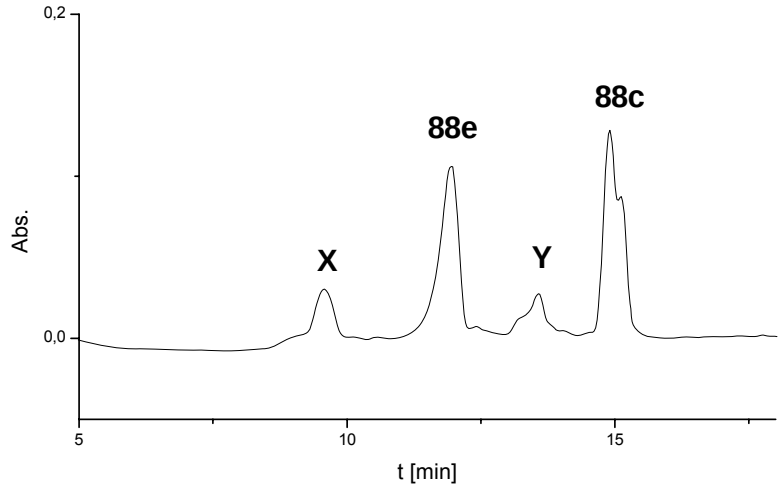


Abb. 68: Analyse von **88c** nach 20 min Inkubation in CEM/0 mit TBAH-Ionenpuffer (Methode 2)

Es war nun noch zu klären, ob die als Hauptintermediat auftretende Säure **88e** befähigt ist, d4TMP **83c** freizusetzen. Die Bestimmung der Halbwertszeiten bei

pH= 7.3 gelang problemlos durch Verwendung einer Standardmethode ohne Ionenpuffer. Für die Bestimmung in CEM/0 wurden mit dieser Methode jedoch ausgesprochen verbreiterte Peaks, sogar schon bei der Bestimmung des 0-Wertes, erhalten. Bei Anwendung von Ionenpaarchromatographie betrug die Retentionszeit der Säure **88e** exakt die des potentiellen Spaltproduktes d4TMP **83c**, so dass die Hydrolysehalbwertszeit in CEM/0 aus den stark verbreiterten Peaks ermittelt werden musste. Der gemessene Wert für die Halbwertszeit in CEM/0 sollte daher mit relativ großer Ungenauigkeit behaftet sein, so dass die Verkürzung von $t_{1/2}$ = 12 h in PBS auf $t_{1/2}$ = 7 h hier nicht weiter diskutiert werden soll. Ein Maß für die Effektivität der Freisetzung von d4TMP **83c** aus der Säure **88e** soll daher die im nächsten Kapitel präsentierte TK^--Aktivität der Verbindungen sein, denn eine solche könnte nicht auftreten, würden nicht auch relevante Mengen d4TMP **83c** freigesetzt.

Ein weiteres außergewöhnliches Verhalten trat bei der Inkubation der getrennten Diastereomere **88c fast/slow** in humanem Blutplasma bei pH= 7.3 auf. Die Inkubation in 10%igem Blutplasma in PBS des Gemisches **88c** zeigte keine beschleunigte Hydrolyse gegenüber PBS pH= 7.3 an, was als ausgesprochen wünschenswert zu erachten ist. Bei Inkubation der getrennten Stereoisomere, diesmal in 50%igem humanem Plasma, wurde allerdings eine Verkürzung der Halbwertszeiten für eine der Verbindungen gemessen. Dies ist im folgenden Diagramm gezeigt.

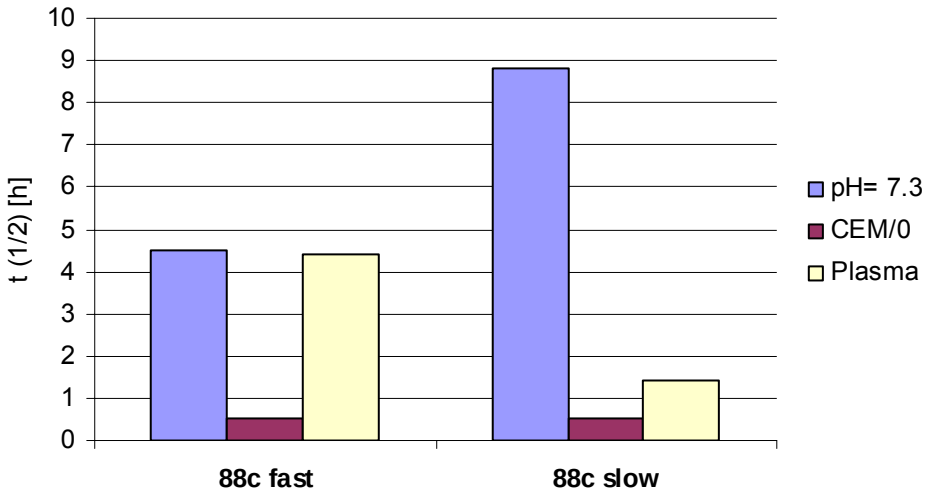


Diagramm 9: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten von **88c fast** und **slow** in verschiedenen Medien

Wegen der erstaunlichen Abnahme der Stabilität von **88c slow** in humanem Plasma wurden die Experimente erneut -mit dem gleichen Ergebnis- durchgeführt. Dies zeigt, dass die im Serum enthaltenen Esterasen ihre Aktivität abhängig von der Stereochemie am Phosphoratom entfalten und im Fall von **88c slow** eine deutliche Reduktion der Stabilität um etwa den Faktor 6 auftritt. Hingegen wird **88c fast** nicht gespalten. Da die Chromatogramme ohne Verwendung von Ionenpuffer gemessen wurden, lässt sich keine wirkliche Aussage über die Hydrolyseprodukte treffen. Eine Möglichkeit wäre die enzymatische Hydrolyse des „lock-in"-Esters. Eine weitere Möglichkeit sei hier nur kurz diskutiert. Umfassende Untersuchungen sind in der Literatur beschrieben.[85] Ein Enzym des humanen Blutplasmas ist die Butyrylcholinesterase (BChE, E.C. 3.1.1.8), deren genaue Funktion nicht bekannt ist.[86] Der katalytische Mechanismus der BChE wurde allerdings aufgeklärt und steht in Analogie zu den Serin-Proteasen, die zur Spaltung von Estern die katalytische Triade, bestehend aus einem Serin-, Histidin- und Glutamat-Rest, verwenden. Weiterhin ist bekannt, dass Cholinesterasen durch Organophosphate (und genau solche sind *cyclo*Sal-Triester) über einen *suicide-inhibition-mechanism* inaktiviert werden können.[87] Für verschiedene *cyclo*Sal-Triester wurden nun umfangreiche Analysen zur Aufklärung eines solchen Verhaltens durchgeführt, wobei sich eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufstellen ließ.[85] Ein Ergebnis dieser Studien war, dass die Inhibition von BChE, wenn sie überhaupt auftritt, stark in Abhängigkeit zu der Konfiguration am P-Atom steht. Es ist also ebenso denkbar, dass **88c slow** im Blutplasma als *suicide-Inhibitor* der Butyrylcholinesterase auftritt. Dieses Verhalten konnte allerdings nur gefunden werden, da 50%iges Plasma und nicht die für diese Untersuchungen üblichen 5%igen Plasmaverdünnungen verwendet wurden. Normalerweise wird die starke Verdünnung der Plasmalösungen mit deren unvorteilhaftem Gelieren bei längeren Inkubationsdauern begründet. Diese Begründung stellte sich allerdings als falsch heraus, da keine Verdickung auch über 20 h Inkubationsdauer beobachtet werden konnte.

Abschließend zu diesem Kapitel über die Charakterisierung von Aminosäure-Ester modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden soll noch eine weitere interessante Eigenschaft der Verbindungen angesprochen werden, die, auf Seite 41-42 bereits vorgestellt, jetzt noch einmal quantifiziert werden soll. Es geht um die Entstehung von Nucleosiddiphosphaten aus *cyclo*Sal-Triestern bei der chemische Hydrolyse durch

nucleophilen Angriff von Phosphat auf das Pronucleotid. Die Freisetzung kann durch ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung eindeutig gezeigt und die Menge bestimmt werden. Dabei wurden alle Spektren zur Vereinfachung Protonen-entkoppelt aufgenommen.

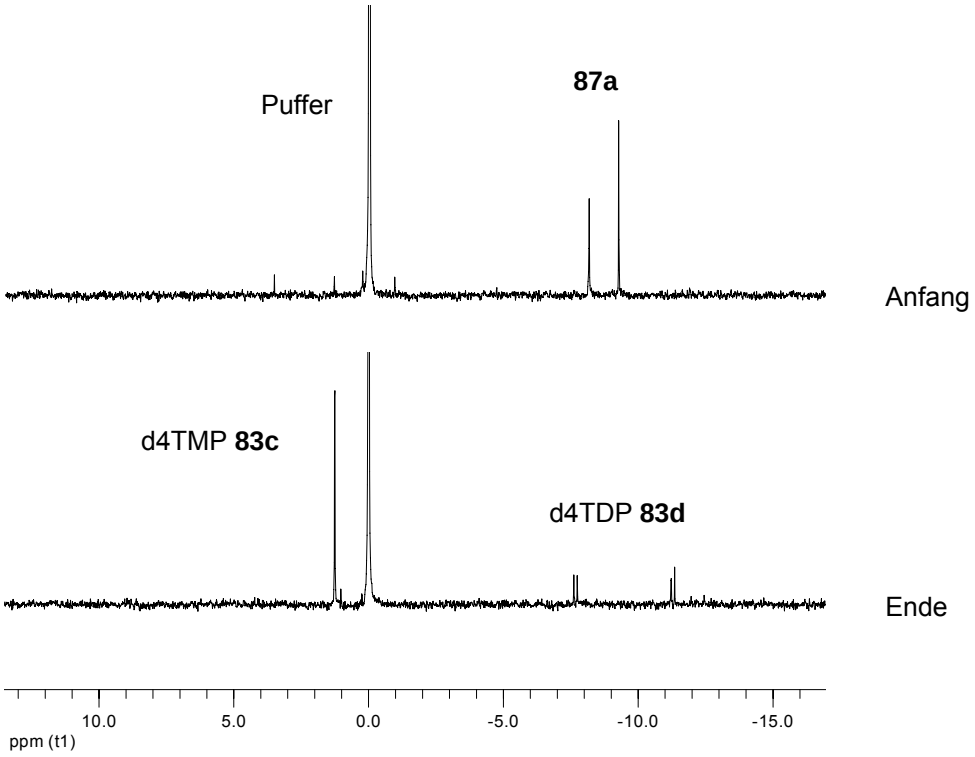


Abb. 69: ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 5-(GlyOMe) **87a**

Für Verbindung **87a** ist eine solche Hydrolyse in Abbildung 69 gezeigt. Man erkennt zu Beginn das Vorliegen der beiden Diastereomere **87a** und das Signal der Phosphationen aus dem Puffer. Zum Ende der Hydrolyse liegen nur noch d4TMP **83c** und d4TDP **83d** vor. Letzteres zeigt zwei Signale, die wegen der P-P-Kopplung zu Dubletts aufspalten. Offensichtlich hydrolysiert **87a** ausschließlich zu zwei Produkten, die beide hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität erwünscht sind. Am Beispiel des 5-(L-ProOMe)-Triesters **90a** sei noch auf eine mechanistische Besonderheit dieser Hydrolysen hingewiesen: Das Auftreten eines Benzylphosphatdiesters **90c** als Intermediat der Hydrolyse. Dieser ist im mittleren Spektrum der nachfolgenden Abbildung markiert. Des Weiteren tritt ein Intermediat X auf, welches nicht zugeordnet werden konnte. Dennoch sind am Ende der Hydrolyse erneut nur d4TMP **83c** und d4TDP **83d** die Produkte. Die Peaks von d4TDP **83d** sind noch einmal hervorgehoben abgebildet, um die Kopplung zu verdeutlichen.

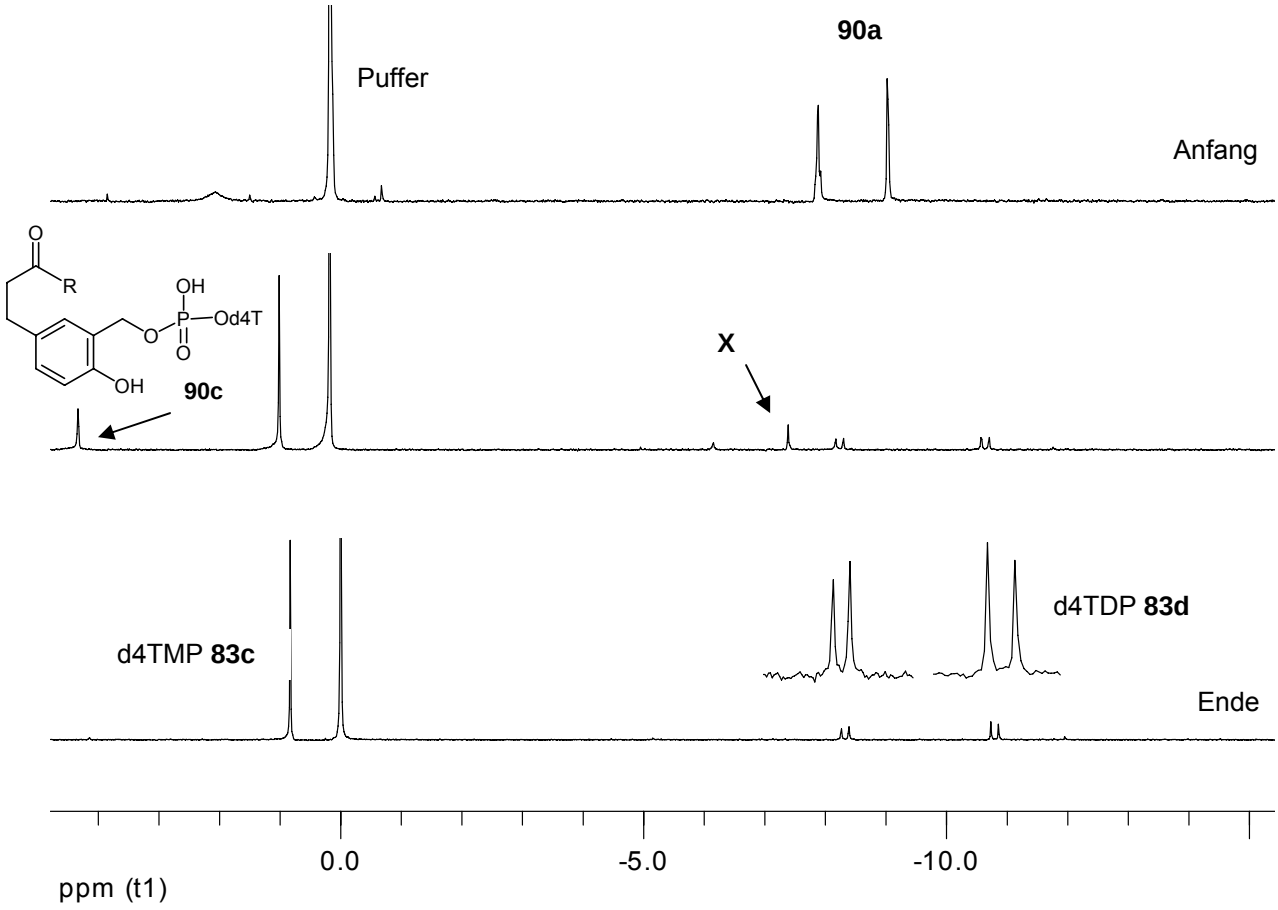


Abb. 70: ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von 5-(L-ProOMe) **90a**

Es wurden noch weitere Verbindungen hinsichtlich ihres Hydrolysemechanismus unter diesen Bedingungen untersucht, für alle ergab sich aber ein ähnliches Verhalten, so dass hier keine weiteren Spektren abgebildet werden sollen. Die prozentual freigesetzten Mengen d4TMP **83c** und d4TDP **83d** im Vergleich mit der Referenzverbindung *cyclo*Sal-d4TMP **108** sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

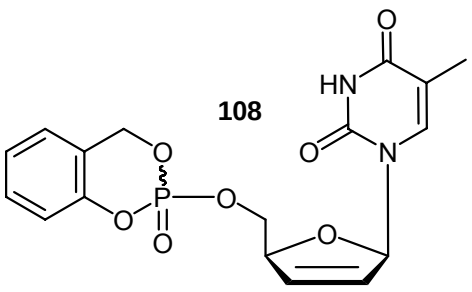


Abb. 71: Referenzverbindung

Verbindung Nr.	d4TMP **83c** [%]	d4TDP **83d** [%]
5-(GlyOMe) **87a**	83	17
5-(GlyOBn) **87b**	83	17
5-(L-AlaOMe) **88a**	86	14
5-(L-AlaOBn) **88c fast/slow**	82	18
5-(L-ProOMe) **90a**	85	15
108	94	6

Tab. 3: Vergleich der Produktverteilung chemischer Hydrolysen

Aus der Tabelle geht deutlich die anteilig größere Freisetzung von d4TDP **83d** aus den Verbindungen **87**, **88** und **90a** im Vergleich zur Referenz **108** hervor. Die Ursache für dieses Verhalten blieb im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt.

Insgesamt scheinen einige der dargestellten Verbindungen für einen intrazellulären Einschluss geeignet zu sein, obwohl der Hydrolysemechanismus insbesondere in CEM/0 nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Festzuhalten bleibt, dass eine enzymatische Spaltung der Amidbindung nicht auftrat. Dennoch scheinen auch andere Prozesse, als die Spaltung der Estergruppe, im Zellextrakt abzulaufen. Um eine effektive Freisetzung von d4TMP intrazellulär nachzuweisen, wurden die antiviralen Aktivitäten der Verbindungen in Kooperation mit Prof. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, ermittelt. Die antiviralen Daten für das BVdU-Derivat **93a** und das ACV-Derivat **94a** lagen zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht vor.

4.1.3.4 Antivirale Eigenschaften der mit Aminosäure-Estern modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotide

Die antiviralen Profile der Verbindungen wurden analog Abschnitt 4.1.2.4 ermittelt. Obwohl die Ergebnisse aus unterschiedlichen Testreihen stammten, ist nur ein Wert für das Referenznucleosid d4T angegeben, da die Werte ähnlich waren. Es schien

daher ratsamer, zum direkten Vergleich alle Werte in einer Tabelle aufzunehmen. Die Pronucleotide, welche in anderen Testreihen untersucht wurden, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

	EC_{50}[a] [μM]			CC_{50}[b] [μM]
	CEM/0		CEM/TK$^-$	CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	**HIV-2**	
5-(GlyOMe) **87a**	2.0 ± 0.0	1.6 ± 0.6	4.0 ± 0.0	220 ± 42
5-(GlyOBn) **87b**	0.31 ±0.08	0.47 ± 0.12	0.4 ± 0.0	75 ± 21
5-(L-AlaOMe) **88a**	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.0	2.5 ± 0.7	152 ± 86
5-(D-AlaOMe) **88b**	0.4 ± 0.07	0.4 ± 0.07	4.2 ± 0.5	61 ± 2
5-(L-AlaOBn) **88c mix**	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	23 ± 7
*5-(L-AlaOBn) **88c slow**	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.3	61 ± 6
*5-(L-AlaOBn) **88c fast**	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.5	48 ± 13
*5-(L-AlaO*t*Bu) **88d**	0.3 ± 0.07	0.4 ± 0.1	3.8 ± 0.0	53 ± 7
5-(L-Asp-diOBn) **89a**	n.b.[c]	n.b.	n.b.	n.b.
5-(L-ProOMe) **90a**	1.3 ± 0.0	1.6 ± 0.6	2.8 ± 1.1	182 ± 97
*5-(L-ProOBn) **90b**	0.70 ± 0.42	1.1 ± 0.44	21 ± 1.4	46 ± 26
*5-(L-Ala) **89e**	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	4.1 ± 0.8	77 ± 7
*Säure **49**	0.14 ± 0.10	0.80 ± 0.20	50.0 ± 30.0	73.6 ± 0.0
d4T **3**	0.40 ± 0.14	0.33 ± 0.00	70 ± 42	124 ± 42

[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration; [c]nicht bestimmt

Tab. 4: Antivirale Profile von **87**-**90** und der Referenzverbindungen **49** und **3**

Um diese Daten interpretieren zu können, müssen zunächst einige Festlegungen getroffen werden, die teilweise etwas willkürlich erscheinen mögen. Dies ist auf die manchmal recht groß ausfallenden Standardabweichungen in biologischen Tests zurückzuführen, die man als Chemiker so nicht gewohnt ist. Insbesondere in den TK$^-$-Testreihen sowie bei der Cytotoxizität fällt dies besonders ins Auge, weswegen

für eine gute Aktivität verglichen mit d4T **3** ein Abweichung um den Faktor 3 als äquivalentes Resultat angesehen wurde. Dies soll damit begründet werden, dass das Diastereomerengemisch **88c** eine vollständige TK^--Aktivität aufwies (EC_{50}/TK^-) = 0.3 μM, wohingegen die getrennten Diastereomere eine TK^--Aktivität von (EC_{50}/TK^-) = 1.0 μM zeigten. Da es aber überhaupt nicht wahrscheinlich ist, dass die getrennten Diastereomere sich gegenüber dem Mix verschlechtern, sondern eher eine Verbesserung des Einen und eine Verschlechterung des Anderen zu erwarten gewesen wäre, soll eben dieser Faktor gelten. Die EC_{50}-Werte wurden daher wie folgt interpretiert: 0-1 (vollständiger TK-Bypass); 1-3 (unvollständiger TK-Bypass); >3 (schlechter TK-Bypass). Auch die CC_{50}-Werte waren unter diesem Blickwinkel recht schwer zu deuten, wie am gleichen Beispiel veranschaulicht werden soll: Der CC_{50}-Wert von **88c mix** lag bei 23 μM, deutete also eine recht hohe Cytotoxizität an. Andererseits wäre dieser Wert als Mittelwert der einzelnen Diastereomere **88c fast/slow** zu erwarten gewesen, beide waren aber um den Faktor 2 bis 3 weniger cytotoxisch. Daher sollen auch hier nur die sehr deutlichen Unterschiede in die Diskussion mit einbezogen werden. Da die Werte bei Messungen in CEM/0 selbst für unterschiedliche Testreihen relativ konstant ausfielen, wurde hier ein direkter Vergleich mit d4T **3** als statthaft angesehen. Des Weiteren soll folgende Überlegung in die Interpretation einfließen: Eine TK^--Aktivität zeigt die Diffusion des Pronucleotids über die Zellmembran unter nachfolgender effektiver Freisetzung von d4TMP im intrazellulären Medium an. Wenn das Pronucleotid keine TK^--Aktivität aufweist, ist dies ausgeschlossen. Allerdings kann es sein, dass das Pronucleotid unter den Inkubationsbedingungen in RPMI/FCS effektiv d4TMP freisetzt, welches dann zu d4T dephosphoryliert wird und über die Zellmembran diffundiert. Daher ist bei effektiver Freisetzung von d4TMP im Kulturmedium eine d4T-analoge Aktivität in CEM/0 zu erwarten. Verringert sich auch diese Aktivität, so liegt ebenso im Kulturmedium keine effektive Freisetzung von d4TMP vor, was auf die Bildung von Nebenprodukten schließen lässt. Unter diesen Prämissen konnte die folgende Gruppierung der Verbindungen vorgenommen werden:

Gruppe 1: Aminosäure-Methylester ergaben eine schlechtere Aktivität in CEM/0, als d4T **3** und einen unvollständigen bis schlechten TK-Bypass bei niedriger Cytotoxizität, so dass entweder von einer schlechten Membranpermeation oder einer

ineffizienten Freisetzung von d4TMP intrazellulär und im Kulturmedium ausgegangen werden konnte.

Gruppe 2: Für beide L-Prolin-Ester gelten die gleichen Schlussfolgerungen wie oben, d.h. L-Prolin wirkt sich nachteilig auf das antivirale Profil aus.

Gruppe 3: Die Benzylester von Glycin und L-Alanin zeigten sehr gute Aktivität in CEM/0 und einen vollständigen TK-Bypass. Folglich lag eine effiziente intrazelluläre Freisetzung von d4TMP vor.

Weiterhin sollen an dieser Stelle einige Besonderheiten verschiedener Verbindungen diskutiert werden. Die Referenz 5-((L-Ala)prop)*cyclo*Sal-d4TMP **89e** zeigte keine TK$^-$-Aktivität, weswegen die Pronucleotide der L-Ala-Reihe **89** prinzipiell für einen intrazellulären Einschluss geeignet scheinen. Dies gilt, da die Säure **89e** offensichtlich nicht über die Zellmembran diffundieren kann. Daher sollte bei der Freisetzung von **89e** aus verschiedenen Estern eine Diffusion aus der Zelle heraus unterbunden sein. Zudem zeigte **89e** d4T-analoge Aktivität in CEM/0. Hieraus lässt sich ableiten, dass **89e** extrazellulär effektiv zu d4TMP hydrolysierte. Da außerdem **88c mix** hohe TK$^-$-Aktivität aufwies, welche aber wegen der schnellen enzymatischen Spaltung in CEM-Extrakt als **89e** in der Zelle vorliegen sollte, muss auch intrazellulär aus **89e** effektiv d4TMP entstanden sein. Wegen der generell schlechten Aktivität der Methylester in TK$^-$-Zellen, kann keine Aussage über den Einfluss der Stereochemie der Aminosäure getroffen werden, der eigentlich mit der Modifikation 5-(D-AlaOMe) **88b** untersucht werden sollte. Hier wäre die Synthese eines Benzylester-Derivats der D-Reihe interessant. Auffällig ist, dass der *tert*-Butylester **88d** im Vergleich zu den Methylestern **87a**, **88a** und **90a** extrazellulär offensichtlich in der Lage war, d4TMP effektiv freizusetzen, nicht aber intrazellulär, da er schlechte TK$^-$-Aktivität zeigte.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Benzylester einen positiven Einfluss auf die TK$^-$-Aktivität hatten, zumindest für Glycin und L-Alanin-Derivate. Dies korrelierte aber nicht mit der beschleunigten Hydrolyse im intrazellulären Medium, da z.B. der L-Prolin-Benzylester zwar rasch gespalten wurde, aber keinerlei TK$^-$-Aktivität aufwies, wohingegen der Glycinbenzylester in CEM/0 nicht wirklich enzymatisch abgebaut wurde. Daher kann auch aus diesen Testreihen nicht der Einfluss eines

intrazellulären Einschlusses auf die antivirale Aktivität abgeleitet werden. Da auch nicht „lock-in“-modifizierte *cyclo*Sal-Pronucleotide teilweise vollständige TK-Bypass-Aktivität zeigen, scheinen die standardisierten *in vitro* Testreihen ohnehin wenig geeignet, Rückschlüsse auf eventuelle Vorteile von *cyclo*Sal-Pronucleotiden der zweiten Generation zu ziehen. Eine weitere Methode zur Untersuchung einer erhöhten Einschleusung von d4TMP **83c** ist die Bestimmung intrazellulär vorliegender d4TMP-, d4TDP- und d4TTP-Spiegel. Dies gelang für *cyclo*Sal-Pronucleotide unter Verwendung Tritium-markierter Nucleoside. Da diese Methode aber recht aufwändig und kostspielig ist, werden im nächsten Kapitel intrinsisch fluoreszierende Nucleoside beschrieben, welche eine Alternative zu Tritium-markierten Nucleosiden darstellen könnten.

4.2 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass „lock-in“-modifizierte *cyclo*Sal-Pronucleotide über verschiedene Synthesestrategien in breiter Vielfalt darstellbar sind. Es konnte eine Alternative zu den POM-modifizierten *cyclo*Sal-Triestern entwickelt werden, die aufgrund ihrer großen Variabilität deutliche Vorteile gegenüber den Acylal-modifizierten Triestern bietet. Bei den neuartigen POM-funktionalisierten Pronucleotiden konnte der Hydrolysemechanismus in verschiedenen Medien eindeutig aufgeklärt werden, bei der Modifikation mit Aminosäure-Estern gelang diese Aufklärung im zellulären Medium nur unvollständig. Die Frage, ob eine „lock-in“-Modifikation vorteilhaft sein könnte, blieb ungeklärt, da mit den standardisierten Testverfahren *in vitro* keine Verbesserung des antiviralen Profils gegenüber nicht „lock-in“-modifizierten Triestern erhalten wurde. Daher scheint es notwendig, andere analytische Methoden zu entwickeln, welche eine Anreicherung des Pronucleotids in der Zelle nachzuweisen vermögen. Hiervon handelt das nächste Kapitel.

5

Synthese von intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotiden zur Verfeinerung analytischer Methoden

5.1 Entstehung von Fluoreszenz

Luminenszenz ist das spontane Aussenden von Strahlung aus einem Molekül, Atom oder Ion, welches sich in einem elektronisch angeregten Zustand befindet und über die Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehrt. Dieser Vorgang wird auch als strahlende Desaktivierung bezeichnet. Die beteiligten elektronischen Übergänge sind solche des Typs n $\rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$. Ihre Anregungswellenlängen liegen im Bereich des nahen UV bis nahen IR.[88,89] Bei den Lumineszenzerscheinungen unterscheidet man zwei Arten: zum Einen die Fluoreszenz, zum Anderen die Phosphoreszenz. Ein ganz wesentlicher Unterschied dieser beiden Strahlungsarten ist die Lebensdauer der angeregten Zustände, aus denen sie hervorgehen. Die Lebensdauern der angeregten Zustände bei der Phosphoreszenz können wenige Millisekunden bis zu einigen Sekunden betragen, da hier während des Übergangs eine verbotene Spinumkehr eintreten muss. Lebensdauern der Fluoreszenz liegen typischerweise im Bereich von 10 ns. Im Folgenden soll nur noch auf das Phänomen der Fluoreszenz eingegangen werden. Eine schematische Darstellung solcher Übergänge gibt Abbildung 72 in Form eines Jablonski-Termschemas.

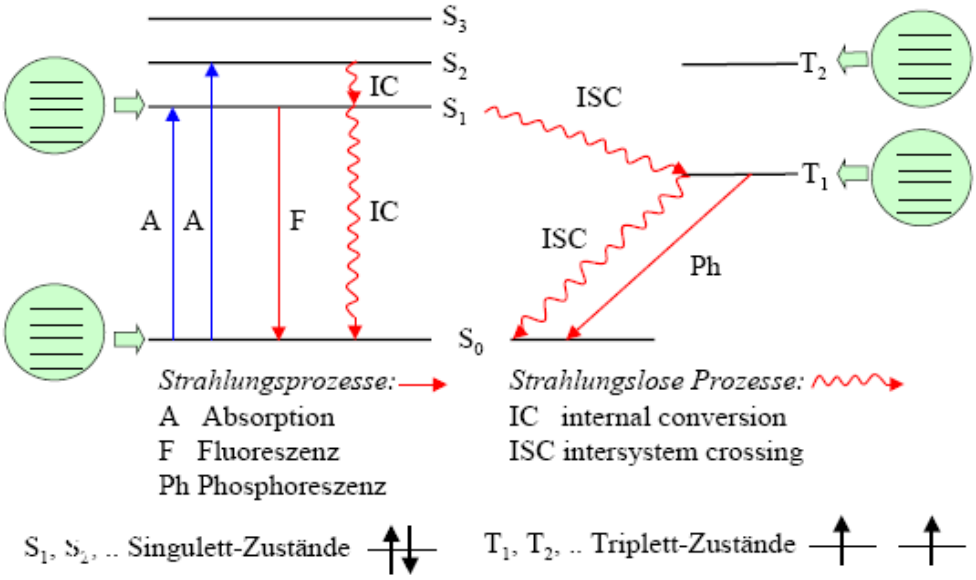


Abb. 72: Jablonski Termschema: Elektronische Anregung (A) vom untersten Vibrationszustand (v = 0) des elektronischen Grundzustandes (S_0) in die verschiedenen Schwingungsniveaus der angeregten Zustände von S_1 und S_2. Nachfolgende strahlungslose Desaktivierung durch innere Umwandlung (IC). Übergang durch Elektronenspininversion aus dem Singulett in den Triplettzustand durch Singulett-Triplett Intersystemcrossing (ISC). Strahlende Desaktivierung durch Fluoreszenz (F) und Phosphoreszenz (Ph) [90]

Ein auffälliges Merkmal der Fluoreszenzemission ist, dass die emittierte Strahlung im Vergleich zur absorbierten rotverschoben ist, d.h. die Emission erfolgt bei größeren Wellenlängen. Dieses Phänomen wird nach seinem Entdecker Sir G. G. Stokes als „Stokes Shift“ bezeichnet und hängt damit zusammen, dass bei einem elektronischen Übergang vom Term S_0 (elektronischer Grundzustand) nach S_1 (1. angeregter elektronischer Zustand) auch Vibrationszustände der anharmonischen Oszillatoren besetzt werden. Da die Übergänge zwischen Vibrationszuständen schneller sind (10^{-14} bis 10^{-12} s) als die elektronischen Übergänge (10^{-10} bis 10^{-9} s), relaxiert das angeregte System zunächst immer in den niedrigsten Vibrationszustand v=0. Bei dieser vibrationellen Relaxation wird Energie in Form von Wärme freigesetzt, um deren Betrag die emittierte Wellenlänge beim elektronischen Übergang vergrößert ist. Ein weiterer wichtiger Beitrag kommt zusätzlich aus den Übergängen von v=0 aus S_1 in schwingungsangeregte „heiße“ Zustände von S_0 , so dass auch hier weniger Energie an die Photonen übertragen wird.
Eine weitere wichtige Eigenschaft fluorophorer Gruppen ist deren Quantenausbeute Φ_f. Sie ist definiert als die Anzahl emittierter Photonen geteilt durch die Anzahl absorbierter Photonen:

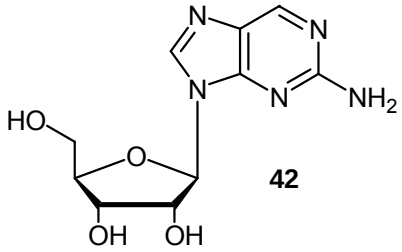
$$\Phi_f = N_F / N_A$$

Die kinetische Definition gibt jedoch größeren Aufschluss über die Konkurrenzprozesse:

$$\Phi_f = \Gamma / (\Gamma + k_{nr}) ,$$

wobei Γ die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz ist und k_{nr} die Summe aller Geschwindigkeitskonstanten strahlungsloser Prozesse.[88,89] Im theoretischen Fall einer Quantenausbeute von 1 würde also jedes angeregte Molekül wieder ein Photon emittieren, was bedeuten würde, dass das Molekül nur einen Weg der Relaxation beschreiten könnte. Dies ist in der Realität so gut wie nie der Fall. Als andere Relaxationswege seien nur das Singulett-Triplett Intersystem-crossing (ISC), die innere Umwandlung (IC) und photochemische Prozesse genannt. Beim ISC geht das Molekül unter Spininversion in einen Triplett-Zustand über und relaxiert über Phosphoreszenzprozesse, bei der IC wechselt das Molekül am Schnittpunkt zweier

Potentialkurven gleicher Spinmultiplizität in einen neuen Zustand und kann nun über weitere Vibrationen relaxieren. Da bei der elektronischen Anregung kurzlebige Radikalspezies entstehen, können diese photochemische Reaktionen eingehen. Als Beispiel sei an dieser Stelle die UV-vermittelte Dimerisierung von Thymidin genannt.
Auch das Lösungsmittel kann auf die Fluoreszenz Einfluss nehmen. Dies äußert sich in bathochromen sowie hyperchromen Verschiebungen der Emissionswellenlängen. Ursächlich liegt dies an der Elektronenumverteilung während des elektronischen Überganges. Dabei kann ein polares, H-Brücken bildendes Lösungsmittel den Zustand S_1 relativ zu einem unpolaren Lösungsmittel stabilisieren und somit eine Rotverschiebung des Überganges induzieren.[88]
Das sogenannte Q*uenching* bezeichnet die Reduktion der Fluoreszenzintensität durch verschiedene Prozesse. Wenn z.B. zu einer Lösung, welche den Fluorophor enthält, andere Moleküle gegeben werden, ist es möglich, dass die Energie vom angeregten Zustand S_1 auf eines dieser Moleküle bei einem Zusammenstoß übertragen wird. Auch Interaktionen im Grundzustand der unterschiedlichen Spezies können die Fluoreszenzintensität reduzieren. Zudem können charge-transfer Prozesse innerhalb eines Moleküls zum *Quenching* führen.[88] Ein weiterer Faktor, welcher die Fluoreszenz beeinflussen kann, ist der pH-Wert einer Lösung. Dies wird z.B. im Fall des *iso*-Adenosin **42** (*iso*-A, s. Abbildung 73) offensichtlich: ϕ_f von *iso*-A beträgt bei 25 °C und pH = 7.0 68 % relativ zu Chininsulfat (Standard; $\phi_{f,absolut}$ = 100 %).[91] Ein Absenken des pH-Wertes unter 4 bewirkt eine Rotverschiebung sowie eine Reduktion der Quantenausbeute. Zudem besteht eine Temperaturabhängigkeit der Quantenausbeute: Bei 70 °C beträgt sie nur noch 25 % bezogen auf den Wert der Quantenausbeute des *iso*-A bei 25 °C.[91] Die Inkorporation von *iso*-A in doppelsträngige DNA oder RNA bewirkt zudem eine Verminderung der Fluoreszenz um etwa den Faktor 100, ein Phänomen, das durch die Fixierung der exocyclischen Aminogruppe bei der Basenpaarung erklärt und durch quantenchemische Rechnungen theoretisch untermauert werden konnte.[92,93] *Iso*-A kann aufgrund dieser Eigenschaften als empfindliche Sonde für die DNA/RNA-Microumgebung eingesetzt werden.



42

Abb. 73: Struktur der Fluoreszenzsonde *iso*-Adenosin (*iso*-A)

5.2 Analytik

Die Fluoreszenz von Verbindungen kann in vielfältiger Weise zur Analyse herangezogen werden. Gegenüber anderen Verfahren, z.B. der UV-Analytik, sind als zwei wesentliche Vorteile die Selektivität und die Sensitivität zu nennen. Selektiv sind die Methoden, da die zu untersuchende Verbindung bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und nachfolgend die Emission bei einer rotverschobenen Wellenlänge stattfindet, so dass Störsignale anderer Verbindungen weitestgehend oder vollständig in den Hintergrund treten. Die erhöhte Sensitivität wird u.a. dadurch erreicht, dass der Fluoreszenzdetektor rechtwinklig zur Strahlungsquelle angeordnet werden kann. Somit wird keine Strahlung aus der Quelle am Detektor gemessen, sondern lediglich die Fluoreszenz. Zudem kann mit Sekundärelektronenvervielfachern eine Signalverstärkung erreicht werden. Insbesondere bei Untersuchungen von Verbindungen durch HPLC kann dies zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität gegenüber der UV-Analytik führen, wie später gezeigt werden wird. Eine qualitative Analysemethode zur optischen Darstellung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Verteilung stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar.

5.3 Zielsetzung

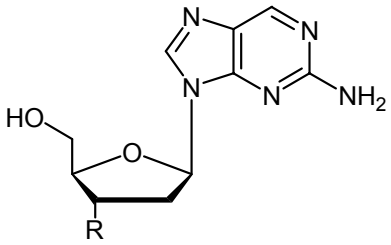
Die Verwendung von intrinsisch fluoreszierenden Pronucleotiden könnte sich eventuell als Alternative zu den bislang durchgeführten Tritium-label HPLC-Studien erweisen.[94] Zur genauen Quantifizierung der intrazellulären NMP, NDP und NTP-Spiegel müssten allerdings die Quantenausbeuten der einzelnen Verbindungen jeweils exakt bestimmt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurde. Es sollte vielmehr eine weitere Analysemethode zur qualitativen

Bestimmung der Zellaufnahme von *cyclo*Sal-Pronucleotiden angewendet werden: die Fluoreszenzmikroskopie. In diesem Fall ist die Bestimmung der Quantenausbeute zweitrangig, da ohnehin nur qualitative Aussagen über die Zellaufnahme getroffen werden können. Zur Durchführung solcher Studien werden Zellen mit der entsprechenden Verbindung inkubiert, gewaschen und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung anregender Strahlung untersucht. Dabei erhält man im Idealfall ein örtlich begrenztes Fluoreszenzsignal aus dem intrazellulären Raum, so dass Aussagen über die Verteilung innerhalb der Zellorganellen getroffen werden können. Um die Aussagen auf nicht fluoreszierende Verbindungen übertragen zu können, ist eine strukturelle Ähnlichkeit der Verbindungen unabdingbar, weswegen die Untersuchungen mit intrinsisch fluoreszierenden Verbindungen durchgeführt werden sollten. Das Anbringen eines Fluoreszenzmarkers bot sich hingegen nicht an, da diese sowohl Größe als auch Polarität der Verbindung stark beeinflussen würden. Ein Problem, dass bei der Verwendung intrinsisch fluoreszierender Nucleoside auftritt, ist die relativ kurzwellige Anregungswellenlänge solcher Verbindungen.

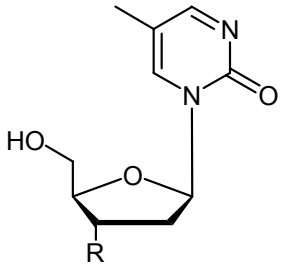
5.4 Zielverbindungen und Synthesestrategie

In vorangegangenen Arbeiten in unserer Gruppe wurden bereits Untersuchungen zur Synthese und Charakterisierung neuartiger intrinsisch fluoreszierender Nucleosidanaloga durchgeführt.[75,79] Um die Palette der zur Verfügung stehenden Verbindungen zu erweitern, sollten noch einige weitere intrinsisch fluoreszierende Nucleoside dargestellt und mit unterschiedlichen Salicylalkoholen maskiert werden. Insbesondere der Synthese von „lock-in“-modifizierten intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotiden galt hierbei das Interesse. Um die intrazelluläre Anreicherung zu simulieren, sollten U-Rohr-Versuche mit diesen Verbindungen unter Verwendung von HPLC-Fluoreszenzdetektion entwickelt werden. Zudem sollten alle dargestellten Verbindungen mit *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Diese Arbeiten wurden von mir an der Welsh School of Pharmacy, Cardiff, unter Anleitung von Dr. Arwyn Tomos Jones durchgeführt, dem an dieser Stelle noch einmal mein herzlichster Dank für die Kooperation ausgesprochen werden soll. Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die bereits dargestellten zu

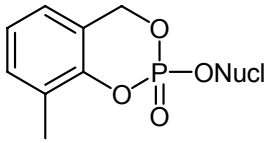
untersuchenden Verbindungen. Ihre Synthese wurde an anderer Stelle bereits ausführlich beschrieben und soll später nur kurz diskutiert werden.



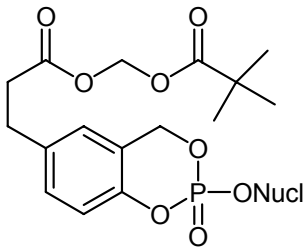
R = OH; Nucl.= *iso*-dA **109a**
R = H ; Nucl.= *iso*-ddA **109b**



R = OH; Nucl.= dm^{5}K **110a**
R = H ; Nucl.= ddm^{5}K **110b**



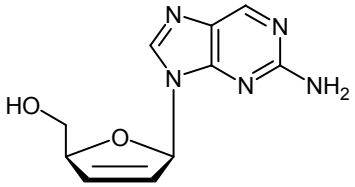
Nucl.= **109a**; 3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-dAMP **111a**
Nucl.= **109b**; 3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-ddAMP **111b**
Nucl.= **110a**; 3-Me-*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112a**
Nucl.= **110b**; 3-Me-*cyclo*Sal-ddm^{5}KMP **112b**



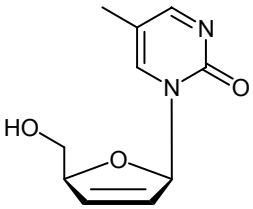
Nucl.= **110a**; 5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112c**
Nucl.= **110b**; 5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-ddm^{5}KMP **112d**

Abb. 74: Bereits synthetisierte intrinsisch fluoreszierende Verbindungen **109**-**112**[95]

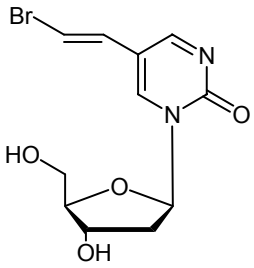
Zusätzlich zu den bereits vorhandenen Verbindungen sollten Analoga aus der Reihe der d4-Nucleoside synthetisiert werden, erneut, um strukturell möglichst nahe an den antiviralen Stammverbindungen (d4T, d4G) zu sein. Diese Nucleosidanaloga und entsprechende *cyclo*Sal-Pronucleotide sind in der nächsten Abbildung gezeigt. Ebenfalls in der Abbildung enthalten ist ein möglicherweise fluoreszierendes Derivat des BVdU, welches aus Gründen der Nomenklaturkonsistenz als BV-dm^{5}K abgekürzt werden soll. Vorab sei angemerkt, dass sowohl die Synthese von d4m^{5}K, als auch BV-dm^{5}K auf der gewählten Syntheseroute misslang. Die Synthese von *iso*-d4A **109c** konnte hingegen sehr erfolgreich durchgeführt werden und lieferte zugleich *iso*-A **42** sowie einen verbesserten Syntheseweg zu *iso*-ddA **109b**.



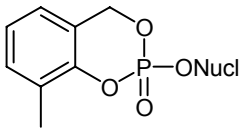
iso-d4A **109c**



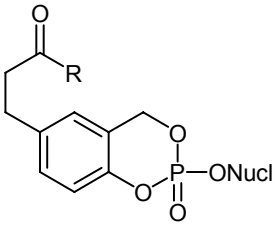
d4m^{5}K **110c**

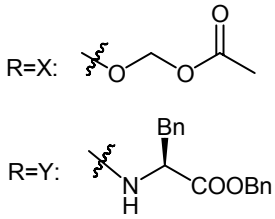


BV-dm^{5}K **113**



Nucl.= **109c**; 3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111c**
Nucl.= **110c**; 3-Me-*cyclo*Sal-d4m^{5}KMP **112e**

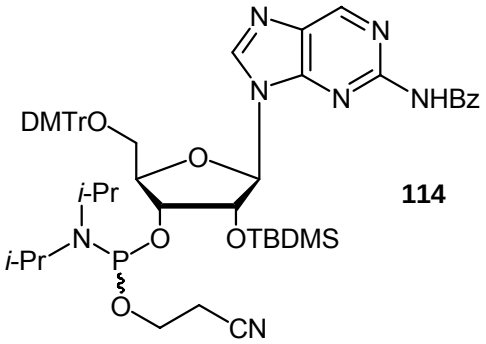




R=X; Nucl.= **110a**; 5-(AM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112f**
R=Y; Nucl.= **110a**; 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112g**
R=Y; Nucl.= **109c**; 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111e**

Abb. 75: Intrinsisch fluoreszierende Zielverbindungen

Da, wie oben angesprochen, in der Synthesesequenz *iso*-A **42** erhalten wurde, sollte zudem das Phosphoramidit **114** zur RNA-Festphasensynthese dargestellt werden. Dieses sollte in Zusammenarbeit mit Prof. Hahn, Universität Hamburg, zur Analytik von RNA-Interferenz durch RNA-Oligomere verwendet werden. Da zum jetzigen Zeitpunkt nicht hinreichende Mengen der Substanz für die Festphasensynthese dargestellt werden konnten, soll die Synthese nur kurz gezeigt werden, weil sie an einigen Stellen von der literaturbekannten Synthese abweicht.[96]



114

Abb. 76: Phosphoramidit **114** für die RNA-Festphasensynthese

Die Synthesestrategie zur Darstellung von *cyclo*Sal-Triestern wurde bereits im vorangegangenen Kapitel 4 beschrieben und sollte auch hier Anwendung finden: Die

Kupplung der entsprechenden Nucleoside mit einem Saligenylchlorphosphit mit nachfolgender *in situ* Oxidation durch *tert*-Butylhydroperoxid.

Zur Darstellung von *iso*-d4A **109c** sollte von Guanosin **G** ausgegangen werden. Im Verlauf der Synthese sollte *iso*-A erhalten und nachfolgend zu *iso*-d4A umgesetzt werden. Der erste Teil, die Synthese von *iso*-A **42**, war in der Literatur auf unterschiedliche Weisen beschrieben.[97,98] Es sollte außerdem möglich sein, ausgehend von **42** zum Phosphoramidit **114** zu gelangen.

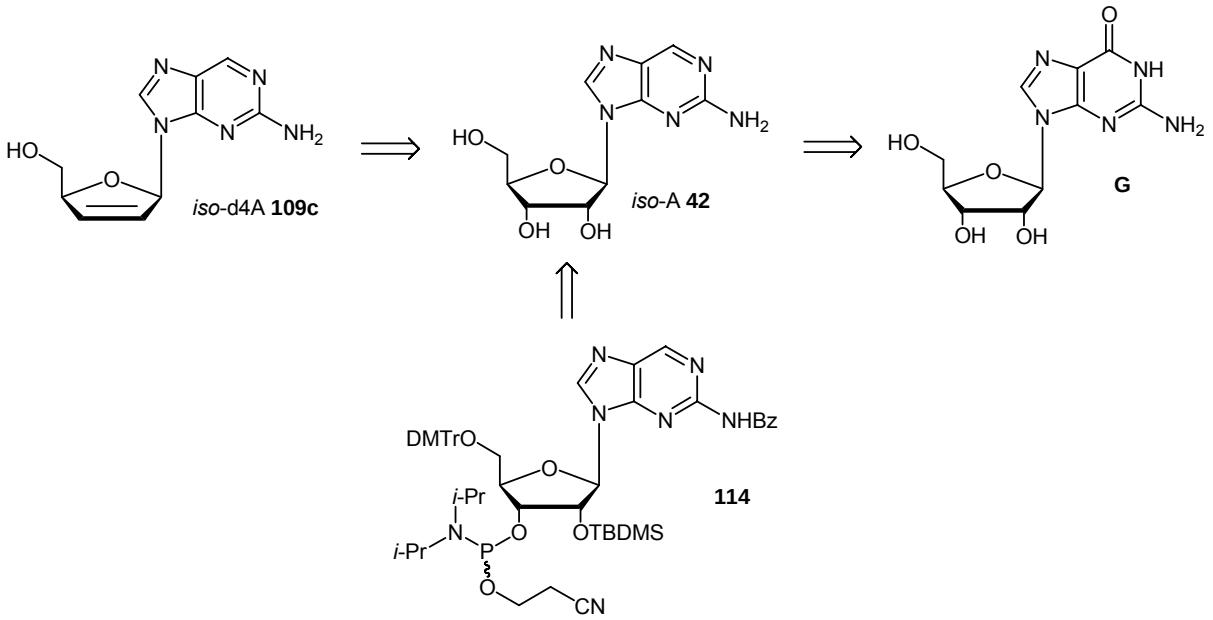


Abb. 77: Retrosynthetische Analyse der Zielverbindungen **109c** und **114**

Die Synthese von dm^5K und ddm^5K wurde von uns bereits erfolgreich durchgeführt.[75] Das Syntheseprotokoll sollte nun zur Darstellung von $d4m^5K$ **110c** und BV-dm^5K **113** angewendet werden.

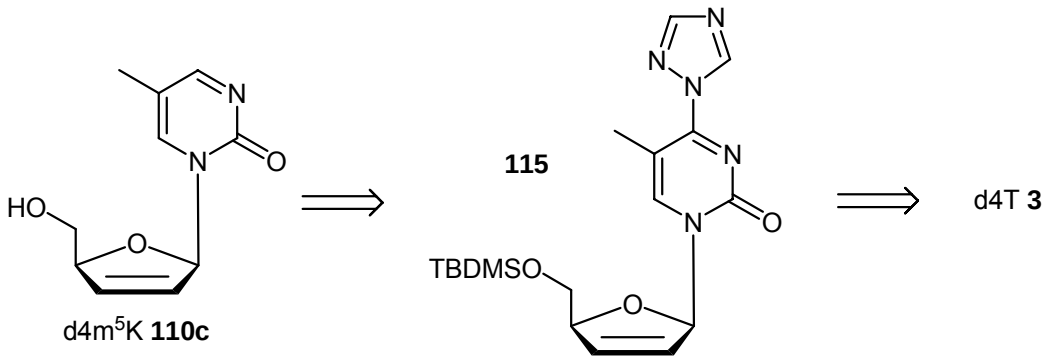


Abb. 78: Retrosynthetische Analyse von $d4m^5K$ **110c**

Dazu sollte das Nucleosid zunächst geeignet geschützt und dann in das Triazolit **115** (im Fall von d4T **3**) umgewandelt werden. Um zum d4m^{5}K **110c** zu gelangen, sollte eine Reaktion mit Hydrazin und nachfolgende Reduktion mit PTAD **116** erfolgen. Diese Reaktionssequenz sei im Folgenden am Beispiel der bereits synthetisierten Verbindungen dm^{5}K **110a** und ddm^{5}K **110b** erläutert.

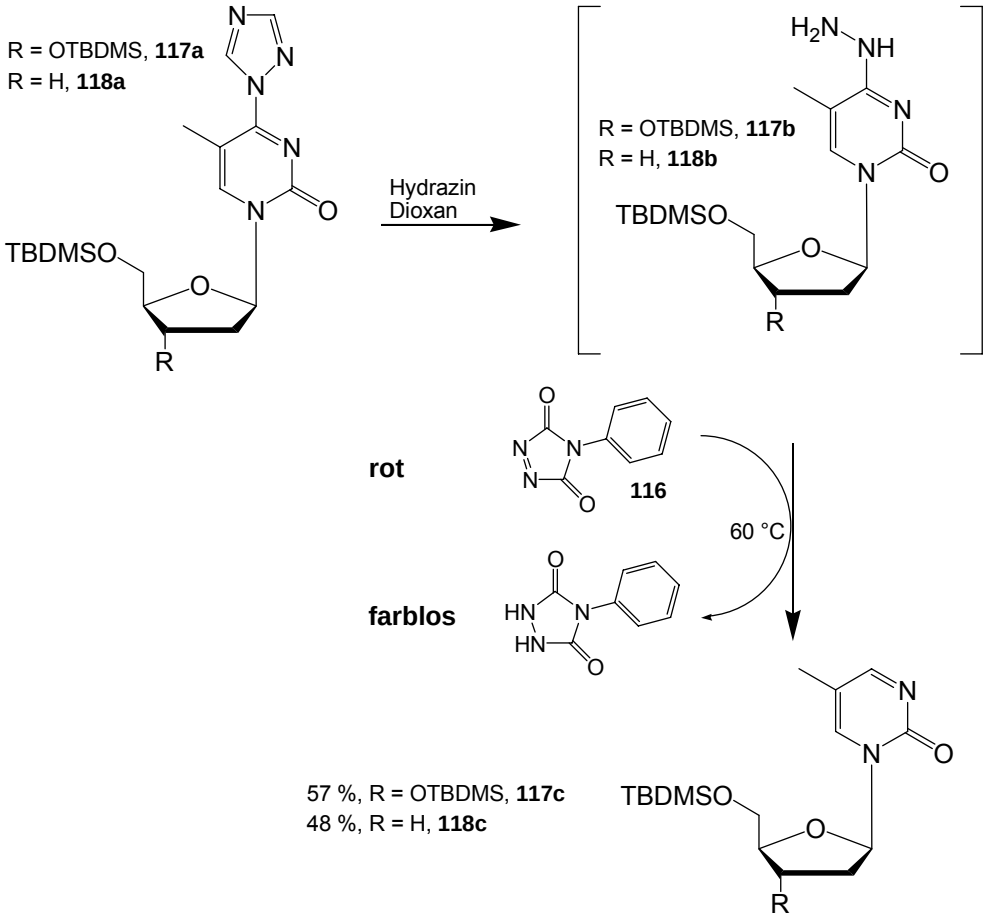


Abb. 79: Reduktion der C-4 Position unter Verwendung von Hydrazin und PTAD **116**

Die Umsetzung und Reinigung der synthetisch leicht zugänglichen Triazolide **117a** und **117b** ist das Herzstück der Reaktionssequenz. Zunächst werden durch Zugabe von Hydrazin die Intermediate **117b** und **118b** erzeugt und diese anschließend durch Zugabe von PTAD **116** unter Stickstoffentwicklung reduziert. Der Reaktion schließt sich eine recht umständliche Chromatographie an. Es sollte nun überprüft werden, ob diese Sequenz neben der Darstellung von **117c** und **118c** ebenso geeignet wäre, d4m^{5}K und BV-dm^{5}K zu erhalten.

5.4.1 Synthese von intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotiden

Zur Darstellung von *iso*-dA **109a** war auf eine bekannte Synthese zurückgegriffen worden.[99] Ausgehend von dG führte diese über das 6-Thio-Derivat **119** unter anschließender Reduktion mit Nickel zur Zielverbindung **109a**. Durch anschließende Barton-Desoxygenierung konnte *iso*-ddA **109b** in mäßiger Ausbeute erhalten werden.[95]

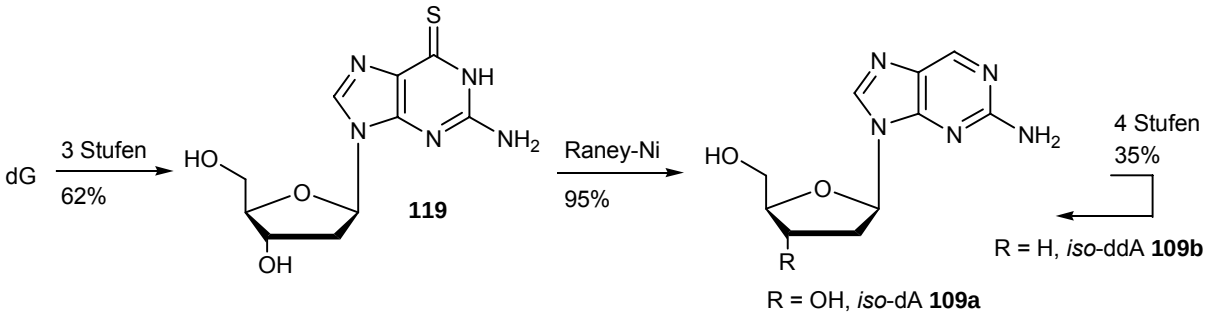


Abb. 80: Synthese von *iso*-dA **109a** und *iso*-ddA **109b**

Ein Problem bei dieser Reaktionsführung, ist die Verwendung von Nickel, welches als toxisches Schwermetall bereits in Spuren in Zelltests störend sein kann. Obwohl also diese Synthese vermutlich auch zur Darstellung von *iso*-d4A **109c** geeignet wäre, wurde nach einer alternativen Route gesucht. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von G-Derivaten wurde schließlich in der Chlorierung der 6-Position mit anschließender Hydrierung gefunden.[98] Die von V. Nair *et al.* publizierte photochemische Reduktion konnte hingegen trotz zahlreicher Versuche unter verschiedensten Bedingungen nicht nachvollzogen werden.[97]

Zunächst wurde Guanosin (G) an den drei OH-Gruppen mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Das Produkt Ac_3-G **120** konnte aus Toluol und *iso*-Propanol kristallisiert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMAP zwar beschleunigt, führte aber auch zu ca. 20% zu einer Acetylierung der exocyclischen Aminogruppe. Daher sollten in der Reaktion keine Katalysatoren verwendet werden. Die nachfolgende Chlorierung an C-6 gelang mit Tetraethylammoniumchlorid (TEAC) und $POCl_3$ in Acetonitril.[100] Die Trocknung von TEAC über P_2O_5 im Exsikkator und die Destillation von *N,N*-Dimethylanilin führten zu einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute an **121**. Wie bereits erwähnt, versagte die photochemische Reduktion von **121** im UV-Photoreaktor (253 nm) in Gegenwart von Triethylamin, indes führte die Reduktion

unter Wasserstoffatmosphäre mit einem Palladium-Kohle-Katalysator zu hervorragenden Ausbeuten an acetyliertem *iso*-A **122**. Die Abspaltung der Schutzgruppen gelang in wässriger Ammoniaklösung bei quantitativem Umsatz zu *iso*-A **42**.

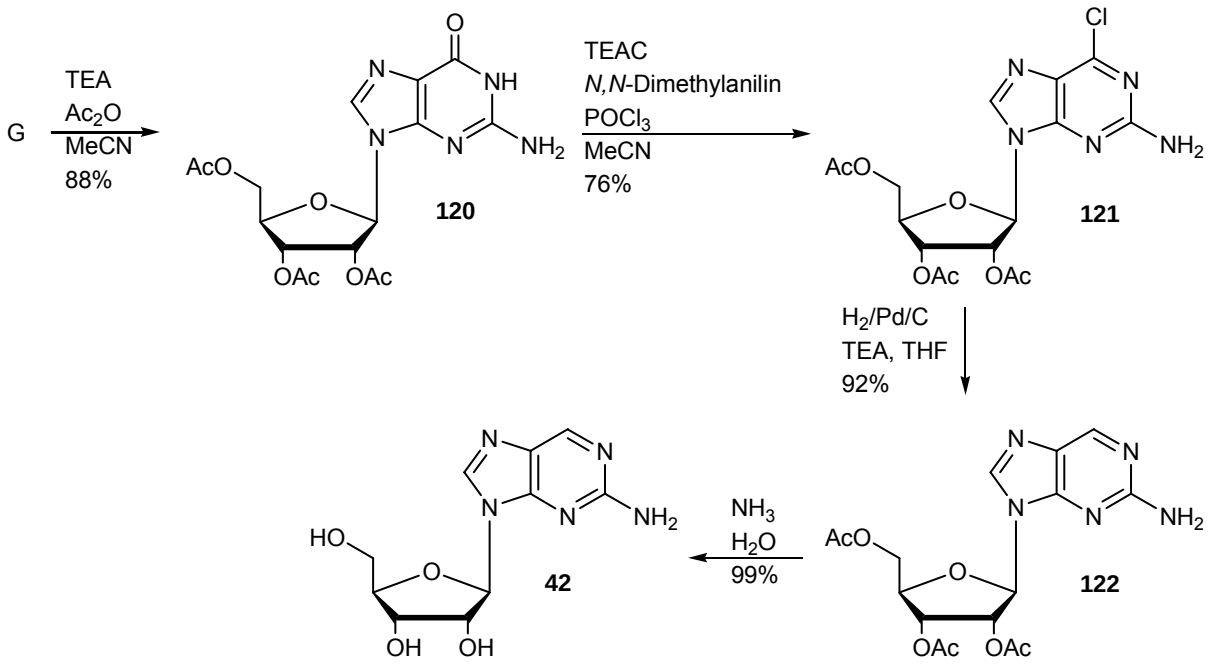


Abb. 81: Synthese von *iso*-A **42**

Wie in der in Abb. 80 beschriebenen Synthese war auf diese Weise (Abb. 81) also auch eine vierstufige Reaktion zur Transformation der Nucleobase notwendig, und gleichermaßen wurde eine gute Ausbeute von ca. 60% über die Stufen erreicht, allerdings musste kein Nickel verwendet werden. Außerdem erwies sich die chromatographische Aufarbeitung der Verbindungen als deutlich einfacher.

Es sind verschiedene Methoden zur Einführung einer Doppelbindung an vicinalen Diolen bekannt. In dieser Arbeit wurden zwei davon hinsichtlich ihrer Eignung zur Darstellung von *iso*-d4A untersucht: Die Corey-Winter Olefinierung und eine Barton-McCombie analoge reduktive Didehydrogenierung.[101] Im ersten Fall ließe sich auf eine Schützung der primären OH-Gruppe eventuell verzichten, da aber für die Durchführung der Barton-Reaktion auf jeden Fall eine 5´-Schutzgruppe benötigt wurde, sollte auch das 5´-geschützte Edukt für die Corey-Winter-Olefinierung verwendet werden, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Zunächst wurde daher die 5´-OH-Gruppe mit TBDMS-Chlorid blockiert, um die nachfolgenden Umsetzungen vornehmen zu können.

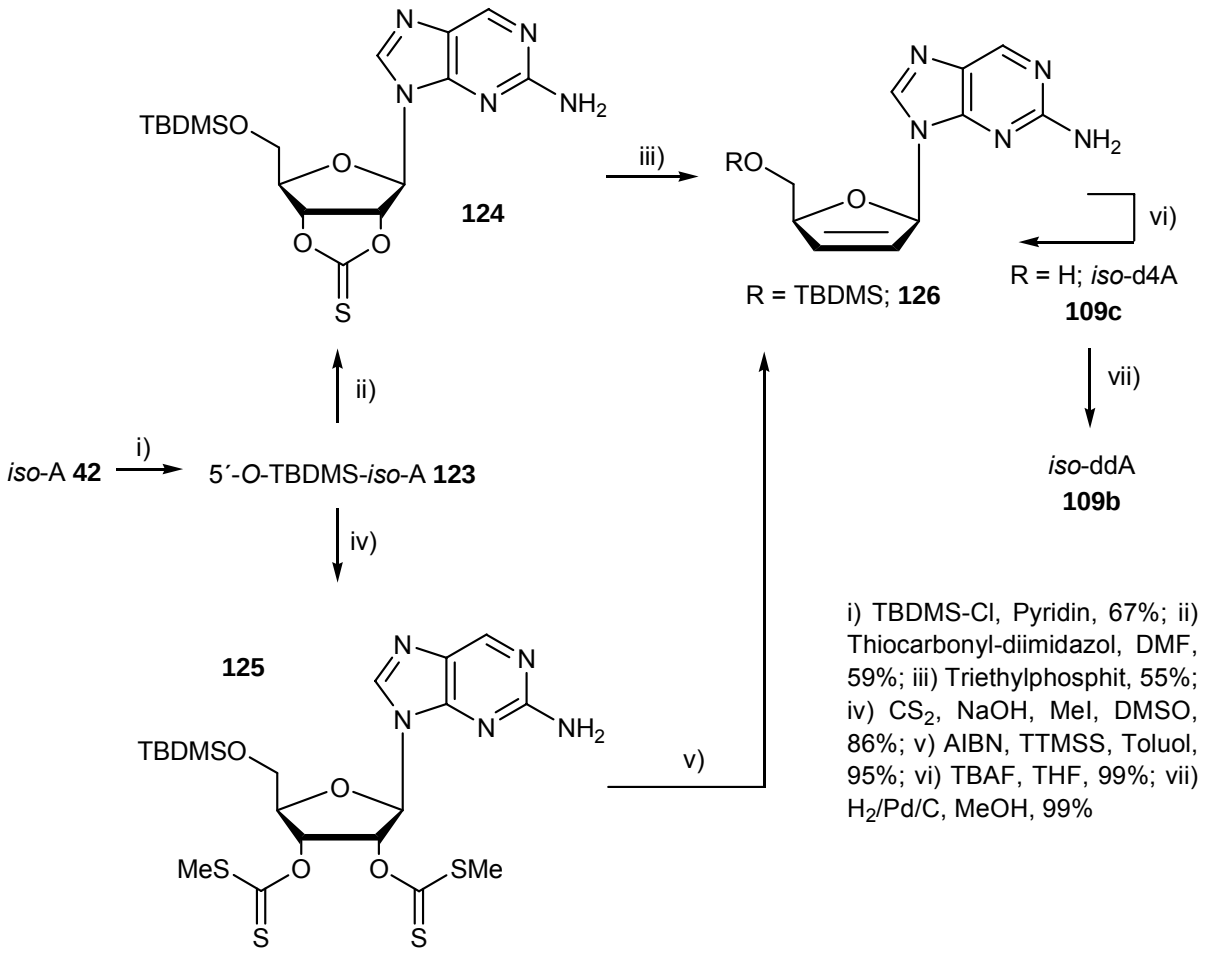
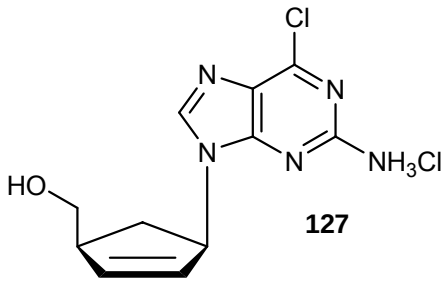


Abb. 82: Synthese von *iso*-d4A **109c** und *iso*-ddA **109b** ausgehend von *iso*-A **42**

Die Corey-Winter Olefinierung verläuft über den oberen Reaktionsweg (ii, iii). Die Synthese des Reaktionsintermediats **124** wurde durch Zugabe von Thiocarbonyldiimidazol in DMF zu **123** erreicht, allerdings nur in unbefriedigenden Ausbeuten um 60%. Es wurde nicht mehr untersucht, ob eine Zugabe von DMAP die Reaktion verbessert hätte, allerdings scheint eine Steigerung der Ausbeute aufgrund der Einfachheit der Umsetzung wahrscheinlich. Dies verdeutlicht aber, dass eine direkte Umsetzung von **42** ohne Schutzgruppe vermutlich nicht besonders ratsam ist. Verbindung **124** wurde nun mehrere Stunden in Triethylphosphit als Lösungsmittel und Reagenz bei erhöhter Temperatur gerührt. Dabei kommt es wahrscheinlich zur Entstehung eines Carbens an der Thiocarbonylgruppe und schließlich zur Cycloreversion unter CO_2-Entwicklung.[102] Die Ausbeute war mit 55% als mäßig anzusehen, aber auch hier scheint noch Spielraum zur Verbesserung vorhanden zu sein, da Edukt **124** und Produkt **126** exakt den gleichen R_f-Wert aufwiesen und somit ein früherer Abbruch der Reaktion zur Unterdrückung von Nebenreaktionen eventuell

möglich gewesen wäre. Über beide Schritte verlief die Umsetzung von **123** zu **126** mit einer Gesamtausbeute von 32%. Da aber *iso*-A bereits in einer vierstufigen Synthese dargestellt werden musste, ist dieses Ergebnis als unzulänglich zu bezeichnen. Eine deutliche Verbesserung der Gesamtausbeute wurde über den unteren Reaktionsweg erreicht. Für die Einführung der Doppelbindung wurde Verbindung **125** benötigt, welche durch Umsetzung von **123** mit Kohlenstoffdisulfid und Natronlauge in DMSO und anschließender Methylierung mit Methyliodid in 86%iger Ausbeute erhalten werden konnte. Die nachfolgende reduktive Olefinierung zu **126** verläuft über einen Radikalkettenmechanismus. AIBN wurde als Radikalstarter und Tris-trimethylsilylsilan (TTMSS) zum Erhalt der Kettenreaktion zugegeben. Dabei stellt TTMSS eine sehr gute Alternative zu den sonst üblicherweise verwendeten toxischen Zinnorganylen dar. Es wurde ebenso versucht, die Reaktion ohne TTMSS durchzuführen, allerdings konnte in diesem Fall kein Umsatz beobachtet werden. Die Reaktion lieferte das Produkt **126** in einer hervorragenden Ausbeute von 95%. Über beide Schritte konnte unter Anwendung der Barton-Reaktion eine Gesamtausbeute von 82% erzielt werden; gegenüber der Corey-Winter Olefinierung also eine deutliche Verbesserung. Die Entschützung von **126** wurde durch Einwirkung von TBAF in THF unter quantitativem Umsatz erreicht. Ausgehend von G konnte *iso*-d4A **109c** in 33%iger Ausbeute über acht Stufen dargestellt werden. Gleichzeitig konnte *iso*-ddA **109b** aus *iso*-d4A **109c** durch Hydrierung erhalten werden. Damit konnte die Ausbeute der Synthese, verglichen mit der in Abb. 80 gezeigten, um zehn Prozentpunkte verbessert werden.

Ausgehend von dem nachfolgend gezeigten carbocylischen Nucleosid **127**, welches wir als Industriespende in großen Mengen besaßen, sollten nun auch fluoreszierende carbocyclische Verbindungen synthetisiert werden.



127

Abb. 83: Carbocyclisches Nucleosid-Analogon **127**

Carbocyclische Nucleoside sind solche, bei denen das Sauerstoffatom des Zuckerderivates durch eine Methylengruppe ersetzt ist. Warum es im Einzelnen sinnvoll sein kann, carbocyclische Strukturen zu untersuchen und welche Vorteile sie bieten, soll hier nicht erörtert werden.[103] Eine wichtige Eigenschaft, von der im nächsten Kapitel noch die Rede sein wird, ist die deutlich erhöhte Stabilität der glykosidischen Bindung gegenüber Säuren, da hier keine Aminal-Struktur vorliegt. Die Verbindung **127** war auch gerade deswegen so interessant, weil aus ihr recht schnell größere Mengen fluoreszierender Nucleosidanaloga zugänglich sein sollten.
Es war in der Literatur bereits beschrieben worden, wie sich bei dem Carbocyclus **127** ohne Nebenreaktion an der Doppelbindung das Chloratom reduktiv entfernen lässt.[104] Zunächst konnte die in der Literatur angegebene Vorschrift nur mit sehr geringen Ausbeuten nachvollzogen werden. Das änderte sich, als der für die Reaktion verwendete wässrige Ammoniak in mehreren Chargen zugegeben wurde, um das Ausgasen zu kompensieren. Zudem ist in der folgenden Abbildung die Hydrierung von **127** zu *carba-iso*-ddA **130** gezeigt.

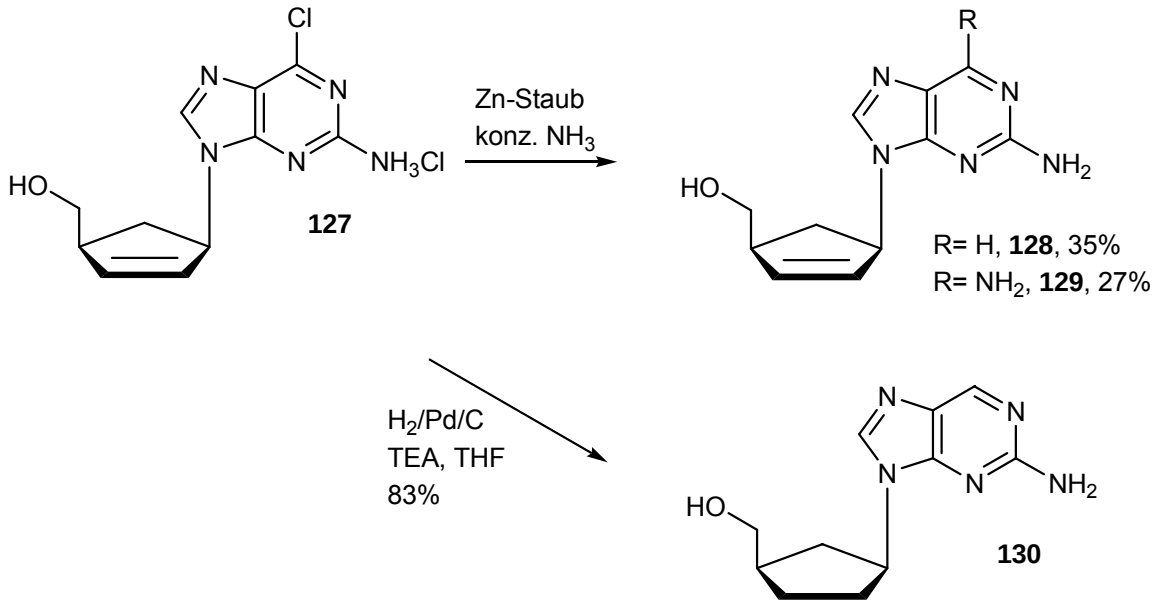


Abb. 84: Reduktive Umsetzung von **127** zu *carba-iso*-d4A **128** und *carba-iso*-ddA **130**

Auf diese Weise ließ sich also recht schnell eine große Menge intrinsisch fluoreszierender Nucleoside der *iso*-A-Reihe darstellen. Interessant war auch die Entstehung des *carba*-d4-2,6-Diaminonebularine **129**, welches sonst aus **127** im Autoklaven in Gegenwart von Ammoniak erhalten wird.[104] Prinzipiell sind alle diese Verbindungen als Prodrugs für entsprechende G-Derivate anzusehen, da entweder

die 6-Aminogruppe durch Adenosindeaminase (ADA) in eine Carbonylgruppe übergeführt werden kann, oder die 2-Position durch Xanthin-Oxidase (XAO) oder Aldehydoxidase oxidiert werden kann.[32,33,104] Daher waren auch für alle Verbindungen die antiviralen Daten von Interesse.

Die Synthese der Verbindungen d4m^{5}K **110c** und BV-dm^{5}K **113** gelang hingegen nicht. Beide Nucleoside BVdU **11** und d4T **3** konnten zwar TBDMS-geschützt werden, was nicht unbedingt weiter verwunderlich ist, und auch die Überführung beider Verbindungen in die entsprechenden Triazolide **131**/**115** gelang in guten Ausbeuten, bei der Umsetzung mit PTAD konnte allerdings kein definiertes Produkt isoliert werden.

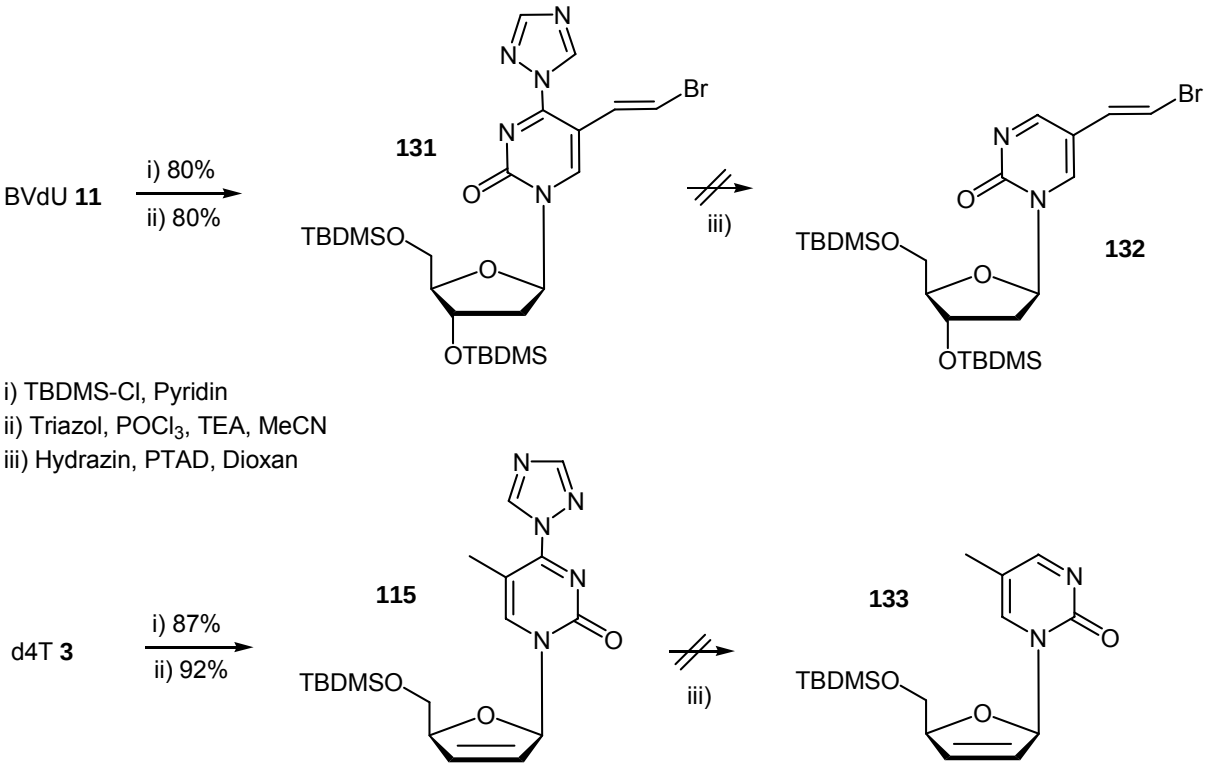


Abb. 85: Versuch der Synthese von **132** und **133**

Es stellte sich nun die Frage, warum denn die Reaktion so gut geeignet war, dm^{5}K **110a** und ddm^{5}K **110b** darzustellen, hier andererseits vollkommen versagte. Da der Mechanismus der Reaktion nicht bekannt ist, lassen sich an dieser Stelle nur Mutmaßungen anstellen. Es ist z.B. so, dass die Reaktion mit einer besseren Ausbeute verläuft, wenn man die Lösungsmittel vorher entgast. Dies deutet auf einen radikalischen Mechanismus hin, der folgenderweise formuliert werden könnte:

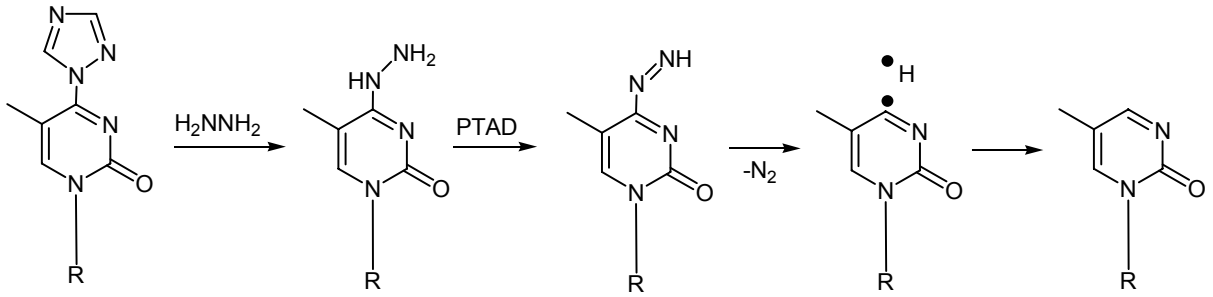


Abb. 86: Postulierter radikalischer Mechanismus zur Reduktion mit PTAD

Wenn tatsächlich unterschiedliche Radikalspezies auftreten, könnte das erklären, warum die Reaktion bei d4T **3** versagt, da hier auch die Doppelbindung reagieren kann. Bei BVdU **11** wäre prinzipiell die Bromvinyleinheit betroffen. Mit den vorhandenen Daten und verwendeten Mitteln lässt sich natürlich ein solcher Mechanismus nicht aufklären. Immerhin aber steht der postulierte Mechanismus im Einklang mit den gefundenen experimentellen Ergebnissen und gibt eine Antwort auf die Frage, warum denn so ähnliche Verbindungen wie d4m^{5}K **110c** und ddm^{5}K **110b** nicht auf demselben Wege darstellbar sind.

Es mussten nun noch die entsprechenden *cyclo*Sal-Triester aus den neuen Nucleosidanaloga gewonnen werden. Dies geschah auf teilweise unterschiedlichen Wegen. Der Grund liegt darin, dass eine neue, direkte Synthese von Phosphorchloridaten entwickelt worden war, die im nächsten Kapitel vorgestellt werden soll. An dieser Stelle sollen nur die optimalen Kupplungsbedingungen anhand der fluoreszierenden carbocyclischen Nucleoside untersucht werden. Die andere Verbindung wurde über die bereits ausführlich diskutierte Chlorphosphitmethode synthetisiert.

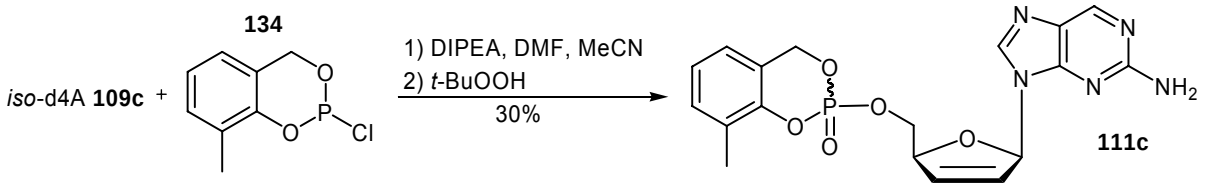


Abb. 87: Synthese von 3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111c**

Die Umsetzung der carbocyclischen Nucleoside *carba-iso*-d4A **128** und *carba-iso*-ddA **130** wurde in einer Mischung aus Pyridin und THF durchgeführt. Alternativ kann für die Umsetzung statt THF auch DMF gewählt werden. Pyridin hingegen muss bei der Reaktion verwendet werden, da es gleichzeitig als Aktivator für das Phosphorchloridat wirkt. Wegen der Empfindlichkeit von Phosphorchloridaten in Gegenwart von Pyridin, muss die Reaktion bei mindestens -40 °C durchgeführt werden, was in etwa auch dem Gefrierpunkt entspricht. Daher ist der Zusatz anderer Lösungsmittel nötig.

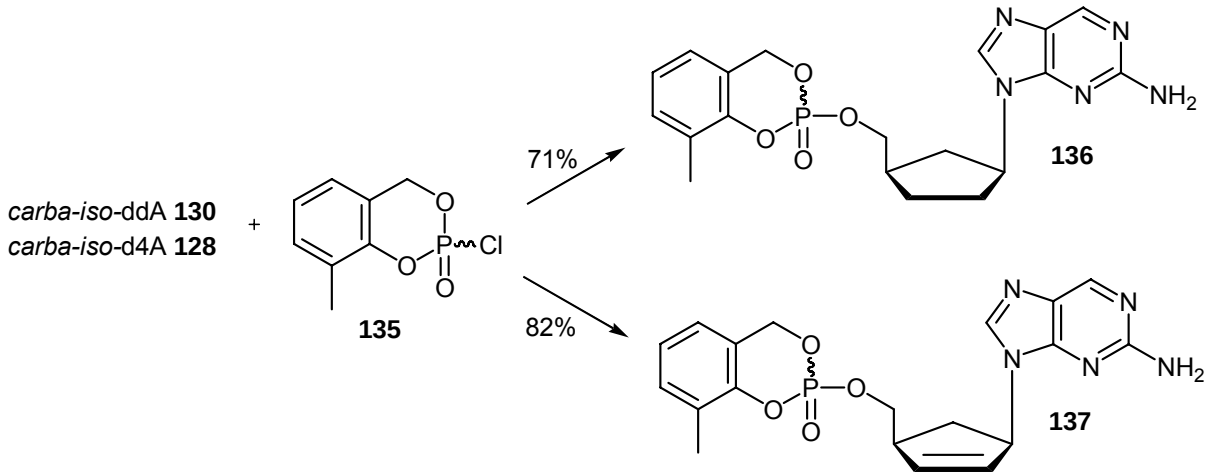
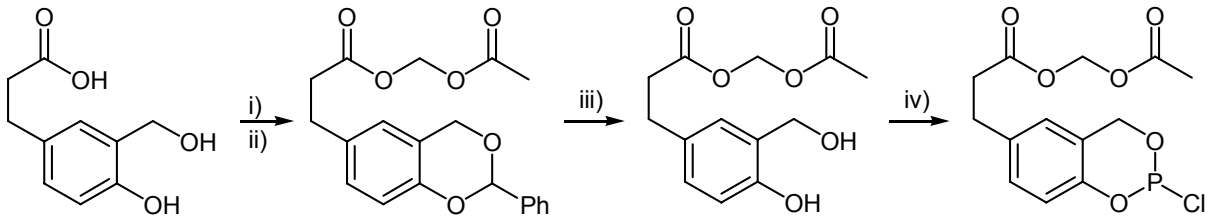


Abb. 88: Synthese der Zielverbindungen **136** und **137** mit der Phosphorchloridat-Methode

Diese Methode lieferte für die ersten Versuche ausgesprochen gute Ausbeuten (**136**: 71%; **137**: 82%). Damit empfiehlt sie sich als echte Alternative zur Chlorphosphitmethode, mit welcher sie nun kurz verglichen werden soll: Ein wesentliches Problem bei der P(III)-Route ist die genaue Dosierung des Chlorphosphits, gerade bei kleinen Ansätzen. Sie liegen oft als Öle vor und können wegen ihrer Luftempfindlichkeit nur ungenau abgewogen werden. Die Phosphorchloridate hingegen sind luftstabil und können durch Chromatographie gereinigt werden. Meist liegen sie als Feststoffe vor und können daher sehr genau eingewogen und problemlos über lange Zeiträume gelagert werden. Weiterhin kommt bei den Synthesen anstelle von DIPEA Pyridin als Base zum Einsatz. Pyridiniumchlorid lässt sich wiederum wesentlich leichter chromatographisch abtrennen, als DIPEA-Hydrochlorid. Die Synthese der Phosphorchloridate ist im nächsten Kapitel mit ihren Einschränkungen beschrieben, daher soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden. Ein Nachteil der Methode ist sicherlich die etwas

mühselige Durchführung, da die Reaktionstemperatur über 6 h bei -40 °C gehalten werden muss. Dies kann allerdings durch die Verwendung eines Cryostaten erreicht werden.

Um genauere Aussagen über das Verhalten „lock-in“-modifizierter *cyclo*Sal-Pronucleotide treffen zu können, sollten solche Triester mit intrinsisch fluoreszierenden Nucleosidanaloga dargestellt werden. Die Synthese des Aminosäurester-modifizierten Chlorphosphits **106** wurde im letzten Kapitel in Abb. 61 bereits beschrieben. In diesem Fall war ein Phenylalanin-Ester verwendet worden, da die Hoffnung bestand, die Löslichkeit in Diethylether könnte gegenüber Alanin-Estern verbessert sein. Leider wurde diese Hoffnung enttäuscht, und so musste die Reaktion in THF unter Inkaufnahme der üblichen Verunreinigungen durchgeführt werden. Die Synthese von POM-funktionalisierten Chlorphosphiten ist bereits beschrieben worden. An dieser Stelle soll aber kurz die Einführung von AM-Acylalen diskutiert werden. Der Grund für die Einführung dieser Modifikation wird auf den nächsten Seiten genannt.



i) Benzaldehyddimethylacetal, *p*-TsOH, THF; ii) AM-Br, DIPEA, THF, 56%; iii) kat. HCl, Reflux, 1min, 82%; iv) PCl_3, Pyridin, Et_2O, 65%

Abb. 89: Synthese des AM-modifizierten Chlorphosphits **140**

Die Synthese des Salicylalkohols **68a** ist bereits im letzten Kapitel beschrieben worden. Ganz analog der POM-Funktionalisierung konnte die AM-Modifikation eingeführt werden, zunächst durch Schützung des Salicylalkoholes mit Benzaldehyddimethylacetal, dann durch Umsetzung mit kommerziell erhältlichem Acetoxymethylbromid (AM-Br). Da das Bromid reaktiv genug war, musste zuvor keine Finkelsteinreaktion durchgeführt werden. Auf diese Weise gelang die Synthese der Verbindung **138** in 56%iger Ausbeute. Da für die nachfolgenden Reaktionen genug von der Verbindung vorhanden war, wurde keine Reaktionsoptimierung durchgeführt. Die Entschützung von **138** zum Salicylalkohol **139** gelang durch kurzes

Aufkochen der Verbindung in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser, dem drei Tropfen konzentrierter Salzsäure zugesetzt waren. Diese Methode liefert bei einer Vielzahl verschiedener Salicylalkohole stets hervorragende Ausbeuten. In diesem Fall konnte der Salicylalkohol **139** trotz der Acylalmodifikation in 82%iger Ausbeute nach Chromatographie isoliert werden. Die Umsetzung zum Chlorphosphit konnte in Diethylether mit PCl_3 durchgeführt werden. Pyridin diente als Base und konnte nach beendeter Reaktion als Pyridiniumchlorid durch Schlenkfiltration entfernt werden. Die geringe Ausbeute von 65% legt in diesem Fall Verluste bei der Schlenkfiltration nahe. Dennoch konnte genug des Chlorphosphits **140** für die weiteren Synthesen erhalten werden. Ein entsprechendes Phosphorchloridat wurde nicht synthetisiert, da zu diesem Zeitpunkt die Methode noch nicht bekannt war.

Die Synthese der „lock-in“ modifizierten, intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Triester wurde in DMF/THF- oder DMF/Acetonitril-Gemischen durchgeführt. Als Base diente DIPEA, zur Oxidation wurde *tert*-Butylhydroperoxid verwendet. Da die Synthesen alle mehr oder weniger unter Standardbedingungen abliefen, ist in der folgenden Abbildung jeweils nur die Ausbeute angegeben, in welcher die einzelnen Triester erhalten wurden.

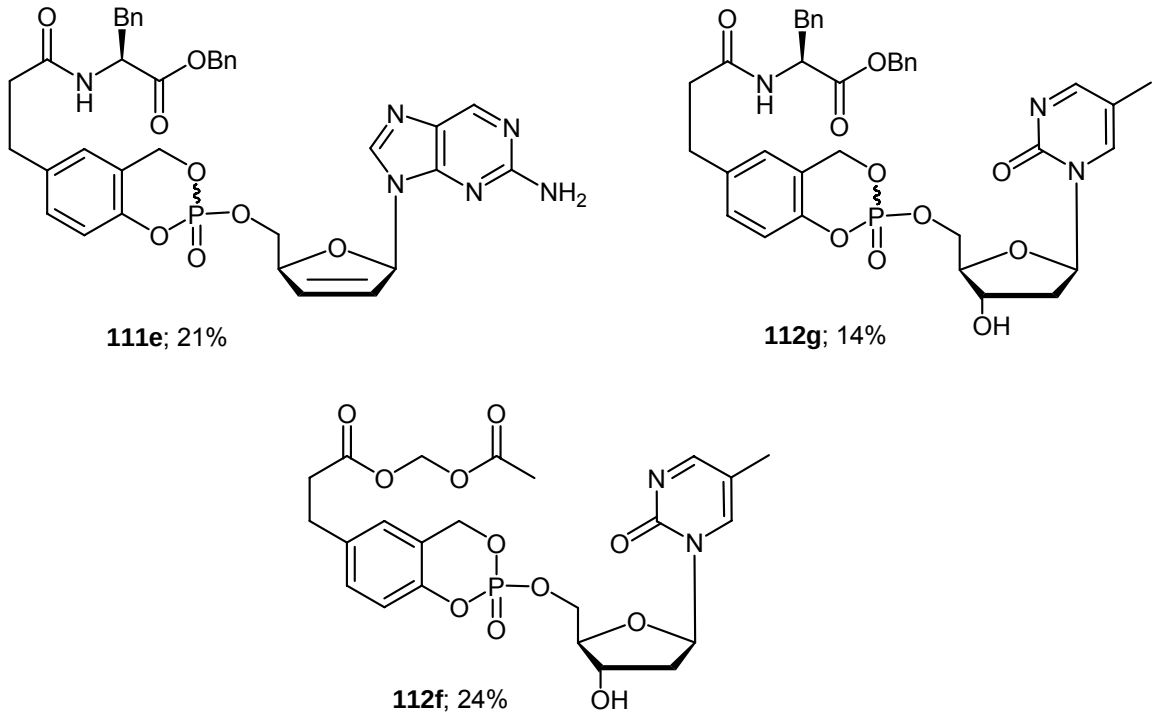


Abb. 90: Intrinsisch fluoreszierende, „lock-in“-modifizierte *cyclo*Sal-Triester

Die relativ niedrigen Ausbeuten sind verschiedenen Faktoren zuzuschreiben; da wegen der fortgeschrittenen Anzahl der Syntheseschritte nur geringe Mengen der Edukte zur Verfügung standen, war eine genaue Dosierung der Reagenzien äußerst schwierig. Letztendlich handelt es sich natürlich auch um recht komplexe Verbindungen, bei denen Nebenreaktionen vermehrt auftreten könnten. Insgesamt aber reichten die dargestellten Mengen für die angestrebten Untersuchungen aus.
Zusammen mit den bereits in meiner Diplomarbeit synthetisierten Verbindungen soll nun im nächsten Kapitel das analytische Potential erschlossen werden.

5.4.2 Charakterisierung der intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotide

Für einige der Verbindungen waren bereits Quantenausbeuten relativ zu *iso*-dA **109a** und dm^{5}K **110a** bestimmt worden. Die Resultate sollen hier kurz zusammengefasst werden. Alle *iso*-dA-Derivate zeigten erwartungsgemäß eine deutlich intensivere Fluoreszenz, als die dm^{5}K-Derivate. Bei Letzteren trat ein starker Quenching-Effekt auf, wenn die Verbindung als *cyclo*Sal-Triester vorlag. Die Fluoreszenzemission wurde substituentenabhängig um bis zu 40% reduziert. Bei der Hydrolyse der Verbindungen zum entsprechenden Monophosphat nahm dann die Fluoreszenz wieder auf den Ursprungswert zu. Dieses Verhalten ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.[75]

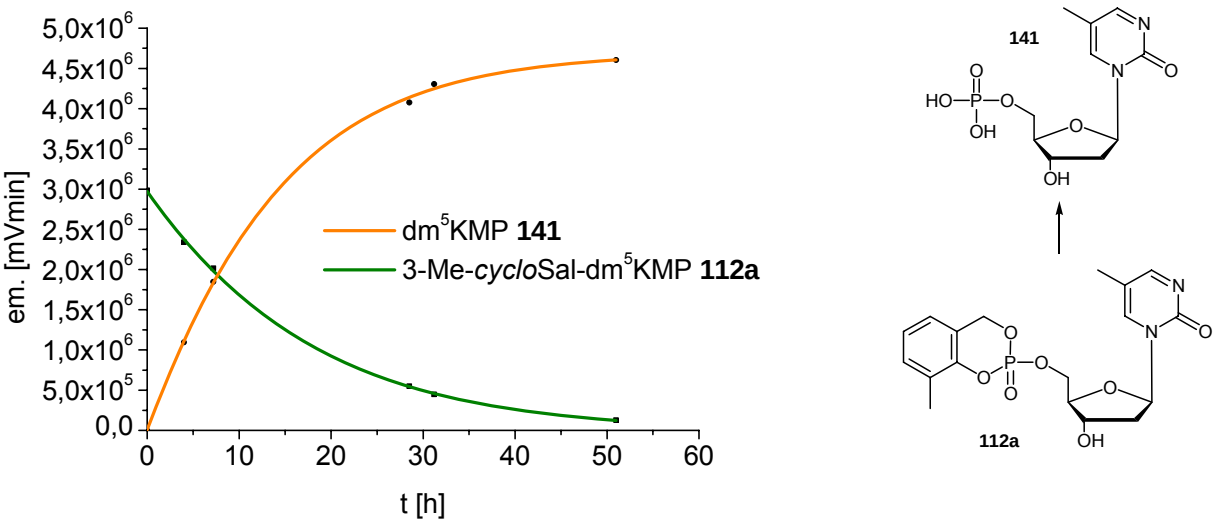


Abb. 91: Fluoreszenzzunahme bei fortschreitender Hydrolyse

Solche Eigenarten traten bei den *iso*-dA-Derivaten nicht auf. Es wurde im Kenntnisstand bereits die Vermutung geäußert, dies könne mit einer π-π-Wechselwirkung des *cyclo*Sal-Restes und der Nucleobase zusammenhängen, die bei Pyrimidin-Nucleosiden auftritt, bei Purin-Nucleosiden hingegen nicht. Fakt ist auf jeden Fall, dass diese Abweichungen bei der HPLC-Analyse berücksichtigt werden müssen. Die gemessenen Absorptions- und Emmisionsspektren waren für alle Verbindungen einer Reihe gleich, weswegen z.B. für die carbocyclischen Nucleoside diese Messungen nicht erneut durchgeführt wurden, da gleiches Verhalten vorausgesetzt werden konnte. Die typischen Emissionsspektren je eines Nucleosides und eines Triesters desselben sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

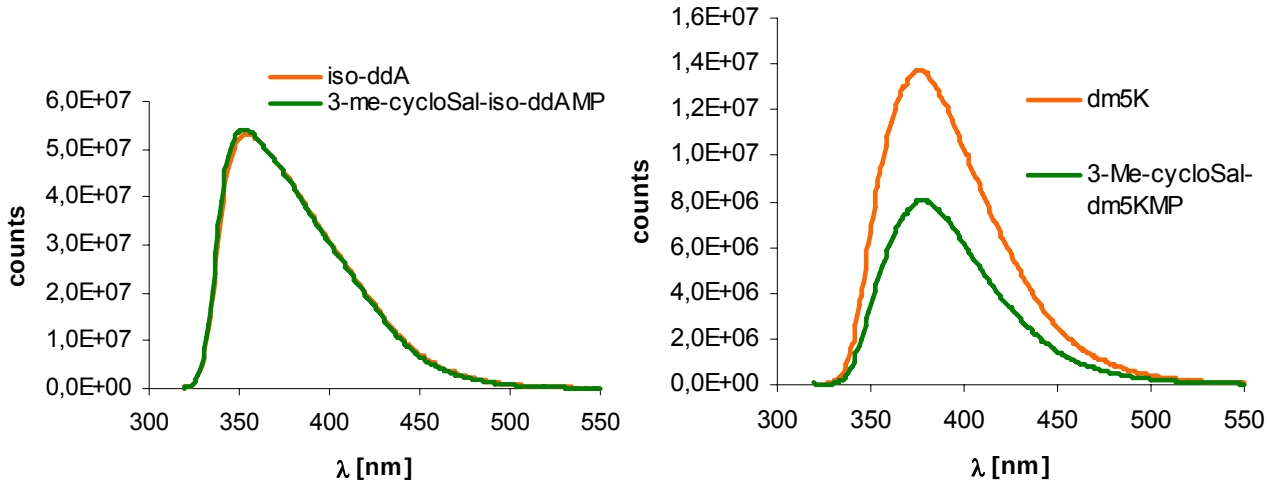


Abb. 92: Emissionsspektren

Für *iso*-A-Derivate erfolgt die Anregung typischerweise bei 305 nm, die Anregung für dm^{5}K-Derivate liegt leicht verschoben bei 314 nm. Weiterhin ist anzumerken, dass die Emission der *iso*-dA-Derivate bei ca. 355 nm im Maximum erfolgt, bei dm^{5}K-Derivaten hingegen bei ca. 378 nm. Beide Nucleoside erzeugen daher ein blaues Leuchten.

Um die Empfindlichkeit der Fluoreszenzanalyse zu demonstrieren, wurde eine Verdünnungsreihe von 3-Methyl-*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111c** angefertigt und 40 µL HPLC-analytisch untersucht. Bei normalen UV-Analysen mit Nucleosiden liegt eine vernünftige Konzentration bei ca. 1 mM, wenn man ein Injektionsvolumen von 40 µL verwendet. Bei der Verdünnungsreihe wurde mit einer Konzentration von 1 µM begonnen, was also bereits einer tausendfachen Verdünnung gegenüber der normalen UV-Detektion entspricht. Die Verdünnung wurde bis zu einem Faktor von

320000 fortgeführt (entsprechend einer Konzentration von ca. 3 nM) und je 40 µL der Verdünnungslösungen HPLC-analytisch unter Fluoreszenzdetektion untersucht. Die absolut nachgewiesenen Mengen lagen bei den höchsten Verdünnungen also im femto- bis picomol-Bereich. Diese Mengen sind so gering, dass ein direkter Nachweis der Verbindungen nach einem Zellaufschluss möglich scheint. Die Linearität der Signalintensität war bei der gemessenen Verdünnungsreihe hervorragend. Dies zeigt die folgende Abbildung.

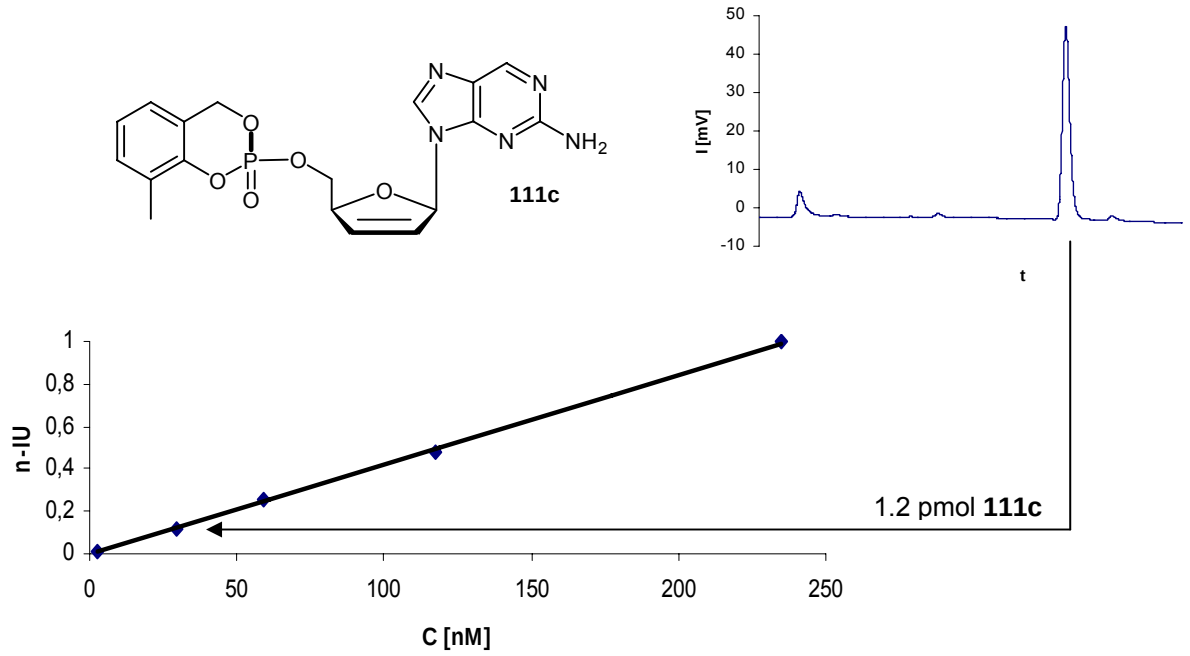


Abb. 93: Verdünnungsreihe und HPL-Chromatogramm von **111c**

Der Einfachheit halber ist die Ordinate in normierten Integrationseinheiten skaliert (n-IU), also der integrierte Wert geteilt durch den höchsten integrierten Wert. Die Abszisse zeigt die jeweilige Konzentration der Verdünnungsreihe angegeben in nmol/L. Selbst bei einer injizierten Menge von nur 1.2 pmol **111c** ist das HPL-Chromatogramm eindeutig und noch nicht durch Rauschen gestört. Es ist wichtig zu erwähnen, dass UV-analytisch in diesem Konzentrationsbereich kein Signal mehr zu detektieren ist. Da das abgebildete Chromatogramm als Vorletztes einer recht langen Reihe gemessen wurde, setzte hier schon geringe Hydrolyse zum entsprechenden Monophosphat ein, welches gleich zu Beginn von der Säule eluierte. Normalerweise zeigt sich bei der Fluoreszenzdetektion nämlich kein Injektionspeak, was ein weiterer Vorteil ist.

Neben der Ermittlung der Fluoreszenzeigenschaften wurden auch die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ der *cyclo*Sal-Triester bestimmt. Im Folgenden sind die Chromatogramme der Hydrolyse von 3-Methyl-*cyclo*Sal-*carba*-*iso*-ddAMP **136** unter Verwendung von Fluoreszenzdetektion leicht versetzt dargestellt.

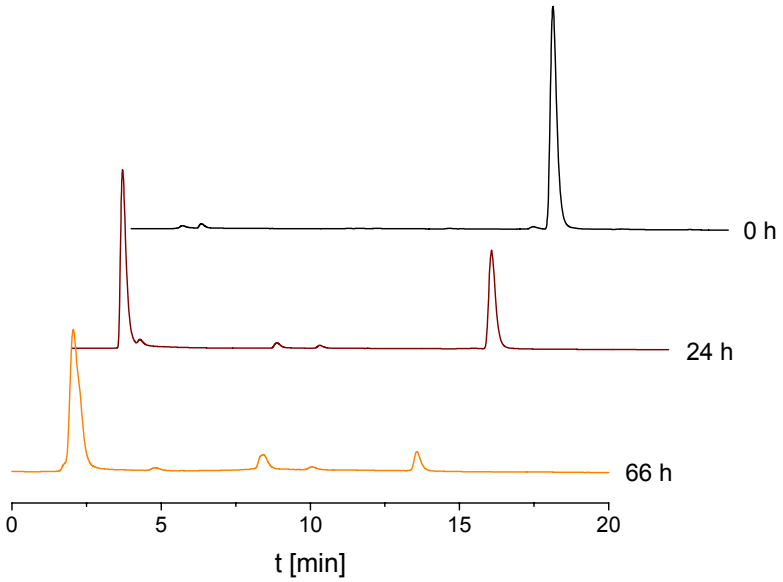


Abb. 94: Chromatogramme der Hydrolyse von **136** bei pH = 7.3 und T = 37°C in PBS

Die Hydrolyse der Verbindung verläuft ohne Entstehung nennenswerter Mengen an Nebenprodukten zu dem entsprechenden Monophosphat. Dies war auch für die anderen Pronucleotide der Fall, weswegen hier nun die Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse einiger Verbindungen gezeigt werden sollen.

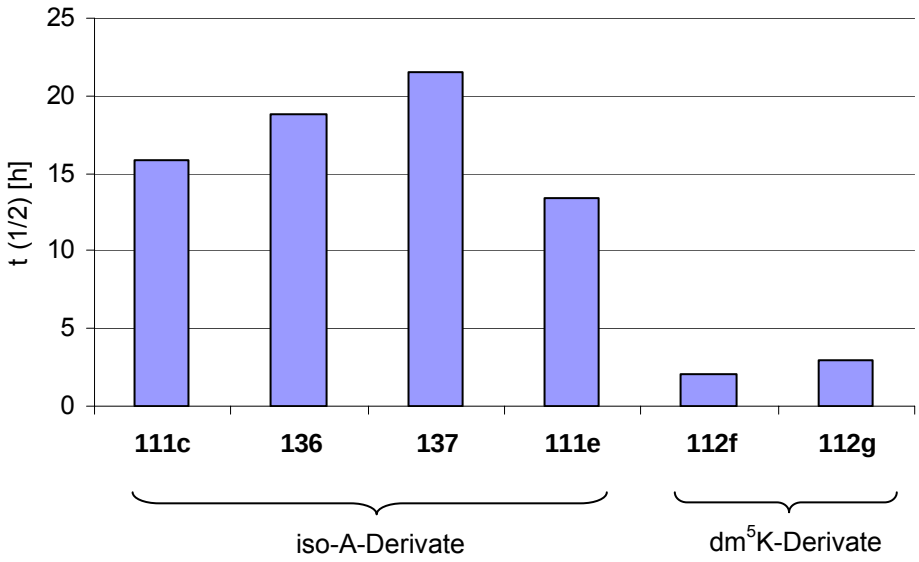


Diagramm 10: Vergleich der chemischen Stabilität in PBS pH = 7.3

Bei den *iso*-A-Derivaten, also 3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111c**, 3-Me-*cyclo*Sal-*carba*-*iso*-ddAMP **136**, 3-Me-*cyclo*Sal-*carba*-*iso*-d4AMP **137** und 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111e**, liegt die chemische Hydrolysehalbwertszeit im Bereich von 14 h bis 21 h. Diese Werte stehen in Einklang mit den erwarteten Ergebnissen. Die Hydrolyse von **111e** ist leicht beschleunigt gegenüber den anderen, da der Substituent hier in der nicht so stark stabilisierenden *para*-Position zur phenolischen OH-Gruppe steht. Die Werte für **136** und **137** könnten leicht erhöht sein, da sie bei Fluoreszenzdetektion ermittelt wurden und damit ca. um den Faktor 3000 verdünnt gegenüber den anderen Verbindungen gearbeitet wurde. Die dm^5K-Derivate 5-(AM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^5KMP **112f** und 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-dm^5KMP **112g** weisen deutlich geringere $t_{1/2}$-Werte auf. Sie liegen zwischen 2 h und 3 h. Dieses Verhalten wurde im letzten Kapitel bereits auf den assistierenden Effekt der freien OH-Gruppe bei der Hydrolyse zurückgeführt. Die „lock-in"-Modifikationen waren allerdings unter den gewählten Bedingungen stabil.

Es wurde nun untersucht, wie sich die „lock-in"-Modifikationen unter dem Einfluss von Esterasen verhalten würden. Dazu wurden zwei der drei Verbindungen in CEM/0 Zellextrakt inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiträumen analysiert. Die erhaltenen Werte sind im Folgenden dargestellt und mit den Werten der chemischen Hydrolyse verglichen. In diesem Fall ist allerdings die Halbwertszeit in Minuten angegeben und aus Gründen der Übersichtlichkeit die Ordinate logarithmisch skaliert.

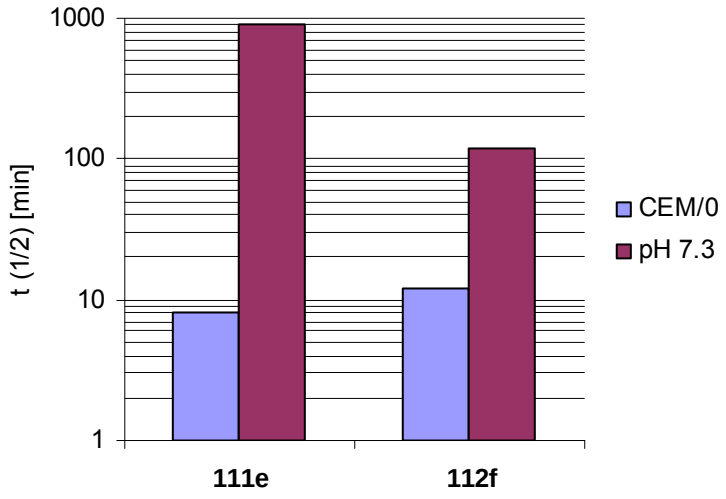


Diagramm 11: Vergleich der enzymatischen und chemischen Stabilität

An dieser Stelle sei sogleich erwähnt, dass 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111e** die vom Hydrolyse-Profil bislang beste dargestellte „lock-in"-Verbindung ist, da sich bei ihr die Geschwindigkeit der chemischen und enzymatischen Hydrolyse um den Faktor 110 unterscheiden, d.h. die enzymatische Hydrolyse um mehr als zwei Größenordnungen beschleunigt ist. Bei 5-(AM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112f** ist diese Beschleunigung nicht so groß, da durch den assistierenden Effekt der 3´-OH-Gruppe die Hydrolysegeschwindigkeit des Phosphattriesters stark beschleunigt wird. Die Differenzierung beträgt hier lediglich den Faktor 2. Nichtsdestoweniger war nun bewiesen, dass mit den Verbindungen **111e** und **112f** und sehr wahrscheinlich auch mit 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112g** intrinsisch fluoreszierende „lock-in"-modifizierte *cyclo*Sal-Pronucleotide für die Analytik zur Verfügung standen. Der Nutzen dieser Verbindungen soll nun in einigen kleinen Experimenten zunächst demonstriert werden.

Es sollte die Diffusion der „lock-in"-modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotide über eine Diffusionsbarriere aus einer wässrigen Donatorphase (D) in eine wässrige Acceptorphase (A) untersucht werden. Durch Variation der Bedingungen in D und A sollte eine Anreicherung der Verbindung in A erreicht werden. Als Diffusionsbarriere bot sich wegen der Unmischbarkeit mit Wasser und wegen der höheren Dichte Dichlormethan (CH_2Cl_2) an. Als vernünftige experimentelle Anordnung stellte sich ein U-Rohr heraus, in dessen Armen zwei wässrige Lösungen durch eine CH_2Cl_2-Barriere getrennt werden könnten. Um die Experimente zu beschleunigen, wurde die CH_2Cl_2-Phase vorsichtig mit einem Rührfisch durchmischt.

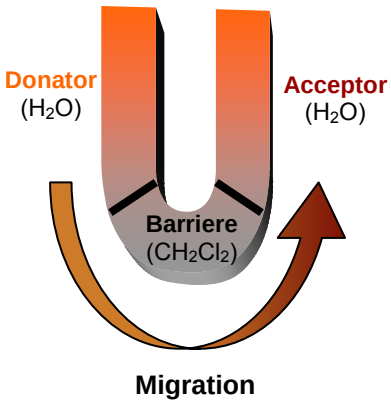
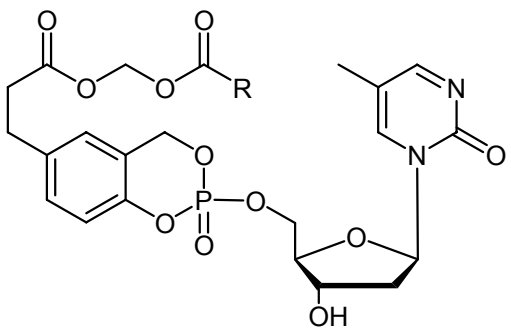


Abb. 95: Aufbau von U-Rohr Diffusionsversuchen

Zum Ablauf solcher Experimente lässt sich prinzipiell sagen, dass zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl D als auch A Proben entnommen und HPLC-analytisch untersucht wurden. Dabei kam dem 0-Wert in D besondere Bedeutung zu. Auf ihn wurden alle anderen gemessenen Werte bezogen, so dass sie als Fraktion des 0-Wertes angegeben werden können. Damit lässt sich relativ schnell der Grad der Anreicherung erkennen. Wie schon erwähnt, schwanken die Quantenausbeuten der Triester und Monophosphate von dm^{5}K-Derivaten, so dass hier Korrekturen bei der Auswertung der Daten vorgenommen werden mussten. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte unter Verwendung der Fluoreszenzdetektion, da so nur sehr geringe Mengen für die Analysen aus den Phasen entnommen werden mussten (je 1 μL). Dies wäre mittels UV-Detektion unmöglich gewesen. Generell wurden die Experimente folgendermaßen durchgeführt: Es wurden 38 μL einer 50 mM Stammlösung des Triesters mit 962 μL H_2O auf eine Konzentration von 1.9 mM verdünnt. In die Acceptorphase wurden 962 μL H_2O und 38 μL DMSO gegeben. Diese Phasen wurden gleichzeitig in ein U-Rohr übergeführt, in welchem 1.1 mL CH_2Cl_2 vorgelegt waren. Die Zugabe musste gleichzeitig erfolgen, um eine Durchmischung der Phasen zu vermeiden. Ein kleiner Rührfisch in der CH_2Cl_2-Phase sorgte bei 500 rpm für eine schwache Durchmischung. Die Arme des U-Rohres wurden nun mit Alufolie und Parafilm abgedichtet, bis Proben entnommen wurden. Dafür wurde aus D und A je 1 μL entnommen und mit 499 μL Wasser auf eine Konzentration von 4.0 μM verdünnt. Von diesen Lösungen wurden je 40 μL injiziert (also etwa 160 pmol Absolutmenge). Die Anregung erfolgte bei 314 nm, die Emission wurde bei 378 nm detektiert. Die auf diese Weise untersuchten Verbindungen sind in der folgenden Abbildung gezeigt.



R = *t*Bu; 5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112c**
R = CH_3; 5-(AM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112f**

Abb. 96: In U-Rohr Experimenten verwendete *cyclo*Sal-Pronucleotide

Aus Voruntersuchungen in meiner Diplomarbeit waren einige Notwendigkeiten für diese Untersuchungen bekannt. Es war z.B. möglich gewesen, durch pH-Wert Unterschiede in D und A eine Anreicherung zu erreichen, allerdings misslangen Experimente mit Zellextrakt und „gealtertem“, zentrifugierten Zellextrakt, da an der Phasengrenze zwischen A und CH_2Cl_2 stets Denaturierung auftrat. Die Verwendung biologischer Medien schien aber notwendig, um das „lock-in“-Verhalten simulieren zu können. Ein Ausweg wurde in der Verwendung von Schweineleberesterase (PLE) gefunden, die unter den gewählten Bedingungen über lange Zeiträume stabil und aktiv war. Da die Aminosäureester im Gegensatz zu den POM- und AM-Acylalen nicht von PLE gespalten wurden, konnten diese Experimente nur mit den Acylalen durchgeführt werden. Bei den POM-Acylalen ergab sich ein weiteres Problem, so dass schließlich das AM-Acylal dargestellt werden musste: Die schlechte Löslichkeit in Wasser. Um dies zu veranschaulichen, wurden die log*P*-Werte, also die dekadischen Logarithmen der Nernstschen Verteilungskoeffizienten, der Verbindungen in CH_2Cl_2 und Wasser ermittelt. Man erkennt recht schnell, dass **112c** wenig Bestrebung zeigen sollte, die CH_2Cl_2-Phase zu verlassen. Dies konnte in den Experimenten bestätigt werden. **112c** akkumulierte rasch in der CH_2Cl_2-Phase und verblieb dort.

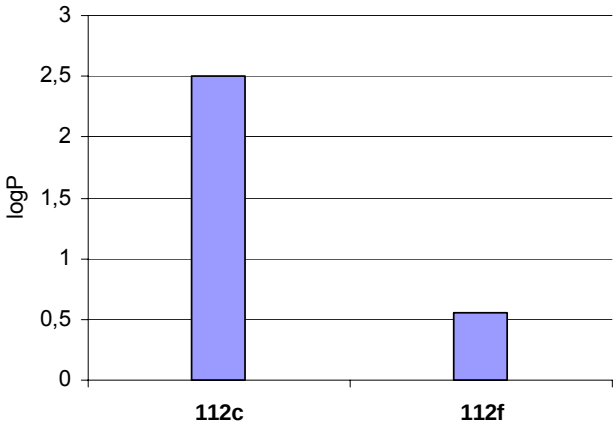


Diagramm 12: Vergleich der log*P*-Werte von **112c** und **112f**

Dabei ist der Wert für **112c** mit einer relativ großen Ungenauigkeit behaftet, da das Signal in der wässrigen Phase nicht sonderlich intensiv war. Würde eine Gleichverteilung in Wasser und CH_2Cl_2 erhalten, so wäre der Verteilungskoeffizient $P = 1$ und $\log P = 0$. Ein positiver Wert gibt an, dass anteilig mehr in der organischen Phase zu finden war, bei einem Wert von etwa 2.5 bewegt man sich allerdings schon

im Promillebereich, so dass eine genaue Auswertung schwierig wird. Bei 5-(AM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP **112f** liegt hingegen ein dynamisches Verteilungsgleichgewicht zwischen beiden Phasen vor. Dies wird auch in den folgend beschriebenen U-Rohr Experimenten deutlich.

Versuch 1: Migration durch Unterschiede im pH-Wert

Eine Möglichkeit der chemischen Unterscheidung von D und A besteht darin, verschiedene pH Werte in den Phasen einzustellen. In der basischeren Phase sollte dann aufgrund der beschleunigten Hydrolyse des *cyclo*Sal-Triesters **112f** eine Anreicherung eintreten. Phase D wurde auf einen pH-Wert von 6.8 und A auf 7.3 eingestellt.

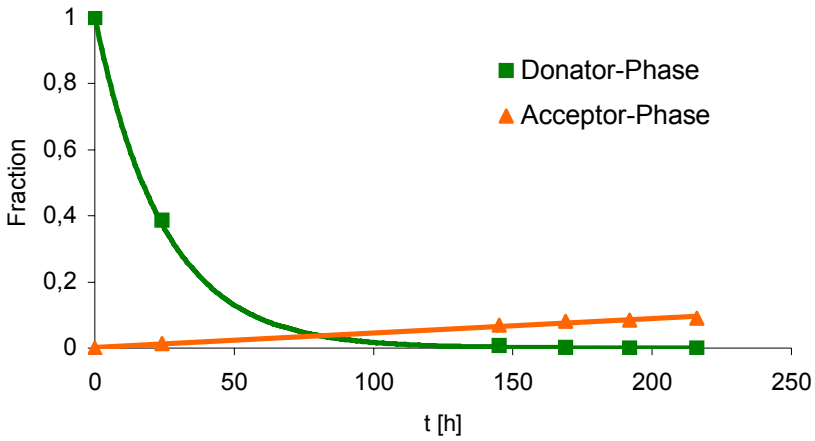


Diagramm 13: Migration von **112f** von D (pH = 6.8) nach A (pH = 7.3)

Die Entwicklung wurde über etwa 10 Tage verfolgt. Man erkennt eine langsame Anreicherung in der Acceptorphase. Dennoch verblieb ein Großteil der Verbindung in der CH_2Cl_2-Barriere.

Versuch 2: Migration durch enzymatische Spaltung

In diesem Versuch sollte die AM-Modifikation von einer in der Acceptorphase befindlichen Esterase gespalten werden. Dies sollte die Rückdiffusion unterbinden, wie bereits im letzten Kapitel ausführlich diskutiert wurde. Der Acceptorphase wurden daher 2.75 U PLE auf 1 mL Gesamtvolumen zugegeben. Die pH-Werte beider Phasen wurden auf 6.8 eingestellt.

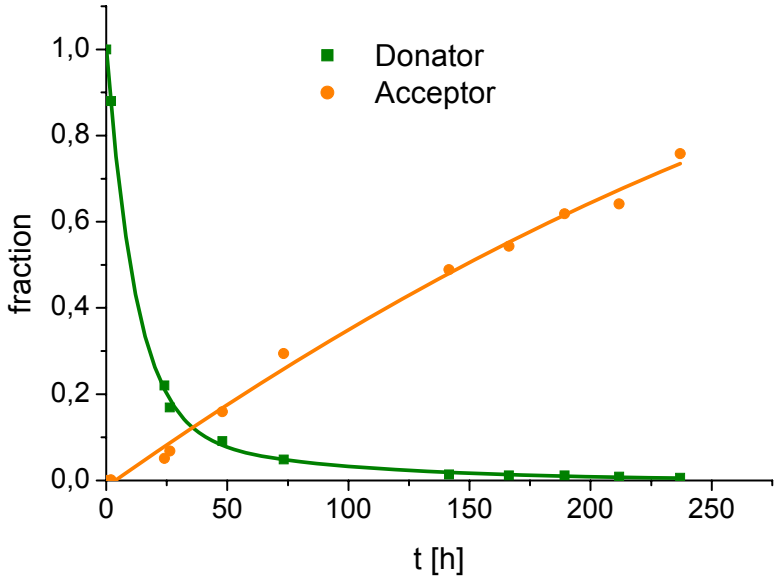


Diagramm 14: Migration von **112f** von D (pH = 6.8) nach A (pH = 6.8, 2.75 U PLE)

Es wird an dieser Stelle deutlich, dass der Plan aufgeht; durch Anbringen eines enzymatisch spaltbaren Restes, in diesem Fall AM, kann die Migration über eine Diffusionsbarriere erzwungen werden, was wiederum bedeutet, dass die im letzten Kapitel vorgestellten „lock-in"-modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotide prinzipiell zur intrazellulären Anreicherung verwendet werden können. Natürlich ist der experimentelle Aufbau recht schlicht und vermag keine Feinheiten abzubilden, aber die rasche Zunahme von **112f** (und Abbauprodukten) in A auf etwa 80% im Rahmen der Versuchsdauer illustriert recht schön das Prinzip des „lock-in"-Mechanismus.[75]

5.4.3 Antivirale Daten der intrinsisch fluoreszierenden *cyclo*Sal-Pronucleotide

Auch von den intrinsisch fluoreszierenden Nucleosiden und Pronucleotiden wurden die antiviralen Daten ermittelt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt lagen nur die Testergebnisse gegen HIV vor. Als eigentlich interessantester Wert präsentiert sich in der folgenden Tabelle die Cytotoxizität. Für den Einsatz der Pronucleotide als intrazelluläre Sonden für die Fluoreszenzmikroskopie würde ein hoher CC_{50}-Wert offensichtlich nachteilig sein. Erfreulicherweise lagen die erhaltenen Konzentrationen alle deutlich über den bei der Fluoreszenzmikroskopie zu verwendenden

Konzentrationen. Da von den Verbindungen nicht unbedingt eine Aktivität gegenüber HIV zu erwarten war, sind die schlechten EC_{50}-Werte nicht überraschend.

	EC_{50}[a] [µM]		CC_{50}[b] [µM]
	CEM/0		CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	
Iso-d4A **109c**	>50	>50	106 ± 6
Carba-iso-ddA **130**	>250	>250	128 ± 7
Carba-iso-d4A **128**	>250	>250	>250
carba-d4-2,6-Diaminonebularine **129**	22 ± 11	50 ± 0.0	>250
3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111c**	>50	>50	96 ± 2
3-Me-*cyclo*Sal-*carba-iso*-ddAMP **136**	>50	>10	82 ± 1
3-Me-*cyclo*Sal-*carba-iso*-d4AMP **137**	>10	>50	106 ± 6

[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration

Tab. 5: Antivirale Profile intrinsisch fluoreszierender Nucleoside und Pronucleotide

5.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

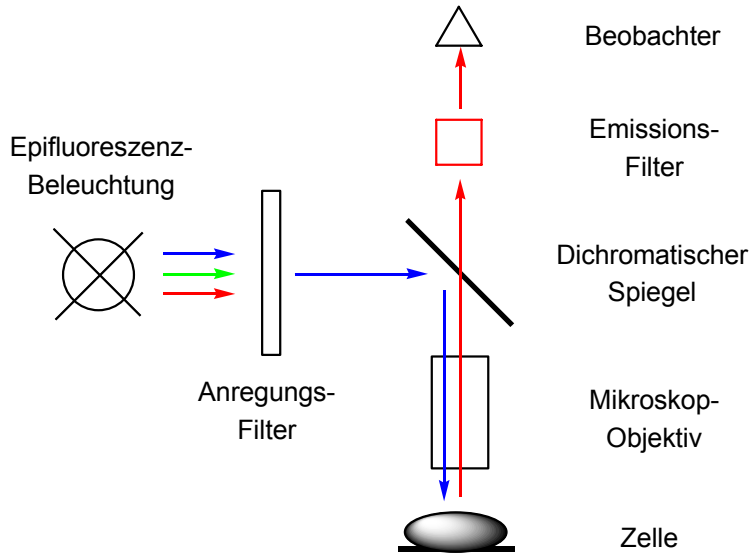


Abb. 97: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

Ausgehend von der Epifluoreszenzbeleuchtung wird durch einen Anregungsfilter ein Wellenlängenbereich selektiert, der zur UV-Anregung der Probe verwendet werden soll. Dieser Strahl wird an einem dichromatischen Spiegel auf die Zelle gelenkt und regt dort die Probe an, die eine Fluoreszenzantwort aussendet. Die emittierten Photonen passieren den dichromatischen Spiegel und einen weiteren Filter und können nun beobachtet werden. Meist geschieht die Aufzeichnung der Bilder mit einer Kamera. Wird der erste Anregungsfilter aus dem Strahlengang entfernt, erhält man eine sogenannte Lichtfeldaufnahme (bright field; bf), welche die Zelle mit ihren Strukturen abbildet. Auf diese Weise können Vergleichsaufnahmen angefertigt werden. Ein Problem bei den Anregungsfiltern für die von uns angestrebten Messungen war, dass sie so konstruiert sind, dass sie die Epifluoreszenzbeleuchtung in die drei Bestandteile rot, grün und blau gespalten werden kann. Für uns war der Blaulichtmodus von Interesse, da die Anregung unserer Verbindungen im Maximum zwischen 304 und 314 nm erfolgen sollte. Es stellte sich allerdings heraus, dass der Anregungsfilter alle Wellenlängen unter 340 nm herausfilterte. Dies lag am äußersten Rand der UV-Absorptionsbanden der dargestellten Nucleosid-Analoga, weswegen zunächst die Kristalle der Verbindungen auf Trägern fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden, um zu überprüfen, ob überhaupt eine Fluoreszenzantwort erhalten werden könnte. Dazu wurden zunächst *iso*-d4A **109c** und dm^{5}K **110a** untersucht.

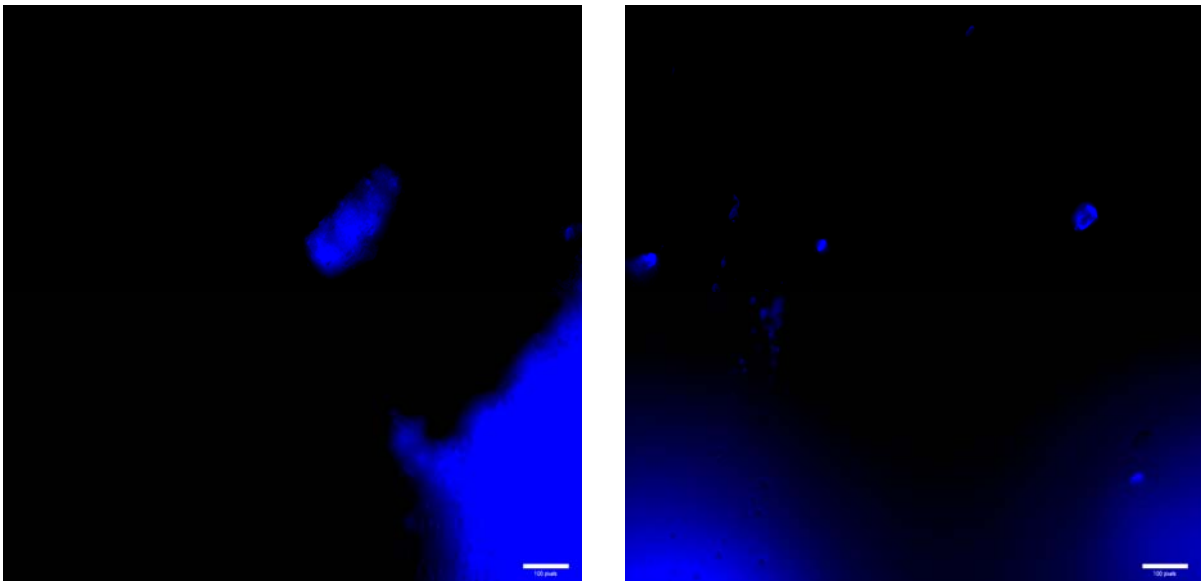
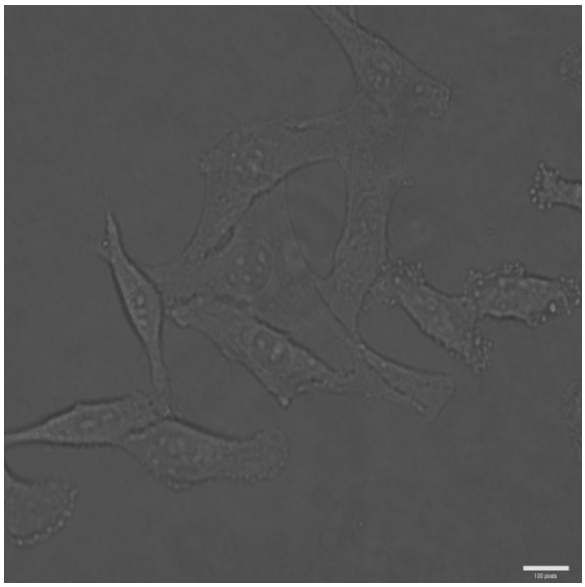
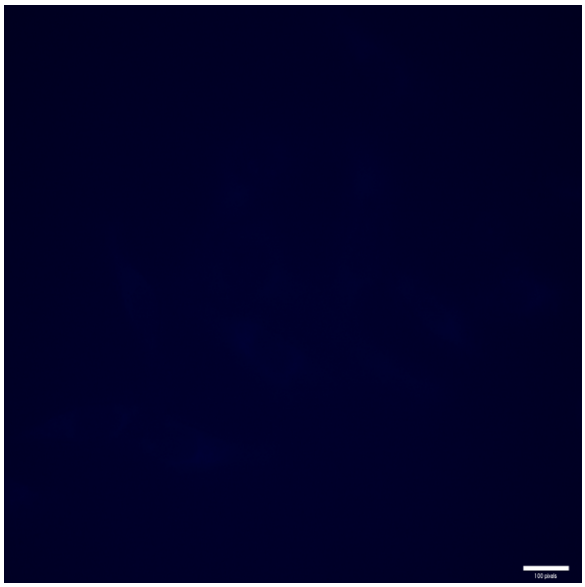


Abb. 98: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kristalle von *iso*-d4A **109c** (links) und dm^{5}K **110a** (rechts)

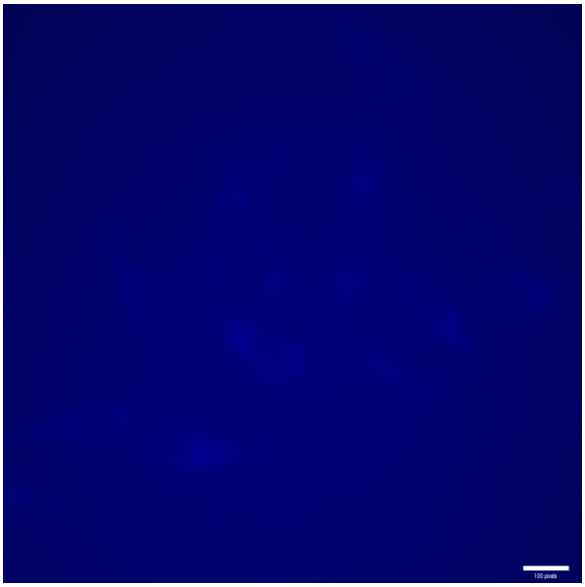
Die Bilder zeigen eindeutig eine blaue Fluoreszenzantwort der Kristalle. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass trotz des Filters noch eine gewisse Anregung stattfand. In den Laboratorien von Dr. Arwyn Tomos Jones, Welsh School of Pharmacy, Cardiff, Wales, wurden von mir nun weitere Untersuchungen in Zellkulturen durchgeführt. Zunächst wurde auf HeLa-Zellen zurückgegriffen, eine unsterbliche Krebs-Zell-Linie (humane Epithelzellen, Zervixkarzinom, *He*nrietta *La*cks). Die Zellen wurden in Inkubationsflaschen im Zellinkubator vermehrt, bis eine Konfluenz von ca. 60 bis 70% erreicht war. Durch Zugabe von Trypsin wurden die Adhäsionsproteine, mit denen sich die Zellen am Gefäß festhielten, durchtrennt und die vereinzelten Zellen als Suspension in spezielle Trägerschalen für die Fluoreszenzmikroskopie gebracht. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer (je nach Menge der eingebrachten Zellen) in dem Inkubationsmedium (DMEM+Glutamax, 1g/L D-Glucose+Pyruvat; Penicillin, Vancomycin; FCS) wurde die Konfluenz der Zellen in den Trägerschalen überprüft. Details zur Züchtung sind im Experimentalteil zu finden. Bei hinreichender Konfluenz wurde das Nährmedium entfernt und durch Nährmedium ersetzt, welches bestimmte Mengen von DMSO-Stammlösungen (8 mM, 50 mM) der zu untersuchenden Verbindungen enthielt. Zunächst wurde das Inkubationsmedium nach 1 h entfernt und die Zellen mehrfach mit einem indikatorfreien Medium gewaschen. Dann wurde ein klares Medium auf die Zellen gegeben und diese unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Untersuchungen erfolgten zunächst mit 8 und 80 μM Konzentrationen der Verbindungen im Nährmedium. Die folgende Abbildung 99 zeigt den Leerwert, der bei Bestrahlung der Zellen ohne Analyt erhalten wurde. Dabei erfolgte zunächst eine Aufnahme der Zellen im Lichtfeld und dann unter UV-Bestrahlung. Ein weiterer variabler Parameter bei diesen Messungen war die Belichtungsdauer B der Kamera, mit der die Bilder aufgezeichnet wurden. Typischerweise wurden für Lichtfeldaufnahmen 6 ms Belichtungszeit gewählt. Bei UV-Anregungen wurde zwischen 100 ms bis 3 s variiert. Bei einer hohen Belichtungsdauer wurde das Bild insgesamt heller, dafür ging Kontrast verloren. Der Leerwert wurde unter Verwendung mehrerer Belichtungsdauern aufgezeichnet.



Blank; bf; B = 6 ms



Blank; 350 nm; B = 700 ms



Blank; 350 nm; B = 3 s

Abb. 99: Leerwert (Blank) im Lichtfeld (bf) und unter Anregung bei 350 nm mit variabler Belichtungsdauer B; HeLa

In der bf-Aufnahme erkennt man einige langgezogene HeLa-Zellen mit Zellkern (ca. 15 Stück). Der gleiche Ausschnitt unter Bestrahlung bei 350 nm bei einer Belichtungsdauer von 700 ms zeigt keinerlei Signal. Erst bei 3 s Belichtungsdauer beginnt man schwach die Zellstrukturen zu erkennen. Bei einem deutlichen Signal der Analyten sollte bei diesen Belichtungsdauern daher keine wesentliche Störung auftreten.

Es wurden nun verschiedene Experimente mit unterschiedlichen Verbindungen bei 1 h Inkubationsdauer und einer Konzentration von 8 μM durchgeführt. Die Ergebnisse waren für alle Verbindungen ähnlich, daher ist exemplarisch nur 3-Me-*cyclo*Sal-*iso*-ddAMP **111b** abgebildet.

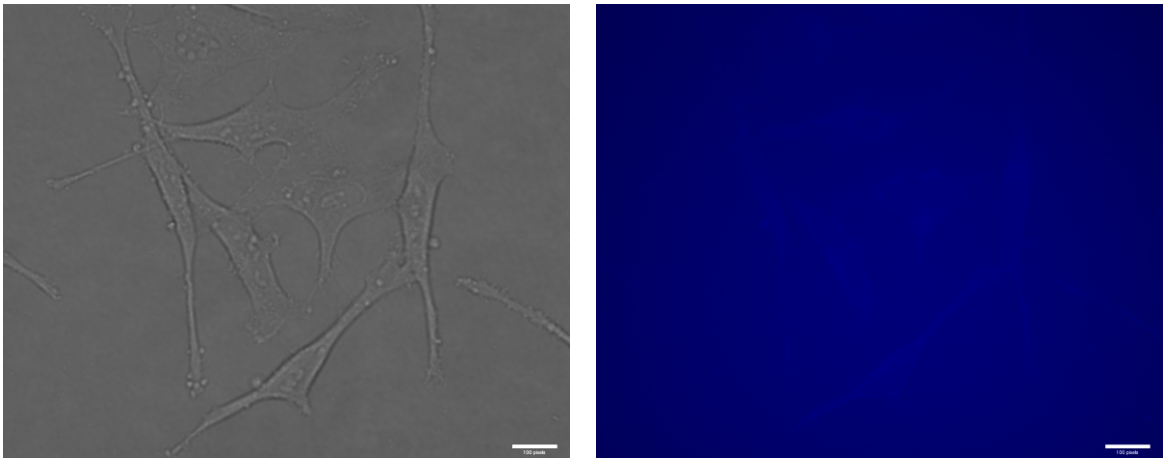


Abb. 100: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **111b** (links: bf, B=6ms; rechts: 350nm, B=2s)

Die Ergebnisse ließen zwei hauptsächliche Annahmen zu: Entweder war **111b** nicht in der Lage, in die Zelle zu gelangen, oder aber die Fluoreszenz war zu schwach, da nur eine geringe Anregung bei 350 nm erfolgte. Da diese Ergebnisse aber für alle untersuchten Verbindungen gefunden wurden, wurde eher von der letzteren Vermutung ausgegangen. Es war schlicht unwahrscheinlich, dass von der Vielzahl der untersuchten Nucleoside, Nucleotide und Pronucleotide kein einziges in der Lage gewesen sein sollte, die Zellmembran zu passieren. Aus diesem Grund wurden zunächst die Konzentrationen auf bis zu 150 μM erhöht und die Inkubationsdauern schrittweise auf zunächst 2 h, dann 6 h und schließlich 24 h erhöht. Im letzteren Fall wurden die Inkubationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dies alles sollte letztlich dazu dienen, genug Analyt in die Zelle zu schleusen, um eine intensive Fluoreszenzantwort zu erhalten. Bei den erhöhten Konzentrationen trat bei einigen der Verbindungen die Cytotoxizität in den Vordergrund, so dass kaum noch gesunde Zellen zur Analyse gefunden werden konnten. Einige der Verbindungen erwiesen sich jedoch auch bei hohen Konzentrationen als hinreichend verträglich für die Zellen. Ein besonderes Augenmerk bei der Analyse galt nun den „lock-in"-modifizierten Triestern 5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP **111e** und

5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-*iso*-dm^{5}KMP **112g**, da hier wegen der intrazellulären Akkumulation eine weitere Intensitätssteigerung des Signals erwartet wurde.

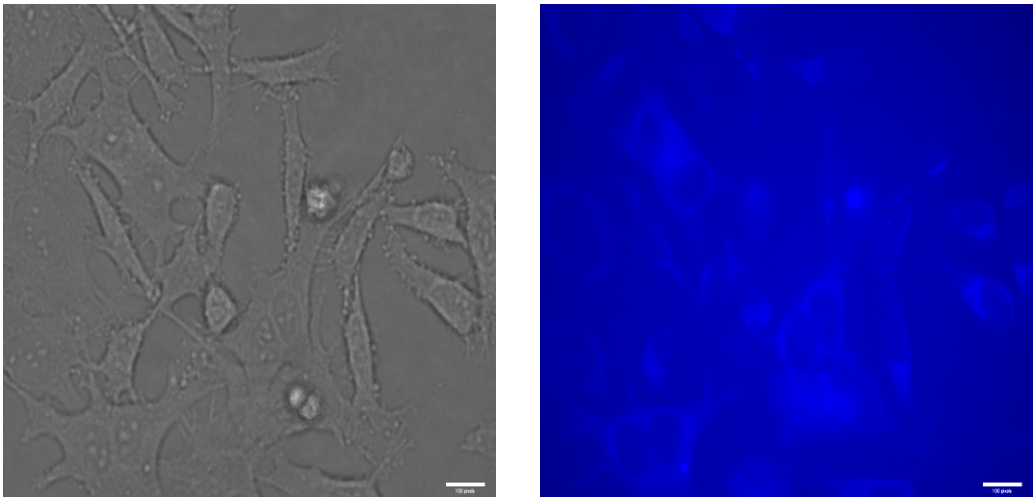


Abb. 101: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **112g** (links: bf, B=6ms; rechts: 350nm, B=2s)

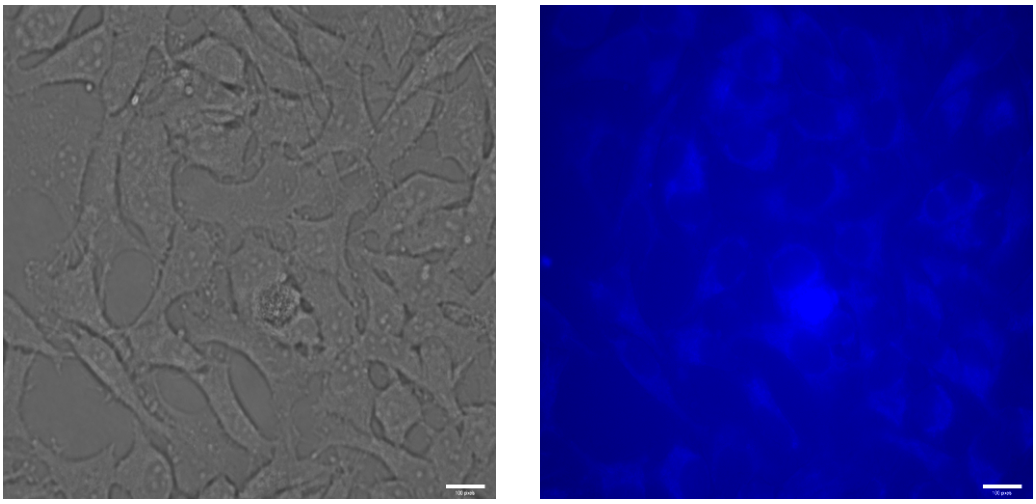


Abb. 102: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **111e** (links: bf, B=6ms; rechts: 350nm, B=2s)

Man erkennt in beiden Fällen nach einer Inkubationsdauer von 5 h zwar Signale, die aus dem Zellinneren stammen, für die hohen Konzentrationen und langen Belichtungsdauern ist das Signal dennoch sehr schwach (und am Monitor deutlich besser zu erkennen, als in gedruckter Form), obwohl es sich etwas vom Leerwert abhebt (s. Abb. 99). Auch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 h brachte keine wesentlichen Verbesserungen der Ergebnisse. Um den Einfluss der Zell-Linie auszuschließen, wurden die Untersuchungen mit einigen der Verbindungen in der humanen Leukämiezell-Linie HL-60 wiederholt. Da diese keine Adhäsionsfaktoren

ausbilden, musste nach den einzelnen Waschvorgängen ein Zellpellet durch Zentrifugation erzeugt werden. Ansonsten glichen die Experimente den vorher beschriebenen.

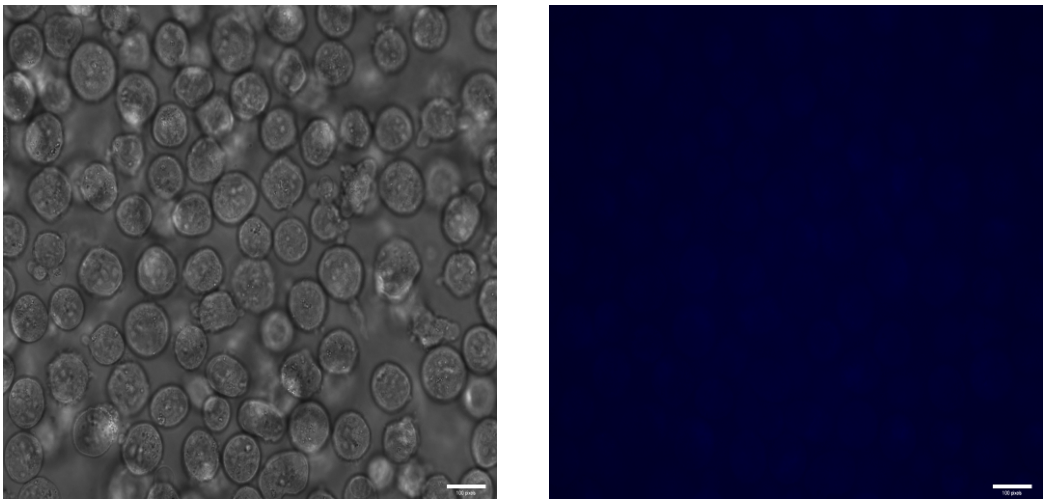


Abb. 103: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **111e** (links: bf, B=6ms; rechts: 350nm, B=600 ms) in HL-60

Man erkennt auch in HL-60 bei leicht verkürzter Belichtungsdauer von 600 ms kein Signal. Damit bleibt nur festzustellen, dass Standardfluoreszenzmikroskope zur Analyse der diskutierten Verbindungen ungeeignet sind. Zur Anregung müsste entweder ein UV-Laser verwendet werden, der bis zu der optimalen Wellenlänge um 310 nm anregt, oder es müssten intrinsisch fluoreszierende Nucleoside mit langwelligeren UV-Banden dargestellt und untersucht werden. Prinzipiell könnten dafür die sogenannten BCNAs geeignet sein (bicyclic pyrimidine nucleoside analogs), die von C. McGuigan *et al.* entdeckt wurden.[105]

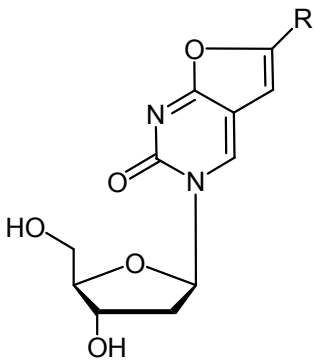
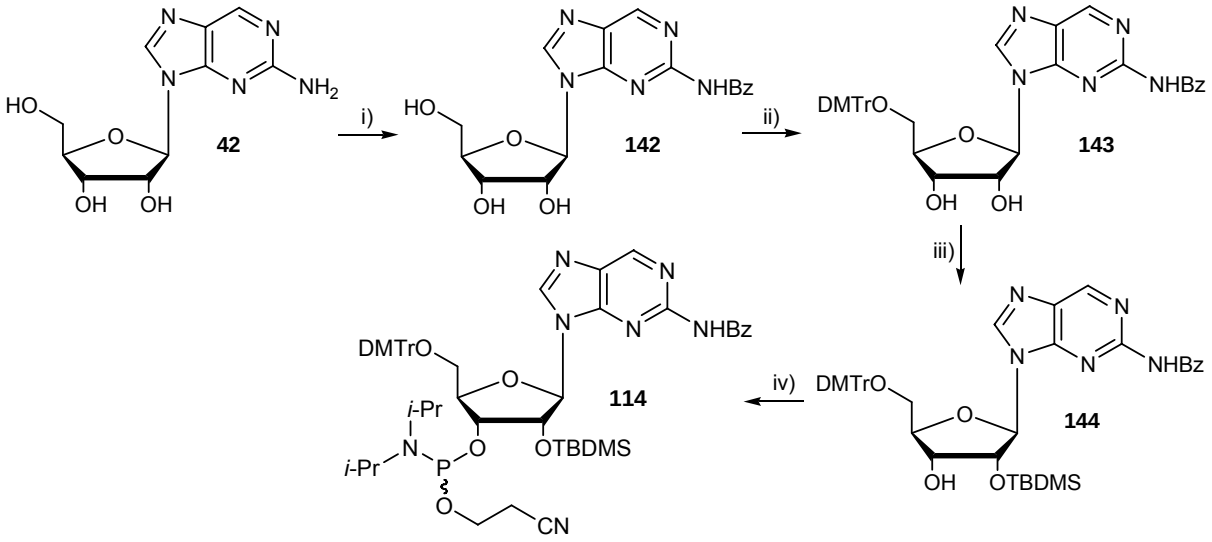


Abb. 104: Leitstruktur der BCNAs

Wird der Rest R nicht zu sperrig gewählt, so unterscheiden sich diese Analoga nur geringfügig von den zugrundeliegenden Pyrimidin-Strukturen. Sie sollten daher auch prinzipiell zur Aufklärung des Diffusionsverhaltens von *cyclo*Sal-Pronucleotiden geeignet sein.
Für die in diesem Kapitel besprochenen Verbindungen bietet sich aufgrund der geringen Nachweisgrenze für einige der Verbindungen die Inkubation von verschiedenen Zellen unter anschließendem Zellaufschluss und nachfolgender HPLC-Analyse des Lysats an. Dies bietet den Vorteil einer möglichen Quantifizierung durch Integration der Chromatogramme. Die einfachste Form solcher Experimente ließe sich wohl mit humanen Blutzellen durchführen.

5.4.5 Synthese eines intrinsisch fluoreszierenden Phosphoramidits

Als letzter Punkt in diesem Kapitel soll die Optimierung der Synthese eines intrinsisch fluoreszierenden Phosphoramidits für die automatisierte RNA-Festphasensynthese besprochen werden. Das Nucleosid-Analogon *iso*-A **42** ist hinsichtlich seiner Fluoreszenzeigenschaften ausgesprochen interessant: Liegt es in doppelsträngiger DNA- oder RNA basengepaart vor, so ist die Fluoreszenz um wenigstens zwei Größenordnungen verringert. Wird die Basenpaarung unterbunden oder der Doppestrang getrennt, so entsteht ein intensives Fluoreszenzsignal, mit dem man Aussagen über die DNA- bzw. RNA-Microumgebung treffen kann. Insbesondere zur Untersuchung von RNA-Interferenz, bei der doppelsträngige RNA eine Rolle spielt, scheint *iso*-A **42** eine ausgesprochen interessante Sonde zu sein.
In der nachfolgenden Abbildung ist eine in der Literatur beschriebene Synthese gezeigt.[106] Die Reaktionssequenz beginnt mit der transienten Schützung von **42** mit TMS-Chlorid und Schützung der Aminofunktion. Die Ausbeute dieser Reaktion ist mit 90% angegeben. Für die zweite Umsetzung mit DMTr-Chlorid wurde keine Ausbeute angegeben. Nachfolgend wird die 2´-OH-Gruppe mit TBDMS-Chlorid geschützt (45% Ausbeute), und im letzten Schritt erfolgt die Umsetzung zum Phosphoramidit **114** in 98%iger Ausbeute.



i) TMS-Cl, Pyridin, Bz-Cl, 90%; ii) DMTr-Cl, DMAP, TEA, Pyridin; iii) TBDMS-Cl, Imidazol, Pyridin, 45%;
iv) *N,N*(Diisopropylamino)(cyanoethyl) phosphonamidochlorid, N-Methylimidazol, THF, 98%

Abb. 105: Synthese von **114** nach J. Doudna *et al.*

Leider gelingt es nicht oft, die transiente Schützung mit TMS-Chlorid zu reproduzieren. Es war daher ein Ziel dieser Arbeit, eine reproduzierbare Synthese des Phosphoramidits **114** zu erarbeiten. Da im Verlauf der Synthese von *iso*-A **42** die dreifach acetylierte Vorstufe **122** erhalten wurde, lag es nahe, die transiente Schützung durch Verwendung dieser Verbindung zu umgehen. Ausgehend von **122** konnte dann tatsächlich eine geeignete Synthese zur Darstellung des Phosphoramidits **114** entwickelt werden.

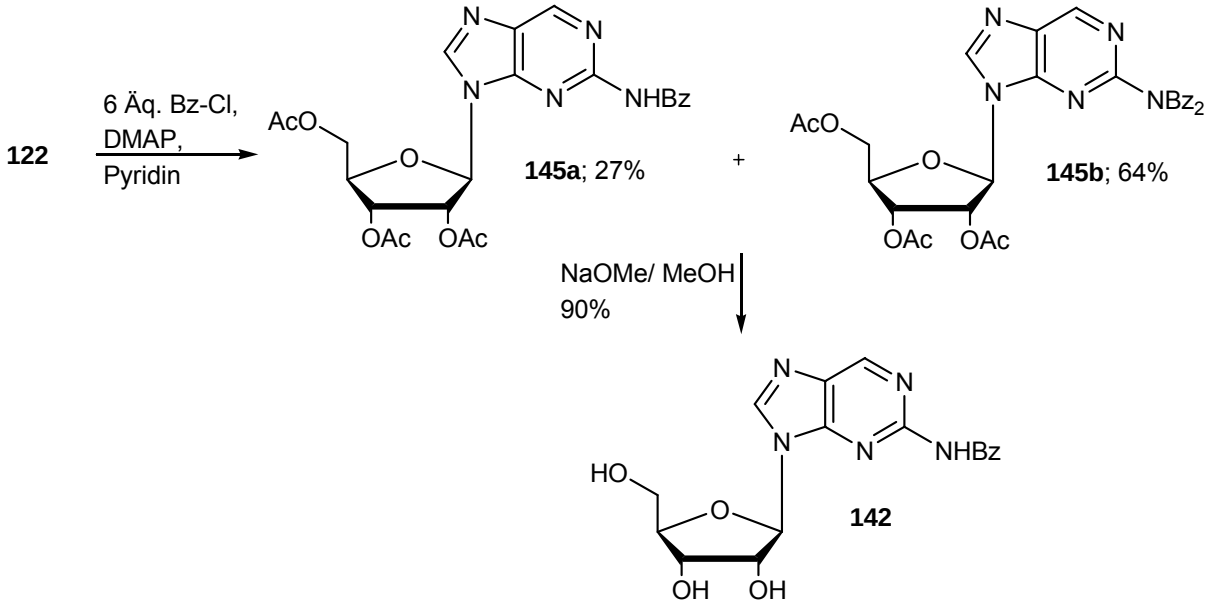


Abb. 106: Synthese von N^2-Bz-*iso*-A **143** ohne transiente Schützung

Das dreifach acetylierte *iso*-A **122** wurde in Pyridin mit DMAP als Aktivator mit einem Überschuss Benzoylchlorid benzoyliert. Trotz der sechsfachen Menge Bz-Cl wurde keine vollständige Doppelbenzoylierung der Aminogruppe erreicht. Nach Abbruch der Reaktion wurden die beiden Produkte **145a**,**b** am Chromatotron getrennt und zunächst separat für die nachfolgende Reaktion eingesetzt. Insgesamt verlief die Benzoylierungsreaktion mit einer Ausbeute von 91%. Die Entfernung der Schutzgruppen wurde unter Zemplèn-Bedingungen mit einer katalytischen Menge im Fall von **145a** oder einem leichten Überschuss im Falle des doppelt benzoylierten Eduktes **145b** durchgeführt. Dabei kristallisierte bei beiden Reaktionen das Produkt **142** in reiner Form in ca. 90%iger Ausbeute aus der Reaktionslösung aus und konnte durch Filtration abgetrennt werden. Auch eine Mischung von **145a**/**b** konnte bei Zugabe eines leichten Überschusses an Natriummethanolat auf diese Weise umgesetzt werden. Damit ist die Reaktionssequenz schnell durchzuführen und liefert **142** in hoher Reinheit, ganz im Gegensatz zu den quälenden Chromatographien bei der transienten Schützung. Die nachfolgenden Reaktionen wurden im Wesentlichen wie in Abb. 105 beschrieben durchgeführt. Die DMTr-Schützung wurde leicht verändert, da unter den angegebenen Bedingungen störende Nebenreaktionen an der 2´- und 3´-OH-Gruppe auftraten. Bei Durchführung der Reaktion in DMF mit *sym*-Collidin als Base und Silbernitrat als Aktivator wurden Ausbeuten um 65% bei wesentlich verkürzter Reaktionsdauer erhalten.[96] Bei der Umsetzung mit TBDMS-Chlorid zu **144** traten als wesentliche Nebenreaktionen die Umsetzung an 3´-OH und die doppelte Schützung auf. Die Trennung dieser Gemische erwies sich als schwierig. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen scheint wünschenswert, wurde aber nicht mehr durchgeführt. Insgesamt sollte die neue Syntheseroute geeignet sein, das Phosphoramidit **114** verlässlich darzustellen.

5.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Synthese und Charakterisierung intrinsisch fluoreszierender Verbindungen umfassend untersucht. Das eigentliche Ziel, der intrazelluläre Nachweis der Verbindungen mittels Fluoreszenzmikroskopie, konnte wegen des Anregungsfilters nicht erreicht werden. Dennoch konnten die Verbindungen zu unterschiedlichen analytischen Experimenten herangezogen werden. Mit einfachen U-Rohr-Versuchen ließ sich so der „lock-in“-Mechanismus

untersuchen, der ausführlich im letzten Kapitel diskutiert wurde. Wegen der Möglichkeit eines empfindlichen HPLC-Nachweises der Pronucleotide sollten Zellinkubations- und Aufschluss-Studien durchgeführt werden. Für die Fluoreszenzmikroskopie sollten andere intrinsisch fluoreszierende Nucleosidanaloga auf Basis der BCNAs (s. Abb. 104) verwendet werden.

6

Synthese und Charakterisierung von Nucleosiddiphosphat-Prodrugs

6.1 Erläuterung des Konzeptes

Es wurde im Kenntnisstand bereits erläutert, dass bei einigen Nucleosidanaloga nicht die Monophosphorylierung, sondern vielmehr die Diphosphorylierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Nucleosidanabolismus darstellt. Zu diesen Nucleosiden zählt AZT **1**. Weiterhin weisen pharmakokinetische Untersuchungen auf eine hämatopoietische Toxizität von AZTMP hin, die sich in Anämie und Neutropenie äußert.[6] Es wäre daher ausgesprochen wünschenswert, ein Prodrug-System in Händen zu halten, dass die Freisetzung von AZTMP zu umgehen vermag. Dies könnte sich in einer verminderten Cytotoxizität und einer erhöhten antiviralen Aktivität äußern. Zudem wurde bereits erläutert, dass Pronucleotidsysteme in der Lage sein können, antiviral inaktive Nucleosidanaloga in potente antivirale Verbindungen umzuwandeln.[37] Da dies letztlich aus der intrazellulären Freisetzung der Nucleotide resultiert, wodurch ein Enzym-Bypass erreicht wird, scheint es nicht abwegig, dass antiviral inaktive Nucleosidanaloga und Nucleotid-Prodrugs durch Anwendung eines Nucleosiddiphosphat-(NDP)-Prodrug-Konzeptes ebenso in aktive Verbindungen verwandelt werden könnten. Weiterhin ist oftmals über die intrazellulären Umwandlungen, welche Nucleosidanaloga erfahren, wenig bekannt. Ein System, welches intrazellulär effektiv die entsprechenden NDP oder gar NTP freizusetzen vermag, wäre also auch vom analytischen Gesichtspunkt zur rationalen Entwicklung von antiviral aktiven Verbindungen höchst bedeutsam. Ein solches Prodrug-Konzept sollte einige Anforderungen erfüllen. Die Freisetzung des NDP muss selektiv unter Abspaltung nicht toxischer Masken erfolgen. Die Verbindungen sollen hinreichend lipophil sein, um die Zellmembran durch passive Diffusion zu überwinden. Weiterhin wäre es wünschenswert, dass die Verbindung intrazellulär beschleunigt gespalten wird, um einen „lock-in“-Effekt zu erreichen und extrazellulär eine hohe Stabilität aufweist. Wegen all dieser Anforderungen ist es bislang nicht gelungen, ein erfolgreiches NDP-Prodrug-Konzept zu etablieren. Dies liegt wohl unter anderem daran, dass die Phosphorsäureanhydrid-Bindung bei vollständiger Kompensation der negativen Ladungen destabilisiert wird, so dass ein ungewollter Bindungsbruch eintritt. Daher war zunächst zu klären, auf welche Weise die Phosphate maskiert werden könnten und ob eine Maskierung aller Positionen uberhaupt möglich ist. Die folgende Abbildung zeigt die potentiellen Maskierungsstellen einer Diphosphateinheit.

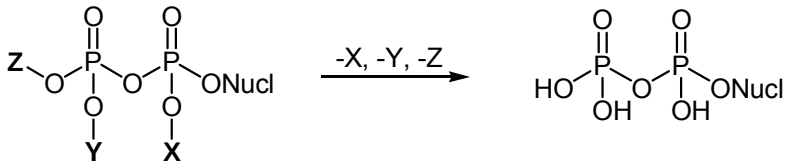


Abb. 107: Maskierung eines Nucleosiddiphosphates

Der nächste Abschnitt beschäftigt sich nun mit der Synthese X-Y-Z-maskierter Nucleosiddiphosphate (NDP).

6.2 Entwicklung eines NDP-Prodrugs auf Basis des *cyclo*Sal-Systems

Es war naheliegend, sich zunächst mit der Anwendung des *cyclo*Sal-Systems auf NDP zu befassen. Dabei würde nur eine Blockierung des β-Phosphatrestes an den Positionen Y und Z erfolgen (s. Abb. 107). Aufgrund der strukturellen Besonderheit würden auf diese Weise Diastereomere erhalten werden. Die Position X (s. Abb. 107) bliebe ungeschützt und würde vermutlich deprotoniert vorliegen. Daher könnte es notwendig sein, die Polarität der Verbindung durch Modifikationen R der *cyclo*Sal-Einheit zu verringern (s. Abb. 108).

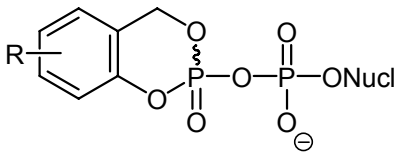


Abb. 108: Struktur von *cyclo*Sal-NDP

Bei der Anwendung des *cyclo*Sal-Systems auf NDP müssen hinsichtlich des Hydrolysemechanismus einige Besonderheiten bedacht werden. Bei *cyclo*Sal-NMP verläuft die chemische Hydrolyse selektiv, da die Benzyl-, Phenyl- und Alkylphosphatesterbindungen deutlich verschiedene Reaktivitäten aufweisen. Die niedrigste Austrittstendenz bei nucleophiler Substitution am Phosphoratom weist dabei die Alkylphosphatesterbindung auf, die aber im Fall des *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs gegen eine Phosphorsäureanhydridbindung ausgetauscht ist. Daraus resultiert eine konkurrierende Spaltung des Phenylphosphatesters gegenüber der Anhydridbindung. Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die möglichen Spaltungsmechanismen.

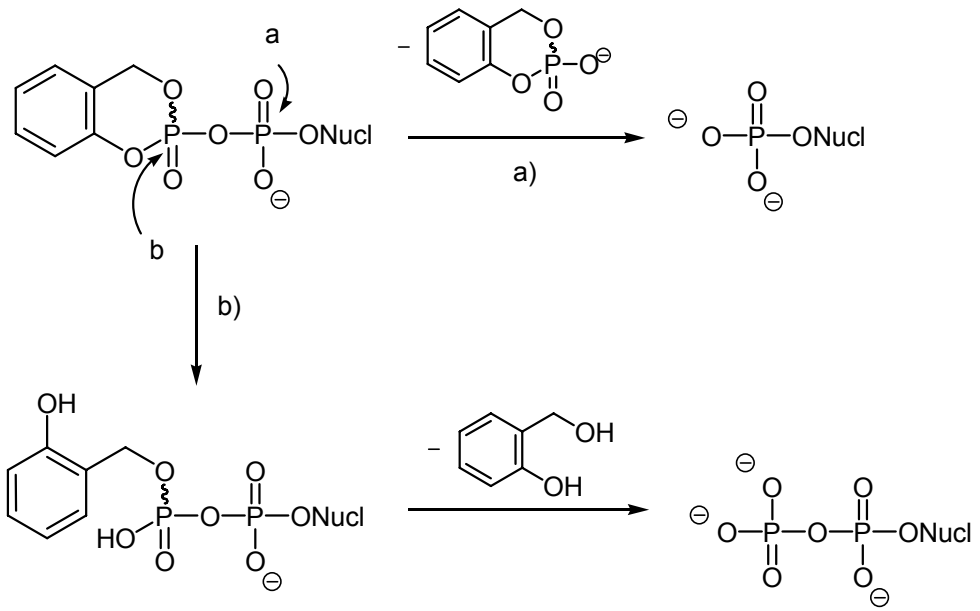
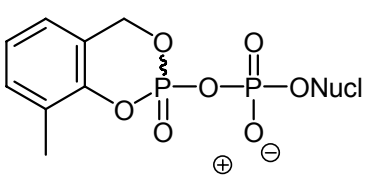


Abb. 109: Mögliche Hydrolysewege bei der Spaltung von *cyclo*Sal-NDP

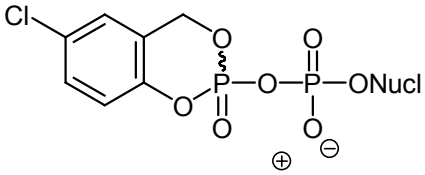
Es ist nun ziemlich leicht ersichtlich, dass über den oberen Weg zwar eine biologisch aktive Verbindung freigesetzt, das Ziel aber deutlich verfehlt würde. Auf den nächsten Seiten wird nun gezeigt werden, dass beide Wege durchlaufen werden und dass eine Beeinflussung zugunsten des NDPs möglich ist.

6.2.1 Zielverbindungen und Synthesestrategie

Um den Einfluss des Substitutionsmusters der *cyclo*Sal-Maske beurteilen zu können, sollten je ein donor- und akzeptorsubstituiertes *cyclo*Sal-NDP dargestellt und hinsichtlich ihres Hydrolyseverhaltens untersucht werden. Zusätzlich zu den verschiedenen Masken sollte auch das Nucleosid variiert werden, wobei die Wahl auf AZT **1** und d4T **3** fiel. Die Verwendung von AZT **1** lässt sich dadurch begründen, dass hier sogleich die Hoffnung bestand, durch einen Thymidylat-Kinase-Bypass die Aktivität des Wirkstoffes zu erhöhen. Da bei d4T **3** nur die erste Phosphorylierung durch die Thymidin-Kinase gehemmt ist, scheint es zunächst nicht sinnvoll, dieses Nucleosid zu verwenden. Diese Wahl begründete sich darauf, dass in unserer Arbeitsgruppe auf ein größeres Reservoir d4T **3** zurückgegriffen werden konnte, so dass es als Edukt zu Übungszwecken verwendet werden konnte. Schließlich musste zunächst eine geeignete Syntheseroute entwickelt werden und zu diesem Zweck schien d4T **3** prädestiniert. Aus diesen Überlegungen ergaben sich folgende Zielverbindungen:



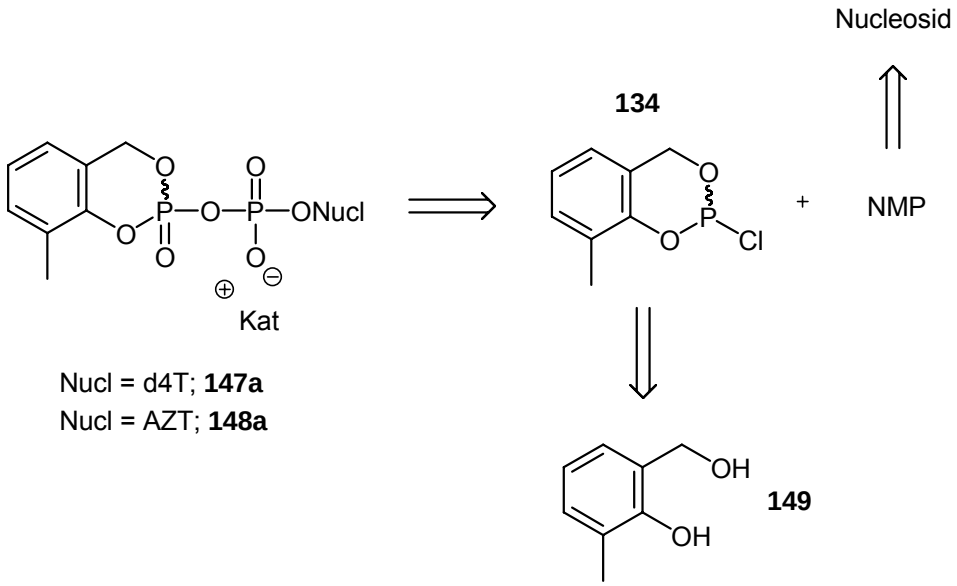
Nucl = d4T; **147a**
Nucl = AZT; **148a**



Nucl = d4T **3**; **147b**
Nucl = AZT **1**; **148b**

Abb. 110: Zielverbindungen

Es sollte zunächst versucht werden, die Synthese der Verbindungen **147**/**148** möglichst nahe an den Kupplungsbedingungen für *cyclo*Sal-NMP zu halten, da auf diesem Feld beträchtliche Erfahrungen vorlagen. Die retrosynthetische Analyse ergibt unter dieser Bedingung folgendes Bild:



Nucl = d4T; **147a**
Nucl = AZT; **148a**

Abb. 111: Retrosynthetische Analyse von **147a** und **148a**

Es musste das Chlorphosphit **134** aus dem Salicylalkohol **149** dargestellt werden. **134** sollte dann mit dem entsprechenden Nucleosidmonophosphat gekuppelt und *in situ* oxidiert werden. Die Nucleosidmonophosphate müssen aus den Nucleosiden dargestellt werden. An dieser Stelle soll schon einmal erwähnt werden, dass mit unterschiedlichen Gegenionen Kat^+ betreffend Synthese und Isolierung gearbeitet werden muss. Um die Kupplungsreaktion zu den Zielverbindungen **147** und **148** untersuchen und verstehen zu können, wurde davon ausgegangen, dass größere Mengen der Nucleosidmonophosphate benötigt werden würden. Daher musste zunächst eine geeignete Methode gefunden werden, welche zur Synthese größerer

Mengen NMP führt. Von den zahlreichen Methoden zur Darstellung von Nucleosidmonophosphaten soll später nur eine einzige detailliert diskutiert werden. *Sowa* und *Ouchi* beschrieben die Umsetzung verschiedener Nucleoside mit Phosphorylchlorid, Pyridin und Wasser in Acetonitril.[107] Diese Synthese erwies sich als ausgesprochen geeignet zur Darstellung größerer Mengen an NMP.

6.2.2 Synthese und Charakterisierung von *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs

Es soll nun zunächst auf die Synthese der Edukte für die Kupplungsreaktion eingegangen werden. 3-Methylsaligenylchlorphosphit **134** wurde nach einer bekannten Synthese ausgehend von 3-Methylsalicylsäure dargestellt.

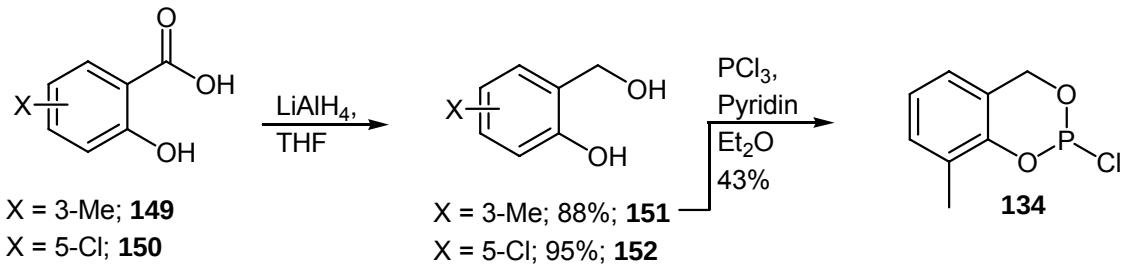


Abb. 112: Synthese der Salicylalkohole **149**/**150** und des Chlorphosphits **134**

Die Reduktion der Säuren **149** und **150** mit Lithiumaluminiumhydrid verlief problemlos. Die abschließende Reinigung der Salicylalkohole **151** und **152** konnte durch Kristallisation aus Petrolether erreicht werden. 3-Methylsalicylalkohol **151** wurde dann nach der Standardmethode in das Chlorphosphit **134** übergeführt. Um einen Einfluss von Verunreinigungen auf die Kupplungsreaktion ausschließen zu können, wurde **134** mittels Kugelrohrdestillation gereinigt, ein Vorgehen, das sich in der niedrigen Ausbeute von 43% niederschlug. Auf die Synthese eines entsprechenden Chlorphosphits ausgehend von 5-Chlorsalicylalkohol **152** wurde aufgrund später zu nennender Erkenntnisse verzichtet.

Als weiterer Synthesebaustein wurde AZT **1** benötigt. Dies konnte zunächst durch Extraktion von AZT-haltigen Tabletten mit heißem Ethylacetat gewonnen werden, später musste jedoch auch auf eine Synthese zurückgegriffen werden, deren Details sich im Experimentalteil finden.[108]

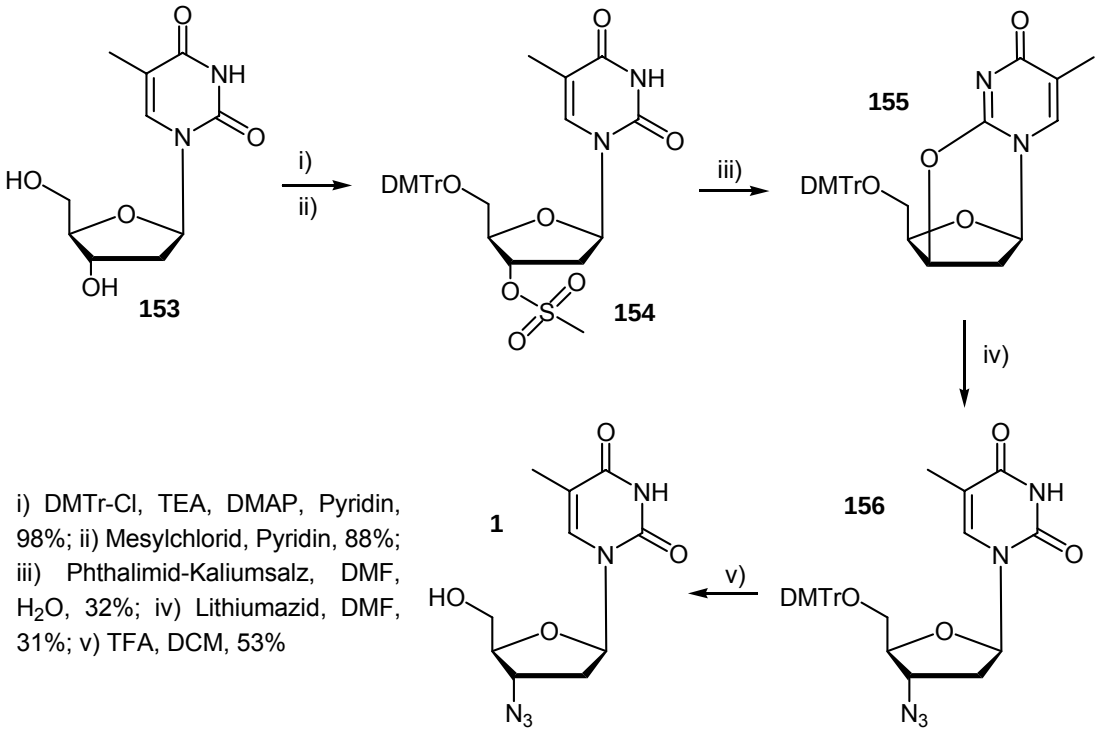


Abb. 113: Reaktionssequenz zur Synthese von AZT **1**

Für die Synthesen von d4TMP **159a** und AZTMP **160a** wurde zunächst Phosphorylchlorid mit Pyridin und Wasser in einem bestimmten Verhältnis zum Tetrachlorpyrophosphat **157** umgesetzt, wobei unterstellt wird, dass Chloridionen und Pyridin einem dynamischen Austausch unterliegen.[107] Nach der Zugabe des Nucleosids bildete dies zunächst das Pyrophosphat-Addukt **158**, welches nachfolgend durch Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat zum entsprechenden NMP zersetzt wurde.

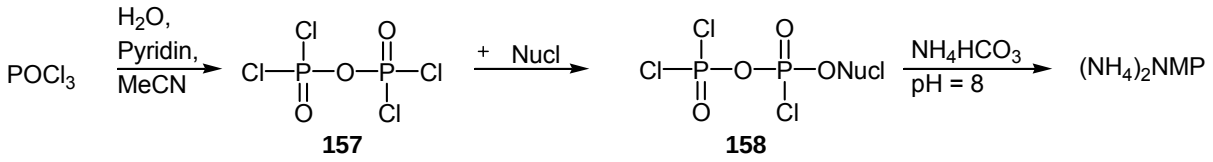


Abb. 113: Synthese von NMP nach *Sowa* und *Ouchi*

Der Einfachheit halber sind in der Reaktionsgleichung zwei Ammonium-Gegenionen zum NMP angegeben. Das stimmt so eigentlich nicht, die Anzahl der Gegenionen ist in diesem Fall nicht genau bekannt. Da die NMP durch Gefriertrocknung erhalten wurden, muss von einem anteiligen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der

Phosphatgruppe ausgegangen werden. Um einen Anhaltspunkt für die genaue Anzahl an Gegenionen zu erhalten, wurde ein zweifach protoniertes NMP durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert und dann lyophillisiert. Aus den ^{1}H-NMR-Integralen ergaben sich im Durchschnitt 1.6 Triethylammonium-Gegenionen pro NMP, der Rest sollten Protonen sein. Dies wurde bei der Berechnung der Ausbeuten nicht berücksichtigt, da der Einfluss verhältnismäßig klein ist. Nachfolgend sind die synthetisierten Mengen d4TMP **159a** und AZTMP **160a** und die Ausbeuten der Reaktionen angegeben.

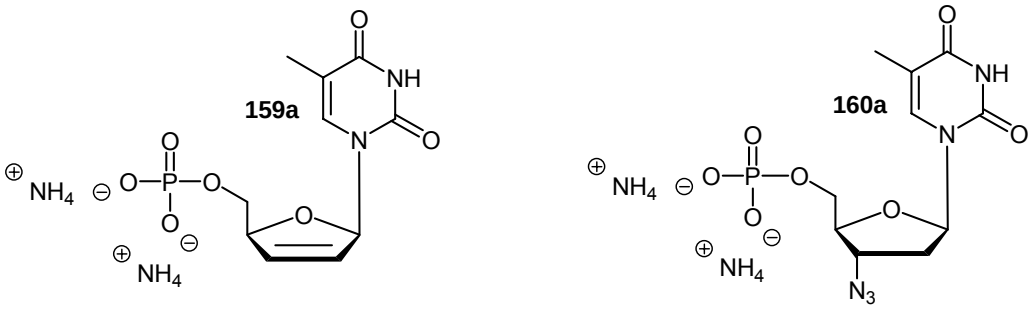


Abb. 114: Isolierte Mengen d4TMP **159a** und AZTMP **160a**

Bei kleineren Ansätzen wurde auch für AZT **1** ein quantitativer Umsatz erreicht. Die eigentliche Schwierigkeit bei der Reaktion bestand in der chromatographischen Reinigung. Hierzu eignete sich Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel mit Wasser als Laufmittel. Als einzige Verunreinigung fielen größere Mengen Phosphat an, da mit einem Überschuss an Phosphorylchlorid gearbeitet werden musste. Dies abzutrennen gestaltete sich gerade bei größeren Mengen als ausgesprochen schwierig, da Phosphatsalze in Dünnschichtchromatogrammen nicht besonders gut nachgewiesen werden können. Bei Ansatzgrößen im Gramm-Maßstab musste die Chromatographie bis zu dreimal durchgeführt werden, ein sehr langwieriger Prozess, da nach jeder Chromatographie eine Gefriertrocknung zur Entfernung von Wasser nötig war. Im Verlaufe der Laborarbeiten wurde auf einen Nachweis von Phosphat durch Zugabe je eines Tropfens der einzelnen Fraktionen zu einer 1 M Bariumacetat-Lösung zurückgegriffen. Dabei fiel Bariumphosphat als unlöslicher Niederschlag aus, die Nucleotide blieben hingegen gelöst. Dies führte zu der Annahme, dass die Phosphatverunreinigungen durch Fällung abgetrennt werden könnten. Der Niederschlag war aber so feinkristallin, dass er nicht durch Filtration entfernt werden konnte. Eine Zentrifugation wurde nicht mehr durchgeführt, dennoch

sollte die Abtrennung von Phosphat durch Kristallisation in zukünftigen Arbeiten weiter verfolgt werden, da sie eine erhebliche Vereinfachung der Reinigung bedeuten würde.

Um die Kupplungsreaktionen zu den Zielverbindungen effektiv durchführen zu können, mussten die NMP in eine in organischen Lösungsmitteln lösliche Form gebracht werden. Gleichzeitig sollte auf diese Weise die Nucleophilie der Verbindungen ansteigen. Generell kann die Erhöhung der Löslichkeit durch Kationenaustausch mit lipophilen Gegenionen erfolgen. Als solche bieten sich z.B. Tetra-*n*-butylammonium- oder Tetra-*n*-octylammonium-Ionen an. Da die Verwendung von Tetra-*n*-butylammonium-Ionen zu einer hinreichenden Löslichkeit führte, wurden alle nachfolgenden Experimente mit ihnen durchgeführt. Der Ionenaustausch an den NMP sollte zunächst -wenig überraschend- an einer Ionenaustauschsäule DOWEX 50WX8 (Tetra-*n*-butylammonium-Form) durchgeführt werden. Sehr überraschend war allerdings, dass nicht einmal ansatzweise ein Austausch beobachtet werden konnte. Dies könnte auf die schlechte Wasserlöslichkeit der Tetra-*n*-butylammonium-NMP zurückzuführen sein. Da Wasser als Elutionsmittel verwendet wurde, war ein Austausch eventuell nicht begünstigt. Daher wurden die Versuche mit Acetonitril/Wasser-Gemischen wiederholt, nun aber war die schlechte Löslichkeit der Ammonium-NMP in Acetonitril hinderlich. Wegen dieser ungünstigen Umstände wurde auf ein indirektes Umsalzen zurückgegriffen: Zunächst wurden die Ammonium-NMP an einer protonierten Ionenaustauschsäule in die H^+-Form gebracht und das wässrige Eluat mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid-Lösung bis zum Neutralpunkt titriert und lyophillisiert. Später wurden dann auch zwei Äquivalente der Lösung eingewogen und direkt zum NMP gegeben. Dieses Vorgehen erwies sich als genauer, verglichen mit der Titration. Es wurde dennoch stets aus den ^{1}H-NMR-Spektren der Verbindungen die genaue Anzahl der Kationen bestimmt, um die stöchiometrischen Berechnungen exakt durchführen zu können. Der Austausch der Kationen konnte durch die oben beschriebenen Durchführungen in sehr guten Ausbeuten erreicht werden, zumindest für die Darstellung von $[N(Bu)_4]_2$d4TMP **159b** und $[N(Bu)_4]_2$AZTMP **160b**.

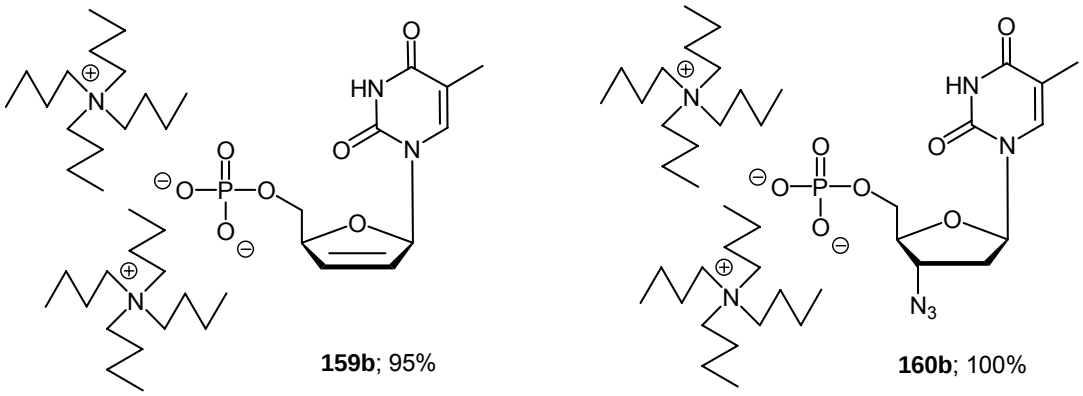


Abb. 115: Darstellung von **159b** und **160b** durch Protonierung und Titration

Damit waren alle benötigten Edukte zur Darstellung der Zielverbindungen vorhanden. Es begann nun eine lange Versuchsreihe, bei der trotz steigender Anzahl der Experimente nur geringe Erfolge erzielt wurden. Andererseits konnten in einem frühen ^{31}P-NMR-Spektrum die vermeintlichen Produktsignale, neben zahlreichen weiteren Signalen, identifiziert werden.

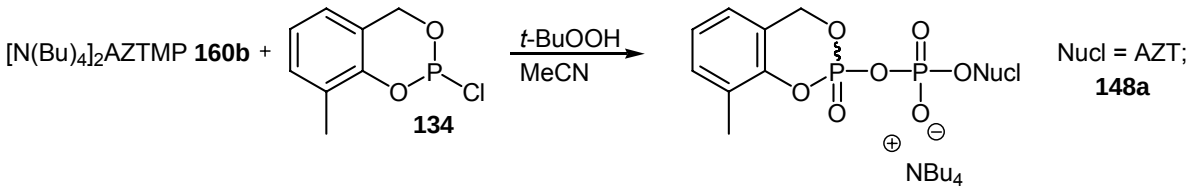


Abb. 116: Versuch der Synthese von **148a** mit der Chlorphosphitmethode

Die Synthese wurde hinsichtlich etlicher Parameter untersucht. Sowohl Lösungsmittel, Reaktionstemperatur und Äquivalentmengen, sowie das Oxidationsmittel wurden variiert. Die Verbindungen wurden allerdings noch nicht chromatographiert, da zunächst anhand der ^{31}P-NMR-Spektren der Anteil an Produkt **148a** erhöht werden sollte. Analoge Experimente wurden zur Darstellung des d4T-Derivates **147a** durchgeführt. Ein wesentlicher Fortschritt konnte erzielt werden, nachdem die Hauptsignale im ^{31}P-NMR-Spektrum einem Nebenprodukt **161** und dem Edukt **160b** zugeordnet werden konnten.

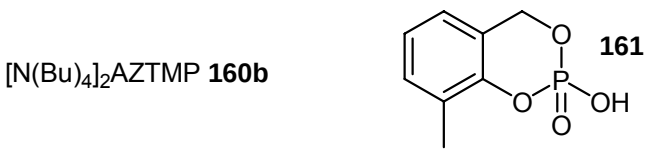


Abb. 117: Hauptbestandteile der lyophillisierten Reaktionsgemische

Diesem Ergebnis konnte nun entnommen werden, dass das hauptsächliche Problem bei der Darstellung der Zielverbindungen in dem hohen Kristallwasseranteil der ausgesprochen hygroskopischen Edukte **159b** und **160b** lag. Obwohl die Verbindungen mehrfach mit Pyridin coevaporiert worden waren, schien dies Prozedere nicht für eine hinreichende Trocknung geeignet. Die Edukte wurden daher zwei Stunden lang in Acetonitril über Molsieb (0.3 nm) gelagert, dann in den Reaktionskolben überführt, mehrfach coevaporiert und die Reaktion in Gegenwart von Molekularsieb durchgeführt. Auf diese Weise gelang es erstmals, das Produkt **148a** in nennenswerten Mengen darzustellen. Nichtsdestoweniger waren noch beträchtliche Mengen an Verunreinigungen im ^{31}P-NMR-Spektrum sichtbar. Die folgende Abbildung zeigt den Ausschnitt aus dem Spektrum, in welchem die Produktsignale erschienen.

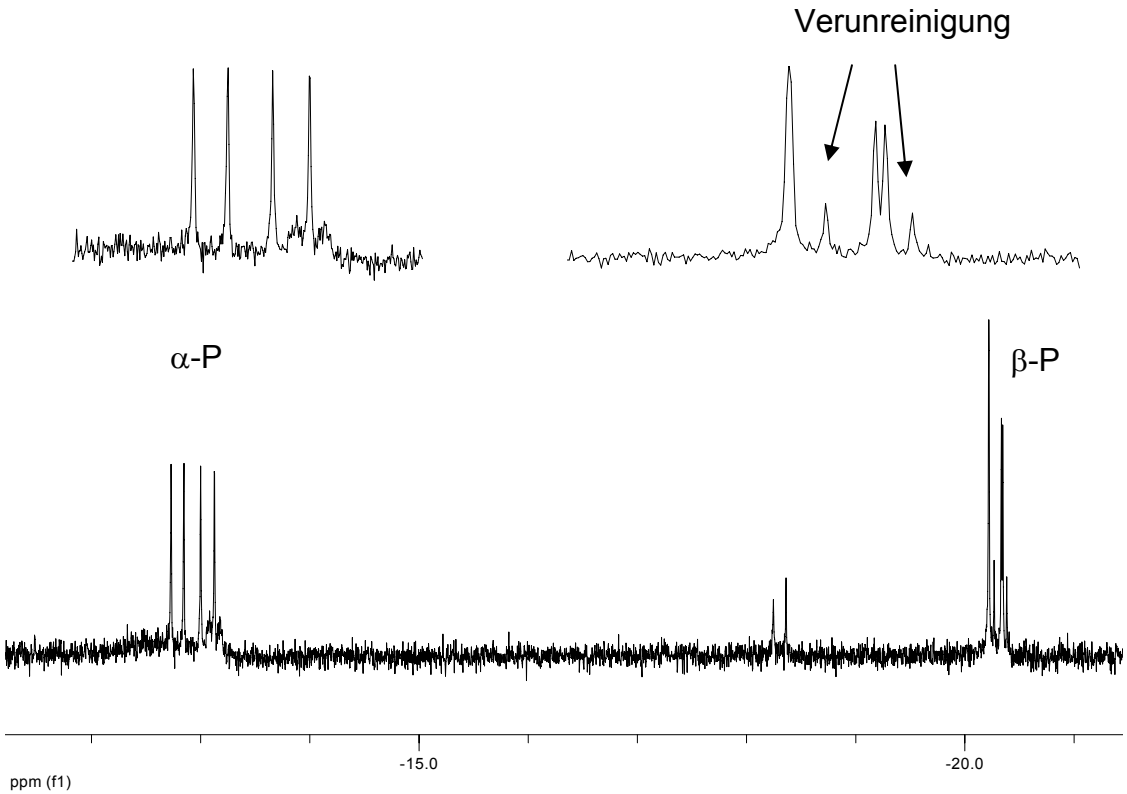


Abb. 118: ^{31}P-NMR-Spektrum (Ausschnitt, ^{1}H-entkoppelt) von **148a**

Für jedes Phosphoratom der Verbindung wurde ein Signal erwartet, das wegen der P-P-Kopplung zu einem Dublett aufspaltet. Da Diastereomere vorlagen, sollte ein doppelter Signalsatz erhalten werden. Aufgrund des Phenolesters am β-P-Atom wurde zudem eine Hochfeldverschiebung des einen Signalsatzes um etwa 10 ppm erwartet. Im Fall des β-P-Atoms konnte eine anteilige Überlagerung der Signale beobachtet werden.

Da es nun möglich war, isolierbare Mengen des Prodrugs **148a** zu synthetisieren, sollte eine Reinigung angestrebt werden. Es wurden folgende Vorgehensweisen erprobt:

1. Umkehrphasenchromatographie mit Wasser/Acetonitril-Gradienten (RP-18, RP-NH_2)
2. Präparative HPLC (RP-18)
3. Präparative Dünnschichtchromatographie
4. Silicagel-Chromatographie (Säule, Chromatotron)
5. Kristallisation
6. Größenausschlusschromatographie (Sephadex-Phasen)

Trotz des großen Aufwandes blieb vermehrte Erfahrung der einzige Nutzen aus diesen Versuchen. Die Verbindungen **147a** und **148a** konnten nicht nennenswert gereinigt werden, was unter anderem auf deren Labilität in wässrigem Medium zurückzuführen sein könnte. Obwohl die Verbindungen in Dünnschicht-chromatogrammen einen Spot ergaben, zersetzten sie sich bei dem Versuch präparativer Trennungen mit organischen Lösungsmitteln an Silicagel. Da aufgrund der verbesserten Synthese allerdings hinreichend reine ^{31}P-NMR-Spektren erhalten wurden und die Nebenprodukte im Wesentlichen bekannt waren, konnte eine ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse in PBS bei pH = 7.3 durchgeführt werden, die zu interpretierbaren Ergebnissen führte. Im oberen ^{31}P-NMR-Spektrum ist der Beginn der Hydrolyse abgebildet. Man erkennt nun die Signalsätze der Verbindung **148a** sowie die Verunreinigungen 3-Methyl-*cyclo*Sal-Phosphat **161** und geringe Mengen des Eduktes AZTMP **160b**. Die weiteren Verunreinigungen konnten nicht zugeordnet werden. Das untere Spektrum zeigt den Zustand der Hydrolyse zum Endpunkt (nach 13 Tagen). Es wird deutlich, dass die Menge an 3-Methyl-*cyclo*Sal-Phosphat **161** und AZTMP **160b** zugenommen hat. Diese beiden Verbindungen bilden den wesentlichen Anteil der Hydrolyseprodukte, d.h. es muss zu einem Bruch der Phosphorsäureanhydrid-Bindung gekommen sein, woraus sich wiederum ableiten lässt, dass Phosphat eine bessere Austrittsgruppe als Phenolat (mit diesem Substitutionsmuster der *cyclo*Sal-Maske) ist.

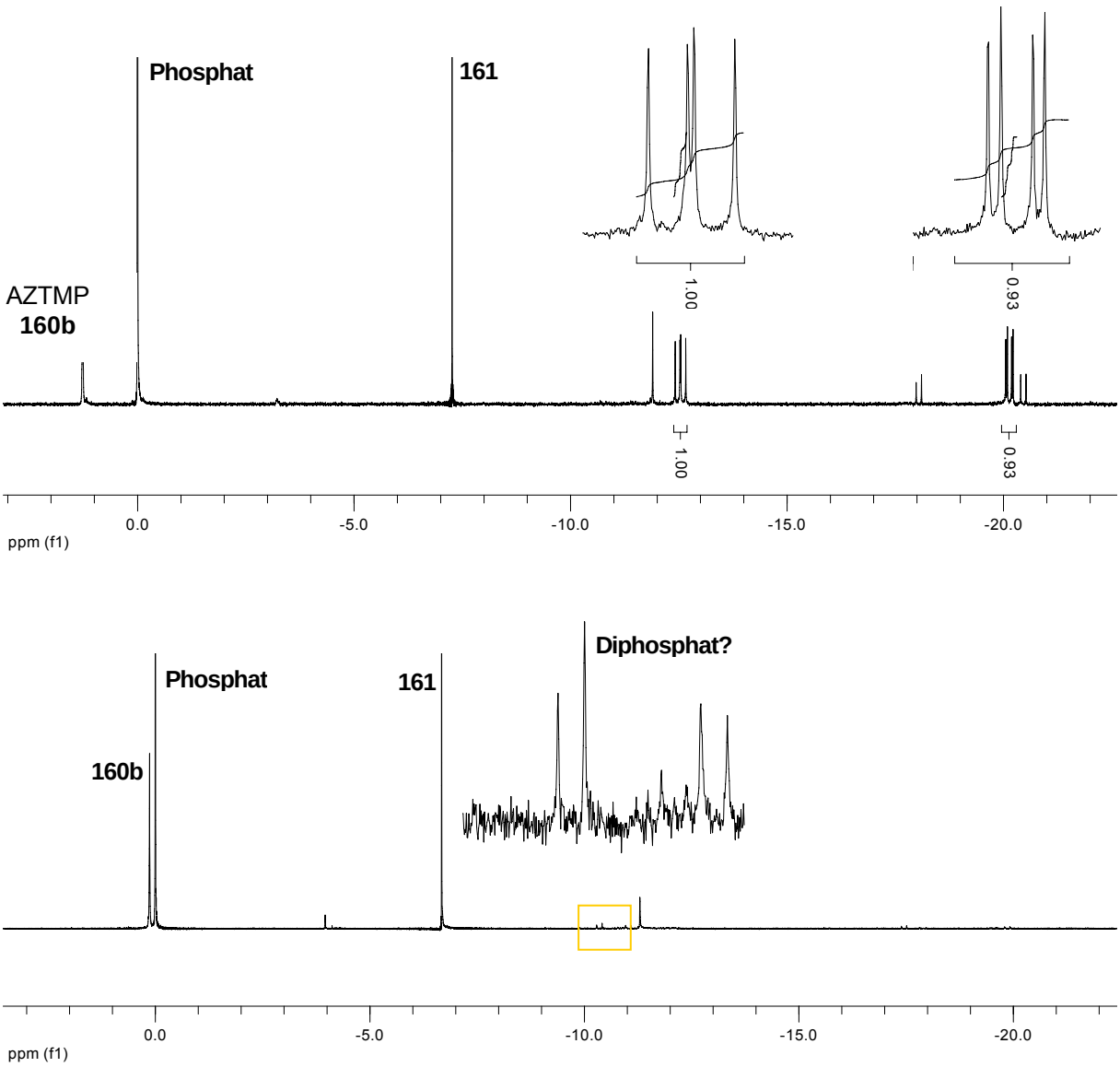


Abb. 119: ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung von **148a** in PBS pH = 7.3 bei t = 0 und t = 13 d

Der hervorgehobene Bereich gibt Anlass zu der Annahme, dass auch geringe Mengen an AZTDP entstanden sein könnten. Eine Integration ergab, dass dies maximal etwa 1% AZTDP gegenüber 99% AZTMP wären. Es wurde daher im Weiteren darauf verzichtet, *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs mit der 3-Methyl-Maske zu synthetisieren, da auf diese Weise eine effiziente Freisetzung von NDP nicht gelingen kann. Man ist allerdings bei dem *cyclo*Sal-System durch Variation des Substitutionsmusters und insbesondere der Art der Substitution in der Lage, die Stabilität der Phenylphosphatester-Bindung gezielt zu beeinflussen. Bei den *cyclo*Sal-NMP äußert sich die Labilisierung dieser Bindung in einer Verkürzung der Hydrolysehalbwertszeit. Es galt also nun durch Akzeptorsubstitution die Phenylphosphatester-Bindung zu labilisieren. Dann sollte untersucht werden, ob dies

zu einer vermehrten Freisetzung von NDP führen würde. Zuvor sei noch angemerkt, dass bei den zahlreichen Experimenten zur Darstellung von **148a** über die P(III)-Methode mit nachfolgender Oxidation die ^{31}P-NMR-Spektren darauf hingewiesen hatten, dass durch die Oxidation vermehrt Nebenprodukte entstanden waren. Es sollte daher versucht werden, die Reaktion mit Phosphorchloridaten durchzuführen. Die direkte Synthese solcher Verbindungen aus den Salicylalkoholen war unbekannt, konnte aber in dieser Arbeit entwickelt werden. Die Synthesen der einzelnen Verbindungen sind im Anschluss an dieses Kapitel beschrieben (s. 6.2.3). Wie in Abb. 110 gezeigt, sollte als Maske 5-Chlorsalicylalkohol zum Einsatz kommen, um zu den Verbindungen **147b** und **148b** zu gelangen. Zunächst wurde die Reaktion allerdings nur zur Darstellung von **148b** verwendet.

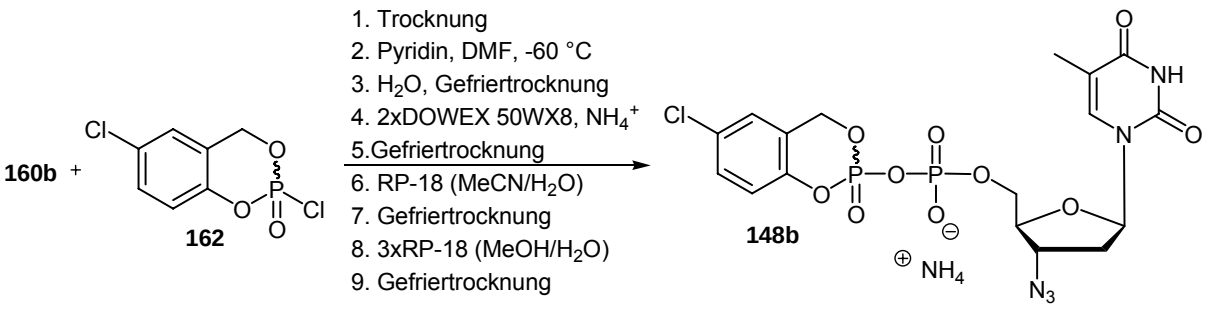
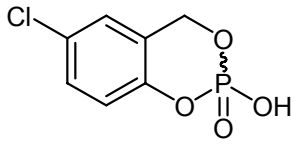


Abb. 120: Synthese und Isolierung der Zielverbindung **148b**

Dieses Syntheseprotokoll gibt recht genau das bislang erfolgreichste Vorgehen zur Darstellung und Isolierung von *cyclo*Sal-NDP an. Die Durchführung ist im Folgenden etwas genauer beschrieben, um eine Vorstellung von dem damit verbundenen Zeitaufwand zu vermitteln. Zunächst musste das Nucleotid [N(*n*-Bu)$_4$]$_2$AZTMP **160b** über Molekularsieb in Acetonitril getrocknet werden. Das Molekularsieb wurde nach 2 h entfernt und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach mehrfachem Coevaporieren mit Pyridin wurde der Rückstand in DMF aufgenommen und frisches Molekularsieb zugegeben. Es wurde DMF verwendet, da die Reaktionslösung auf -60 °C gekühlt werden musste. Der Lösung wurde Pyridin als Aktivator und Base zugesetzt. Nun erfolgte die langsame Zugabe von dem Phosphorchloridat **162**, gelöst in DMF. Nach 3 h Reaktionsdauer wurden die Lösungsmittel entfernt und der Rückstand lyophillisiert, um alle flüchtigen Bestandteile vollständig abzutrennen. Da bekannt war, dass bei RP-18 Chromatographie Tetra-*n*-butylammoniumionen die Trennung stark erschweren, sollten zunächst Ammonium-Ionen eingeführt werden. Dazu wurde

die Verbindung über Dowex 50WX8 (NH_4^+-Form) eluiert und anschließend lyophillisiert. Die Elution wurde einigermaßen rasch durchgeführt, da die Halbwertszeit der Verbindung durch den Chlorsubstituenten erniedrigt war und in wässrigem Medium gearbeitet wurde. Die ^{1}H-NMR-spektroskopische Analyse zeigte einen unvollständigen Austausch an, weswegen der Vorgang wiederholt werden musste. Anschließend wurde das Gemisch an einer RP-18 Phase zunächst mit reinem Wasser, dann mit Wasser/Acetonitril 1:1 eluiert. Bei der Verwendung von reinem Wasser konnten zunächst unverbrauchtes Edukt **160b** und 5-Chlor-*cyclo*Sal-phosphat **163** abgetrennt werden.



163

Abb. 121: Nebenprodukt **163** der Reaktion durch Reaktion von Chloridat **162** mit Wasser

Bei RP-18 Chromatographie handelt es sich um ein relativ langwieriges Verfahren. Da auch die Analyse der einzelnen Fraktionen durch RP-18-Dünnschichtchromatographie erfolgte, wurden die Fraktionen in eisgekühlten Reagenzgläsern aufbewahrt, um die Hydrolyse zu verlangsamen. Nach Vereinigung der produkthaltigen Fraktionen musste erneut lyophillisiert werden. Anschließende dreifache RP-18 Chromatographie, nun mit Wasser/Methanol 1:1 und dementsprechend dreifache Gefriertrocknung lieferte das Produkt **148b** in bislang unerreichter Reinheit. Das ^{31}P-NMR-Spektrum zeigte nur noch wenige Verunreinigungen, das ^{1}H-NMR-Spektrum wies allerdings noch Nebenprodukte auf, so dass keine Ausbeute angegeben werden kann. Sie scheint sich aber im Bereich von 25% zu bewegen. Wegen des komplizierten Vorgehens und der Notwendigkeit der NMR-spektroskopischen Analyse nach jedem Einzelschritt, verstrichen von der Synthese bis zur maximalen Anreicherung etwa 2 Wochen. Dabei sei auch noch angemerkt, dass sich das Produkt **148b** in DMSO-d_6 über Nacht vollständig zersetzte. Dennoch konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs synthetisiert und isoliert werden können. In dem ESI$^-$-Massenspektrum konnte **148b** eindeutig nachgewiesen werden. Zudem konnte die Hauptverunreinigung **163** (etwa 10%; s. Abb. 122) aus dem Massenspektrum und dem ^{31}P-NMR-Spektrum (δ= -10.1 ppm) abgeleitet werden.

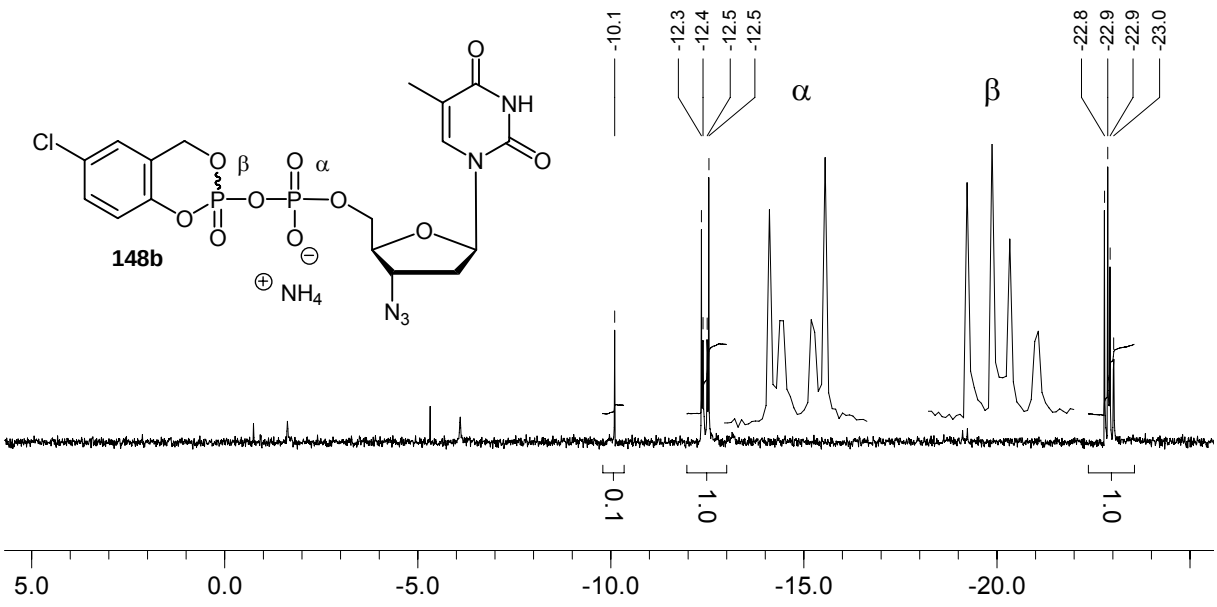
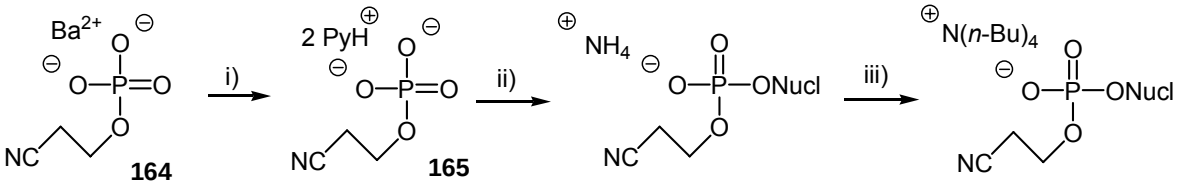


Abb. 122: Ausschnitt aus dem ^{31}P-NMR-Spektrum (^{1}H-entkoppelt) von **148b** in DMSO-d_6

Auf ein Faktum soll noch die Aufmerksamkeit gelenkt werden: Ganz offensichtlich enthielt die Verbindung **148b** kein AZTMP **160b** ($\delta \approx 0.5$ ppm) als Verunreinigung. Damit konnte eine Verfälschung der Ergebnisse bei der Ermittlung der antiviralen Daten ausgeschlossen werden.

Wegen der beträchtlichen Probleme bei der Umkehrphasenchromatographie und überhaupt bei der Reinigung der *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs, wurde noch eine weitere Synthese untersucht, bei der auch das α-Phosphat geschützt vorliegen sollte, um eine normale Chromatographie an Silicagel zu ermöglichen. Dazu wurden die nachfolgend gezeigten Verbindungen **166b** und **167b** dargestellt.



i) Dowex 50WX8 (H^+), Pyridin, 100%; ii) Nucl = d4T **3**, AZT **1**, DCC, Dowex 50WX8 (NH_4^+); iii) Dowex 50WX8 (H^+), N(*n*-Bu)$_4$OH

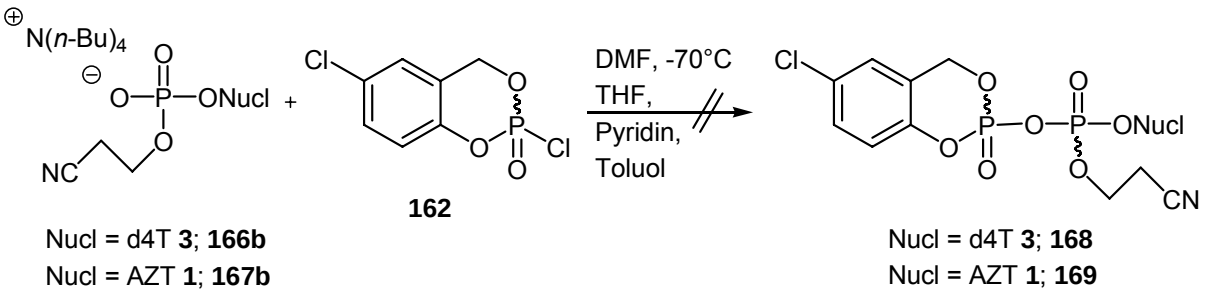
Nucl = d4T; **166a**; 44%
Nucl = AZT; **167a**; 69%

Nucl = d4T **3**; **166b**; 87%
Nucl = AZT **1**; **167b**; 85%

Abb. 123: Synthese der Edukte **166b** und **167b**

Aus dem kommerziell erhältlichen Barium-(β-cyanoethylphosphat) **164** wurde zunächst eine Stammlösung des Pyridiniumsalzes **165** in Pyridin/Wasser durch

Ionenaustausch hergestellt. Dieser Lösung wurden die für die Reaktionen benötigten Äquivalentmengen entnommen und durch mehrfaches Coevaporieren getrocknet.[109] Die entsprechenden Nucleoside d4T **3** und AZT **1** wurden nun zugegeben und die Kupplung durch Zugabe von DCC gestartet.[110] Dabei konnten beide α-geschützten Nucleotide **166a** und **167a** in guten Ausbeuten für die erste Durchführung der Synthese erhalten werden (44% bzw. 69%). Erneut wurden nun durch Protonierung und anschließende Titration die Tetra-*n*-butylammoniumsalze **166b** und **167b** zur Verbesserung der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln dargestellt. Nebenbei bemerkt ist diese Methode natürlich eine alternative Darstellungsmöglichkeit von Nucleosidmonophosphaten. Für größere Ansätze scheint sie aber wegen der schwierigen Abtrennung von Dicyclohexylharnstoff ungeeignet. Es wurde nun die nachfolgende Kupplungsreaktion zunächst an dem d4T-Derivat **166b** erprobt.



Nucl = d4T **3**; **166b**
Nucl = AZT **1**; **167b**

Nucl = d4T **3**; **168**
Nucl = AZT **1**; **169**

Abb. 124: Versuch der Synthese von **168** und **169**

Wieder wurden die Phosphatdiester vor der Reaktion gründlich wie oben beschrieben getrocknet. Bei Durchführung der Reaktion mit dem d4T-Derivat **166b** wurde das Phosphorchloridat **162** über längere Zeit bei -70 °C in Toluol gelöst zu **166b** getropft und die Reaktionslösung noch einige Zeit bei -50 °C gerührt. Dies war analog der Durchführung zur Darstellung von dem *cyclo*Sal-NDP **148b**. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wurde ein ^{31}P-NMR-Spektrum aufgenommen, welches das Scheitern der Reaktion offenbarte. Die zwei Hauptsignale wurden 5-Chlor-*cyclo*Sal-phosphat **163** und dem Edukt **166b** zugeordnet. Dies deutete auf eine vollständige Hydrolyse des Phosphorchloridates **162** hin. Da aber unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet worden war, konnte die Hydrolyse nur im Nachhinein eingetreten sein. Das aber keine Reaktion der Edukte eingetreten sein sollte, schien unwahrscheinlich. Daher wurde die Reaktion mit dem AZT-Derivat **167b** unter gleichen Bedingungen durchgeführt. In diesem Fall wurde die Reaktion jedoch durch

Aufnahme von ^{31}P-NMR-Spektren unter Schutzgasbedingungen verfolgt. Es stellte sich heraus, dass die Zielverbindung **169** entstanden war. Dies ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

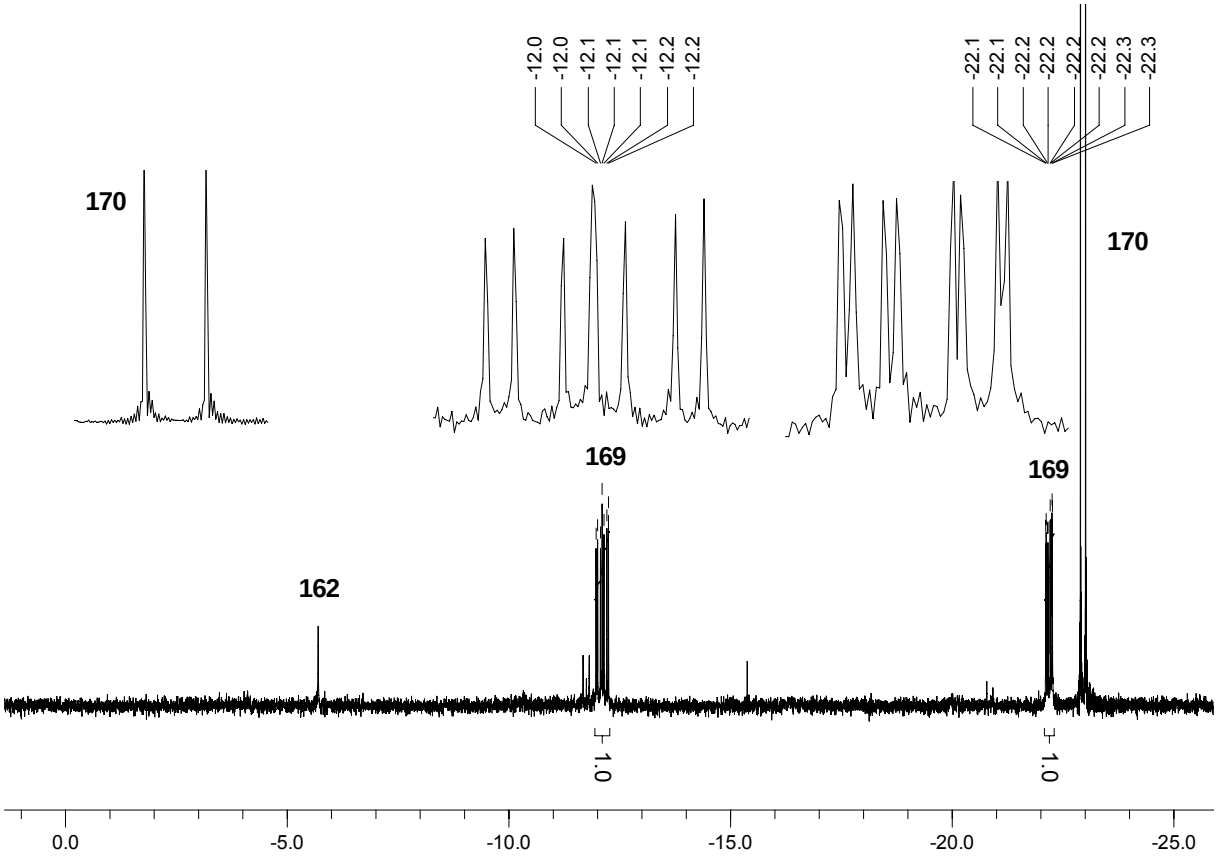
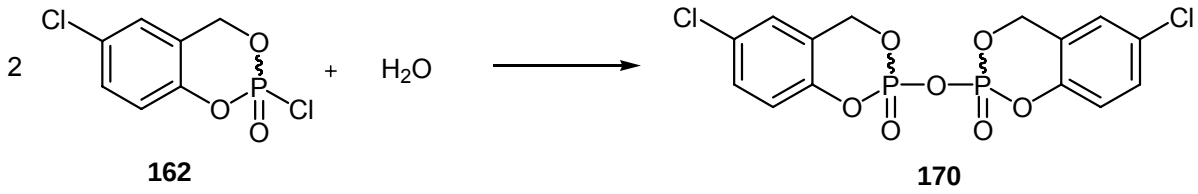


Abb. 125: Ausschnitt aus dem ^{31}P-NMR-Spektrum (^{1}H-entkoppelt) von **169** in $CDCl_3$ unter N_2

Diesem Spektrum konnte eindeutig die Entstehung von **169** entnommen werden, da sehr charakteristische Signale hervorgerufen wurden; die Verbindung enthält zwei unterschiedliche P-Atome, daher sollten zwei Signale auftreten, die wegen der P-P-Kopplung zu je einem Dublett aufspalten. Weiterhin liegt **169** als Gemisch von vier Diastereomeren vor, so dass pro Phosphoratom acht Peaks im ^{31}P-NMR-Spektrum zu erwarten waren. Dies ist in der vergrößerten Darstellung zu sehen. Bei der Signalschar um -12 ppm fallen zwei der Signale zum zentralen Peak zusammen. Weiterhin zeigte das Spektrum den vollständigen Umsatz des Eduktes **167b** und nur eine gering Restmenge des Phosphorchloridates **162** an. Daraus ließ sich ableiten, dass die Zugabe von 1.5 Äquivalenten **162** eine exakte Dosis zum Verbrauch des Kristallwassers und des Eduktes **167b** war. Unter der Annahme, dass Teile des Phosphorchloridates **162** von dem Kristallwasser zersetzt wurden, soll sich dem

zweiten Signal, das mit **170** gekennzeichnet ist, zugewendet werden. Die Vergrößerung zeigt zwei Singuletts bei etwa -23 ppm. Beide Signale sollten daher von einem phenolisch substituierten Phosphatester stammen. Dies führte zur Postulierung folgender Nebenreaktion:



162 **170**

Abb. 126: Postulierte Nebenreaktion bei der Synthese von **169**

Das Dimer **170** weist einige Besonderheiten auf: Es sind prinzipiell wieder vier unterschiedliche Konfigurationen denkbar, wobei aber RS und SR aufgrund eines Inversionszentrums *meso*-Verbindungen sind. Weiterhin sind RR und SS Enantiomere, die nur ein Signal erzeugen sollten. Unter der Annahme von magnetischer Äquivalenz der P-Atome sollte zudem keine P-P-Kopplung auftreten, so dass insgesamt, genau wie beobachtet, 2 Singuletts erscheinen sollten. Unter diesen Gesichtspunkten ist es sehr wahrscheinlich, dass das Dimer **170** tatsächlich entstanden war. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurde erneut ein ^{31}P-NMR-Spektrum aufgenommen. Es konnten erneut nur Zersetzungsprodukte gefunden werden, bei denen es sich vermutlich hauptsächlich um das Edukt **167b** und das Hydrolyseprodukt 5-Chlor-*cyclo*Sal-Phosphat **163** handelte. Die Produkte der Reaktion **169** und **170** waren also nicht luftstabil. Diese Beobachtung hatte einige Auswirkungen auf das später beschriebene Design von NDP-Prodrugs, da sie nahelegte, dass zur Darstellung stabiler Verbindungen nicht alle negativen Ladungen der Pyrophosphatbrücke maskiert werden dürften.

Es sollte nun noch die Hydrolyse von 5-Chlor-*cyclo*Sal-AZTDP **148b** untersucht werden, dessen Synthese in Abb. 120 beschrieben wurde. Dazu wurde die Verbindung in 0.3 mL DMSO-d_6 gelöst und mit 0.3 mL PBS pH = 7.3 versetzt. Die Analyse erfolgte ^{31}P-NMR-spektroskopisch. Der Endpunkt der Hydrolyse ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

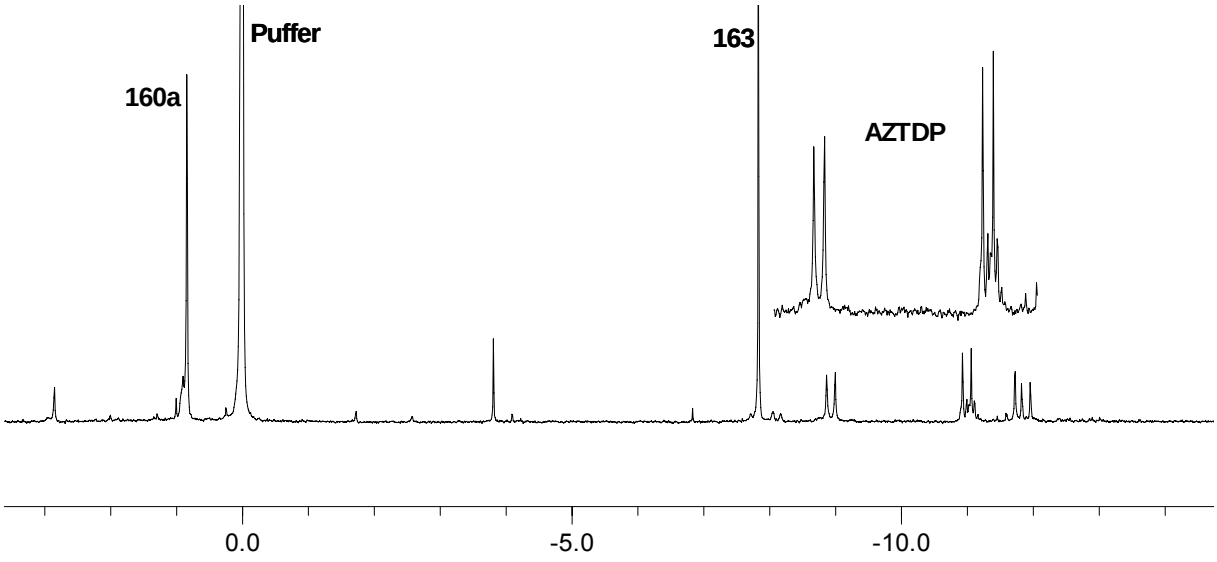


Abb. 127: ^{31}P-NMR-spektroskopische Verfolgung von **148b** in PBS pH = 7.3 bei t = 3 d

Dieses Spektrum zeigt die Hydrolyse von **148b** zu den Zersetzungsprodukten AZTMP **160a** und 5-Chlor-*cyclo*Sal-Phosphat **163**. Man erkennt jedoch weiterhin die Entstehung von AZTDP, das im Unterschied zu der Hydrolyse von 3-Methyl-*cyclo*Sal-AZTDP **148a** (s. Abb. 119, 1% AZTDP) jedoch mit einem Anteil von etwa 25% entsteht (entnommen dem Verhältnis der Integrale von **160a** bei 1 ppm und dem AZTDP-Signal bei -9 ppm). Damit lässt sich der Hydrolysemechanismus in Abb. 128 zusammenfassen.

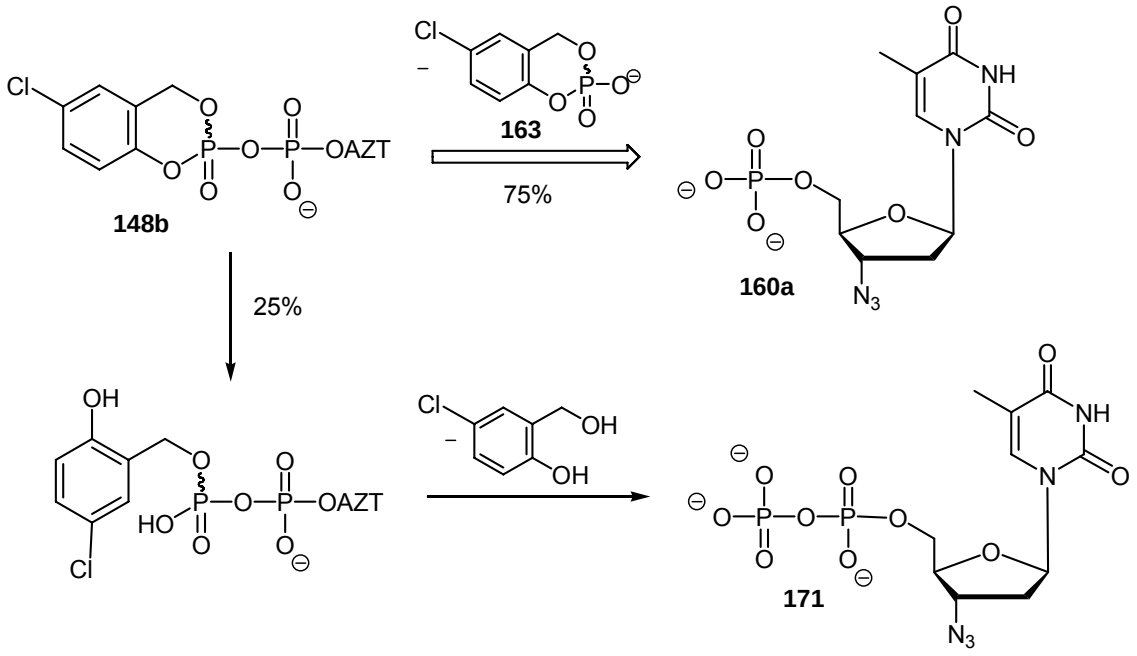


Abb. 128: Hydrolyse von **148b**

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Hydrolyse zur Freisetzung von AZTDP **171** durch Akzeptorsubstitution des *cyclo*Sal-Restes gezielt beeinflussen lässt. Obwohl die Entstehung von 25% AZTDP **171** erfreulich ist, weisen die Resultate doch auf die Grenzen der Verwendung von *cyclo*Sal-Maskierungen für NDP hin. Natürlich wäre es möglich, noch stärkere Akzeptorsubstituenten zu verwenden, allerdings würde man die Hydrolysehalbwertszeit dadurch deutlich senken, was hinsichtlich der Anwendung solcher Verbindungen als Prodrug ungünstig wäre. Zudem wäre mit einer weiter erschwerten Isolierung zu rechnen.

Abschließend wurden die antiviralen Daten der Verbindung **148b** gegenüber HIV-1 und HIV-2 ermittelt. Die Ergebnisse der Tests sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

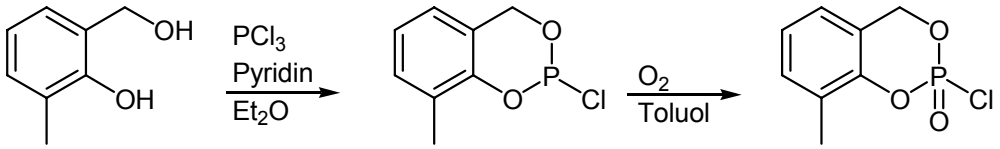
	EC_{50}[a] [μM]			CC_{50}[b] [μM]
	CEM/0		CEM/TK$^-$	CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	**HIV-2**	
5-Cl-*cyclo*Sal-AZTDP **148b**	0.028 ± 0.017	0.01 ± 0.00	38 ± 20	>250
AZT **1**	0.025 ± 0.007	0.011 ± 0.007	12 ± 11	165 ± 75

[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration
Tab. 6: Antivirale Profile von **148b** und der Referenzverbindung AZT **1**

Die Aktivität der Referenzverbindung AZT **1** konnte durch das Prodrug **148b** reproduziert werden. Dennoch wurde ein Verlust der Aktivität in TK-defizienten Zellen festgestellt, was darauf hindeutet, dass die **148b** außerhalb der Zellen hydrolysierte. Durch die Aktivität von Phosphatasen im Inkubationsmedium sollte dann AZT **1** gebildet werden, dass in die Zelle gelangt und für die Aktivität verantwortlich ist. Obwohl die Hydrolysehalbwertszeit von **148b** nicht exakt bestimmt wurde, deuteten die Ergebnisse der ^{31}P-NMR-Studien auf eine recht rasche Hydrolyse des Prodrugs hin, so dass ein erfolgreiches Einschleusen in die Zelle ausbleibt. Natürlich könnte die Diffusion über die Zellmembran auch durch die Polarität der Verbindung eingeschränkt sein.

6.2.3 Synthese von substituierten *cyclo*Sal-Phosphorchloridaten

Zur Synthese der im letzten Abschnitt beschriebenen Verbindungen war die Verwendung von Phosphorchloridaten ausgesprochen hilfreich. Außerdem wurde im Kapitel über die Fluoreszenz gezeigt, dass Phosphorchloridate zur Synthese von *cyclo*Sal-NMP mit hervorragenden Ausbeuten herangezogen werden können. Dabei wurde zunächst auf die von O. Ludek entwickelte Synthesemethode zurückgegriffen.[111]



151 **134** **135**

Abb. 129: Synthese von 3-Me-*cyclo*Sal-phosphorchloridat **135**

Es musste zunächst das Chlorphosphit **134** synthetisiert werden. Hieran schloss sich die Oxidation mit getrocknetem Sauerstoff in Toluol an, so dass Toluol-Stammlösungen von **135** erhalten wurden. Ein Problem bei der Synthese ist, dass die Chlorphosphite für die Oxidation in hoher Reinheit vorliegen müssen, so dass eine vorherige Kugelrohrdestillation unausweichlich bleibt. Hierfür sind aber größere Mengen der Chlorphosphite erforderlich, einhergehend mit massiven Ausbeuteverlusten. Weiterhin konnte die Synthese nicht auf komplexe Salicylalkohole angewendet werden, wie sie z.B. in dem Kapitel über „lock-in"-modifizierte Pronucleotide beschrieben sind, da deren Chlorphosphite nicht destilliert werden können. Die Synthese sollte daher überarbeitet und generalisiert werden. Zur direkten Synthese von **135** aus dem Salicylalkohol **151** sollte Phosphorylchlorid verwendet werden. Da inzwischen bekannt war, dass Pyridin und Pyridiniumsalze als Aktivatoren bei Umsetzungen mit Phosphorchloridaten auftreten, wurde Triethylamin als Base für die Synthesen verwendet. Als optimal stellte sich weiterhin die Durchführung der Reaktion in THF oder Diethylether bei tiefen Temperaturen heraus. $POCl_3$ wurde im Reaktionskolben im Lösungsmittel vorgelegt und eine Mischung von einem Äquivalent Salicylalkohol und 2.1 Äquivalenten Triethylamin über längere Zeit zugetropft. Nach Schlenkfiltration und Entfernung des Lösungsmittels konnten verschiedene Phosphorchloridate durch chromatographische Reinigung am Chromatotron isoliert werden. Dies ist ein weiterer Vorteil der Phosphorchloridate

gegenüber Chlorphosphiten: Sie sind luftstabil, lassen sich chromatographisch reinigen und liegen oft als gut dosierbare Feststoffe vor. Die nachfolgende Abbildung gibt eine Übersicht der durchgeführten Reaktionen.

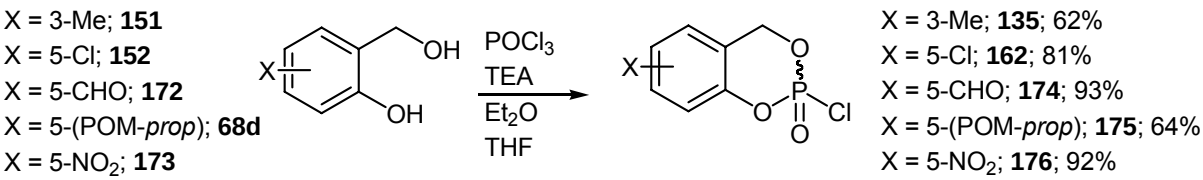


Abb. 130: Neue Synthese von *cyclo*Sal-Phosphorchloridaten

Die Zielverbindungen konnten in guten bis hervorragenden Ausbeuten in hoher Reinheit dargestellt werden. Auf die Vorteile dieser Verbindungen bei Synthesen wurde bereits hingewiesen. Die Möglichkeit ihrer direkten Darstellung aus den Salicylalkoholen unter Tolerierung verschiedener funktioneller Gruppen (z.B. **172**, **68d**) ist daher überaus erfreulich. Die Tendenz der Phosphorchloridate zu kristallisieren, konnte für **162** zur Ermittlung der Kristallstruktur ausgenutzt werden.

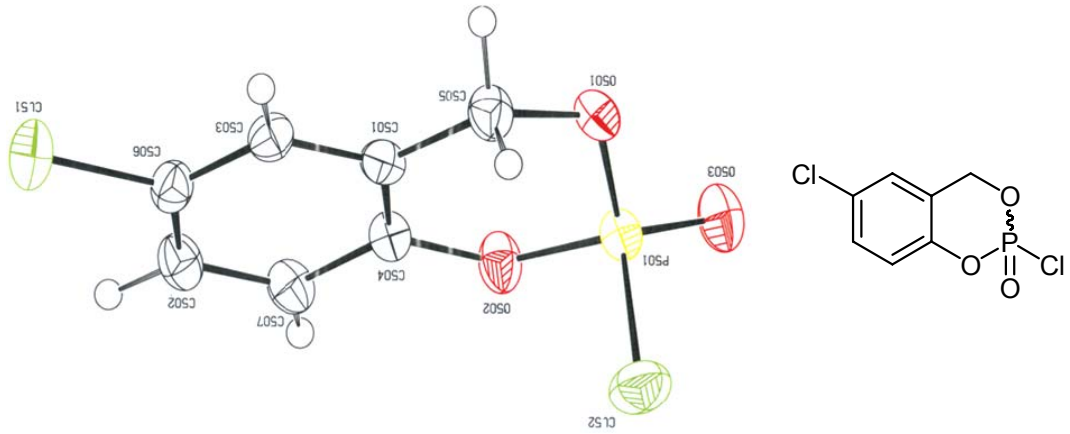


Abb. 131: Kristallstruktur von racemischem 5-Chlor-saligenyl-phosphorchloridat **162**

Bei einigen Verbindungen versagte die Synthese allerdings, z.B. konnte sie nicht zur Darstellung von Aminosäure-Ester-modifizierten Phosphorchloridaten herangezogen werden, da diese bei tiefen Temperaturen in THF unlöslich waren. Weiterhin ist es bislang nicht gelungen, mehrfach substituierte Phosphorchloridate (s. Abb. 132) darzustellen, wobei der Grund hierfür unklar ist.

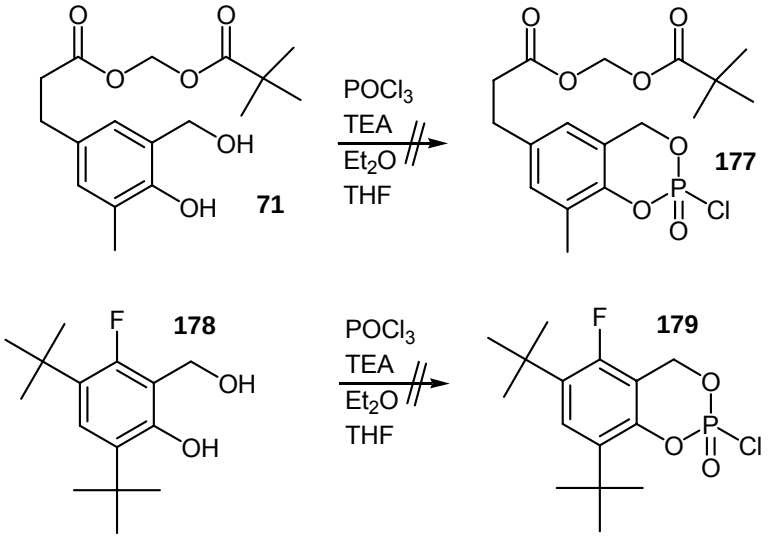


Abb. 132: Fehlgeschlagene Synthesen

Abschließend soll noch auf eine letzte Besonderheit der Phosphorchloridate hingewiesen werden: Man kann sie nicht nur als phosphorylierende Reagenzien einsetzen, sondern weitergehende Umsetzungen an ihnen vornehmen. Dies könnte für spätere Arbeiten von Interesse sein. Die nachfolgende Reaktion wurde nur einmal und ohne Optimierung in einem kleinen Ansatz durchgeführt, daher scheint eine Verbesserung der Ausbeute noch möglich. Die Acylal-Modifikation soll hier nicht diskutiert werden, ihr Zweck kann aber weiterführender Literatur entnommen werden.[69]

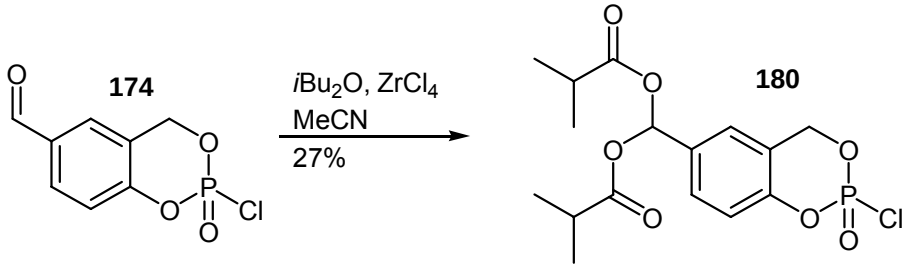


Abb. 133: Darstellung von Acylal **180**

Die Umsetzung erfolgte mit *iso*-Buttersäureanhydrid in Gegenwart von Zirkoniumtetrachlorid in Acetonitril als Lösungsmittel. Interessant ist, dass die Phosphoryleinheit hier gleichsam als Schutzgruppe auftritt.

6.3 Entwicklung eines NDP-Prodrugs auf Basis des Bis-(AB)-Systems

In den letzten Abschnitten dieses Kapitels ist auf die großen Probleme bei der Entwicklung eines NDP-Prodrug-Konzeptes hingewiesen worden. Mit dem *cyclo*Sal-System konnte eine maximale Freisetzung von 25% NDP erzielt werden. Dass dies kaum ausreicht, um von einem effizienten System zu sprechen, muss hier nicht diskutiert werden. Dennoch waren die Synthesen nicht vergebens, da zum Einen viel über die Handhabung hochpolarer und amphiphiler organischer Verbindungen gelernt wurde, zum Anderen ließen sich einige Schlussfolgerungen zur Steigerung der Effizienz einer NDP-Freisetzung ziehen.

Aus den bisherigen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass eine Hydrolysekaskade, die über eine Reaktion am β-P-Atom eingeleitet wird, kaum geeignet ist, effizient das NDP freizusetzen. Dies liegt darin begründet, dass so stets auch die Hydrolyse der Anhydridbindung eingeleitet werden kann, und die Hydrolyse eines Anhydrids ist ein exothermer Prozess. Für die weiteren Arbeiten bedeutete dies: Verwende ein System, bei dem die Hydrolysekaskade entfernt vom P-Atom eingeleitet wird.

Im Kenntnisstand sind einige Prodrug-Systeme aufgelistet und beschrieben, bei denen eine enzymatische Reaktion an der Maskierungsfunktion die Hydrolysekaskade einleitet. Damit verbunden ist gleichsam ein immanenter „lock-in"-Effekt. Ob dies ein Vorteil ist, soll hier nicht erörtert werden. Immerhin könnten solche Pronucleotide prinzipiell durch einen intensiven *first-pass* Metabolismus inaktiviert werden, aber so weitreichende Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Die Wahl der zu verwendenden Maske fiel schließlich auf Bis-Acyloxybenzyl-Ester (Bis(AB)-Pronucleotide), da die bislang erarbeiteten Synthesemethoden übertragbar schienen und weiterhin, da das System flexibel im Hinblick weiterführender Modifikationen zur Einstellung der Hydrolysehalbwertszeit und Lipophilie ist. In der folgenden Abbildung ist die Leitstruktur von BAB-Nucleosiddiphosphat-Prodrugs und deren Hydrolysemechanismus gezeigt.

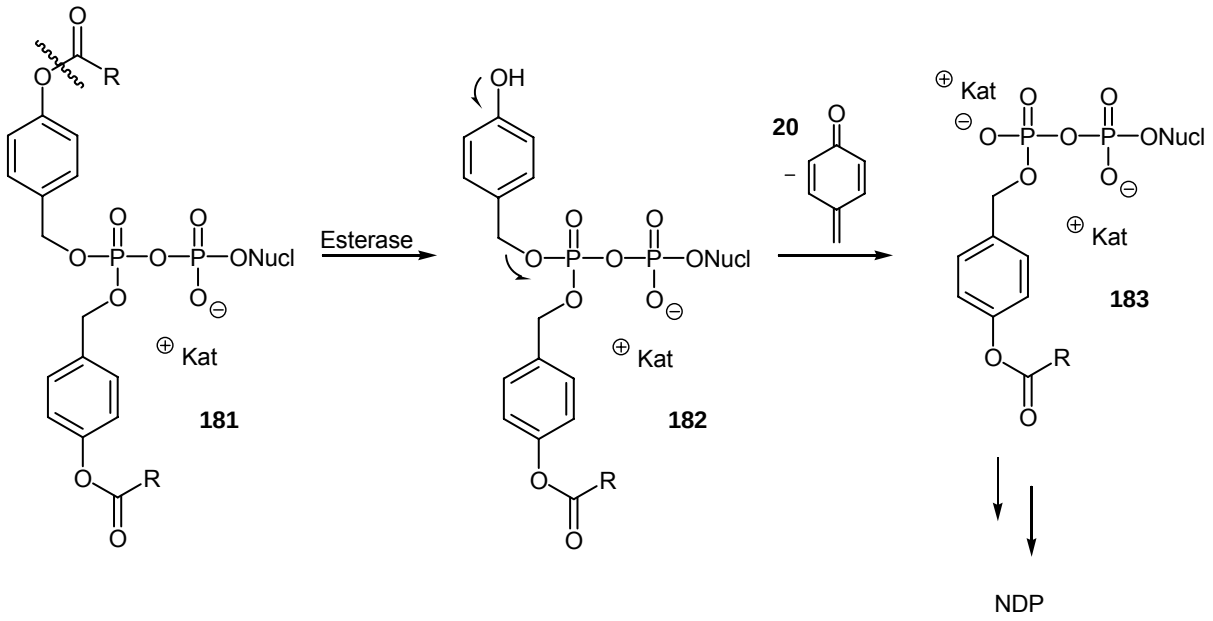


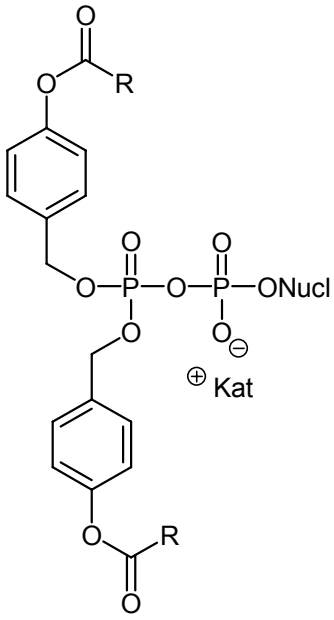
Abb. 134: Postulierter Hydrolysemechanismus von BAB-NDP-Prodrugs

Im ersten Schritt erfolgt die Aktivierung von **181** durch vermehrt intrazellulär vorkommende Esterasen. Dies führt zu einer Umpolung des Akzeptorsubstituenten in einen starken Donorsubstituenten, der *para*-ständig zum Benzylester angeordnet ist. Verbindung **182** ist daher instabil und zerfällt spontan in das Hydrolyseprodukt **183** und das Chinonmethid **20**, dessen Folgereaktionen im Kenntnisstand erläutert wurden. Eine Wiederholung dieser Kaskade an der zweiten Maskierung resultiert schließlich in der Freisetzung des NDP.

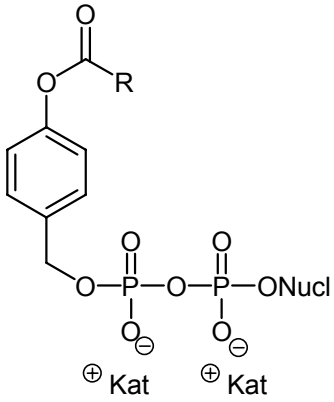
Die Besonderheit dieses Systems besteht darin, dass die enzymatische Reaktion durch einen Spacer von der Pyrophosphatbrücke isoliert ist. Dies ist wichtig, da zwei Äquivalente der Maske abgespalten werden müssen und aus Untersuchungen mit NMP-Prodrugs, z.B. POM-Nucleotiden, bekannt war, dass die zweite Hydrolyse deutlich langsamer abläuft.[50,51,54] Dies wurde mit einer repulsiven Wechselwirkung der freigewordenen Ladung am P-Atom mit dem Enzym begründet. Da bei den BAB-NDP-Prodrugs bereits eine Ladung vorhanden ist und eine weitere bei der Abspaltung der nächsten Maske hinzukommt, sollte dieser Spacer zu einer Affinitätssteigerung der Intermediate **183** führen. Zudem kann über die Reste R die Hydrolysegeschwindigkeit, Enzymaffinität und Polarität gezielt beeinflusst werden, es handelt sich daher um ein sehr variables System. Die Synthese und Charakterisierung dieser ausgesprochen interessanten Verbindungen soll nun beschrieben werden.

6.3.1 Zielverbindungen und Synthesestrategie

Um den Einfluss der Acyl-Modifikation auf Halbwertszeit und Polarität zu untersuchen, sollte eine Vielzahl verschiedener Ester an der phenolischen OH-Gruppe eingeführt werden. Weiterhin sollte der Einfluss des Nucleosides untersucht werden. Es sollten zunächst BAB-NDP-Prodrugs unterschiedlicher Ester (**184**, **185**) mit d4T **3** und AZT **1** dargestellt werden. Die am besten geeignete Maske sollte dann zur Synthese an weiteren Nucleotiden erprobt werden. Weiterhin sollte versucht werden, die monosubstituierten Intermediate **186** und **187** zu isolieren.



R=Me, Nucl=d4T; **184a**
R=*i*-Pr, Nucl=d4T; **184b**
R=*t*-Bu, Nucl=d4T; **184c**
R=heptyl, Nucl=d4T; **184d**
R=Ph, Nucl=d4T; **184e**
R=Me, Nucl=AZT; **185a**
R=*i*-Pr, Nucl=AZT; **185b**
R=*t*-Bu, Nucl=AZT; **185c**
R=heptyl, Nucl=AZT; **185d**
R=Ph, Nucl=AZT; **185e**



R=Me, Nucl=AZT; **186**
R=Ph, Nucl=d4T; **187**

Abb. 135: Zielverbindungen **184a**-**e** und **185a**-**e** sowie die Intermediate **186** und **187**

An dieser Stelle soll noch rasch eine Nomenklatur für die Verbindungen eingeführt werden. Generell werden die Namen der Verbindungen wie folgt gebildet: **B**is-(4-**A**cyloxy**B**enzyl)**N**ucleosid**D**i**P**hosphat, also BAB-NDP. Das entsprechende Gegenion wird vor den Namen gesetzt, z.B. Ammonium-BAB-NDP. Nun sollen die unterschiedlichen Acylreste gekennzeichnet werden. Hier soll so vorgegangen werden:

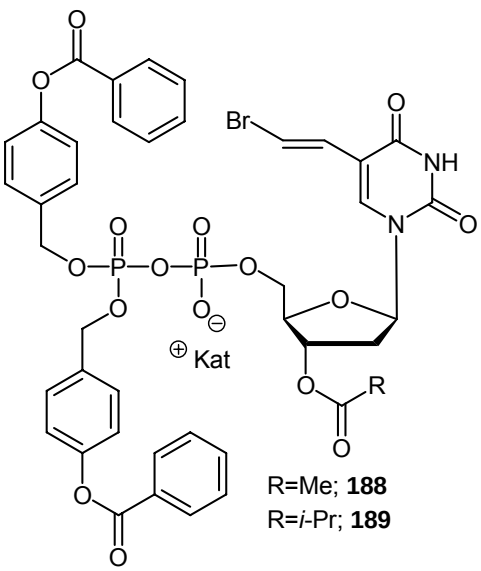
Bis-(4-**A**cetoxy**B**enzyl)NDP:	BAB-NDP;
Bis-(4-**I**so-butyryloxy**B**enzyl)NDP:	BIB-NDP;
Bis-(4-**P**ivaloyloxy**B**enzyl)NDP:	BPB-NDP;

Bis-(4-**O**ctanoyloxy**B**enzyl)NDP: BOB-NDP;
Bis-(4-**B**enzoyloxy**B**enzyl)NDP: BBB-NDP.

Für die entsprechenden monosubstituierten NDP (z.B. **186** und **187**) soll gelten:

(4-**A**cetoxy**B**enzyl)NDP: AB-NDP; usw.

Es muss nun vorweg gegriffen werden: Die Maske mit den besten antiviralen Eigenschaften war leider nicht gleich der Maske mit dem besten Hydrolyseprofil. Dies war zur Zeit der Synthesen aber noch nicht bekannt, weswegen eigentlich die „falsche“ Maske an weiteren Nucleosiden erprobt wurde. Dennoch führte ihre Verwendung letztlich zur Aufklärung konkurrierender Spaltungsmechanismen. Daher muss ihre Darstellung im Nachhinein nicht bedauert werden. Folgende Verbindungen sollten synthetisiert werden:



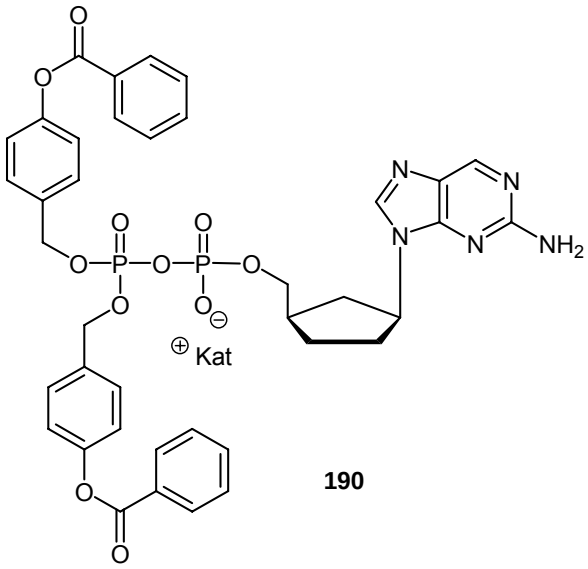


Abb. 136: Zielverbindungen **188**-**190**

Die Verwendung von BVdU **11** ergibt sich aus einer Beobachtung, die bereits im Kenntnisstand beschrieben worden war: Bei dem Aufbau von BVdUTP ist für die ersten beiden Phosphorylierungen eine virale Kinase zuständig. Es gibt ein mutiertes Herpes-Simplex-Virus (B 2006), bei dem eine virale TK-Defizienz vorliegt.[37] Bei Infektion von Zellen mit B 2006 verlieren sowohl BVdU **11**, als auch entsprechende BVdUMP-Prodrugs ihre Aktivität, weswegen ein BVdUDP-Prodrug synthetisiert werden sollte. Eine Aktivität gegenüber B 2006 wäre ein direkter Beweis der

intrazellulären Freisetzung von BVdUDP. Da bei der Synthese vermutlich die 3´-OH-Gruppe ohnehin geschützt vorliegen müsste, sollte eine biodegradierbare Schutzgruppe verwendet werden, so dass nicht noch ein weiterer Entschützungsschritt nötig werden würde. Diese Überlegungen führen zu den BBB-BVdUDP **188** und **189**. Damit wäre das Konzept auch auf antiviral aktive Nucleoside mit 3´-OH-Gruppe anwendbar. Eine weitere Generalisierung des Konzepts sollte durch die Verwendung eines Purin-Nucleosides erreicht werden. Der Nucleosidanteil des BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190** ist das intrinsisch fluoreszierende carbocyclische Nucleosid *carba*-*iso*-ddA **130**. Die Verwendung eines carbocyclischen Nucleosides soll damit begründet werden, dass für die Synthese der NDP-Prodrugs die entsprechenden NMP benötigt wurden. Da mit der Methode nach *Sowa* und *Ouchi* sehr gute Erfahrungen gemacht worden waren, sollte sie auch hier zum Einsatz kommen. Weil aber dd- und d4-Purine in saurem Milieu oft schnell depuriniert werden,[112] wurde auf das in großen Mengen schnell darstellbare carbocyclische Nucleosid **130** zurückgegriffen. BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190**, welches übrigens alle drei Teilaspekte dieser Dissertation vereint, sollte dann mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Obwohl die Ergebnisse des letzten Abschnittes darauf hindeuteten, dass eine vollständige Maskierung der Pyrophosphatbrücke zu einer erheblichen Destabilisierung der Moleküle führt, sollte dennoch nochmals versucht werden, eine solche Verbindung darzustellen.

191

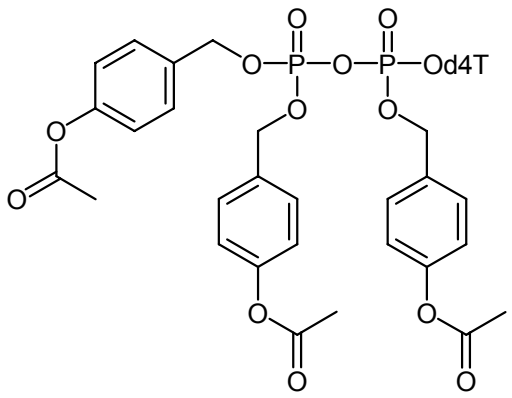


Abb. 137: Zielverbindung Tris-(4-Acetoxybenzyl)d4TDP **191**

Die retrosynthetische Analyse führt, ähnlich den *cyclo*Sal-NDP, zu einer Synthese der Pyrophosphatbrücke im letzten Schritt.

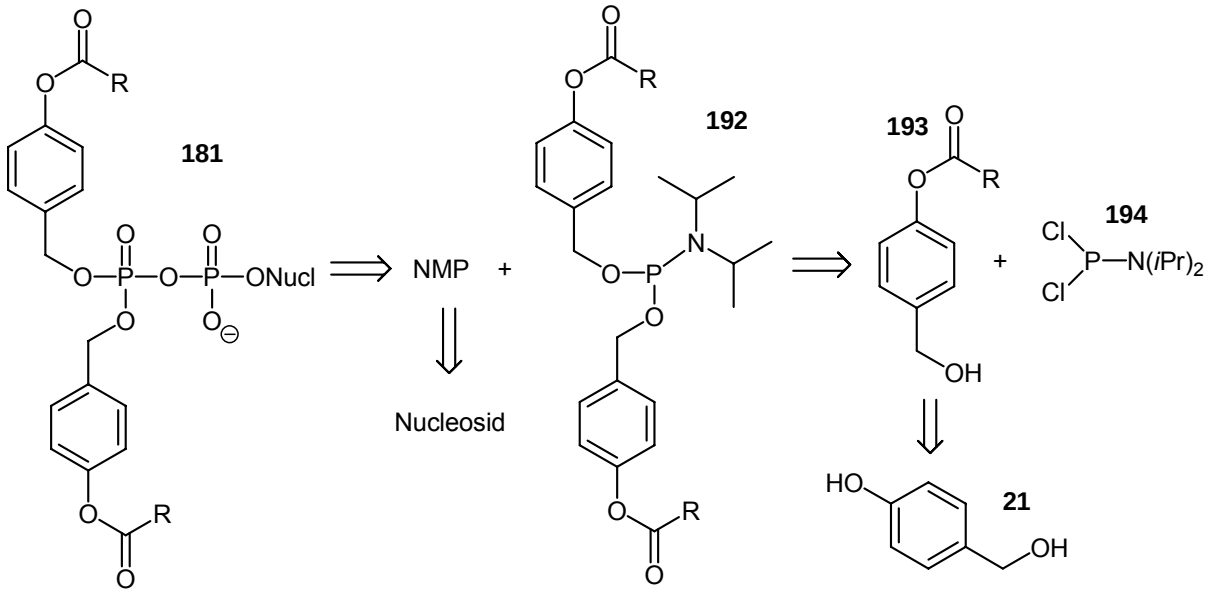


Abb. 138: Retrosynthetische Analyse von BAB-NDP-Prodrugs **181**

Für die Kupplung würden also erneut NMP benötigt werden, die bekanntlich aus den Nucleosiden zugänglich sind. Als Reaktionspartner für diese Reaktion sollten verschiedene Phosphoramidite **192** dargestellt werden. Zu deren Synthese benötigt man das P(III)-Reagenz **194** und entsprechende Phenylester **193**, die wiederum aus *para*-Hydroxybenzylalkohol **21** durch Acylierung darstellbar sein sollten. Ein ähnliches, wenn auch leicht komplexeres Vorgehen, sollte zu Tris-(4-Acetoxybenzyl)d4TDP **191** führen. Die AB-NDP sollten durch selektive Hydrolyse dargestellt werden.

6.3.2 Synthese von BAB-NDP-Prodrugs

Wie in der retrosynthetischen Analyse dargestellt, wurden zunächst etliche Edukte für die Kupplungsreaktionen benötigt. Deren Synthese soll nun im Folgenden beschrieben werden. Zunächst wird auf die Synthese der verschiedenen Phenylester **193** eingegangen. Obwohl in der Literatur gelegentlich die Angst geschürt wurde, eine selektive Acylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol **21** mit Säurechloriden sei nicht möglich, wurde es dennoch versucht, da die literaturbekannten milden Acylierungsmittel selbst erst synthetisiert werden müssen.[113-115] Da 4-Hydroxybenzylalkohol **21** in großen Mengen sehr günstig erworben werden kann, wurden Nebenreaktionen in Kauf genommen. Es stellte sich heraus, dass dies das richtige Vorgehen war.

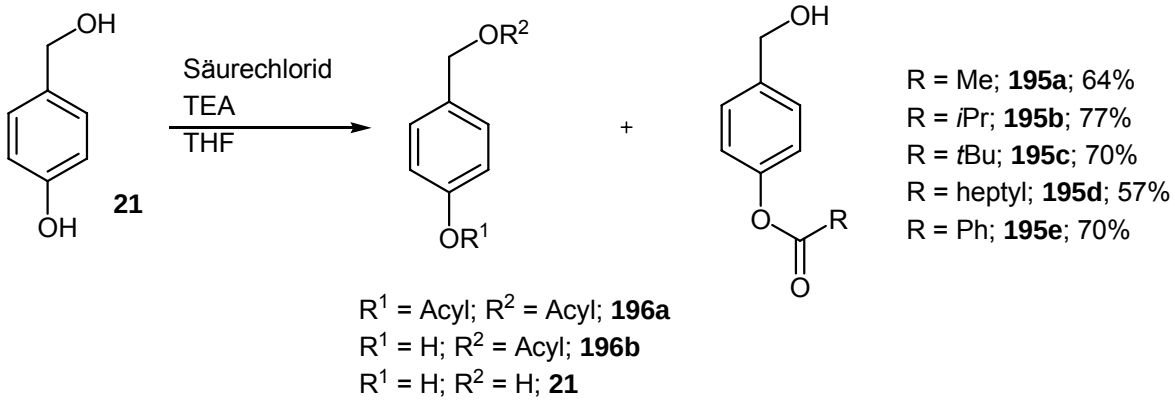


Abb. 139: Produkte der Acylierung von **21**

Um eine hohe Selektivität zu erreichen, wurde bei 0 °C gearbeitet und genau ein Äquivalent Triethylamin zur Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe zugegeben. Weiterhin wurden nur 1.1 Äquivalente Säurechlorid verwendet. Die möglichen Verunreinigungen in dem Produktgemisch sind Edukt **21**, sowie das doppelt acylierte Produkt **196a** und der Benzylester **196b**. Dennoch konnten durchweg gute Ausbeuten um 70% für die Phenylester **195a**-**e** erzielt werden. Das liegt daran, dass die Verunreinigungen recht leicht abgetrennt werden können. Die Extraktion mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung entfernte die Verunreinigungen **21** und **196b**. **196a** konnte leicht durch Chromatographie oder Kristallisation abgetrennt werden. Auf diese Weise gelang es, die Ester **195a**-**e** im Multigramm-Maßstab darzustellen.

Nun musste das Dichlorophosphoramidit **194** synthetisiert werden. Dies gelang durch Umsetzen von Phosphortrichlorid mit DIPA in Diethylether und anschließende Schlenkfiltration.

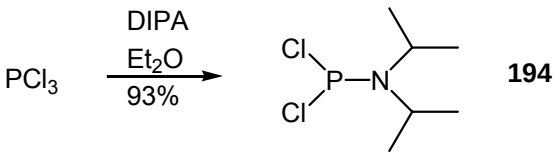


Abb. 140: Synthese des Dichlorophosphoramidits **194**

Aus diesen Edukten konnten nun die verschiedenen Phosphoramidite dargestellt werden. Die Reaktionen wurden in THF mit Triethylamin als Base durchgeführt.

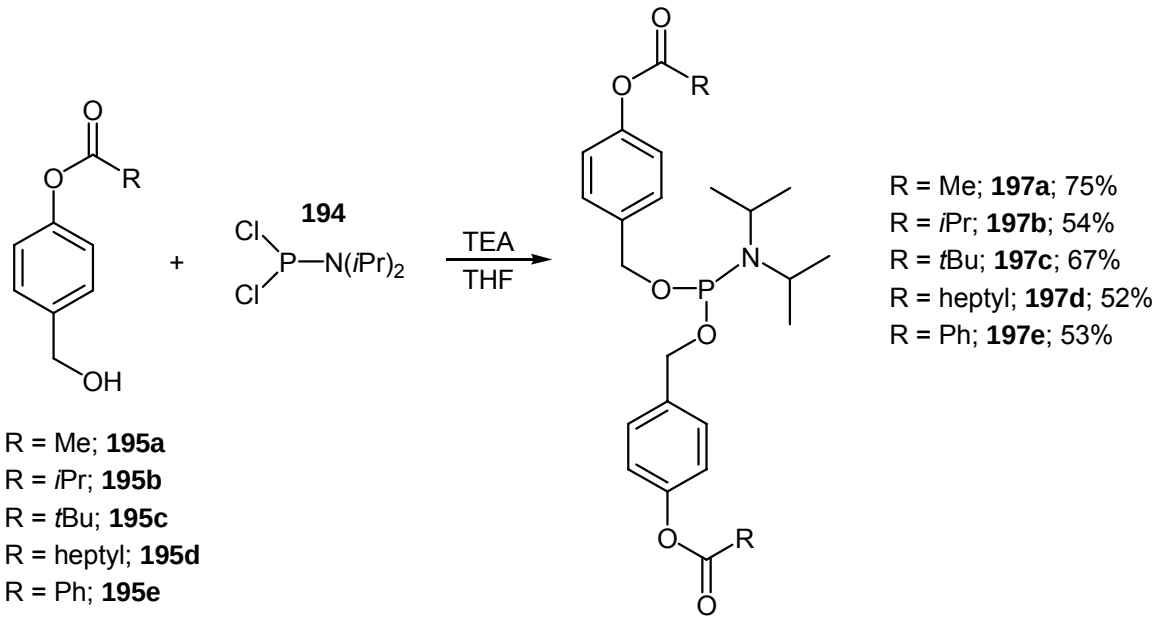


Abb. 141: Synthese der Phosphoramidite **197a**-**e**

Die Phosphoramidite konnten nach der Reaktion am Chromatotron gereinigt werden und kristallisierten bei guter Trocknung im Vakuum und längerer Lagerung bei -26 °C, was in den späteren Kupplungsreaktionen die Dosierung erleichterte. Die Ausbeuten lagen zwischen 52% und 75%. Nebenprodukte wurden nicht isoliert, da diese selbst mit reinem Methanol nicht vom Kieselgel eluiert werden konnten. Immerhin konnte diese Reaktion genutzt werden, um von den Amiditen Mengen um zwei Gramm zu erhalten.

Es sollten nun noch die entsprechenden NMP synthetisiert werden. Zuvor mussten bei BVdU **11** entsprechende 3´-*O*-Acyl-Schutzgruppen eingeführt werden.

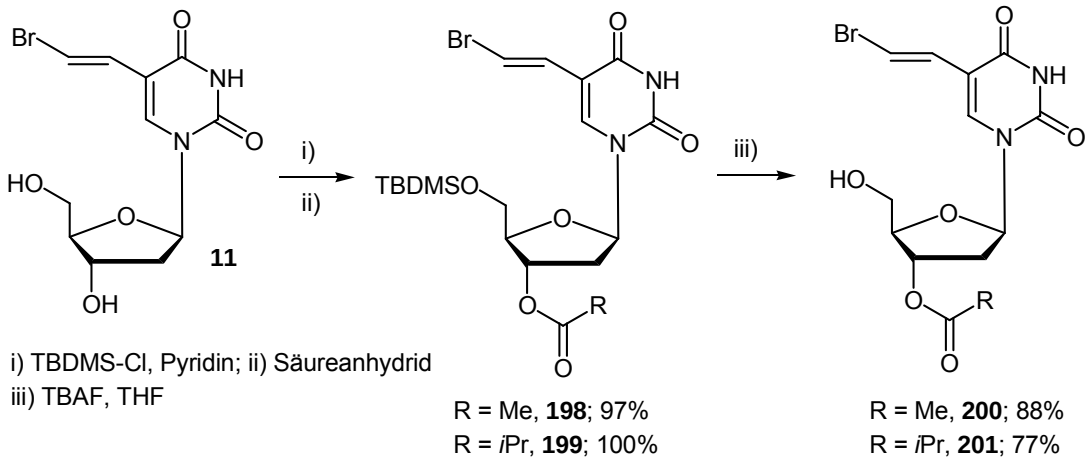
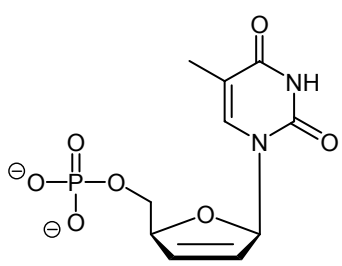


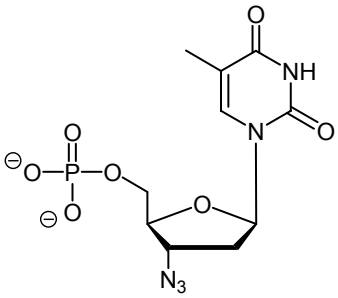
Abb. 142: Synthese 3´-*O*-acylierter BVdU-Derivate **200** und **201**

Die Schritte i) und ii) konnten in einer Eintopfreaktion durchgeführt werden, d.h. zunächst wurde BVdU **11** in Pyridin an der 5´-OH-Gruppe mit TBDMS blockiert. Nachdem das DC die vollständige Umsetzung anzeigte, wurden der Reaktionslösung die entsprechenden Säureanhydride zugefügt. Beide Zwischenprodukte **198** und **199** konnten in quantitativen Ausbeuten chromatographisch isoliert werden. Die Entschützung zu den 3´-*O*-Acyl-BVdU-Derivaten **200** und **201** gelang mit TBAF in THF mit sehr guten Ausbeuten.

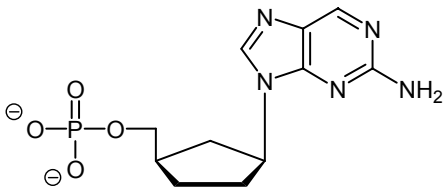
Es waren nun alle benötigten Nucleoside zur Phosphorylierung vorhanden. Die Synthese der BVdU-Derivate **200** und **201** wurde eben, die Synthese von *carba-iso*-ddA **130** im Kapitel über die Fluoreszenz beschrieben. Weiterhin wurde die Methode nach *Sowa* und *Ouchi* bereits an AZT **1** und d4T **3** erprobt. Um die breite Anwendbarkeit zu demonstrieren, wurden noch *carba-iso*-d4A **128** und dm^5K **110a** zu den entsprechenden Monophosphaten umgesetzt. Die Isolierung erfolgte stets über RP-18 Chromatographie mit Wasser als Laufmittel (bei den BVdU-Derivaten war der Zusatz von etwas Acetonitril notwendig). Es wurden stets die Ammoniumsalze isoliert.



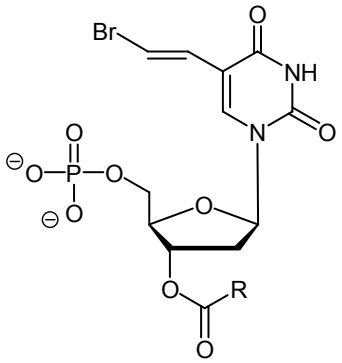
159a; 99%



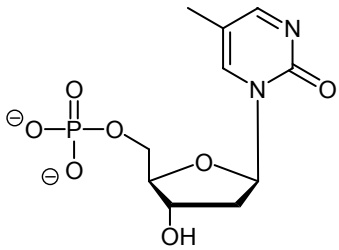
160a; 90%



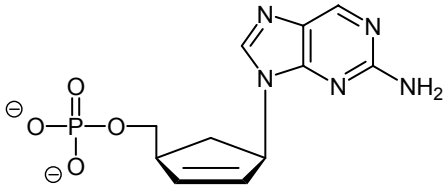
202a; 92%



R = Me, **203a**; 8%
R = *i*Pr, **204a**; 43%



205; 100%

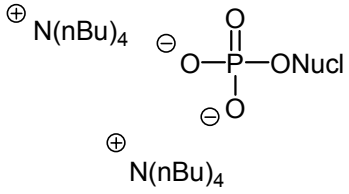


206a; 47%

Abb. 143: Darstellung von Nucleosidmonophosphaten, Gegenionen: Ammonium

Erneut stellte sich der hohe Wert dieser Methode heraus. Lediglich bei der Synthese von Diammonium-*carba*-*iso*-d4AMP **206a** lag die Ausbeute nur bei 47%. Im Fall der BVdUMP-Derivate **203a** und **204a** trat wegen der sauren Reaktionsbedingungen eine anteilige Spaltung der Schutzgruppe zu BVdUMP auf. Die Trennung der Produktgemische gestaltete sich ausgesprochen schwierig, da sich die R_f-Werte nur geringfügig unterschieden. Die zahlreichen Mischfraktionen wurden verworfen, nachdem genügend reines Produkt isoliert worden war. Dennoch ist die Synthese geeignet, verschiedenste NMP darzustellen. Dabei wird selektiv die 5´-OH-Gruppe phosphoryliert (s. **205**) und auch exocyclische Aminogruppen werden toleriert (s. **202a**, **206a**).

Nun mussten die entsprechenden Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-Salze der Verbindungen dargestellt werden. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen hierzu sind auf Seite 131 beschrieben worden. Die nachfolgende Abbildung gibt die Ausbeuten des Ionenaustausches durch Protonierung und Titration wieder.



Nucl = AZT; **160b**; 100%
Nucl = d4T; **159b**; 95%
Nucl = 3´-*O*-Ac-BVdU; **203b**; n.b*
Nucl = 3´-*O*-*i*Bu-BVdU; **204b**; 85%
Nucl = *carba*-*iso*-ddA; **202b**; 0%
Nucl = *carba*-*iso*-d4A; **206b**; 0%

Abb. 144: Ionenaustausch an NMP durch Protonierung und Titration; * nicht bestimmbar

Wie bereits beschrieben, war diese Methode für AZTMP **160a** und d4TMP **159a** von Erfolg gekrönt und auch zur Darstellung von **204b** aus **204a** durchaus geeignet. Da die Ausbeuten stets für zwei Gegenionen angegeben sind, erklären sich die leichten Verluste, weil teilweise auch nur bis zu 1.7 Gegenionen ausgetauscht wurden. Die Synthese von 3´-*O*-Ac-BVdUMP **203b** ist als Sonderfall zu betrachten, da der Ionentausch zwar gelang, bei der Bestimmung der Anzahl an Gegenionen im ^{1}H-NMR-Spektrum allerdings eine langsame Zersetzung über Nacht festgestellt werden konnte. Dies bedeutet, dass das zweifach deprotonierte NMP **203b** basisch genug ist, die Hydrolyse der Acetylgruppe einzuleiten. Nach beendeter Hydrolyse wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Auf diese Weise wurde die entstandene Essigsäure abgetrennt. Nun wurde erneut ein ^{1}H-NMR-Spektrum aufgenommen. Aus diesem Datensatz konnte die Zersetzung von **203b** zu BVdUMP

nachgewiesen werden. Sehr schön sieht man bei diesem Experiment auch die Umwandlung von **203b** zu BVdUMP an dem H-6-Proton der Nucleobase (ca. 8 ppm). Im oberen NMR hat die Zersetzung bereits begonnen, im unteren ist sie fast vollständig abgeschlossen.

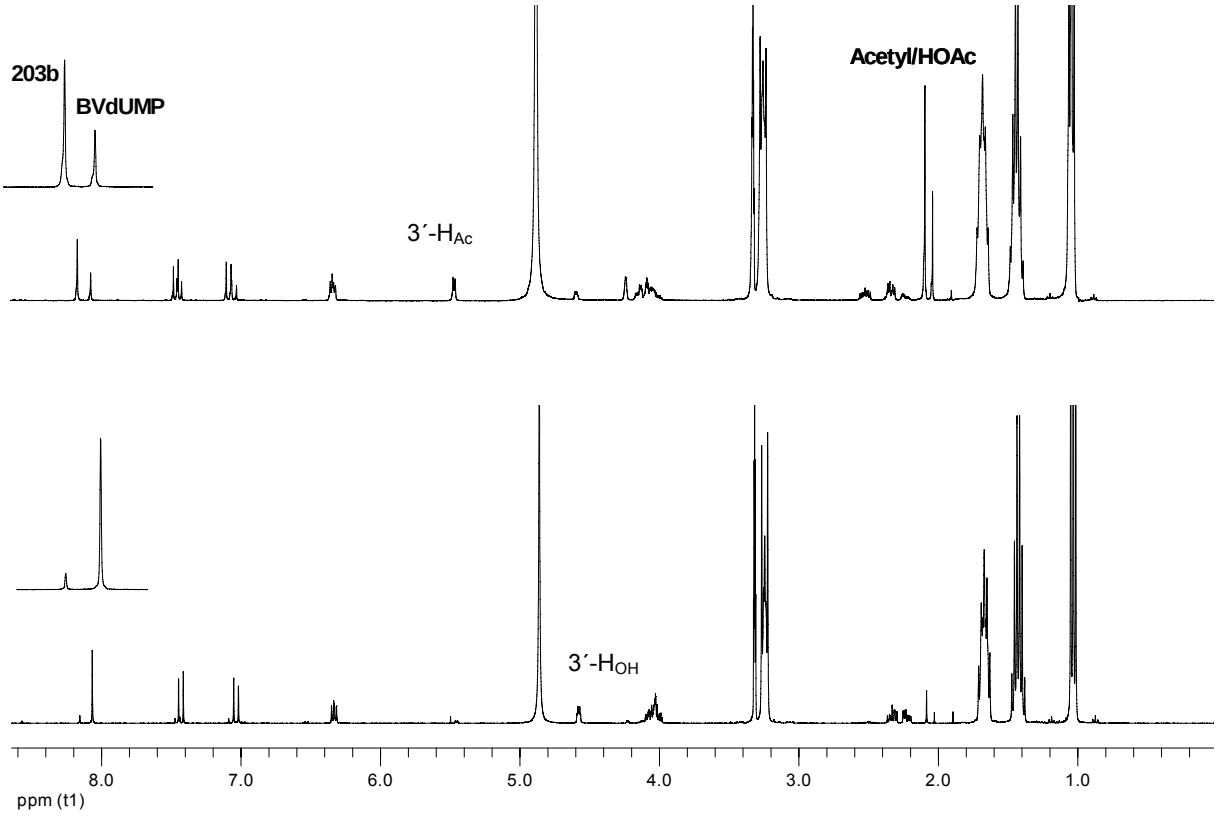


Abb. 145: Zersetzung von **203b** zu BVdUMP

Da die Zersetzung nicht ausgesprochen schnell verlief, sollte **203b** dennoch für weitere Umsetzungen verwendet werden, frisch dargestellt aber ohne die zwischenzeitliche Bestimmung der Gegenionenanzahl im ^{1}H-NMR-Spektrum.

Bei der Synthese von den Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-Salzen der carbocyclischen Nucleoside **202b** und **206b** versagte die Methode der Protonierung und Titration vollständig. Die NMR-Spektren der Produktgemische waren derart komplex, dass eine Analyse unmöglich war. Zudem wurden nur Bruchteile der eingesetzten Massen der NMP **202a** und **206a** von dem Ionentauscher eluiert. Das war insofern bedauerlich, als durch diese Methode sämtliche Reserven an dem *carba-iso*-d4A-Derivat **206a** auf einen Schlag vernichtet waren. Für das Umsalzen von **202a** musste daher anders vorgegangen werden: Da es sich um ein Ammoniumsalz handelt, wurde die direkte Zugabe von zwei Äquivalenten N(*n*-Bu)$_4$OH probiert. Die

Überlegung hierbei war, dass durch die Hydroxidionen die Ammoniumionen deprotoniert werden und Ammoniak und Wasser im Vakuum der Lyophille ausgasen. Da die N(*n*-Bu)$_4$-Kationen hingegen nicht flüchtig sind, sollte so auf direkte Art das Umsalzen erreicht werden.

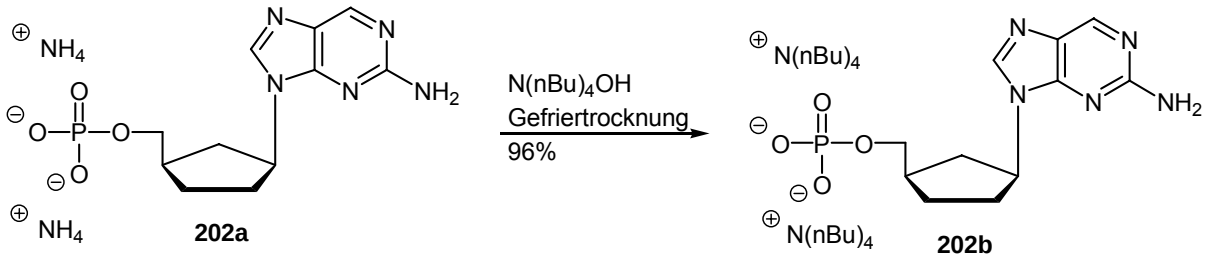


Abb. 146: Direktes Umsalzen von **202a** zu **202b**

Der Ionentausch konnte auf diese Weise erfolgreich durchgeführt werden. So wurde aus der Not eine Tugend, da ein weiterer Schritt auf dem Weg zu BAB-NDP-Prodrugs eingespart werden konnte. Diese Methode des Austausches konnte auch bei anderen Nucleotiden angewandt werden.

Ein anderes Nucleosidanalogon, das für weitere Umsetzungen untersucht werden sollte, ist das acyclische Phosphonat PMEA **207a**, das freundlicherweise von Ulf Görbig zur Verfügung gestellt wurde. Bei der erfolgreichen Synthese eines Prodrugs auf Basis von PMEA **207a**, würde das Spektrum der Anwendbarkeit von Bis(AB)-Maskierungen beträchtlich erweitert werden.

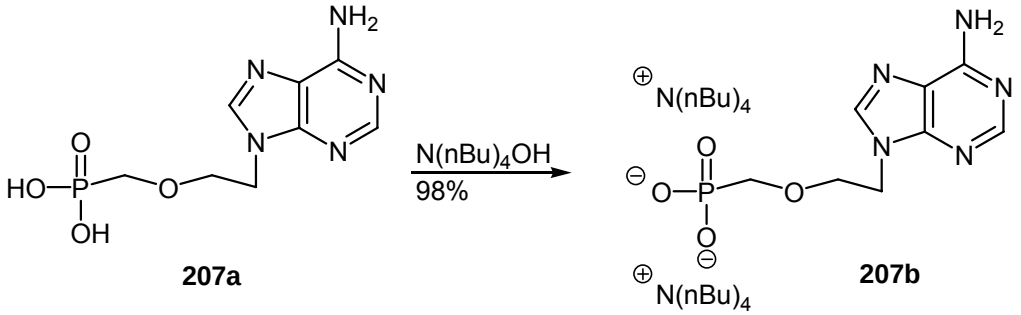


Abb. 147: Synthese des PMEA-Salzes **207b**

Die Umsetzung erfolgte durch einfache Titration der Säure **207a** mit N(*n*-Bu)$_4$OH-Lösung, anschließende Gefriertrocknung und gelang quantitativ.

Damit waren die verschiedenen Synthesebausteine für die Darstellung unterschiedlicher BAB-NDP-Prodrugs vorhanden. Es galt jetzt noch, das Edukt für

die Synthese des dreifach substituierten Prodrugs Tris-(4-Acetoxybenzyl)d4TDP **191** aufzubauen. Hierzu wurde eine bekannte Synthesesequenz bis zum Salz **209a** durchgeführt.[116]

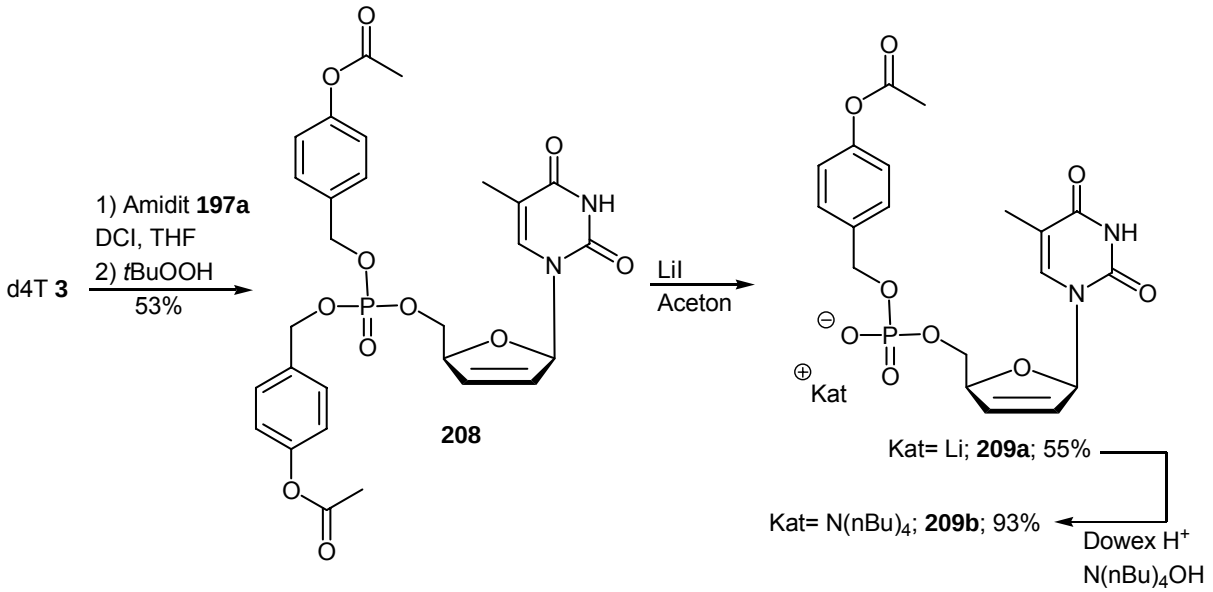


Abb. 148: Synthese des Edukts **209b**

Im ersten Schritt wurde d4T **3** mit dem Amidit **197a** durch Zugabe von Dicyanoimidazol (DCI) gekuppelt und anschließend mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert. Es konnte eine Ausbeute von 53% erzielt werden. Die selektive Abspaltung nur einer Maskierung gelang durch Zugabe von einem Äquivalent Lithium-Iodid zu **208**, gelöst in Aceton. Das Produkt **209a** kristallisierte nach Zugabe von Aceton/Hexan aus und konnte durch Filtration gereinigt werden. Hierin liegt auch der Grund für die etwas geringe Ausbeute von 55%, da nur etwa 140 mg des Edukts **208** eingesetzt worden waren. Bei der Filtration ging dann einiges an Produkt **209a** im Filterpapier verloren. 55 mg des Produktes wurden nachfolgend durch Protonierung und Titration in das Tetra-*n*-butylammoniumsalz **209b** übergeführt, genug also für eine Kupplungsreaktion.

Die Synthese und Reinigung der BAB-NDP-Prodrugs war eine echte Herausforderung, konnte aber gemeistert werden. Da eine Vielzahl verschiedener Verbindungen erzeugt werden sollte, wurde keine der Reaktionen optimiert. Vielmehr wuchs bei jeder Synthese das Wissen um bestimmte Stolpersteine, weshalb bei späteren Ansätzen bessere Ausbeuten und höhere Reinheiten erzielt werden konnten. Die einzelnen Vorgehensweisen sind detailliert im Experimentalteil

aufgeführt, es sollen bei der Beschreibung der verschiedenen Reaktionen daher nur größere Fortschritte akzentuiert werden. Zunächst wird die Synthese der d4T-Derivate **184a**/**c**-**e** beschrieben. Das Derivat **184b** wurde aus Zeitgründen nicht mehr dargestellt, **184c** wurde bereits von Tillman Schulz synthetisiert.

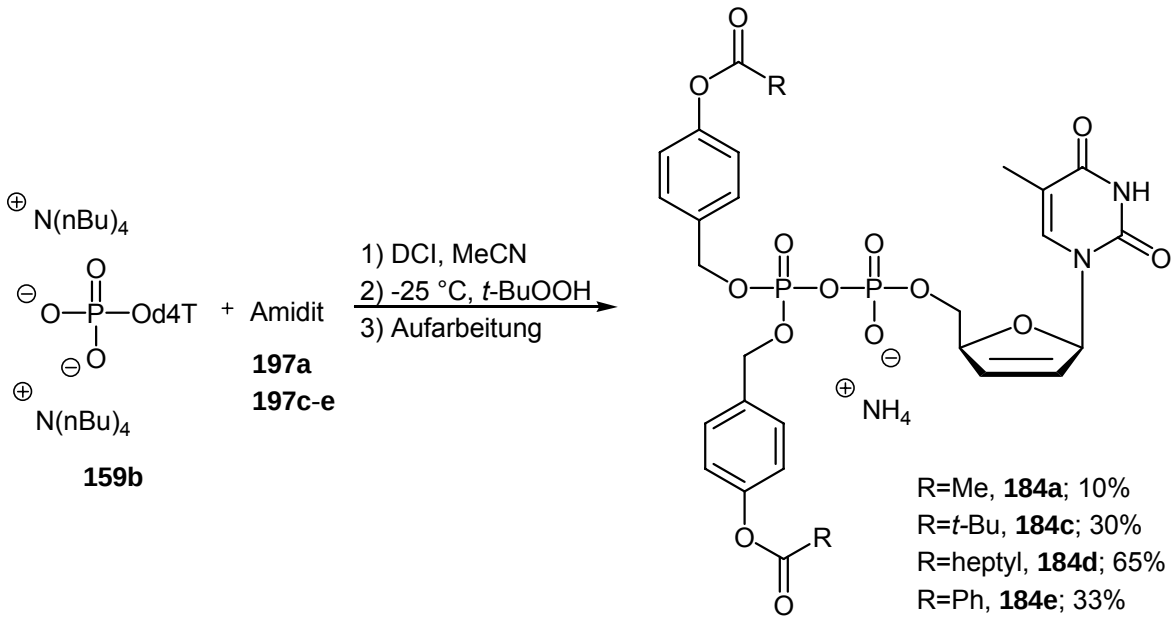
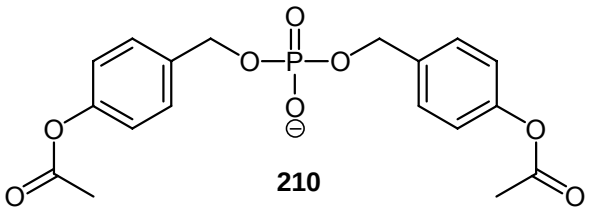


Abb. 149: Synthese der Zielverbindungen **184a**/**c-e**

Als erste Verbindung wurde Ammonium-BAB-d4TDP **184a** dargestellt, daher verwundert die Ausbeute von 10% nicht unbedingt. Zur Synthese der Verbindung sollte das Nucleotid **159b** mehrere Stunden über Molsieb 0.3 nm in Acetonitril getrocknet werden, praktischerweise sollte dies in einem mit Molsieb befüllten Tropftrichter auf dem Reaktionskolben geschehen, von dem die getrocknete Lösung in den Kolben abgelassen werden kann. Bei der Synthese von **184a** wurde dieser Schritt allerdings ausgelassen, wohl ein Grund für die niedrige Ausbeute. Nachfolgend sollte das Nucleotid **159b** mehrfach mit Acetonitril coevaporiert werden, bis ein farbloser Schaum entstanden ist. An diesem Punkt sollten der Inhalt des Kolbens durch Wiegen bestimmt und die einzusetzenden Mengen der Reagenzien berechnet werden. Bei der Synthese von **184a** wurden noch 1.0 Äq. Amidit **197a** eingesetzt, als guter Wert stellten sich hinterher 1.6 bis 2.0 Äquivalente heraus. Weiterhin wurden die Ausbeuten besser, wenn das Amidit in zwei Chargen zugegeben wurde, etwa eine halbe Stunde nach der ersten Zugabe sollte die zweite Zugabe erfolgen. Vom DCI sollten stets 0.1 Äquivalente mehr als vom Amidit verwendet werden, bei portionierter Zugabe des Amidits sollte auch DCI portioniert

werden. Die Kupplungsreaktion erfolgte relativ schnell, nach etwa 30 min war das Amidit verbraucht. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid bei -25 °C und zwar stets der Menge an zugegebenem Amidit entsprechend. Mit diesem Protokoll lassen sich die einzelnen Verbindungen recht verlässlich in Ausbeuten zwischen 30% bis 50% darstellen, was für diese komplexen Verbindungen ein großer Erfolg ist. Oftmals war die Reaktionsausbeute wesentlich besser, aber bei der Reinigung mussten zahlreiche Mischfraktionen verworfen werden. Der Hauptgrund hierfür ist ein Nebenprodukt der Reaktion, das im Fall der ersten Synthese von **184a** isoliert und charakterisiert wurde.



210

Abb. 150: Nebenprodukt BAB-Phosphat **210**

Diese Nebenprodukte entstanden in allen Reaktionen. Je größer der Überschuss an Phosphoramidit, desto größer waren auch die Mengen des Nebenproduktes. In manchen Fällen war die Abtrennung durch RP-18 Chromatographie ausgesprochen schwierig, weswegen auch andere Trennmethoden untersucht wurden. Es führten aber weder Normalphasenchromatographie, Größenausschlusschromatographie, Extraktionen noch Kristallisationsversuche zum Ziel. Es war daher manchmal von Vorteil, geringere Mengen Amidit einzusetzen, da sich unverbrauchtes Edukt wesentlich leichter abtrennen ließ, als z.B. das Nebenprodukt **210**. Bei der Synthese von **184d** wurde eine Ausbeute von 65% erzielt, allerdings waren hier noch etwa 5% des entsprechenden Zersetzungsproduktes BOB-Phosphat enthalten. Das ist dennoch eine beachtlich hohe Ausbeute, die zeigt, dass die schrittweise Reaktionsoptimierung ausgesprochen erfolgreich war. Ein geeignetes Vorgehen zur Reinigung, das sich in vielen Fällen als erfolgreich herausstellte, soll nun kurz skizziert werden. Es scheint aber so zu sein, dass jede Verbindung ihre eigene Behandlung benötigt, so dass dies nur als grobe Richtschnur zu betrachten ist.

Nach dem Ende der Reaktion sollte das Reaktionsgemisch bei hinreichend kleinem Lösungsmittelvolumen (ca. 1.5 mL Acetonitril) direkt auf eine RP-18 Umkehrphase gegeben werden, die mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol 1:1 konditioniert

ist. Die Elution mit Wasser/Methanol 1:1 entfernt zunächst nicht umgesetztes Nucleotid und DCI. Nachdem diese beseitigt sind, sollte schrittweise der Methanolanteil erhöht werden. Wenn Mischfraktionen erhalten werden, sollten diese über Dowex (NH_4^+) in das entsprechende Ammoniumsalz übergeführt werden. Später wurde beobachtet, dass bei einem Ionentausch oft etwa 5% Hydrolyse der Anhydridbindung auftrat, weswegen dieser Schritt, sollte er vermeidbar sein, nicht empfehlenswert ist. Nichtsdestoweniger lassen sich die Ammoniumsalze der Verbindungen wesentlich besser chromatographieren. Die Trennung mit Methanol verläuft generell besser, als mit Acetonitril, manchmal jedoch sollte auch Acetonitril verwendet werden. Manche der Verbindungen wurden auch an der präparativen HPLC (RP-18) getrennt, dabei konnten für kleine Mengen (ca. 2 bis 4 mg) teils gute Ergebnisse erzielt werden, bei größeren Mengen um 20 mg versagte diese Methode jedoch zuverlässig vollständig. Es soll später noch auf ein Trennverfahren hingewiesen werden, welches bei einem der Prodrugs sehr erfolgreich war, bei den oben gezeigten Verbindungen **184a**/**c**-**e** aber nicht mehr untersucht wurde.

Es soll nun auf die Synthese der AZTDP-Prodrugs **185a**-**c**/**e** eingegangen werden. Details zu den Synthesen sind im Experimentalteil zu finden.

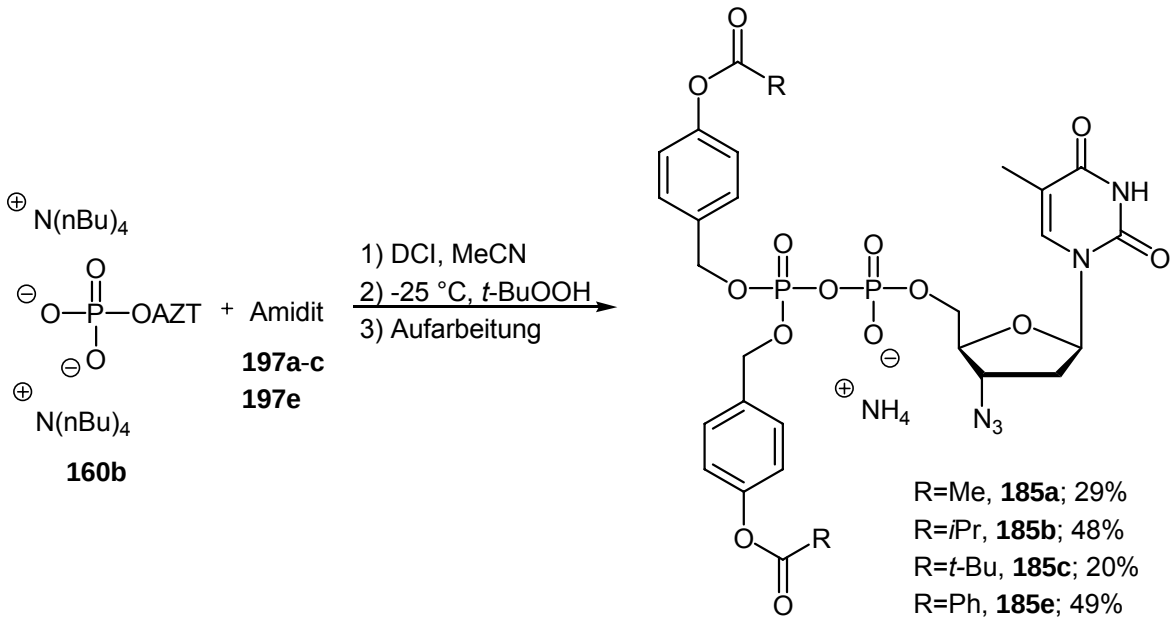


Abb. 151: Synthese der Zielverbindungen **185a**-**c**/**e**

Für alle diese Synthesen gelten prinzipiell die oben getroffenen Aussagen. Die Ausbeuten lagen zwischen den bereits beschriebenen 30% bis 50%, stets begleitet

von erheblichen Verlusten durch Mischfraktionen, die teilweise mehrfach aufgearbeitet wurden, aber nie in eine gänzlich reine Form gebracht werden konnten. Ein besonders extremes Beispiel stellte die Verbindung **185c** dar, die sich als ausgesprochen schwierig zu chromatographieren erwies. Trotz viermaliger RP-18 Gradientenchromatographie mit verschiedenen Lösungsmitteln, dreifachem Ionenaustausch, Sephadex-Chromatographie und Chromatographie an der präparativen HPLC konnten nur 20% der Verbindung in reiner Form erhalten werden, entsprechend etwa 30 mg **185c**. Die Mischfraktionen umfassten hingegen etwa 120 mg, in denen das Produkt zu über 60% auftrat. Wenn dies vollständig isoliert worden wäre, entspräche das einer Gesamtausbeute um 70%. Aufgrund dieser Erfahrungen und um eine Beschleunigung der Synthese allgemein zu erreichen, wurde überprüft, ob die Reaktion zur Darstellung von **185c** eventuell auch ohne Tetra-*n*-butylammonium-Gegenionen durchgeführt werden könnte, also ob es möglich wäre, statt dem Nucleotid **160b** das Ammoniumsalz **160a** zu verwenden. Um das Salz **160a** zu lösen, wurde die Reaktion in DMF anstelle von Acetonitril durchgeführt. Die ^{31}P-NMR-spektroskopische Analyse ergab zwar, dass das Produkt **185c** entstanden war, der Reaktionsumsatz war aber bei weitem nicht so vielversprechend, wie bei Verwendung des Nucleotids **160b**. Angemerkt sei auch noch, dass BBB-AZTDP **185e** hauptsächlich als Tetra-*n*-butylammoniumsalz isoliert wurde (46%) und nur zu 3% als Ammoniumsalz, welches aus Mischfraktionen stammte, die erst umgesalzen und dann an der präparativen HPLC gereinigt wurden. Die Verbindung BOB-AZTDP **185d** konnte aus Zeitgründen nicht mehr dargestellt werden.

Wenden wir uns nun der Synthese von BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190** zu. Bei dieser Umsetzung traten einige Besonderheiten auf, die eine Isolierung in vollständig reiner Form leider unmöglich machten. Die Verbindung konnte allerdings bis zu einer Reinheit von etwa 80% angereichert werden (entnommen dem ^{31}P-NMR-Spektrum). Die Synthese wurde wie oben beschrieben durchgeführt, bei der Reinigung wurde allerdings ein neues Verfahren ausprobiert. Dies soll nach der Reaktionsgleichung diskutiert werden.

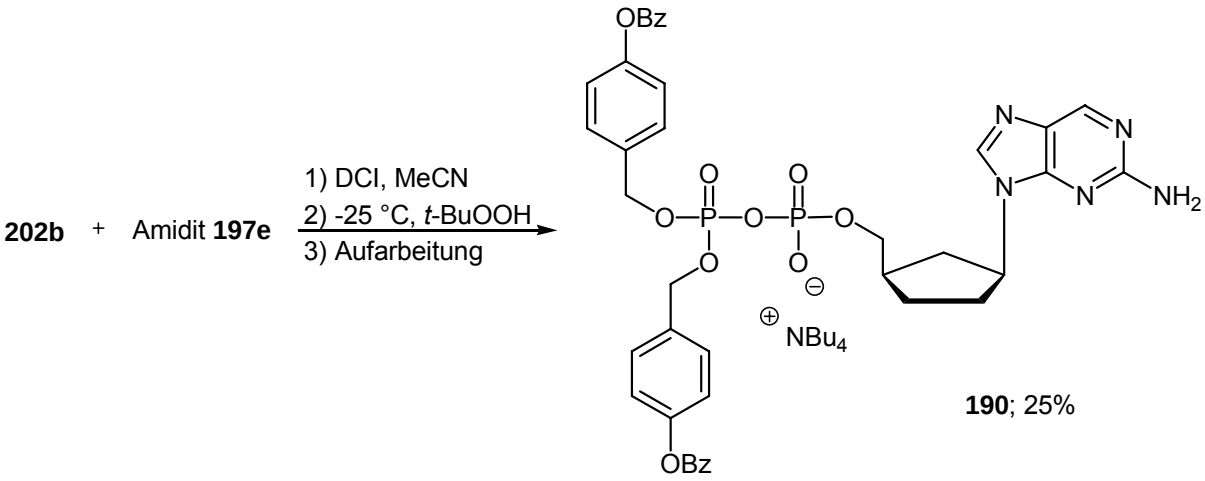


Abb. 152: Synthese der Zielverbindung **190**

Zunächst einmal sei angemerkt, dass Prodrug **190** hauptsächlich als Tetra-*n*-butyl-Ammoniumsalz isoliert wurde, dass nicht vollständig rein war. Die Dünnschichtchromatographien, sowohl Normalphase, als auch Umkehrphase, zeigten eine Verunreinigung mit fast identischem R_f-Wert, bei welcher es sich um die nachfolgend abgebildete Verbindung handelte. Dies wird im nächsten Abschnitt detailliert dargelegt werden.

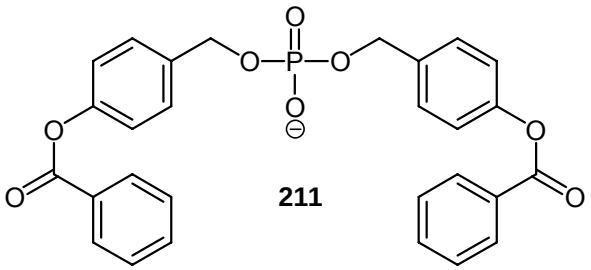


Abb. 153: BBB-Phosphat **211** (vergleiche BAB-Phosphat **210**, Abb. 150)

Es schien nun unmöglich, diese Verunreinigung vollständig abzutrennen, weshalb bei der RP-18 Chromatographie sehr kleine Fraktionen gesammelt wurden. Jede der Fraktionen wurde nun an der analytischen HPLC untersucht und die Fraktionen mit dem geringsten Anteil an Verunreinigung vereint. Dadurch war die oben erwähnte Anreicherung bis zu 80% bei einer Ausbeute von 25% möglich. Andererseits war dieses Ergebnis natürlich nicht zufriedenstellend. Wegen der geringen Unterschiede in den R_f-Werten war klar, dass die Trennung an der präparativen HPLC vorgenommen werden müsste. Da aber an der analytischen HPLC die beiden Produkte **190** und **211** nicht basisliniengetrennt vorlagen, musste die Trennleistung noch erhöht werden. Es wurde weiter oben bereits erwähnt, dass sich Tetra-*n*-

butylammonium-Kationen nachteilig auf das Elutionsverhalten der Verbindungen auswirkten. Da andererseits bei einem Ionentausch stets etwas Zersetzung eintrat, die wiederum zu mehr Produkt **211** geführt hätte, sollten nun Ionentausch und Trennung vereint werden. Dazu wurden etwa 5 mg **190** an der präparativen HPLC (RP-18) mit einem 40 mM Ammoniumformiat-Puffer in H_2O und Acetonitril im Verhältnis 1:1 chromatographiert. Bei der anschließenden Gefriertrocknung wurde der überschüssige Puffer im Vakuum als Ammoniak und Ameisensäure entfernt. Tatsächlich konnte auf diese Weise das BBB-Prodrug **190** noch einmal deutlich angereichert werden. Zugleich wurde sie in das entsprechende Ammoniumsalz übergeführt. Dies kann dem nachfolgend abgebildeten ^{1}H-NMR-Spektrum entnommen werden. Eine vollständige Reinigung konnte auf diese Weise jedoch nicht erreicht werden, was aber andere Ursachen hatte, als das Versagen dieser Trennmethode. Es waren immer noch etwa 10% an BBB-Phosphat **211** und *carba-iso*-ddAMP **202a** enthalten. Die Bereiche, wo normalerweise die *n*-Butyl-Signale auftreten, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Man erkennt, dass ein vollständiger Austausch stattgefunden hat.

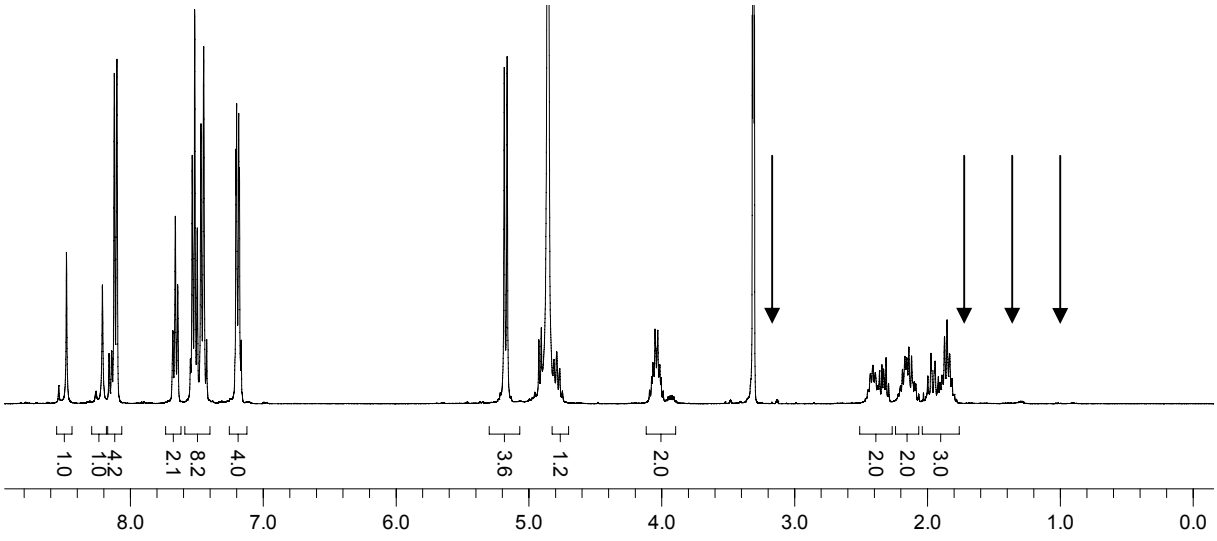


Abb. 154: ^{1}H-NMR-Spektrum von **190** in CD_3OD

Dieses Ergebnis war ausgesprochen erfreulich, zeigte es doch einen Ausweg aus der Misere, dass ein Ionentausch zwar oftmals nötig, jedoch auch immer mit Zersetzung verbunden war. Leider wurde diese Entdeckung erst bei der letzten dargestellten Verbindung gemacht.

Weiterhin sollte das folgend abgebildete Phosphonat-Prodrug **207c** dargestellt werden. Dies war die einzige Synthese von BAB-Prodrugs, die nicht gelang. Warum

dies der Fall gewesen sein könnte, soll erst im nächsten Abschnitt diskutiert werden. Zunächst sei schlicht festgehalten: Weder im Dünnschichtchromatogramm noch direkt nach dem Ende der Reaktion im ^{31}P-NMR-Spektrum konnten Spuren des Produktes **207c** gefunden werden.

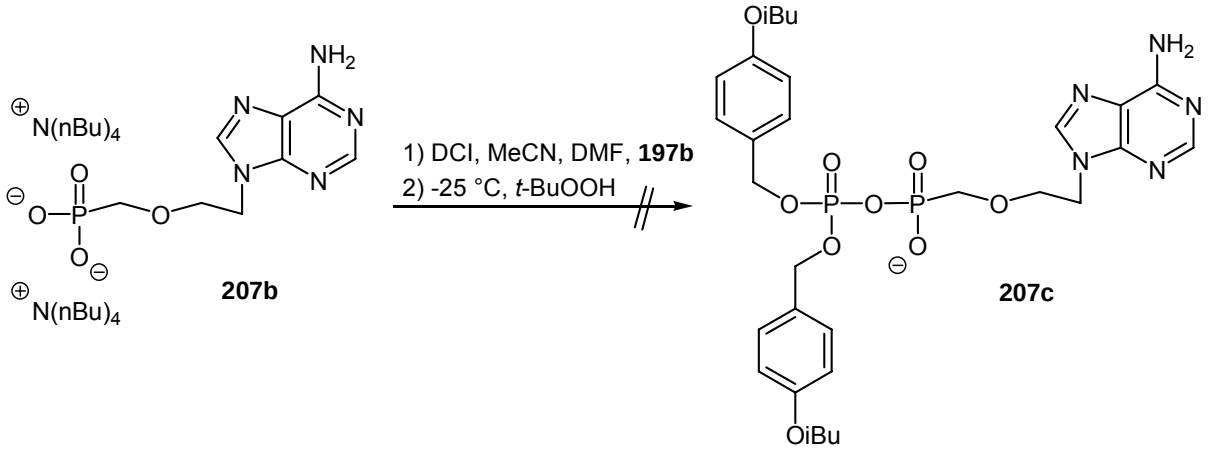


Abb. 155: Versuch der Synthese von **207c**

Als letzte BBB-Prodrugs sollten die BVdU-Derivate **188** und **189** dargestellt werden.

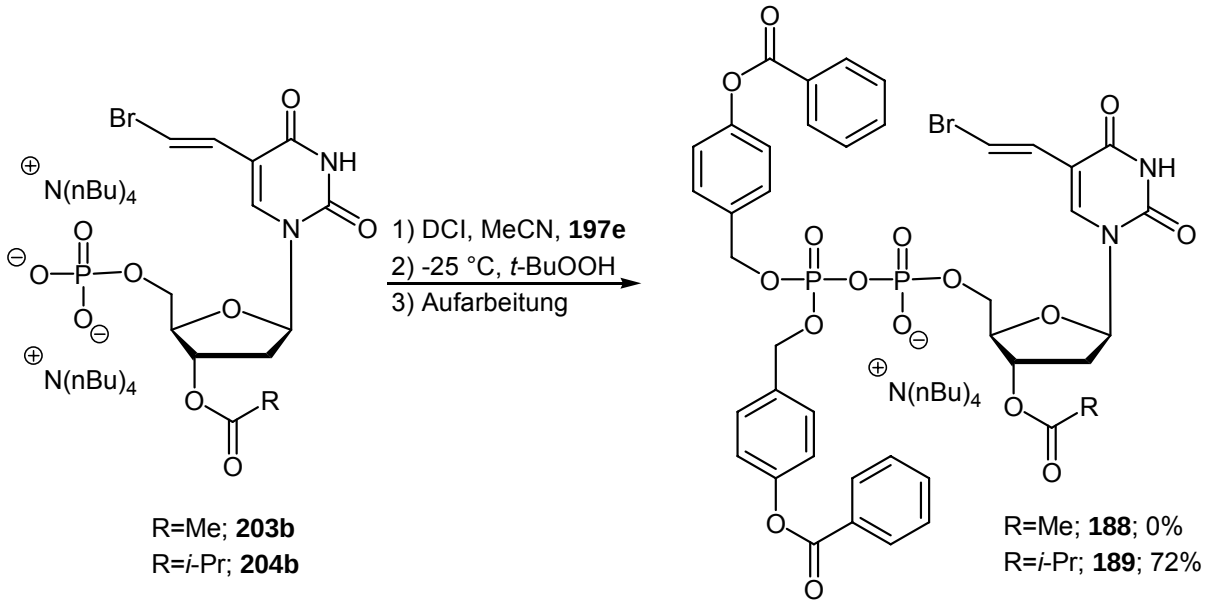


Abb. 156: Synthese der BBB-BVdUDP-Derivate **188** und **189**

Trotz 0% Ausbeute für **188** muss hier angemerkt werden, dass das Produkt **188** entstanden war. Zwar konnte **188** am Ende nicht isoliert werden, es wurde aber in den ^{31}P-NMR-Spektren nachgewiesen. Es konnte jedoch nach der zweiten Chromatographie in den einzelnen Fraktionen nicht mehr gefunden werden. Dies

mag daran gelegen haben, dass der Reaktionsansatz mit 53 μmol relativ klein war. Ganz im Gegensatz dazu konnte Tetra-*n*-butylammonium-BBB-3´-*O*-*i*Bu-BVdUDP **189** in einer ganz außergewöhnlich guten Ausbeute von 72% mit nur geringfügigen Verunreinigungen isoliert werden. Dies ist der sehr geringen Polarität der Verbindung geschuldet, so dass das Nebenprodukt BBB-Phosphat **211** im Vergleich zu anderen Synthesen leicht abgetrennt werden konnte. Um die restlichen Verunreinigungen zu entfernen und gleichzeitig einen Ionentausch zu erreichen, wurden 20 mg (16 μmol) der Substanz **189** über eine RP-18 Säule mit 0.40 M Ammoniumformiat-Puffer in H_2O (2 Teile), verdünnt mit Acetonitril (3 Teile) chromatographiert. Damit betrug die Pufferkonzentration etwa 0.25 mol/L, also ein etwa zehnfacher Überschuss Puffersalz pro mL, verglichen mit der zu trennenden Substanz (geht man davon aus, dass diese in einem Volumen von 1 mL eluiert). Das erhaltene ^{1}H-NMR-Spektrum in MeOD zeigte jedoch fast keinen Austausch der Kationen an.

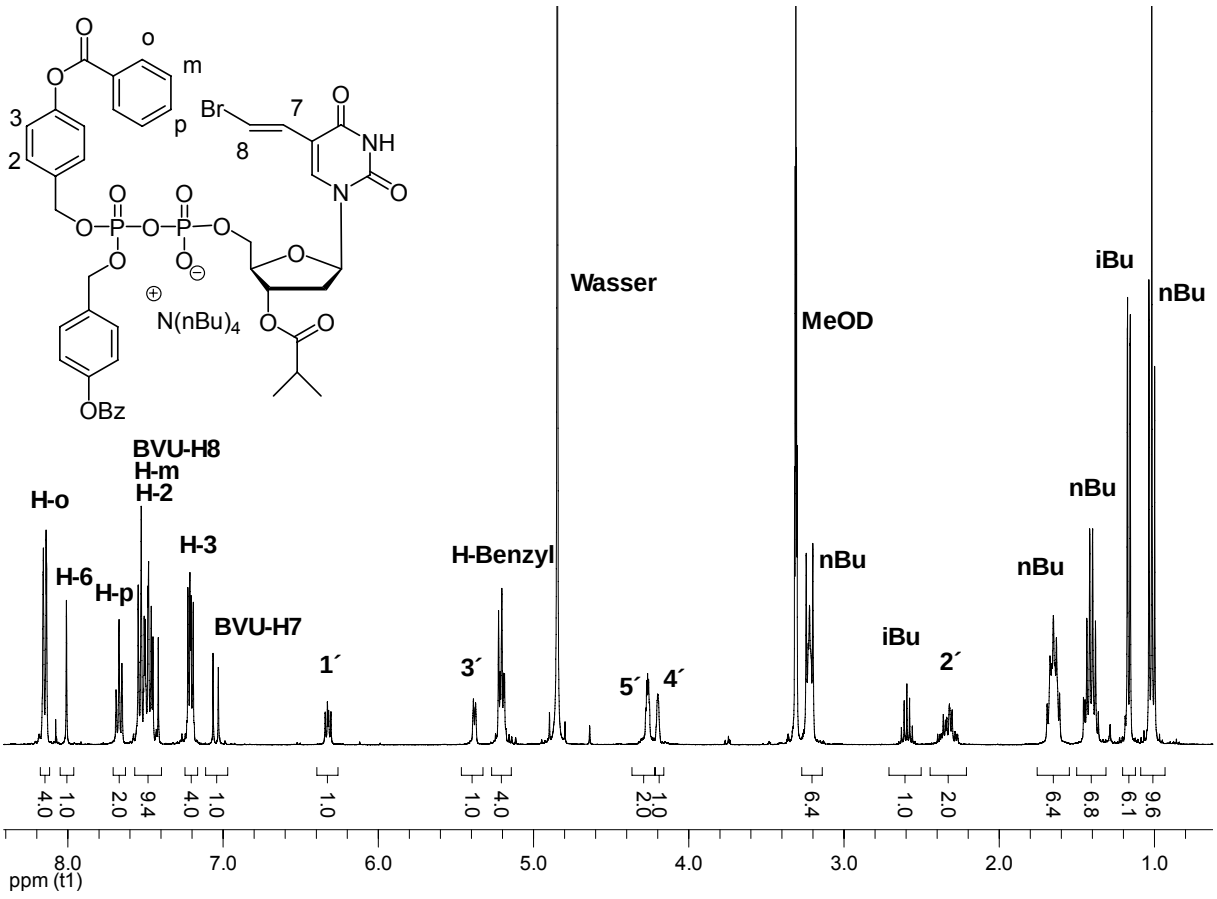


Abb. 157: ^{1}H-NMR-Spektrum von Tetra-*n*-butylammonium-BBB-3´-*O*-*i*Bu-BVdUDP **189**

Dennoch konnte Tetra-*n*-butylammonium-BBB-3´-*O*-*i*Bu-BVdUDP **189** auf diese Weise vollständig gereinigt werden, wie dem ^{1}H-NMR-Spektrum entnommen werden kann. Damit ist die Chromatographie mit Ammoniumformiat-Puffer auch für Normaldruck-Chromatographie von größeren Mengen geeignet und stellt eine echte Bereicherung für die Isolierung von BAB-NDP-Prodrugs dar. Ob die hohe Ausbeute neben der erleichterten Chromatographie auch darauf zurückzuführen war, dass erstmals in der Reaktion **204b** nur mit 1.7 anstelle von 2.0 Gegenionen (N-*n*Bu$_4$) eingesetzt wurde, blieb unklar. Es ist aber nicht auszuschließen, dass dies ein weiterer Parameter zur Optimierung der Synthesen ist.

Im Rahmen der Kupplungsreaktionen sollte nun noch eine letzte Synthese durchgeführt werden.

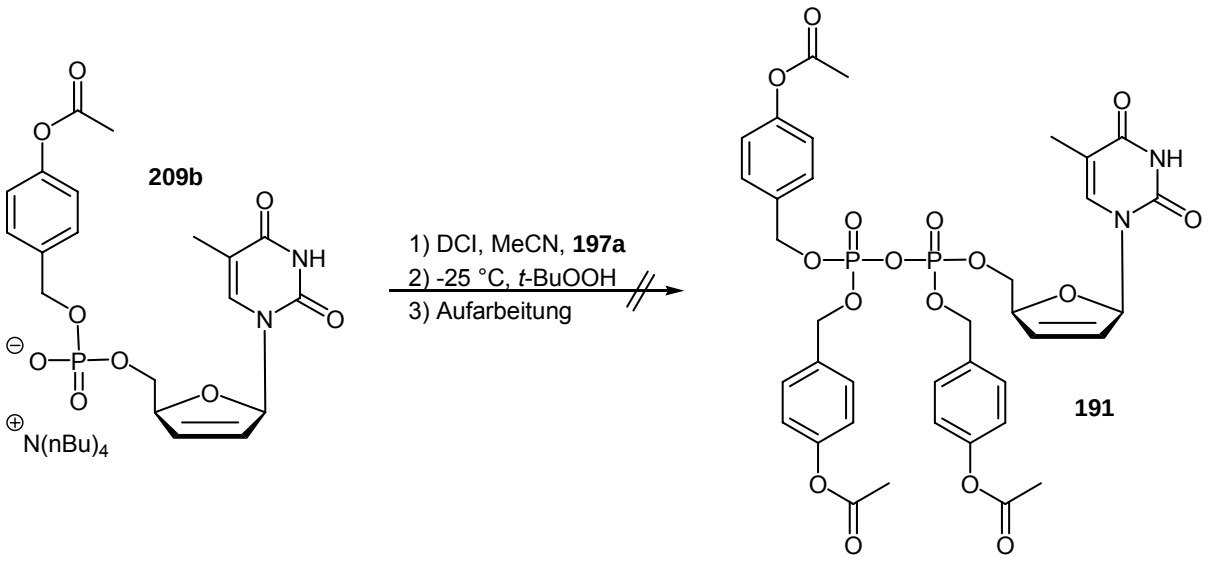
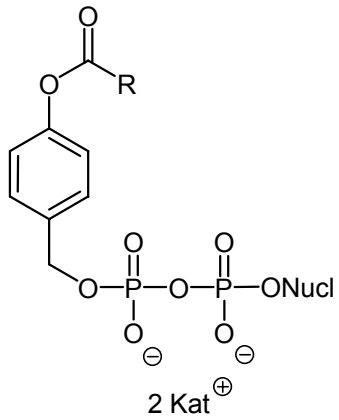


Abb. 158: Versuch der Synthese von TAB-d4TDP

Wie bereits diskutiert, scheinen solche dreifach substituierten Diphosphate instabil zu sein, vermutlich, da eine Hydrolyse durch Hydroxidionen durch die maskierten negativen Ladungen nicht mehr abgewehrt werden kann. Damit zeigt sich, dass bei der Darstellung von NDP-Prodrugs zumindest eine negative Ladung der Pyrophosphatbrücke unmaskiert verbleiben muss. Die notwendige Einstellung der Polarität der Verbindungen kann aber immer noch über die Art der Phenylester erfolgen. Dies ist ein Vorteil der BAB-NDP, da bei der Verwendung von z.B. POM als Maskierungsfunktion keine weitergehenden Modifikationen eingeführt werden könnten.

Es sollten nun noch zwei der intermediär auftretenden monosubstituierten Prodrugs dargestellt werden. Erfreulicherweise konnten die Verbindungen aus den Analytiklösungen für die Hydrolyseverfolgung durch ^{31}P-NMR-Spektroskopie isoliert werden, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden soll. Es ist daher etwas schwierig, eine Ausbeute für die Reaktionen anzugeben. Weil die Intermediate aller Verbindungen später noch diskutiert werden müssen, sollen sie hier schon einmal zur Zuweisung einer Nummer und eines Namens abgebildet werden.



R=Me; Nucl= AZT; **186**; ca. 80%
R=*i*Pr; Nucl= AZT; **212**
R=*t*Bu; Nucl= AZT; **213**
R=Ph; Nucl= AZT; **214**
R=Me; Nucl= d4T; **215**
R=*t*Bu; Nucl= d4T; **216**
R=heptyl; Nucl= d4T; **217**
R=Ph; Nucl= d4T; **187**; ca. 55%
R=Ph; Nucl= 3´-*O*-*i*Bu-BVdU; **218**
R=Ph; Nucl= *carba*-*iso*-ddA ; **219**

Abb. 159: Postulierte Hydrolyse-Intermediate der BAB-NDP

Da für die Hydrolysen etwa 11 μmol der Verbindungen eingesetzt wurden, entsprechend etwa 7 bis 10 mg, konnten von AB-AZTDP **186** und BB-d4TDP **187** auch nur recht geringe Mengen isoliert werden (um 4 mg). Weil weiterhin die Hydrolyse in PBS pH = 7.3 durchgeführt wurde, ist über die Gegenionen wenig bekannt, außer dass es sich sehr wahrscheinlich um Natriumionen oder Kaliumionen handelt, die im PBS enthalten sind. Nach dem Ansetzen der Hydrolysen wurde der Fortschritt ^{31}P-NMR-spektroskopisch in verschiedenen Abständen analysiert. Zum geeigneten Zeitpunkt, also wenn die Hydrolyse zu den Intermediaten abgeschlossen war, wurden die Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt und der Rückstand durch RP-18 Chromatographie gereinigt. Zur Isolierung von AB-AZTDP **186** war dieser Zeitpunkt nach einer Woche erreicht, BB-d4TDP **187** wurde erst nach drei Monaten entsprechend aufgearbeitet. Dies ist eines Kommentars würdig: Selbst nach drei Monaten unter den chemischen Hydrolysebedingungen war das Edukt BBB-d4TDP **184e** nicht vollständig umgesetzt, was dessen außergewöhnliche Stabilität unterstreicht. Beide Verbindungen wurden durch ^{1}H-, ^{31}P- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie vollständig charakterisiert. Von AB-AZTDP **186** gelang die Messung eines hochaufgelösten ESI$^-$-Spektrums, dass die Masse als $(M+H)^-$ ergab (berechnet:

574.074; gefunden 574.076). BB-d4TDP wurde durch niederaufgelöste Massenspektrometrie als $(M+H)^-$ nachgewiesen (berechnet: 593.1; gefunden 593.2). Damit war nicht nur zunächst ein Teil des Hydrolysemechanismus aufgeklärt, vielmehr standen die Verbindungen nun auch als Referenz für HPLC-Messungen zur Verfügung.

Damit mussten nun noch entsprechende NDP synthetisiert werden, um HPLC-Referenzen zur Verfügung zu haben. Dies wurde freundlicherweise von Tillman Schulz erledigt, zumindest für d4TDP **83d** und AZTDP **222**.

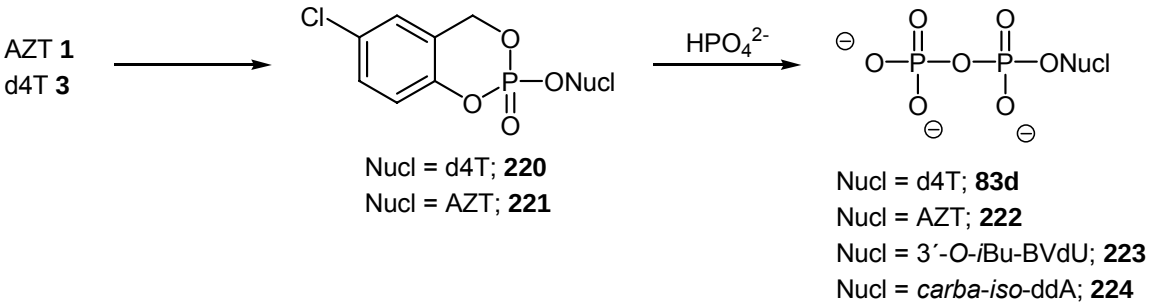


Abb. 160: Synthese der NDP-Referenzen **83d** und **222**

Die oben gezeigte Methode wurde von Svenja Warnecke entwickelt und ermöglicht einen sehr effizienten Zugang zu verschiedensten Nucleosidpolyphosphaten.[117] Prinzipiell wird ein akzeptorsubstituiertes *cyclo*Sal-NMP, in diesem Fall die Triester **220** und **221**, mit Phosphat als Nucleophil geöffnet. Dadurch werden die NDP in etwa 50%iger Ausbeute freigesetzt. Dieses Vorgehen war auch für die Synthese von d4TDP **83d** und AZTDP **222** erfolgreich, so dass nun genügend Referenzverbindungen zur Hand waren, um die Hydrolyseeigenschaften von BAB-NDP-Prodrugs durch NMR- und HPLC-Analytik sowie Massenspektrometrie aufzuklären.

Als kurze Zusammenfassung dieses synthetischen Abschnitts sollen noch einmal einige Besonderheiten hervorgehoben werden. Zunächst sei festgehalten, dass alle für die Kupplungsreaktionen benötigten Edukte in guter bis sehr guter Ausbeute in größeren Mengen dargestellt werden konnten. Dabei sind die NMP prinzipiell in einem synthetischen Schritt darstellbar, die Phosphoramidite in zwei Schritten. Es ist auf die durchgeführte Weise also sehr schnell Zugang zu den recht komplexen BAB-NDP zu erlangen und das in offensichtlich hervorragenden Ausbeuten, die nur durch

die Reinigung vermindert wurden. Für den Umgang mit den recht komplexen chromatographischen Trennungen und den Ionenaustausch-Chromatographien konnten verlässliche Protokolle entwickelt werden. Dabei wurden im Vergleich zu den zunächst durchgeführten Synthesen und Reinigungen die Wege verkürzt, optimiert und weitere Optimierungsmöglichkeiten aufgezeigt. So sollte z.B. eine wesentliche Verkürzung der Chromatographien bei der Synthese von NMP durch Fällung von Phosphat mit Bariumacetat erreicht werden können. Der Ionentausch von Ammonium gegen Tetra-*n*-butylammonium muss zudem nicht mehr durch Elution über einen Ionentauscher erfolgen, sondern kann durch direkte Zugabe von Tetra-*n*-butylammonium-Hydroxid erreicht werden. Weiterhin kann die Reinigung der BAB-NDP durch Umkehrphasenchromatographie mit Ammoniumformiat-Puffer erheblich vereinfacht werden und führt teilweise zu einem Austausch der Gegenionen, so dass eine weitere Ionenaustausch-Chromatographie vermieden wurde. All dies zusammengenommen konnte die Synthese der BAB-NDP, die zunächst mehrere Wochen in Anspruch nahm, auf ca. eine Woche verkürzt werden.

6.3.3 Charakterisierung von BAB-NDP-Prodrugs

In diesem Abschnitt werden die Zersetzungsmechanismen von BAB-NDP-Prodrugs in unterschiedlichen Medien untersucht. Da fast jede der Verbindungen ein eigenes Verhalten aufwies, wird die übersichtliche Darstellung der Ergebnisse etwas erschwert. Zunächst soll vorweggenommen werden, dass die Hydrolyse abhängig war vom verwendeten Medium, von Zusätzen zu diesem Medium, vom Nucleosid, von der Temperatur und vom Acylrest der BAB-Modifikation. Generell wurde für jedes BAB-NDP-Prodrug auf folgende Weise vorgegangen:

1. Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ bei verschiedenen pH-Werten (2.0, 6.8, 7.3 und 8.7) in unterschiedlichen .
2. Bestimmung der Hydrolyseprodukte, die bei der chemischen Hydrolyse entstanden, durch ^{31}P-NMR-Spektroskopie und durch Auswertung der HPL-Chromatogramme unter Verwendung der synthetisierten Referenzverbindungen.
3. Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ in verschiedenen biologischen Medien (CEM/0, Blutplasma, P3HR1, RPMI-Nährmedium, FCS).

4. Bestimmung der Hydrolyseprodukte, die bei der enzymatischen Hydrolyse entstanden, hauptsächlich durch Auswertung der HPL-Chromatogramme und in einem Fall durch Massenspektrometrie.
5. Vergleich der Ergebnisse mit anderen BAB-NDP-Pronucleotiden.

In Abbildung 134 wurde der Hydrolysemechanismus für die BAB-NDP-Pronucleotide postuliert. Dass dieser Mechanismus tatsächlich prinzipiell zutreffend ist, soll zunächst am Beispiel von BAB-AZTDP **185a** gezeigt werden. Damit wird zugleich offenbar, dass die Hydrolyse auch pH abhängig und nicht nur in Gegenwart von Esterasen eingeleitet wird. Es wurden 11 μmol der Substanz in DMSO-d_6 gelöst, mit PBS pH = 7.3 versetzt und die Hydrolyse ^{31}P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Es ergab sich folgendes Bild der chemischen Hydrolyse:

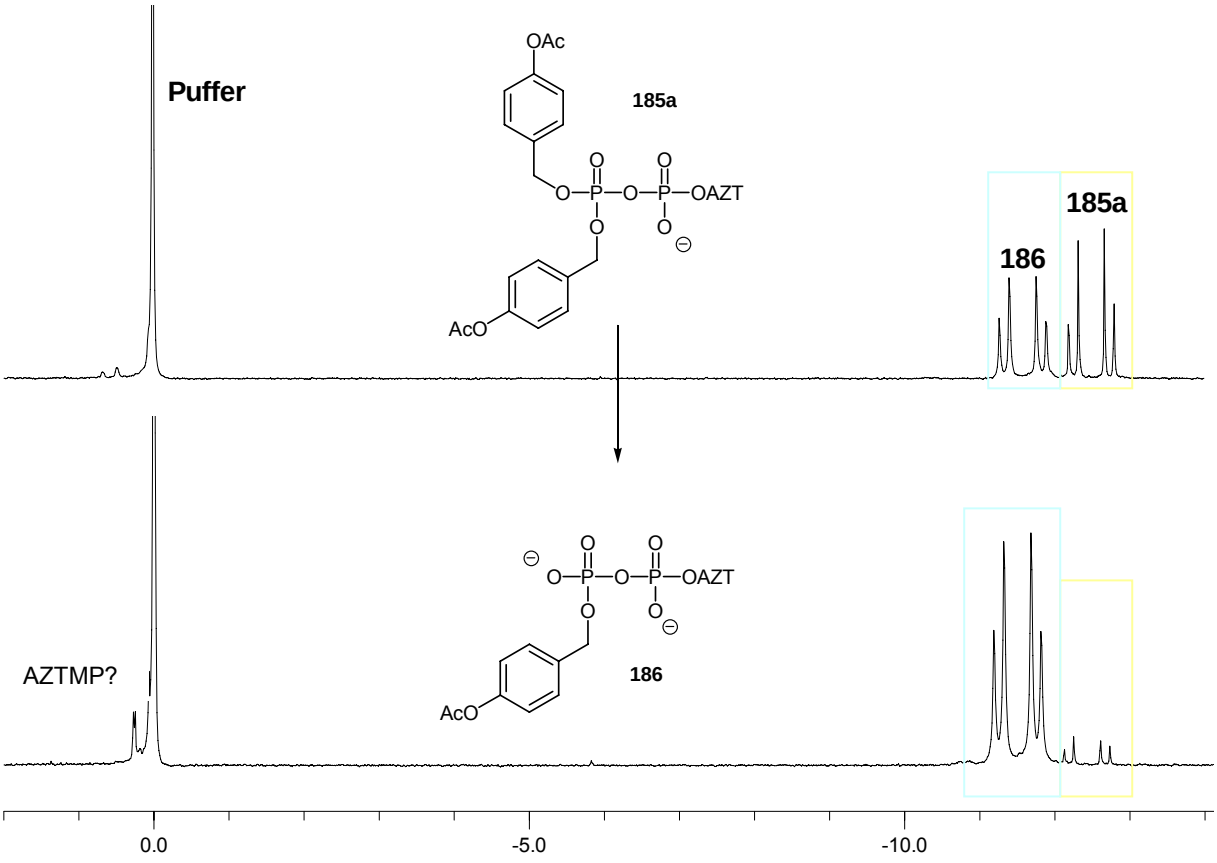


Abb. 161: Chemische Hydrolyse von BAB-AZTDP **185a** zu AB-AZTDP **186** (oben nach 12 h, unten nach 4 d); Ausschnitte aus den ^{31}P-NMR-Spektren (^{1}H-entkoppelt).

Die NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse zeigt eindeutig die präferentielle Entstehung von **186** aus **185a**. Wenn überhaupt eine Spaltung der Anhydridbindung zu AZTMP eintrat, dann in einem nur untergeordneten Maß. Diese

Hydrolyse verlief erstaunlich einheitlich und zeigt, dass das Konzept prinzipiell aufgeht. An diesem Punkt wurde die Hydrolyse unterbrochen und das Intermediat **186** durch Umkehrphasenchromatographie isoliert. Hierdurch konnte die Entstehung von **186** bewiesen werden. Die Signalform ergibt sich aus folgenden Überlegungen: Zwei unterschiedliche Phosphoratome sollten zwei verschiedene Signale erzeugen, die je durch P-P-Kopplung zu Dubletts aufspalten. Die Zuweisung der einzelnen Signale konnte für BAB-AZTDP **185a** durch ^{31}P-^{1}H-Korrelationsspektroskopie erreicht werden.

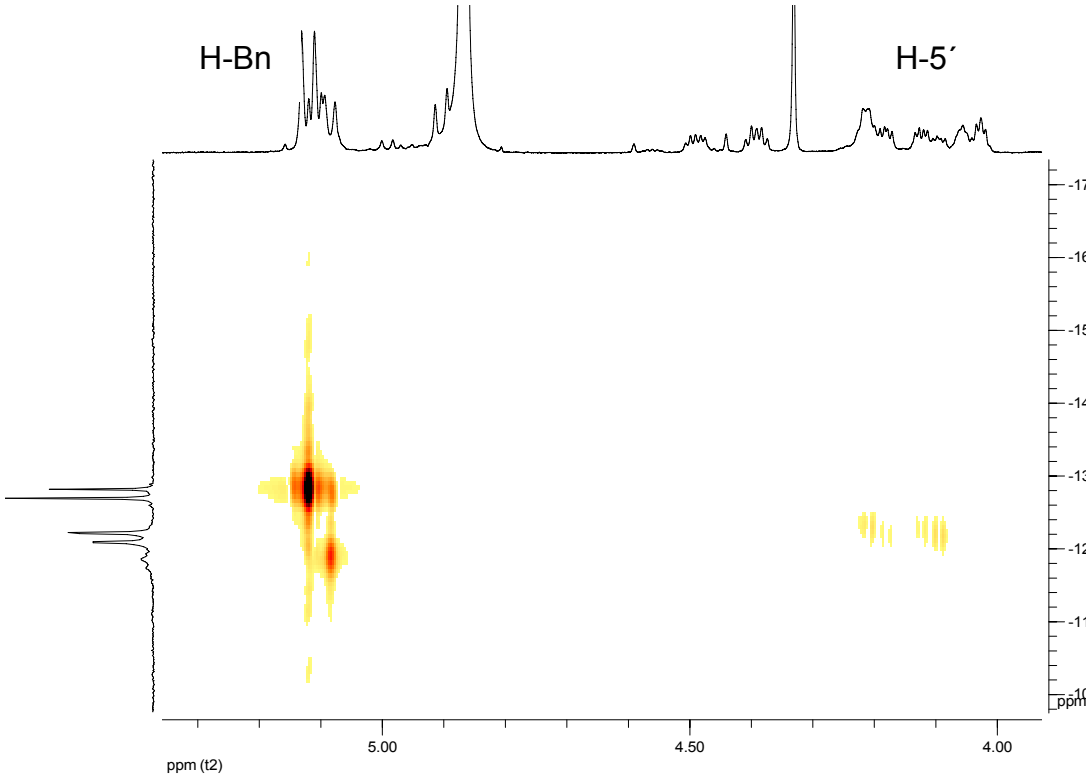


Abb. 162: Ausschnitt aus dem ^{31}P-^{1}H-Cosy von **185a** zur Zuweisung von P-α und P-β

Die Ergebnisse dieser Korrelation wurden auf alle weiteren Verbindungen übertragen. Auf der ^{31}P-Achse erkennt man bereits eine anteilige Hydrolyse der Verbindung. Dies lag daran, dass eine recht lange Zeit vom Lösen der Probe bis zur eigentlichen Messung verstrich. Man sieht dennoch eindeutig die Kopplung von P-α auf die 5´-Protonen sowie die Benzylprotonen und von P-β auf die Benzylprotonen.

Nachdem das Hydrolyse-Intermediat **186** eindeutig identifiziert war, wurde ein Teil davon erneut hydrolysiert. Nachfolgend ist der Endpunkt dieser Hydrolyse gezeigt. Dabei tritt ausgehend von **186** ausschließlich AZTDP **222** als Hydrolyseprodukt auf.

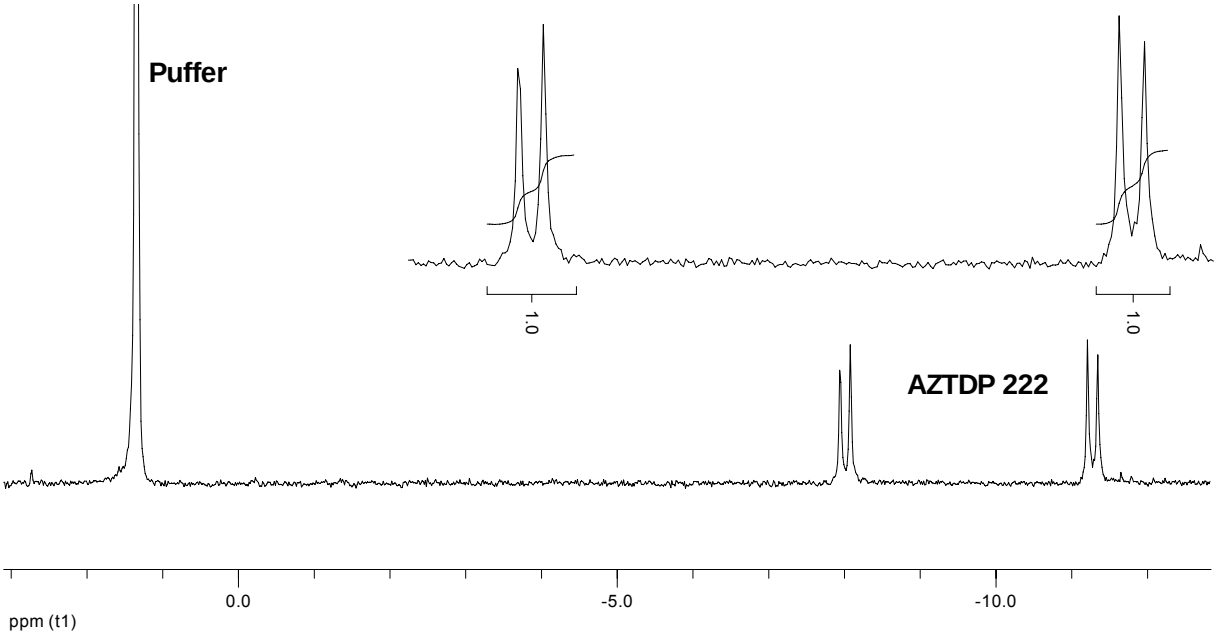


Abb. 163: Ausschnitt aus dem ^{31}P-NMR-Spektrum (^{1}H-entkoppelt) der Hydrolyse von **186** nach 8 Tagen zu **222**

Diese Hydrolyse verläuft selektiv. Es wird ausschließlich AZTDP **222** freigesetzt. Da sie langsamer verläuft, als die erste Hydrolyse, kann auch das Intermediat gut nachgewiesen werden. Dass in diesem Fall nicht einmal geringe Mengen AZTMP **160a** durch Hydrolyse der Anhydridbindung entstanden, wird an der zusätzlichen Ladung der Pyrophosphatbrücke liegen, welche die Zersetzung weiter erschwert. Mit diesen Ergebnissen lässt sich folgendes feststellen: Die chemische Hydrolyse von BAB-AZTDP **185a** verläuft über das Intermediat AB-AZTDP **186** unter abschließender quantitativer Freisetzung des Nucleotids AZTDP **222**. Dies ist, betrachtet man die vorherigen Ergebnisse mit *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs, ein ganz unglaublicher Erfolg, der sich bei der Analyse von BAB-d4TDP **184a** wiederholte.

Diese Ergebnisse sollten nun durch HPLC-Messungen untermauert und die Hydrolysehalbwertszeiten der Verbindungen bestimmt werden. Hierzu wurde ein neuer PBS-Puffer pH = 7.3 angesetzt, der sich scheinbar in der Konzentration von dem alten Puffer etwas unterschied, da leicht verlängerte Halbwertszeiten erhalten wurden. Die Vorgehensweise bei diesen chemischen Hydrolyse-Experimenten ist im Experimentalteil zu finden. Da auch die Abbauprodukte nachgewiesen werden sollten, wurde auf Ionenpaarchromatographie mit TBAH-Laufpuffer zurückgegriffen, wie eigentlich in allen folgenden Experimenten, da hier auch hochpolare Verbindungen auf der RP-18-Phase unterscheidbare Retentionszeiten ergeben. Aus diesem Grund wurde aber auf die Zugabe eines internen Standards verzichtet, da

Signalüberlagerungen vermieden werden sollten. Die erzielten Ergebnisse waren aber immer noch mit genügender Genauigkeit behaftet, wie später gezeigt werden wird.

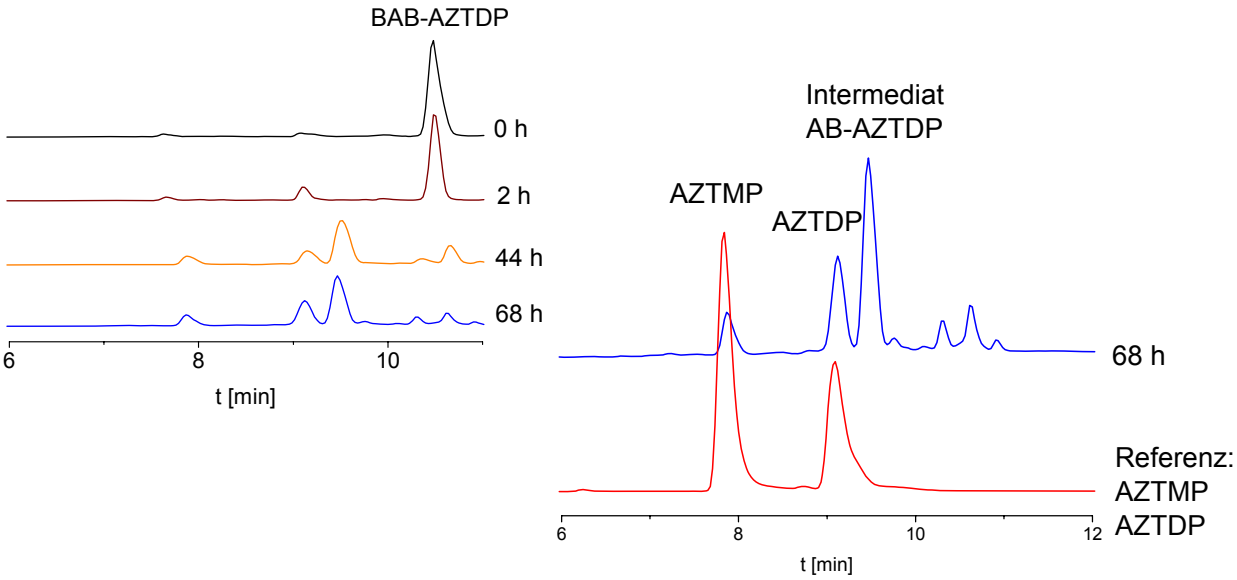


Abb. 164: Chromatogramme der chemischen Hydrolyse von **185a** nach t=0h bis t=68h (links); Vergrößerung des Chromatogramms der chemischen Hydrolyse nach t=68h und Zuordnung der Hydrolyseprodukte (rechts); Methode 4

Diesen Chromatogrammen war nun zu entnehmen, dass tatsächlich die Hydrolyse über das Intermediat **186** stattfindet und dass sowohl AZTDP **222**, als auch AZTMP **160a** entstehen. Die Hydrolyse von BAB-AZTDP **185a** zum Intermediat AB-AZTDP **186** verläuft mit einer Hydrolysehalbwertszeit von $t_{1/2}$ = 17 h. Für die Hydrolyse des Intermediats **186** wurde in einer separaten Messung $t_{1/2}$ = 107 h gefunden. Hier zeigte sich das gleiche Bild, wie in den vorher beschriebenen ^{31}P-NMR-Hydrolysestudien: Aus dem Intermediat AB-AZTDP **186** wurde ausschließlich AZTDP **222** freigesetzt. Das bedeutet, dass AZTMP **160a** nur durch die Hydrolyse der Anhydridbindung BAB-AZTDP **185a** entstehen kann und zwar umso mehr, je länger die Halbwertszeit des ersten Schrittes ist. Eine Hydrolyse der Anhydridbindung von AB-AZTDP kann wegen der zusätzlichen Ladung hingegen nicht stattfinden.

Es galt nun herauszufinden, wie sich die BAB-Prodrugs in zellulärem Medium verhalten würden. Hierzu wurde die entsprechende Verbindung in humanem CEM/0 Zellextrakt inkubiert und die Lösungen HPLC-analytisch untersucht. Details hierzu sind wie immer im Experimentalteil zu finden. Die Ergebnisse werden erneut nur für BAB-AZTDP **185a** gezeigt, gelten aber analog für BAB-d4TDP.

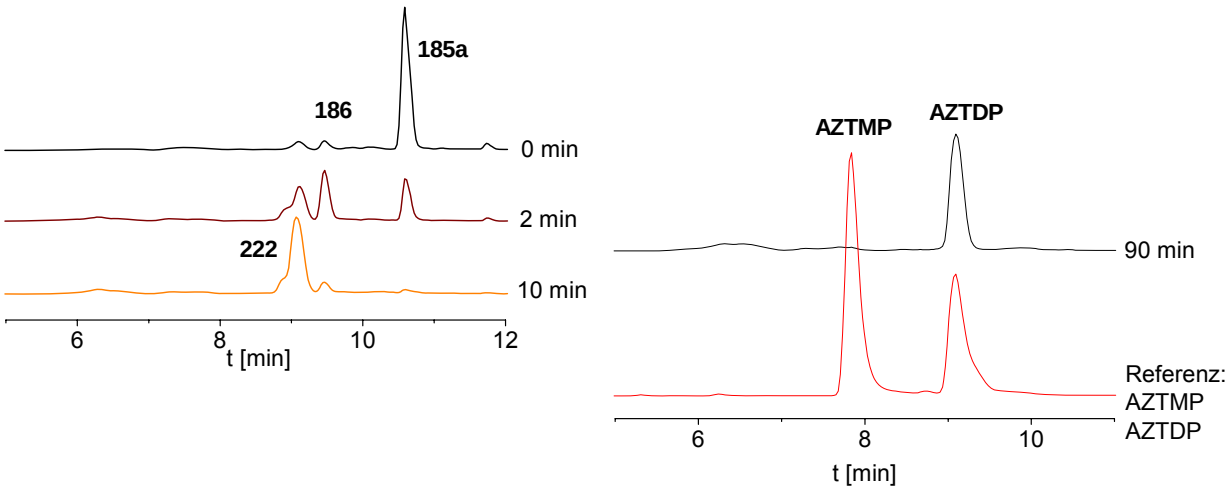


Abb. 165: Hydrolyse von **185a** nach t=0min bis t=10 min (links) in CEM/0 ; Chromatogramm der enzymatischen Hydrolyse nach t=90 min und Zuordnung der Hydrolyseprodukte (rechts); Methode 4

Dieses Ergebnis ist so eindeutig wie erfreulich: Das einzig auftretende Hydrolyseprodukt ist AZTDP **222**. Die Integration der Signale von Anfangs- und Endpunkt zeigte die Freisetzung von über 95% AZTDP **222** innerhalb von etwa 15 min. Im Zellextrakt wurden 0% AZTMP **160a** durch Spaltung der Anhydridbindung gefunden. Die Beschleunigung der Hydrolyse im Zellmedium, verglichen mit der Halbwertszeit der chemischen Hydrolyse, liegt für den ersten Schritt bei einem Faktor von etwa 500, für den zweiten Schritt wurde gar eine über 3000fache Beschleunigung gefunden.

An dieser Stelle soll zum Vergleich die Hydrolyse von BAB-d4TMP **208** in CEM/0 herangezogen werden, welche in unserer Arbeitsgruppe von Ulrike Muus durchgeführt worden war. Hier zeigte sich eine Halbwertszeit für die erste Spaltung zu **209** von etwa 10 min, die zweite Spaltung lief hingegen mit $t_{1/2}$ = 4 h ab.

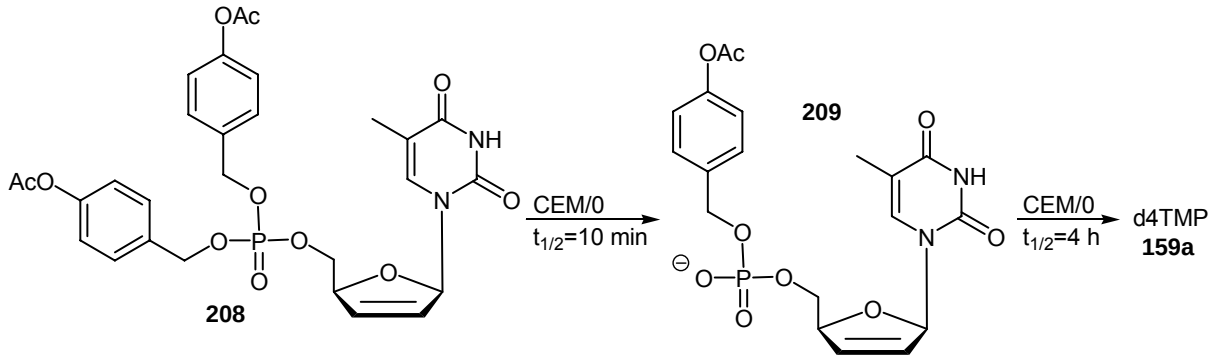


Abb. 166: Hydrolyse und Halbwertszeiten von **208**/**209** zu d4TMP **159a**

Dies ist ein überraschendes Ergebnis, zeigt es doch, dass die zusätzliche Phosphateinheit zu einer Affinitätszunahme der Verbindungen gegenüber Esterasen führt. Die Annahme, dass die negative Ladung des Intermediates **209** durch eine repulsive Wechselwirkung mit dem Enzym zu einer Verlangsamung der Hydrolyse führt, mag richtig sein, es scheinen jedoch auch noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen.[53,54] Mit den oben gezeigten Ergebnissen war somit zunächst die Befürchtung ausgeräumt, durch eine weitere Ladung, wie z.B. bei AB-AZTDP **186**, würde die zweite enzymatische Hydrolyse eventuell überhaupt nicht mehr stattfinden.

Wenden wir uns nun der Hydrolyse von BIB-AZTDP **185b** zu. Es ist anzunehmen, dass die chemische Hydrolyse durch die Verwendung eines *iso*-Butyrylesters langsamer abläuft, als die entsprechende Hydrolyse eines Acetylesters. Die Hydrolysehalbwertszeit zu dem entsprechenden IB-AZTDP **212** sollte damit verlangsamt sein und gleichzeitig die Menge an freigesetztem AZTMP **160a** durch Hydrolyse der Pyrophosphatbrücke zunehmen. Die Auswertung der Chromatogramme ergab folgendes Bild:

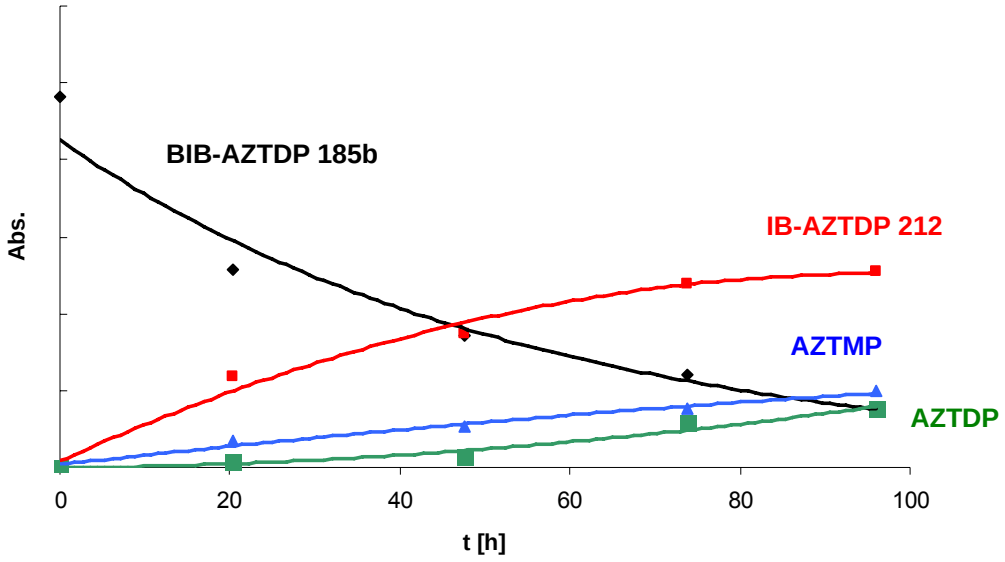


Diagramm 15: Hydrolyseverlauf von BIB-AZTDP **185b** in PBS pH = 7.3

Die Hydrolyse wurde über etwa 100 h verfolgt. Dabei ergab sich für BIB-AZTDP **185b** eine Halbwertszeit von 39 h: Dies entspricht gegenüber BAB-AZTDP **185a** etwas mehr als einer Verdopplung des Wertes. Daher kann durch den Konkurrenzprozess, die Hydrolyse der Anhydridbindung, deutlich mehr AZTMP **160a** entstehen. Dennoch ist das Hauptprodukt der Hydrolyse IB-AZTDP **212**, d.h. die Spaltung der

Pyrophosphatbrücke bei pH = 7.3 verläuft mit einer Halbwertszeit, die deutlich über 40 h liegt. Man erkennt aus dem Diagramm, dass zum Ende der Beobachtungszeit die Geschwindigkeit der Bildung von AZTDP **222** zunimmt. Dies resultiert aus der Anreicherung von IB-AZTDP **212**, aus welchem ausschließlich AZTDP **222** entstehen kann. Die Bildung von AZTMP **160a** sollte daher mit dem Verbrauch des Edukts aufhören. Die Hydrolyse wurde nicht bis zum Ende verfolgt, da auch das Intermediat IB-AZTDP **212**, verglichen mit AB-AZTDP **186**, eine nochmals deutlich erhöhte Halbwertszeit aufwies.

Es soll nun die Hydrolyse der Verbindung in CEM/0 Zellextrakt besprochen werden. Im Folgenden sind zunächst einige der erhaltenen Chromatogramme abgebildet.

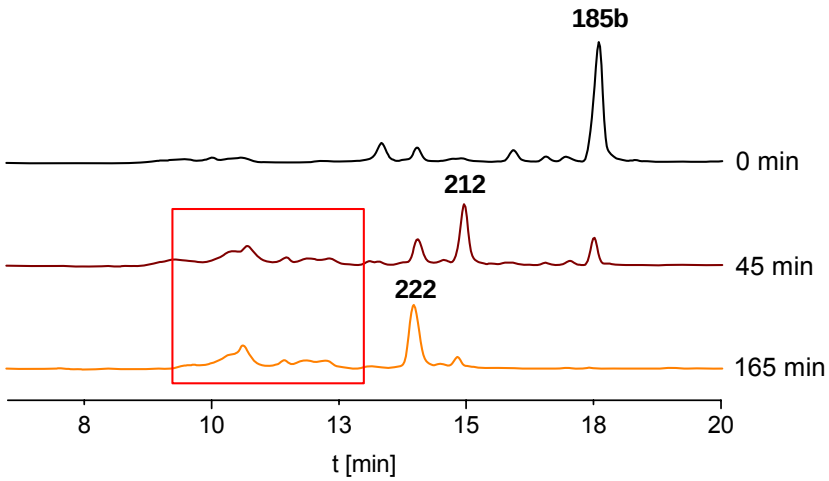


Abb. 167: Chromatogramme der enzymatischen Hydrolyse von BIB-AZTDP **185b**; Methode 2

Auch in diesem Fall erkennt man die Abnahme des Edukts **185b**, welches zunächst in das Intermediat IB-AZTDP **212** zerfällt, dass dann weiter zu AZTDP **222** abgebaut wird. Mit dem roten Kasten ist ein Bereich markiert, in dem weitere, undefinierte Abbauprodukte auftreten. Worum es sich hierbei handelt, soll später geklärt werden. Die Halbwertszeit der ersten Hydrolyse von BIB-AZTDP **185b** wurde zu $t_{1/2}$ = 17 min bestimmt. Für die zweite Hydrolyse ist keine genaue Halbwertszeit bekannt, sie liegt aber wohl zwischen 30 min und einer Stunde.

Die Zersetzung und Entstehung der einzelnen Moleküle ist in dem nachfolgenden Diagramm gezeigt. Dieser Darstellung kann deutlich entnommen werden, dass zwar immer noch AZTDP **222** das Hauptprodukt der Hydrolyse ist, dieser Umsatz ausgehend von **185b** aber nicht mehr quantitativ ist, sondern noch etwa zu 60%

stattfindet. Die restlichen 40% scheinen die in Abb. 167 mit dem roten Kasten markierten undefinierten Zersetzungsprodukte zu sein.

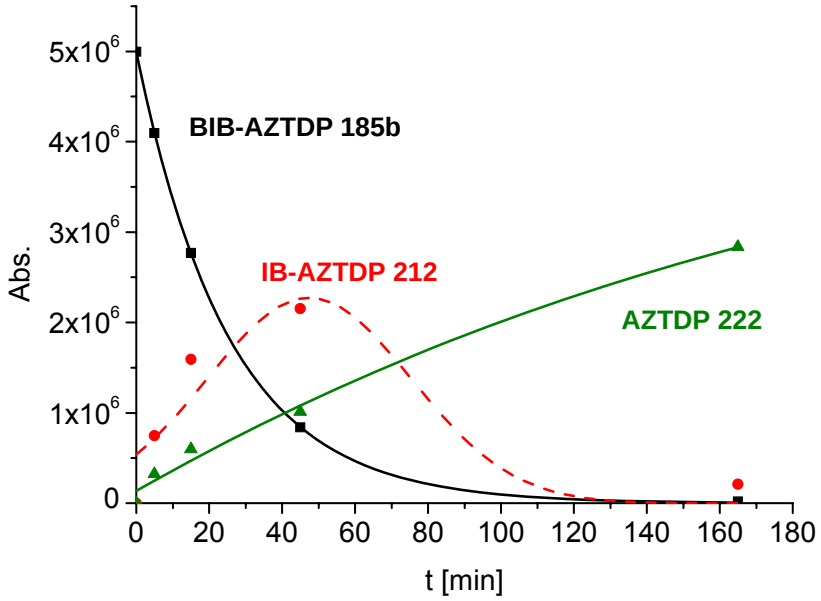


Diagramm 16: Ungefährer Hydrolyseverlauf von BIB-AZTDP **185b** in CEM/0

Wenn man den Acylrest weiter verzweigt, gelangt man zu den BPB-NDP-Prodrugs, also solche, die eine Pivaloylgruppe tragen, von denen nun BPB-AZTDP **185c** diskutiert werden soll. Auch hier sollte als generelle Tendenz eine Erhöhung der Hydrolysehalbwertszeiten, sowohl der chemischen, als auch der enzymatischen zu erwarten sein. Es galt nun herauszufinden, ob damit eine weitere Abnahme der freigesetzten Menge AZTDP **222** einhergehen würde. Die chemische Hydrolyse bei pH = 7.3 verlief mit einer Hydrolysehalbwertszeit von 75 h für den ersten Schritt. Die Hauptprodukte waren PB-AZTDP **213** und AZTMP **160a**. Über den beobachteten Zeitraum konnte keine Entstehung von AZTDP **222** gefunden werden, vermutlich, da die zweite Hydrolyse nun noch langsamer ablief. Die erste Hydrolyse in CEM/0 Zellextrakt verlief mit einer Halbwertszeit von 1 h, also noch einmal deutlich langsamer, als die Hydrolyse der *iso*-Butyryl-Gruppe. Die Auswertung der Chromatogramme ergab, dass die Hydrolyse der zweiten Pivaloylgruppe durch Enzyme nicht stattfand. Daher wurde auch kein AZTDP **222** freigesetzt. Vielmehr hydrolysierte das Intermediat PB-AZTDP **213** unter dem Einfluss des biologischen Mediums zu nicht definierten Folgeprodukten, wie dies auch schon anteilig in Abb. 167 beschrieben war. Es schien daher so, dass das Intermediat im Zellextrakt nicht stabil war. Fand also der Abbau zum NDP nicht schnell genug statt, konnten

zahlreiche andere Zersetzungen eintreten. Eine genauere Analyse kann leider erst zu späterem Zeitpunkt gezeigt werden.

Aus der aliphatischen Reihe fehlen nun noch die Ergebnisse der Analyse von BOB-d4TDP **184d**. Zunächst soll erneut die chemische Hydrolyse besprochen werden. Die Halbwertszeit der ersten Hydrolyse wurde zu 63 h bestimmt. Damit wirkte sich die Fettsäuremodifikation deutlich stabilisierender aus, als die α-verzweigte *iso*-Buttersäure-Modifikation. Die Halbwertszeit des Intermediates OB-d4TDP **217** kann nicht angegeben werden, da es nicht isoliert worden war. Im Gegensatz zu PB-AZTDP **213** fand aber über den beobachteten Zeitraum eine weitere Hydrolyse zu d4TDP **83d** statt, wie die folgenden Chromatogramme zeigen.

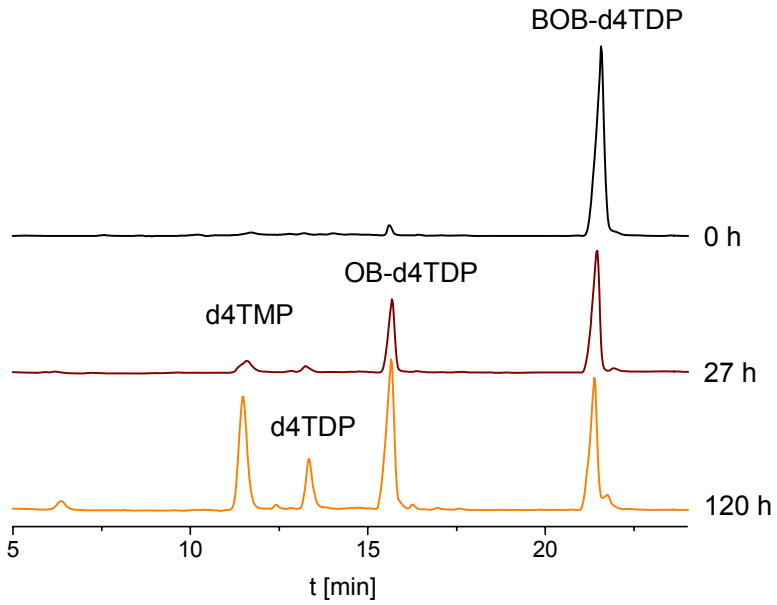


Abb. 168: Chromatogramme der chemischen Hydrolyse von BOB-d4TDP **184d** nach t=0h bis t=120h in PBS pH = 7.3; Methode 2

Bis zum Ende des beobachteten Zeitraums entstand eine größere Menge d4TMP **159a**, verglichen mit d4TDP **83d**. Es sei allerdings angemerkt, dass diese Hydrolyseuntersuchungen über einen sehr langen Zeitraum liefen. Dass die Verbindungen überhaupt derart stabil sein könnten, war vor diesen Untersuchungen nicht abzusehen. Aus dem mittleren Chromatogramm bei 27 h kann weiterhin entnommen werden, dass die Hydrolyse der Anhydridbindung immer noch langsamer verläuft, als die Spaltung der Esterbindung. Damit liegt die Halbwertszeit der Hydrolyse der Anhydridbindung bei BAB-Nucleotiden deutlich jenseits der 60 h,

vermutlich eher im Bereich um 150 h und mehr, ein wirklich überraschend hoher Wert.

Die Zuordnung der Verbindungen in den oberen Chromatogrammen erfolgte durch Coinjektion von d4TMP **159a** und d4TDP **83d** nach einer Hydrolysedauer von 125 h.

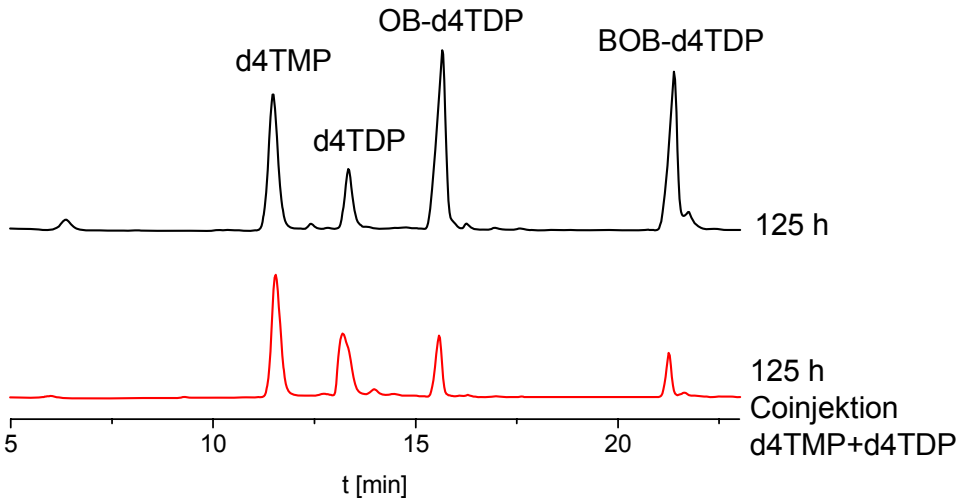


Abb. 169: Zuordnung der Peaks durch Coinjektion von d4TMP und d4TDP; Methode 2

Man erkennt, dass die mit d4TMP und d4TDP gekennzeichneten Peaks bei der Coinjektion relativ zu den anderen beiden Peaks an Intensität gewinnen. Da die Retentionszeiten der einzelnen Nucleotide bekannt waren, konnte auf diese Weise die Zuordnung erfolgen.

Es war nun ausgesprochen interessant, das Verhalten von BOB-d4TDP **184d** in CEM/0 Extrakt zu untersuchen, da die erste Halbwertszeit der chemischen Hydrolyse in der Größenordnung von BPB-AZTDP **185c** lag, die zweite Hydrolyse allerdings vergleichsweise schneller abzulaufen schien. Die Halbwertszeit in CEM/0 wurde zu 1 h für den ersten Schritt bestimmt, derselbe Wert, der auch für **185c** gemessen worden war. Die Analyse der Chromatogramme ergab allerdings, dass auch die zweite Hydrolyse des Octanoats von den Enzymen des Extrakts eingeleitet wurde. Bei der Auswertung wurden recht ähnliche Ergebnisse erhalten, wie bei BIB-AZTDP **185b**, nur dass aufgrund der generell längeren Halbwertszeiten insgesamt etwa 30% d4TDP **83d** im Zellextrakt freigesetzt wurden. Allerdings stammt dieser Wert aus der Analyse der Hydrolyse nach 220 min. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl BOB-d4TDP **184d**, als auch das Intermediat OB-d4TDP **217** noch nicht vollständig verbraucht, so dass die Angabe von 30% zu niedrig erscheint. Es wurde wiederum

ein breiter Bereich an Zersetzungsprodukten erhalten, welcher mit einem Kasten umrahmt ist.

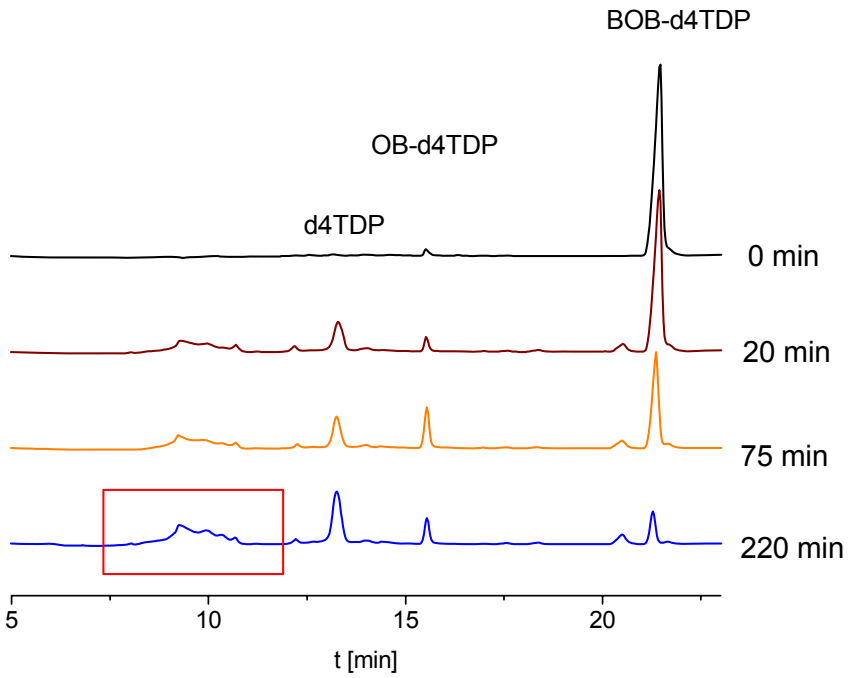


Abb. 170: Chromatogramme der enzymatischen Hydrolyse von BOB-d4TDP **184d**; Methode 2

Die Zuordnung der einzelnen Peaks ergab folgendes Bild:

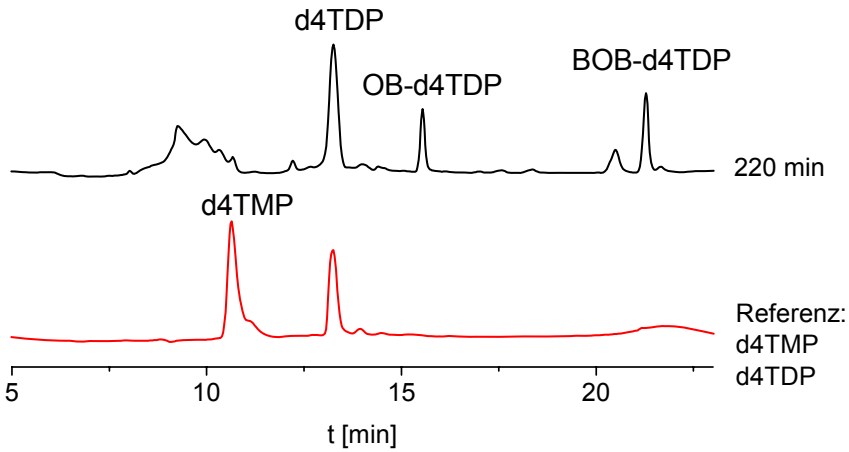


Abb. 171: Zuordnung der Peaks der enzymatischen Hydrolyse von **184d**; Methode 2

Man erkennt eindeutig die Entstehung von d4TDP **83d**, allerdings scheint kein d4TMP **159a** als Spaltprodukt aufzutreten, aber dennoch eine Vielzahl undefinierter Nebenprodukte mit einer ähnlichen Polarität. Die Untersuchung von BOB-d4TDP **184d** lieferte ein weiteres Steinchen im Mosaik der BAB-NDP-Prodrugs; es war zuvor

gezeigt worden, dass die Freisetzung an NDP in CEM/0 von der ersten Hydrolysehalbwertszeit abhängig ist. Nun war auch klar, dass die zweite Hydrolysehalbwertszeit einen Einfluss hat. In diesem Zusammenhang wurde noch untersucht, ob d4TDP **83d** in CEM/0 abgebaut würde. Obwohl eine langsame Abnahme festgestellt werden konnte ($t_{1/2}$ ≈ 10 h), sollte es über die beobachteten Zeiträume akkumulieren können.

Für die AZTDP-Reihe wurde im Folgenden eine Auftragung der prozentual freigesetzten Menge an AZTDP **222** gegen die erste Hydrolysehalbwertszeit vorgenommen. Es scheint eine Korrelation vorhanden zu sein.

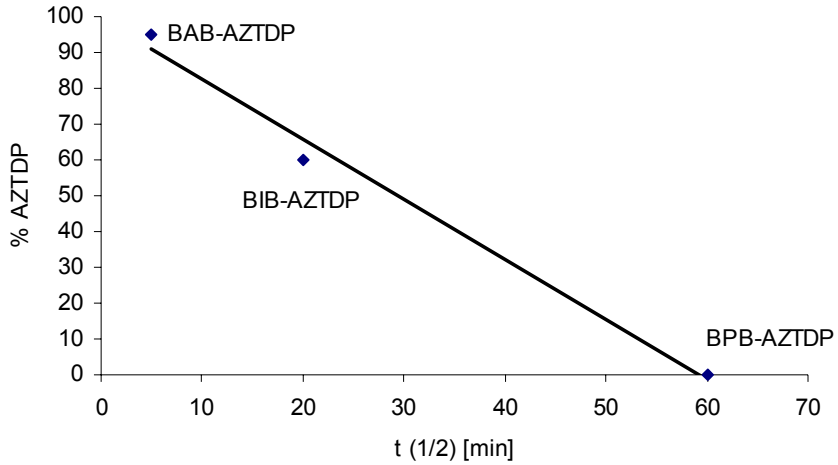


Diagramm 17: Korrelation von erster Halbwertszeit in CEM/0 und freigesetzter Menge AZTDP **222**

Da BOB-AZTDP **185d** im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr dargestellt werden konnte, ist nicht bekannt, ob hier eine vergleichbare Freisetzung von über 30% AZTDP stattfände. Als Optimist würde ich jedoch sagen, dass in diesem Fall auch die zweite Spaltung rasch genug ablaufen würde, um entsprechende Mengen AZTDP **222** entstehen zu lassen.

Mit diesen ersten Untersuchungen war die aliphatische Reihe der BAB-NDP-Prodrugs charakterisiert. Die Ergebnisse der Hydrolysestudien sollen daher noch einmal für alle untersuchten Verbindungen in einem Diagramm zusammengefasst werden.

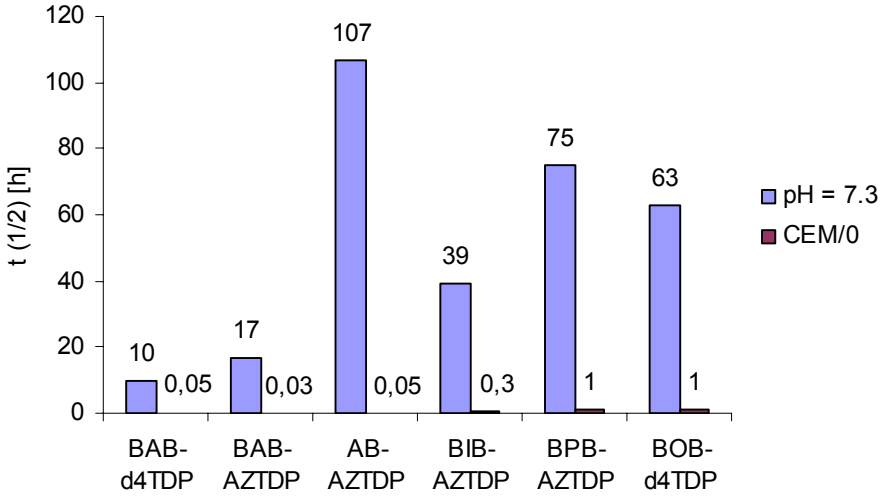


Diagramm 18: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten

Mit diesem Diagramm wird noch einmal der große Unterschied zwischen chemischer und enzymatischer Hydrolyse deutlich. Auch erkennt man die Zunahme der Stabilität durch Verzweigung der Estermodifikation. Aus dieser Reihe bricht nur die Octanoyl-Modifikation aus. Weiterhin steigt die chemische Stabilität, wenn schon eine Maske abgespalten wurde. Wir haben dennoch gelernt, dass trotz der geringen enzymatischen Stabilität ab einer Hydrolysehalbwertszeit von etwa 1 h nur noch wenig NDP freigesetzt wird, dies aber in Abhängigkeit von der zweiten Hydrolysehalbwertszeit. Zukünftige BAB-NDP-Prodrugs müssen daher so gestaltet werden, dass beide Masken schnell durch Enzyme abgespalten werden können.

Es sollen nun die Stabilitäten der Benzoyl-modifizierten Pronucleotide BBB-d4TDP **184e**, BBB-AZTDP **185e**, BB-d4TDP **187**, BBB-3´-*O*-*i*Bu-BVdUDP **189** und BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190** untersucht werden. Gerade aus diesen Studien konnte viel über das Verhalten von BAB-NDP-Produgs gelernt werden, da hier hauptsächlich Zersetzungsreaktionen in den Vordergrund traten. Zunächst einmal war das Anbringen eines Benzoylesters von großem Interesse, da das aromatische System beliebig weiter modifiziert werden könnte. An dieser Stelle soll vorweggenommen werden, dass BBB-d4TDP **184e** in den antiviralen Tests eine TK-Bypass-Aktivität aufwies, woraus geschlossen werden konnte, dass das Pronucleotid in die Zelle gelangte und dort entweder d4TMP oder d4TDP freisetzte. Diese Ergebnisse waren auch der Grund für die Synthese der anderen Verbindungen.
Es sollen nun zunächst die Hydrolysehalbwertszeiten der BBB-Verbindungen in PBS pH = 7.3 verglichen werden.

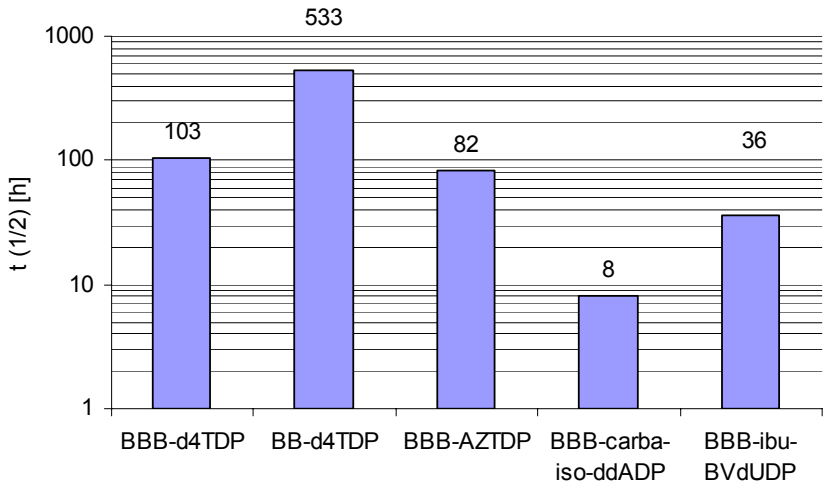


Diagramm 19: Vergleich der chemischen Stabilität in PBS pH = 7.3; logarithmische Skalierung

Die erhaltenen Werte für BBB-d4TDP **184e** und BBB-AZTDP **185e** liegen in einer vergleichbaren Größenordnung. Die Verbindungen sind noch einmal etwas stabiler, verglichen mit den aliphatischen Modifikationen. Bei der monosubstituierten Verbindung BB-d4TDP **187** steigt die Stabilität noch einmal dramatisch auf etwa drei Wochen an. Dies ist im Einklang mit den vorher diskutierten Ergebnissen. Aus dieser Reihe bricht das carbocyclische-Derivat **190** am deutlichsten aus, aber auch das BVdU-Derivat **189** scheint wesentlich instabiler, als **184e** und **185e**. Dieses Verhalten ist näher zu betrachten. Da die Labilisierung am deutlichsten bei dem carbocyclischen Derivat **190** hervortrat, wurden sämtliche erhaltenen Daten der Verbindung analysiert, weitere Experimente durchgeführt und interpretiert. So konnte folgendes Bild der Hydrolyse entwickelt werden:

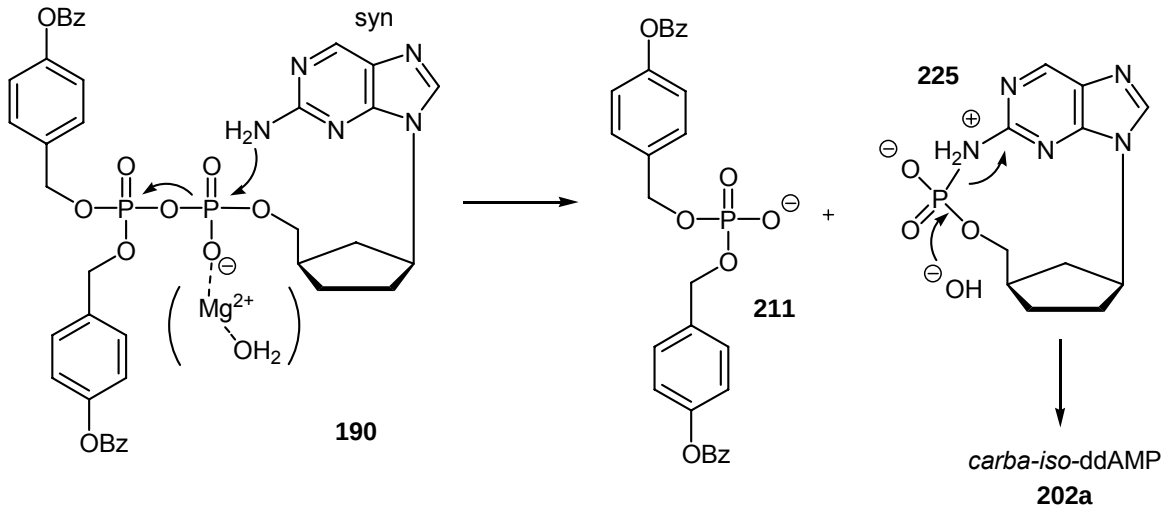


Abb. 172: Postulierter (hauptsächlicher) Hydrolysemechanismus von **190**

Aus den experimentellen Daten wurden folgende Schlüsse gezogen: Durch Rotation der Nucleobase kann die *syn*-Konformation eingenommen werden. Eventuell ist sie sogar durch Wechselwirkungen mit den aromatischen Systemen der Maskierungen in dieser Position stabilisiert (ausgeprägtes Quenching der Fluoreszenz wurde beobachtet). Die Aminogruppe kann in dieser Position einen nucleophilen Angriff auf die Anhydridbindung durchführen, was sich als Resultat in den Spaltprodukten BBB-Phosphat **211** (nachgewiesen) und **225** (postuliert) niederschlägt. **225** scheint instabil und zersetzt sich zu Folgeprodukten, u.a. *carba-iso*-ddAMP **202a**. Die Koordination von **190** durch Magnesium-Ionen beschleunigt den Vorgang um etwa das zehnfache. Die Ableitung dieses Mechanismus wird auf den nächsten Seiten vorgenommen.

Um zunächst einen Überblick über das Verhalten von **190** zu gewinnen, wurde die Verbindung bei verschiedenen pH-Werten erneut hydrolysiert. Außerdem wurde die Verbindung in P3HR1-Zellextrakt inkubiert und die Spaltprodukte analysiert. Aus den Ergebnissen dieser Studie konnte ein Einfluss von Magnesium-Ionen auf die Hydrolysegeschwindigkeit abgeleitet werden, weshalb auch bei einer chemischen Hydrolyse Magnesium-Ionen zu der Lösung gegeben wurden. Die Ergebnisse dieser Studien sind in dem nächsten Diagramm zusammengefasst. Man erkennt deutlich den Einfluss der Magnesium-Ionen auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

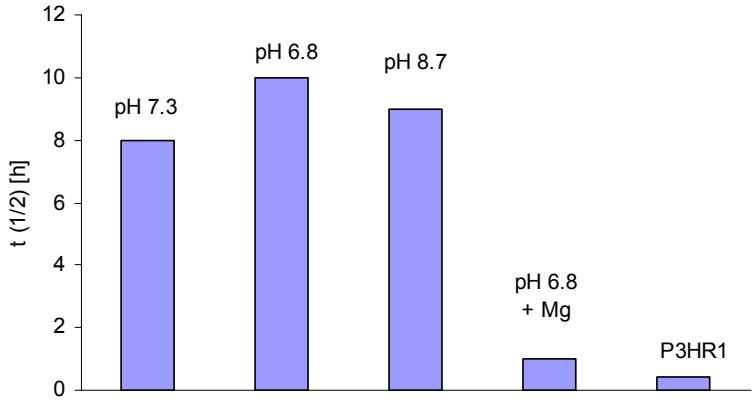


Diagramm 20: Hydrolysehalbwertszeiten von **190** in verschiedenen Medien

Die Stabilität der Verbindung liegt in den PBS-Lösungen im Rahmen der Fehlergrenzen bei etwa 9 h. Dies bedeutet, dass die Hydrolyse im Wesentlichen pH unabhängig ist, da die Spaltung der Anhydridbindung wesentlich schneller, als die Spaltung der Esterbindungen abläuft. Die Zugabe von Magnesium-Ionen ließ die Stabilität bei pH = 6.8 um etwa eine Größenordnung fallen. Weiterhin muss vor der

Analyse der Chromatogramme noch erwähnt werden, dass es sich bei Verbindung **190** um ein fluoreszierendes Nucleosid handelt, so dass also ein sehr empfindlicher Nachweis möglich sein sollte. Obwohl die Verbindung ein Fluoreszenzsignal hervorrief, war doch ein massiver Verlust an Intensität gegenüber dem Stammnucleosid *carba-iso*-ddA **128** zu beobachten, d.h. durch die Modifikation wurde ein starkes Quenching verursacht. Die Ursache hiervon könnte eine π-π-Interaktion der aromatischen Systeme mit der Nucleobase sein, da eine konkurrierende Absorption des aromatischen Systems bei der Anregungswellenlänge von 305 nm unwahrscheinlich schien. Um sicher zu gehen, wurden die UV-Spektren des BBB-Prodrugs **190** und des Benzoyloxybenzylesters **195e** aus entsprechenden HPL-Chromatogrammen extrahiert. Die Analyse erfolgte an der HPLC, um die Intensität des Signals von **195e** zu bestimmen und gleichzeitig die Retentionszeit zur Verfügung zu haben. Dies wird später noch diskutiert werden. Es ist aber bislang gemeinhin so gewesen, dass die Spaltprodukte, wie z.B. Benzylalkohol, wegen ihrer geringen UV-Absorption, verglichen mit den Nucleosid-Derivaten, nicht in den Chromatogrammen auftraten. Dies sollte sich mit der Verwendung der Benzoyloxybenzyl-Modifikation drastisch ändern. Die Chromatogramme zeigten eine deutliche Zunahme des integralen Absorptionskoeffizienten, so dass **195e** bei Integration um 265 nm eine fast ebenbürtige Signalintensität, wie die entsprechenden Nucleoside, aufwies. Dies ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

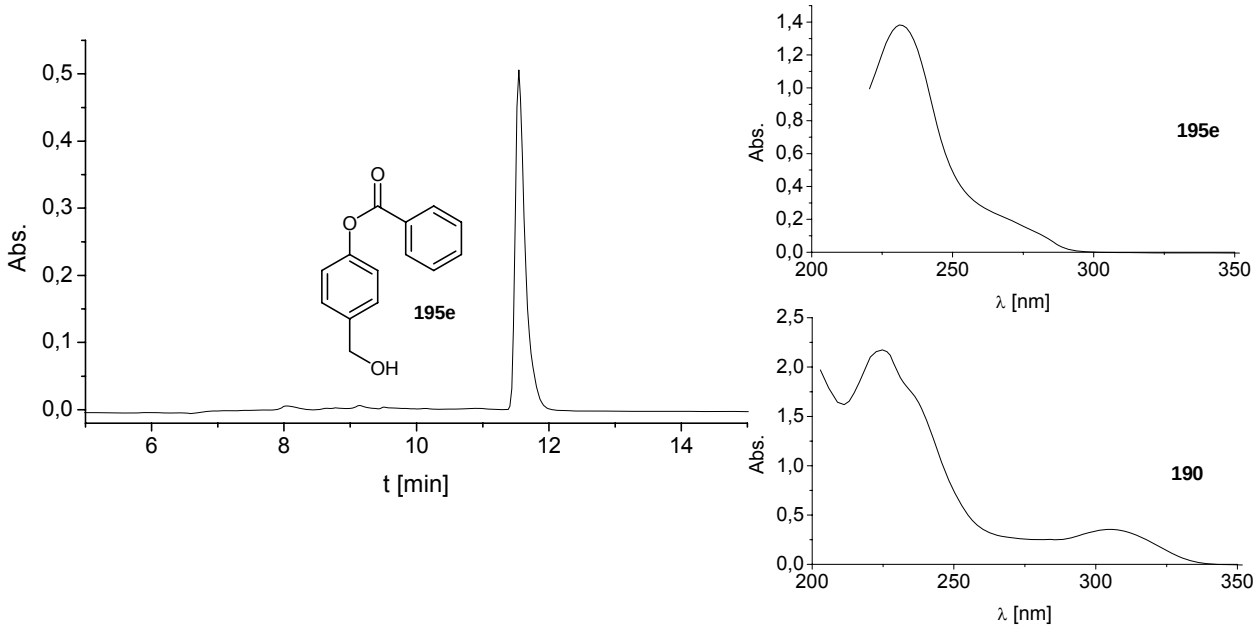


Abb. 173: HPL-Chromatogramm von **195e** bei 265 nm (C=2mM, 40 μL Injektionsvolumen); extrahiertes UV-Spektrum (oben) und Vergleich mit dem UV-Spektrum von BBB-Prodrug **190** (unten)

Dem Chromatogramm und den UV-Spektren war nun Folgendes zu entnehmen: Spaltprodukte wie **195e** (die Entstehung wird in Abb. 187 gezeigt)oder BBB-Phosphat **211** mit zwei Chromophoren sollten in den HPL-Chromatogrammen sichtbar sein. Weiterhin war ein Fluoreszenzquenching durch konkurrierende Absorption unwahrscheinlich, da **195e** bei der Anregungswellenlänge von 305 nm und der Emissionswellenlänge um 355 nm keine Absorption zeigte. Die Identifikation von **195e** und **211** sollte durch Auswertung der UV-Spektren der einzelnen Peaks möglich sein, eine unterscheidbare Retentionszeit vorausgesetzt. Mit diesen Informationen wenden wir uns nun einigen erhaltenen Chromatogrammen zu.

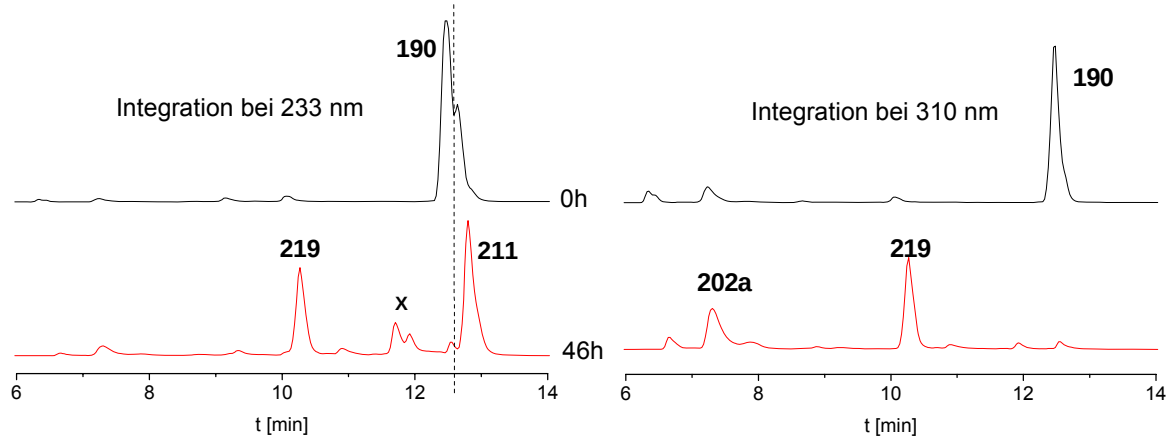


Abb. 174: Vergleich der Chromatogramme der chemischen Hydrolyse (pH = 6.8) von **190** nach t=0 h und t=46 h bei unterschiedlichen Integrationswellenlängen; Methode 4

In den linken Chromatogrammen erfolgte die Aufzeichnung bei 233 nm, der Bereich also, in dem auch z.B. BBB-Phosphat **211** absorbiert (der exakte Nachweis von **211** erfolgt später). Man erkennt, dass schon zu Beginn eine Verunreinigung mit **211** vorlag. Nach 46 h ist das Prodrug **190** vollständig verbraucht. Es wurde zu einem großen Anteil in **211** und das Intermediat BB-*carba-iso*-ddADP **219** umgewandelt. Über die weiteren Produkte X soll hier nicht spekuliert werden. Führt man die Integration hingegen bei 310 nm durch (rechte Chromatogramme), erhält man ausschließlich Signale der Verbindungen, welche die fluoreszierende Nucleobase enthalten. Damit ließ sich auch sehr exakt die Halbwertszeit, trotz der überlagerten Signale, ermitteln. Man erkennt hier das Intermediat **219** und *carba-iso*-ddAMP **202a** (bestimmt durch Referenz-Injektion; hier nicht abgebildet). Beide Chromatogramme stützen den Verdacht, dass es zu einem Bruch der Anhydridbindung gekommen war, dass aber auch anteilig Hydrolyse zu dem Intermediat stattfand. Dass aus dem Intermediat kein *carba-iso*-ddADP **224** freigesetzt wurde, mag an der hohen

Halbwertszeit von **219** liegen, oder es verweist auf die Nebenprodukte X, die aus einer Zersetzung von BB-*carba*-*iso*-ddADP **219** nach einem ähnlichen Mechanismus, wie für **190** vorgeschlagen, resultieren könnten. Diese Ergebnisse zeigen auch, warum die Reinigung von **190** sich als so außergewöhnlich schwierig herausstellte. Andererseits war die Synthese von dem BBB-Prodrug **190** nachträglich ein Segen, da durch das langwellige Absorptionsmaximum der modifizierten Nucleobase die einzelnen Hydrolyseprodukte aufgelöst werden konnten. Diese Ergebnisse ließen sich dann später auf andere BBB-Prodrugs, bei denen die Nebenprodukte nicht ausgeblendet werden konnten, übertragen. Zunächst aber wollen wir uns der Hydrolyse von **190** in P3HR1-Zellextrakt zuwenden, da aus den Hydrolyselösungen der massenspektrometrische Nachweis von BBB-Phosphat **211** gelang.

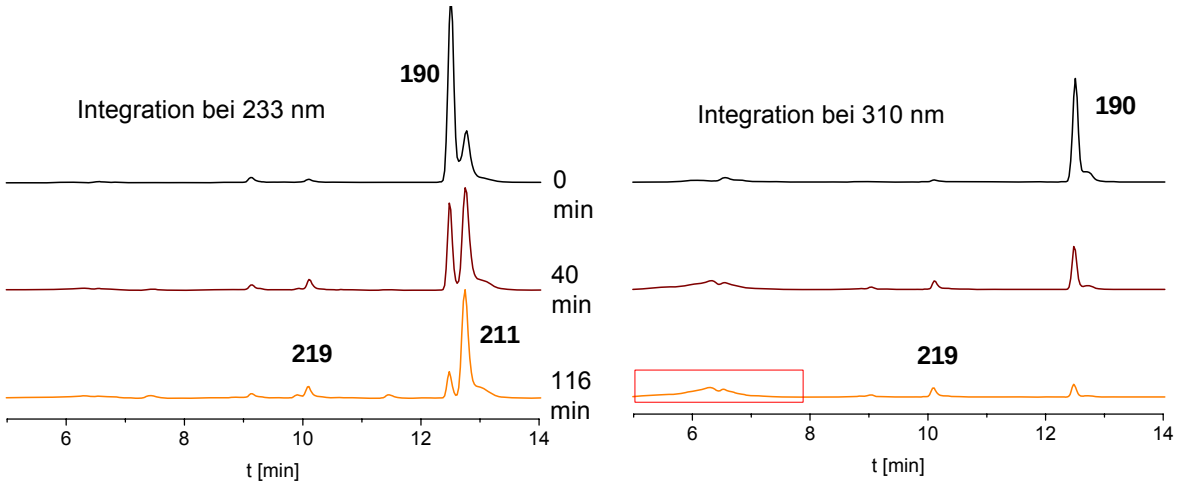


Abb. 175: Vergleich der Chromatogramme der enzymatischen Hydrolyse (P3HR1) von BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190** nach t=0 min bis t=116 min bei unterschiedlichen Integrationswellenlängen; Methode 4

Erneut zeigt das linke Chromatogramm (Integration bei 233 nm) die Zersetzung des Prodrugs **190**, diesmal über einen Zeitraum von 2 h. Die Hydrolysehalbwertszeit wurde zu 23 min bestimmt. Es fällt allerdings auf, dass nur Spuren des BB-Intermediats **219** entstehen, d.h. eine enzymatische Hydrolyse findet nicht statt. Das einzige Produkt, das in diesem Chromatogramm nachgewiesen werden kann, ist BBB-Phosphat **211**, weswegen von einem quantitativen Bruch der Anhydridbindung ausgegangen werden muss. Die Integration bei 310 nm ergab das rechte Chromatogramm. Man erkennt den Abbau von **190** zu nicht definierten Folgeprodukten, die mit einem Kasten markiert sind. Es soll nun endlich der Nachweis der Entstehung von **211** erbracht werden; da offensichtlich bei allen untersuchten Wellenlängen **211** das einzige definierte Produkt der Hydrolyse war,

wurde eine Zellextrakt-Hydrolyselösung (2.5 h Inkubation von BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190**) entsprechend verdünnt und durch ESI$^-$-Massenspektrometrie analysiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt das erhaltene Massenspektrum.

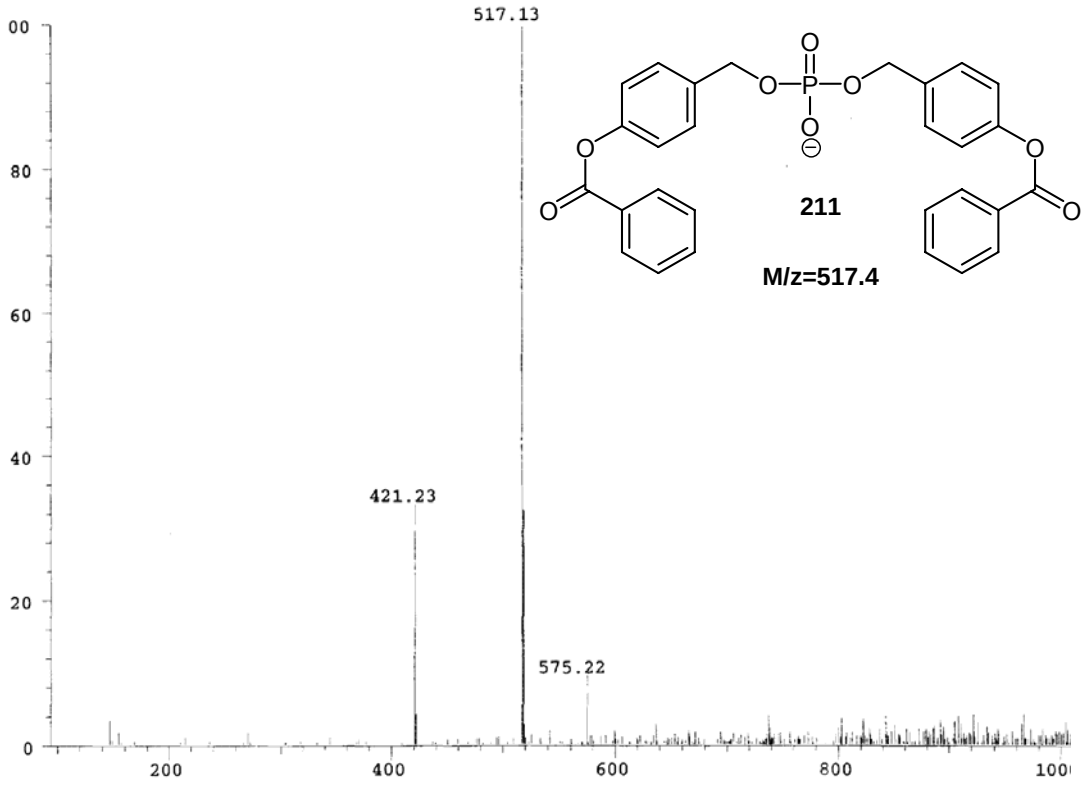


Abb. 176: Massenspektrometrische Analyse (ESI$^-$) des P3HR1-Hydrolysats von **190** nach 2.5 h

Trotz der komplexen Zusammensetzung von Zellextrakten konnte BBB-Phosphat **211** mit einer Molmasse von 517 als Basispeak im Spektrum nachgewiesen werden. Das Verhalten von Prodrug **190** in Zellextrakt kann nun auf folgende Weise interpretiert werden:

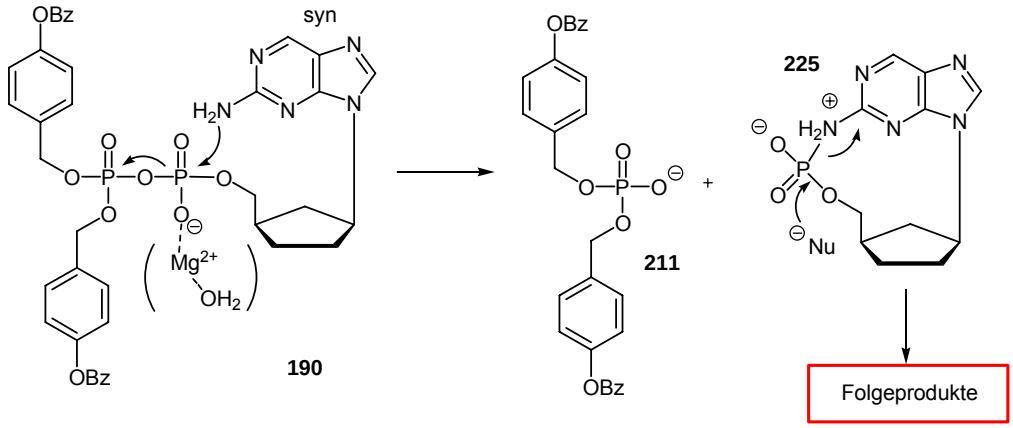


Abb. 177: Hydrolyse von **190** in biologischem Medium

Die Hydrolyse des Intermediats **225** kann im Gegensatz zu den Bedingungen der chemischen Hydrolyse (bei welcher *carba-iso*-ddAMP **202a** im Chromatogramm nachgewiesen wurde) durch Öffnung mit von Hydroxid-Ionen verschiedenen Nucleophilen stattfinden, z.B. mit Aminosäuren. Dies würde die Entstehung undefinierter Nebenprodukte, wie in Abb. 175 (rechts) gezeigt, erklären. Andererseits wäre auch eine direkte Spaltung der Anhydridbindung durch Nucleophile des Zellextrakts bei Aktivierung mit Magnesium-Ionen denkbar. Dies würde direkt zu BBB-Phosphat **211** und den Folgeprodukten führen. Dies wäre dann ein Mechanismus, der auch bei allen anderen BAB-NDP-Prodrugs auftreten könnte. Und tatsächlich erinnern wir uns, wie z.B. in Abbildung 167 gezeigt worden war, dass eine erhöhte enzymatische Stabilität zur Bildung nicht definierter Folgeprodukte führte, die in Konkurrenz zur Esterspaltung entstanden. Es scheint daher so, dass in Gegenwart von Magnesium-Ionen eine Labilisierung der Pyrophosphatbrücke eintritt, welche ihre Ursache in der Neutralisation der negativen Ladung hat, so dass ein nucleophiler Angriff erleichtert wird.

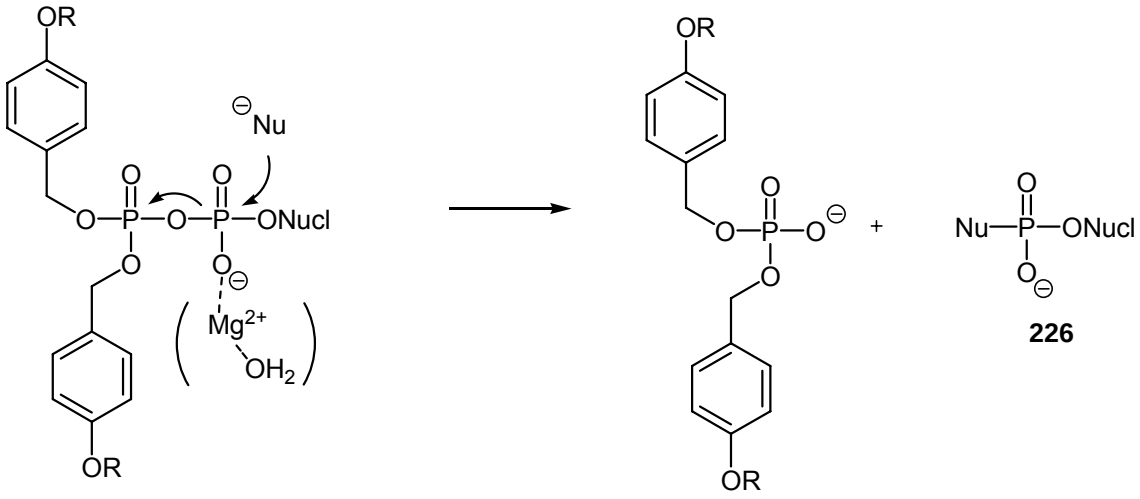


Abb. 178: Konkurrierende Anhydridspaltung von BAB-NDP-Pronucleotiden in Gegenwart von Mg^{2+}

Diese Spaltung findet tatsächlich statt, was die nicht definierten Zersetzungsprodukte der BAB-Pronucleotide in biologischen Medien erklärt. Dabei entsteht eine Vielzahl von Nebenprodukten **226**. Bei Prodrug **190** scheint aber zusätzlich die in Abb. 177 gezeigte Spaltung einzutreten, da hier die Halbwertszeit zu etwa 20 min bestimmt wurde, was der mit Abstand niedrigste Wert für die BBB-Reihe war. Mit den bislang diskutierten Ergebnissen konnten nun also die HPLC-Retentionszeit von BBB-Phosphat **211** und dessen UV-Spektrum zur Zuordnung der Spaltprodukte anderer

Prodrugs der BBB-Reihe verwendet werden. Es war ja in Diagramm 19 (s. S. 185) aufgefallen, dass das carbocyclische Prodrug **190** eine um ca. eine Größenordnung niedrigere chemische Hydrolysehalbwertszeit, verglichen mit BBB-d4TDP **184e** und BBB-AZTDP **185e**, zeigte. Auch gegenüber dem BBB-BVdU-Derivat **189** war eine deutliche Verminderung von $t_{1/2}$ zu erkennen, was mit dem in Abb. 172 gezeigten Mechanismus erklärt worden war. Warum allerdings ein so deutlicher Unterschied der Stabilität zwischen **184e**, **185e** und **189** zu verzeichnen war, blieb bislang unklar. Diesem Phänomen soll sich im Folgenden zugewendet werden, da hieraus Schlüsse über die Anwendbarkeit des BAB-Konzepts auf unterschiedliche Nucleoside abgeleitet werden können.

Es konnte festgestellt werden, dass BBB-Phosphat **211** bei Verwendung unterschiedlicher Gradienten an der HPLC stets die gleiche Retentionszeit, wie BBB-d4TDP **184e** aufwies. Dennoch ließen sich aus den Chromatogrammen einige Aussagen ableiten.

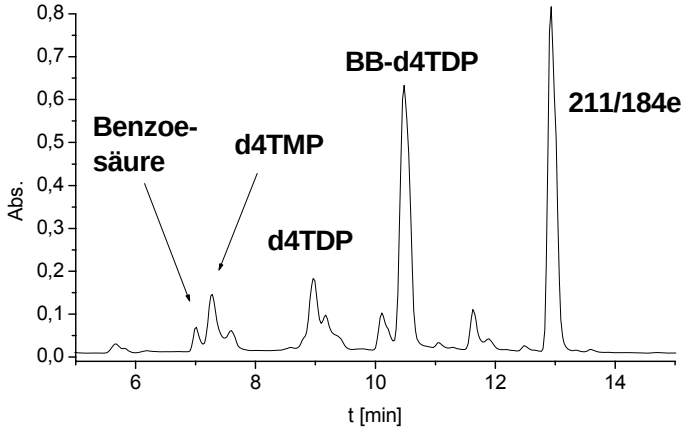


Abb. 179: Chromatogramm der chemischen Hydrolyse von BBB-d4TDP **184e** (pH=7.3; t=170 h; Integration bei 250nm)

Alle angegebenen Produkte wurden durch Referenz-Injektion der entsprechenden Verbindungen bestimmt. Benzoesäure entsteht durch die Hydrolyse des Esters, tritt aufgrund der geringen Absorption aber nur als kleiner Peak auf. Weiterhin wird das Intermediat BB-d4TDP **187** freigesetzt und hieraus wiederum d4TDP. Die Entstehung von d4TMP weist auf einen Bruch der Anhydridbindung von **184e** hin. Da aber das andere Spaltprodukt **211** die gleiche Retentionszeit und einen hohen Absorptionskoeffizienten aufweist, wird eine stark verlangsamte Abnahme des Edukts **184e** vorgetäuscht. Weiterhin ist zur Interpretation der Signalintensitäten

darauf hinzuweisen, dass die Integration bei 250 nm durchgeführt wurde. Die Verbindungen **211**, **184e** und **187** weisen aber einen wesentlich größeren Absorptionskoeffizienten auf, als d4TMP und d4TDP, weswegen die Intensitäten in dieser Form nicht aussagekräftig sind. Dennoch kann aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass **184e** eine deutlich höhere Stabilität aufweist, als das carbocyclische Derivat **190** (Das Chromatogramm wurde nach 170 h Inkubationsdauer aufgenommen), aber eine geringere Halbwertszeit, als die in Diagramm 19 angegebenen 103 h besitzen sollte. Dies stützt den für **190** in Abb. 172 postulierten Hydrolysemechanismus. Bei BBB-AZTDP **185e** konnte unter bestimmten Bedingungen eine Abtrennung von BBB-Phosphat **211** in den Chromatogrammen erreicht werden, am deutlichsten gelang die Trennung aber für das sehr unpolare BBB-BVdU-Derivat **189**. Mit diesem Prodrug konnte nun eindeutig gezeigt werden, dass die geringe Hydrolysehalbwertszeit von **190** einen Sonderfall darstellte.

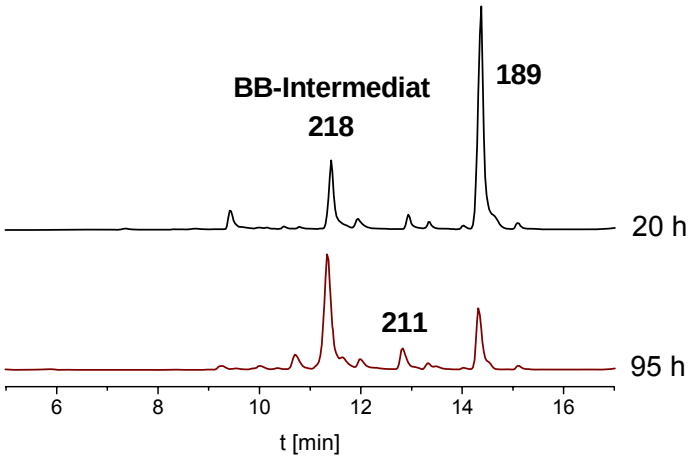


Abb. 180: Chemische Hydrolyse des BBB-BVdU-Derivates **189** (pH=7.3; Methode 4)

Aus diesen Chromatogrammen wird eines sehr schön ersichtlich: Das BVdU-Derivat **189** wurde annähernd quantitativ in das BB-Derivat **218** umgewandelt. Ein Bruch der Anhydridbindung unter Freisetzung von BBB-Phosphat **211** findet nur in einem äußerst untergeordneten Maße statt. Eine Aufklärung, ob chemisch oder enzymatisch die 3´-*O*-*iso*Butyryl-Gruppe gespalten würde, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt worden. Allerdings war das Verhalten der BBB-Pronucleotide in Zellextrakt noch Gegenstand einiger Untersuchungen. Es galt herauszufinden, ob die beschleunigte Hydrolyse der Anhydridbindung in biologischem Medium auch hier stattfinden würde.

Dazu sollen zunächst die ermittelten Hydrolysehalbwertszeiten in biologischem Medium angegeben werden (CEM/0 für die d4T- und AZT-Derivate **184e**, **187** und **185e**; P3HR1 für die BVdU- und *carba-iso*-ddA-Derivate **189** und **190**).

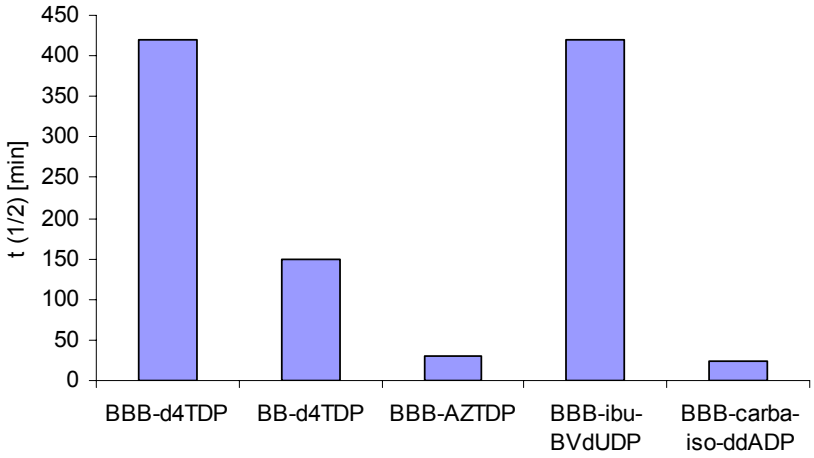


Diagramm 21: Hydrolysehalbwertszeiten in CEM/0 bzw. P3HR1

Bei allen Verbindungen tritt eine beschleunigte Zersetzung im Vergleich mit der chemischen Hydrolyse auf. Keine der Verbindungen setzte effektiv das entsprechende NDP frei, die Gründe hierfür sind bereits ausführlich dargelegt worden. Es sind dennoch einige Besonderheiten aus diesen Halbwertszeiten herauszulesen. Obwohl BBB-d4TDP **184e** und BBB-AZTDP **185e** sich strukturell recht ähnlich sind, erkennt man, dass **185e** in Zellextrakt dramatisch schneller unter Freisetzung nicht definierter Produkte gespalten wird. Gleichzeitig weist das BVdU-Derivat **189** eine ähnliche Halbwertszeit wie BBB-d4TDP **184e** auf. Bei dem AZT-Derivat **185e** muss folglich eine weitere Destabilisierung der Anhydridbindung in zellulärem Medium auftreten. Da die Nucleobase von d4T und AZT gleich ist, ist die Ursache vermutlich in der Azidgruppe zu suchen. Es wäre eine assistierende Koordination von Mg^{2+} denkbar.

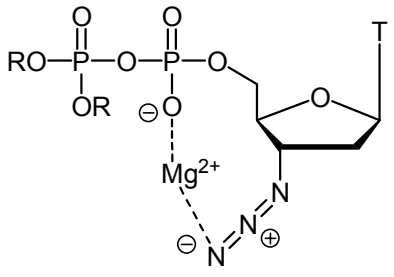


Abb. 181: Mögliche Koordination bei der Hydrolyse von BAB-AZTDP-Prodrugs

Weiterhin könnte es sein, dass konformative Eigenschaften der Verbindungen einen Einfluss auf die Hydrolyse haben. Der deutliche Unterschied der Hydrolyse von BBB-d4TDP **184e** und BBB-AZTDP **185e** soll mit den folgenden Chromatogrammen belegt werden.

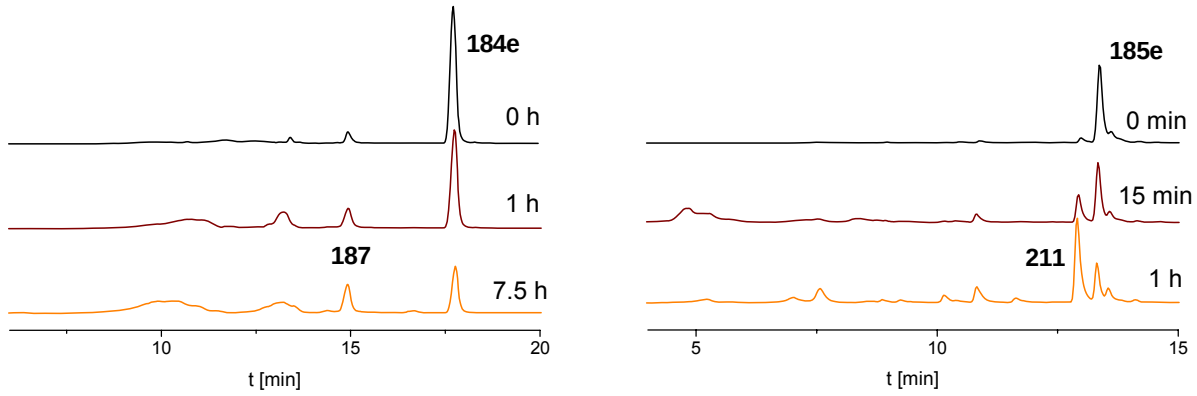


Abb. 182: HPLC-Verfolgung der Hydrolyse von **184e** und **185e** (CEM/0, Methode 2 und Methode 4)

Nach 1 h Inkubationsdauer war **185e** im Wesentlichen zu BBB-Phosphat **211** und undefinierten Folgeprodukten abgebaut, was den in Abb. 178 formulierten Mechanismus stützt. Bei **184e** verlief die Spaltung hingegen wesentlich langsamer und es konnte sogar die Entstehung von BB-d4TDP **187** nachgewiesen werden. Es ist nun interessant, dass das Intermediat **187** im Vergleich mit BBB-d4TDP **184e** in Zellextrakt eine nochmals verkürzte Halbwertszeit aufwies ($t_{1/2}$ = 2.5 h vs $t_{1/2}$ = 7 h). Dies ist verwunderlich, da bislang stets eine verlangsamte Hydrolyse für den zweiten Schritt gefunden wurde. Wir sollten uns daher die Chromatogramme der enzymatischen Hydrolyse von BB-d4TDP **187** genauer ansehen.

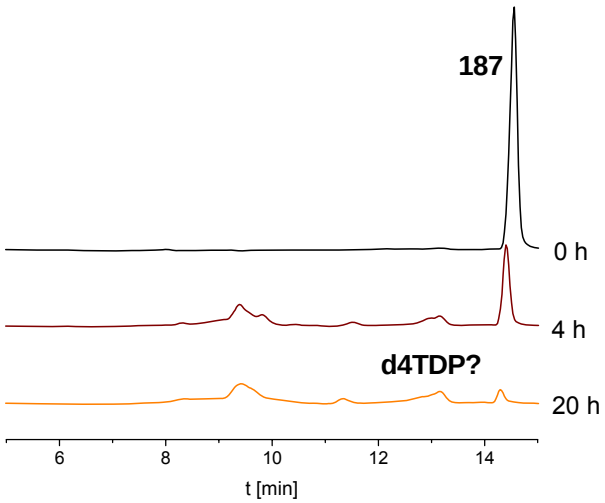


Abb. 183: Chromatogramme der Hydrolyse von **187** (CEM/0; Methode 2)

Es wird ersichtlich, dass **187** erneut in nicht definierte Folgeprodukte zerfällt, d.h. in zellulärem Medium kann aus BBB-d4TDP **184e** kein d4TDP effektiv freigesetzt werden. Zudem scheint eine enzymatische Reaktion am Benzoylester nur geringfügig stattzufinden. Der mit „d4TDP?“ gekennzeichnete Bereich entspricht der Retentionszeit von d4TDP. Dem UV-Spektrum konnte entnommen werden, dass es sich um eine nucleosidische Verbindung handelt. Allerdings scheinen hier auch noch andere Verbindungen zu eluieren. Die zusätzliche Destabilisierung des Intermediats **187** könnte mit einer besseren Koordination von Magnesium-Ionen zusammenhängen.

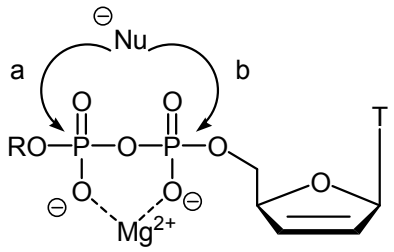


Abb. 184: Mögliche Koordination bei der Hydrolyse des Intermediats **187**

Durch die Koordination scheint es möglich, dass ein nucleophiler Angriff über die Wege a und b erfolgt. Bei Weg a würde durch den Bruch der Anhydridbindung d4TMP freigesetzt, was erklären mag, warum **184e** bei *in vitro* Tests eine TK$^-$-Aktivität aufwies (s. nächster Abschnitt). Natürlich könnte diese Aktivität auch aus den geringen freigesetzten Mengen d4TDP oder durch Umwandlung der Folgeprodukte resultieren. Der oben gezeigte Mechanismus verdeutlicht nun aber, dass die Hydrolysegeschwindigkeit des zweiten Schrittes von entscheidender Bedeutung bei der intrazellulären Freisetzung von NDP ist, da die AB-Intermediate offensichtlich gegenüber den BAB-NDP noch einmal beträchtlich destabilisiert werden. Zur Erinnerung sei noch einmal angemerkt, dass aus den isolierten Intermediaten ausschließlich das NDP bei der chemischen Hydrolyse freigesetzt wurde, d.h. sie sind chemisch gegenüber den BAB-NDP stabilisiert! Dies mag erklären, warum z.B. aus BPB-AZTDP **185c** ($t_{1/2}$ = 1 h) kein NDP entstand, wohl aber aus BOB-d4TDP **184d** ($t_{1/2}$ = 1 h), da hier die zweite Hydrolyse noch rasch genug ablief.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Verwendung der BBB-Maske zur Freisetzung von NDP völlig ungeeignet ist. Dennoch konnten mit ihrer Hilfe die

mechanistischen Abläufe der Hydrolyse detailliert untersucht werden. Aus diesen Ergebnissen wiederum lassen sich Voraussetzungen für das zukünftige Design von BAB-NDP-Prodrugs ableiten.

Es ist bislang nur für BBB-*carba*-*iso*-ddADP **190** eindeutig belegt worden, dass tatsächlich Magnesium-Ionen auslösend für die drastisch verringerte Hydrolysehalbwertszeit sind. Diese Lücke soll nun für andere Verbindungen geschlossen werden. Außerdem ist die Untersuchung der Stabilität in weiteren Medien Gegenstand der nachfolgenden Experimente. Um ein umfassendes Bild zu erhalten, wurden einige der Verbindungen in Citrat-HCl-Puffer bei pH = 2.0 hydrolysiert, was in etwa dem pH-Wert der Magensäure entspricht. Weiterhin wurden Untersuchungen in humanem Blutplasma (HS; mit und ohne Zusatz von $MgCl_2$) in fötalem Kälberserum (FCS; mit und ohne Zusatz von $MgCl_2$), in RPMI-Kulturmedium (mit und ohne Zusatz von HS, FCS und $MgCl_2$) und in Leberzellextrakt durchgeführt. Die Untersuchungen in humanem Blutplasma sollten Erkenntnisse darüber liefern, ob BAB-NDP-Produgs sich über die Blutbahn im Körper verteilen könnten. Fötales Kälberserum wird bei *in vitro* Tests zu 10% dem RPMI-Kulturmedium beigegeben, diese Untersuchungen und die Experimente in RPMI sollen später zur Interpretation der antiviralen Daten herangezogen werden. Untersuchungen in Leberzellextrakten könnten auf einen mehr oder minder stark ausgeprägten *first pass* Metabolismus hinweisen.

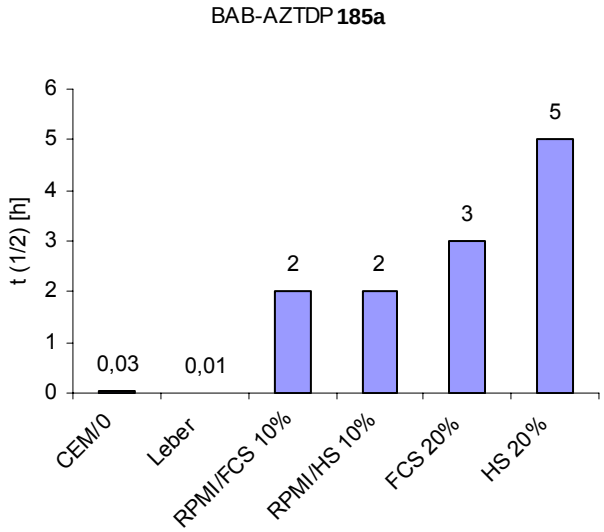


Diagramm 22: Profil von **185a**

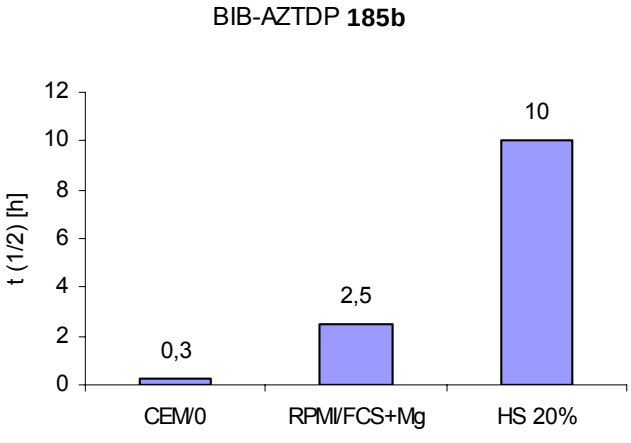


Diagramm 23: Profil von **185b**

Die chemischen Stabilitäten sind in den Diagrammen 18 und 19 angegeben (s.S. 184-185)

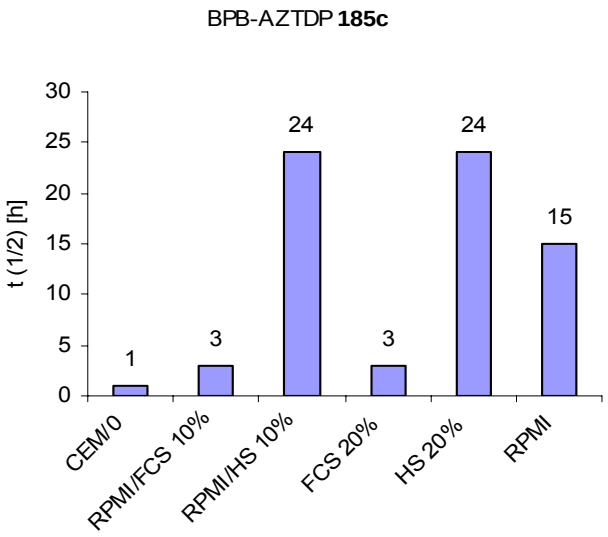


Diagramm 24: Profil von **185c**

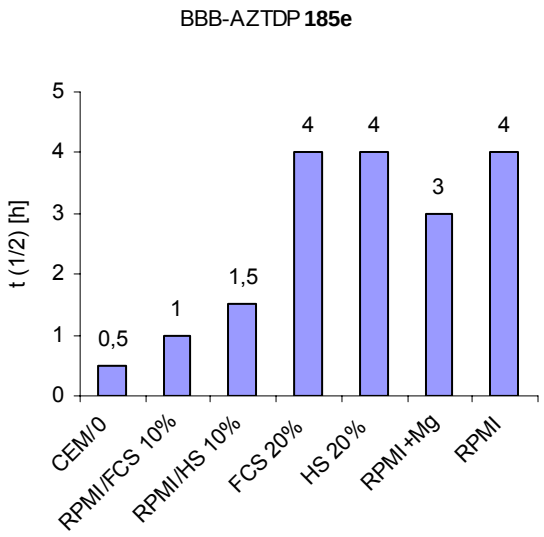


Diagramm 25: Profil von **185e**

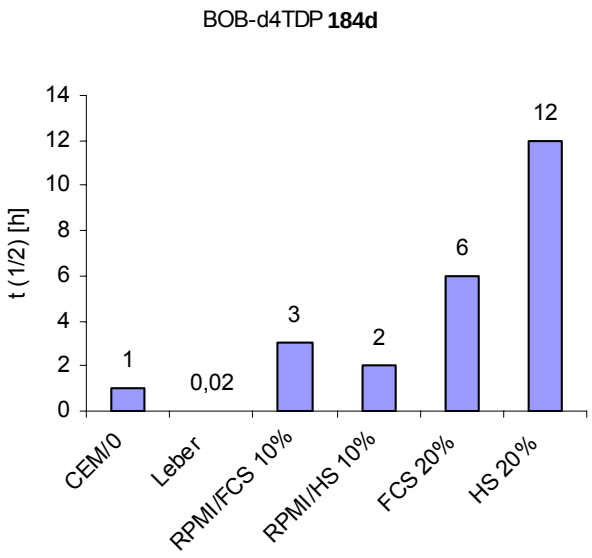


Diagramm 26: Profil von **184d**

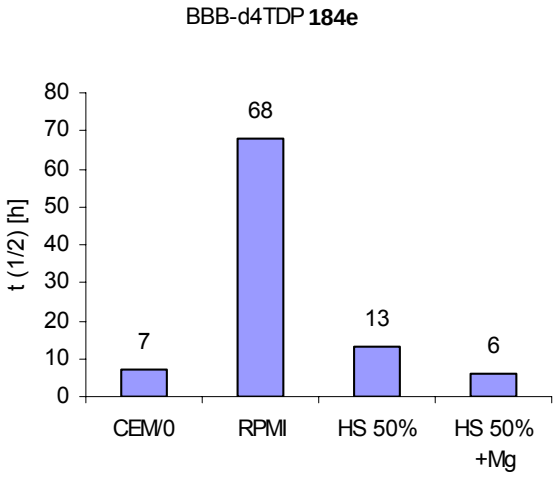


Diagramm 27: Profil von **184e**

In diesen Datenreihen (und in den dazugehörigen Chromatogrammen) verstecken sich nun einige interessante Informationen. Bevor mit der Interpretation begonnen wird, sollen aber noch einige zusätzliche Informationen gegeben werden. Einige der Werte (hauptsächlich RPMI/FCS, RPMI/HS und FCS) wurden aus Zweipunktbestimmungen nach 0 h und 3 h abgeleitet, d. h. sie sind mit einem relativ großen Fehler belastet, weswegen Unterschiede von einer Stunde nicht diskutiert werden sollen. Diese Werte werden vielmehr verwendet, um Tendenzen abzuleiten. Weiterhin sind die in Diagramm 27 gezeigten Werte mit einer großen Unsicherheit behaftet, da hier das mögliche Spaltprodukt BBB-Phosphat **211** die gleiche

Retentionszeit aufweist, wie das Edukt BBB-d4TDP **184e**. Eine genaue Messung der Halbwertszeiten scheint daher nicht möglich, nur die Zersetzungsprodukte aus den Chromatogrammen können hier untersucht werden. Außerdem soll noch auf die Inhaltsstoffe des RPMI-Kulturmediums hingewiesen werden. Dies sind im Wesentlichen Glucose, verschiedene Aminosäuren, Inositol, Phenolrot, Folsäure, Nicotinamid, Riboflavin, Thiamin, Biotin, Glutathion, Vitamin B-12, L-Glutamin, Calciumnitrat, Cholinchlorid, Natrium- und Kaliumphosphate, Natriumbicarbonat, HEPES-Puffer, und Magnesiumsulfat. Der pH Wert beträgt etwa 7.5. Aus dieser Auflistung sollte nun ersichtlich sein, dass eine Menge unterschiedlicher Nucleophile im RPMI-Kulturmedium enthalten sind und weiterhin auch Magnesium-Ionen.

Wir können uns nun der Interpretation der Daten widmen. Zunächst fällt auf, dass die Stabilität aller Verbindungen in den untersuchten Medien deutlich geringer ist, als in PBS-gepufferten Salzlösungen. Diese Reduktion lässt sich auf die verbleibende Esterase-Aktivität in z.B. HS und FCS zurückführen, was zu einer anteiligen Spaltung der Maskierungsfunktionen führt. Dennoch ist die Stabilität der Verbindungen in 20%igem Plasma noch in einem für Prodrugs vernünftigen Bereich von 5 h (**185a**) über 10 h (**185b**) bis 24 h (**185c**). Diese Reihung zeigt zugleich wieder die unterschiedliche Stabilität der verzweigten aliphatischen Reihe gegenüber Esterasen. Man erkennt auch, dass FCS offensichtlich gegenüber HS eine höhere Esterase-Aktivität aufweist, wie den Diagrammen 22, 24 und 26 entnommen werden kann. Auch die Inkubation der Verbindungen in RPMI ohne weitere Zusätze vermindert die Stabilität (s. Diagramm 24 und 27), was ursächlich wohl nun an der Spaltung der Pyrophosphatbrücke liegt, da RPMI Magnesium-Ionen und Nucleophile enthält. Die Zugabe von FCS oder HS zum RPMI-Medium verschärft die Abnahme der Halbwertszeiten gemeinhin noch einmal dramatisch, es ergeben sich aber für die unterschiedlichen Verbindungen verschiedene Bilder. Wir entnehmen aus Diagramm 25, dass eine Beschleunigung der Hydrolyse durch Mischung von RPMI mit FCS oder HS stattfindet. Allerdings war die Verbindung BBB-AZTDP **185e** ohnehin als Sonderfall entlarvt worden. Dies äußert sich in den ausgesprochen kurzen Halbwertszeiten. Für das BPB-Derivat **185c** (Diagramm 24) muss ein eigenartiges Verhalten festgestellt werden: Hier bewirkt nur die Kombination RPMI/FCS einen dramatischen Verlust an Stabilität. RPMI/HS zeigt gegenüber HS keine Destabilisierung. Dies könnte auf die unterschiedliche enzymatische Aktivität verweisen. Warum allerdings durch die Kombination RPMI/HS eine Stabilisierung

gegenüber RPMI eintritt, ist unklar. Aus Diagramm 26 können wir entnehmen, dass hier sowohl durch Kombination von RPMI mit FCS, als auch RPMI/HS eine entsprechende Destabilisierung eintritt, was ebenso für BAB-AZTDP **185a** gefunden wird. Auffällig ist weiterhin, dass eine zusätzliche Zugabe von Magnesiumchlorid stets mit einer weiteren Destabilisierung einhergeht, ein Ergebnis, dass die postulierten Hydrolysemechanismen stützt. Dies soll noch einmal beispielhaft an HPL-Chromatogrammen gezeigt werden.

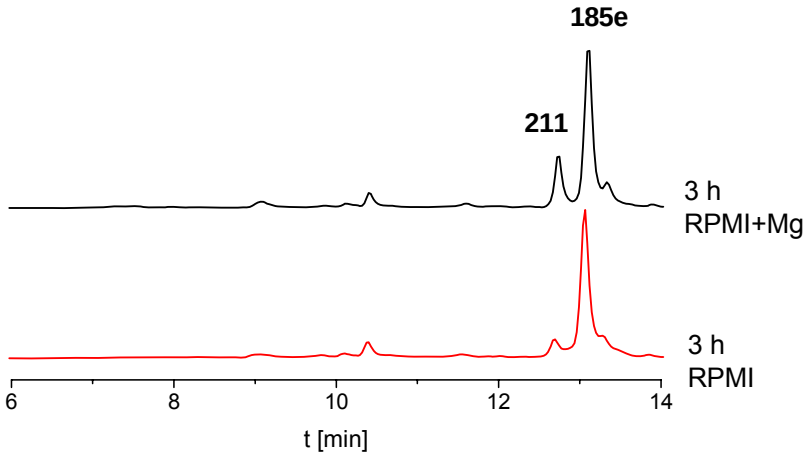


Abb. 185: Chromatogramm der Hydrolyse von BBB-AZTDP **185e** in RPMI+Mg und RPMI nach 3 h; Methode 4

Man erkennt wiederum die Freisetzung von BBB-Phosphat **211** aus **185e**. Bei Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration fällt die Spaltung allerdings deutlich intensiver aus. Bei allen durchgeführten Untersuchungen führte die Kombination von RPMI mit 10% FCS stets zu einem Verlust an Stabilität um etwa eine Größenordnung. Daher war trotz aller günstigen Eigenschaften der Verbindungen mit einer Verfälschung der *in vitro* Testergebnisse zu rechnen. Abschließend sei angemerkt, dass sowohl BAB-AZTDP **185a**, als auch BOB-d4TDP **184d** in Leberzellextrakt sehr rasch unter Freisetzung nicht definierter Produkte gespalten wurden. Ob allerdings d4TDP oder AZTDP in Leberzellextrakt ebenso zersetzt würden, war nicht mehr Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die schnelle Spaltung ist wenig überraschend, da in Leberzellen die Esterase-Konzentration noch einmal deutlich erhöht ist. Zudem können weitere Enzyme an den Abbaumechanismen beteiligt sein.

Als letzter Punkt soll nun noch die Stabilität einiger Verbindungen bei pH = 2.0 angesprochen werden. Generell nahm die Stabilität der untersuchten BAB-NDP-Pronucleotide bei geringerem pH-Wert zu, da durch die geringere Konzentration an

Hydroxid-Ionen sowohl der Bruch der Anhydridbindung, als auch die Esterspaltung langsamer verliefen. Da die Hydrolyse bei pH = 2.0 so ausgesprochen langsam war, konnte ein weiterer Hydrolysemechanismus, der von Ulrike Muus in ihrer Dissertationsschrift für BAB-NMP postuliert wurde, untersucht werden. Es ist gezeigt worden, dass ein spontaner Bindungsbruch der Benzylphosphatester-Bindung durch Umpolung des *para*-Substituenten stattfindet. Es gilt nun, die Annahme zu untersuchen, ob auch ohne vorherige Umpolung eine Spaltung eintreten kann. Dies ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

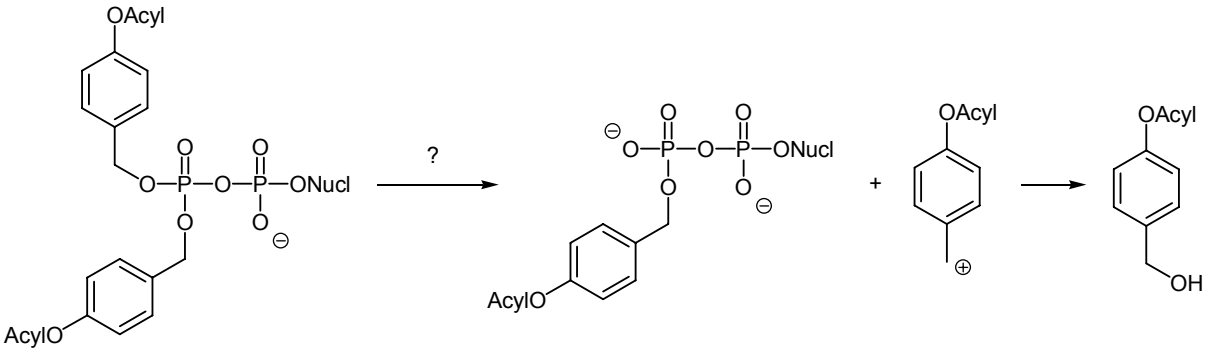


Abb. 186: Möglicher Zerfall von BAB-NDP-Prodrugs ohne Umpolungsreaktion

Dieser Zerfall sollte in erster Näherung pH-unabhängig sein. Wir erinnern uns, dass mit Verbindung **195e** (s. Abb. 173, S. 187) ein Benzoyl-substituierter Benzylalkohol zur Verfügung stand, welcher ein intensives HPLC-Signal hervorrief, und welcher somit als Spaltprodukt nachweisbar sein sollte. Zunächst sollen die ermittelten Halbwertszeiten bei pH = 2 angegeben werden, und danach sollen einige der aufgezeichneten Chromatogramme analysiert werden.

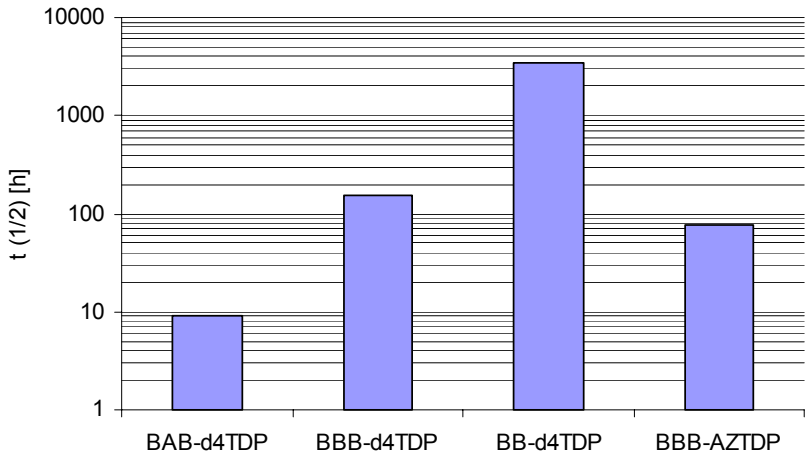


Diagramm 28: Stabilität einiger Prodrugs in Citrat/HCl-Puffer pH = 2.0

Aus den ermittelten Halbwertszeiten tritt die unglaubliche Stabilität von BB-d4TDP **187** mit einer Halbwertszeit von etwa 3500 h deutlich hervor. Das Derivat BAB-d4TDP **184a** weist hingegen eine etwa so große Halbwertszeit wie bei pH = 7.3 auf. Dies könnte auf die Möglichkeit einer sauren Spaltung der Estergruppe hinweisen, die bei den BBB-Derivaten **184e** und **185e** nicht mehr stattfindet. Insgesamt verweisen diese Ergebnisse auf die bislang schon mehrfach gefundene hohe chemische Stabilität von BAB-NDP-Prodrugs, zumindest in Abwesenheit von Magnesium-Ionen. Um den in Abb. 186 gezeigten Mechanismus zu untersuchen, sollen die aufgezeichneten Chromatogramme nun nach der Entstehung von 4-(Hydroxymethyl)phenylbenzoat **195e** (t_R= 11.8 min; Methode 4) durchsucht werden. Tatsächlich findet man in einigen Fällen (und auch in Hydrolyselösungen bei pH = 7.3) einen Peak um diese Retentionszeit mit entsprechendem UV-Spektrum, wenn die Halbwertszeit genügend groß ist. Dieses Nebenprodukt ist in den bislang gezeigten Chromatogrammen nicht zugeordnet worden (s. z.B. Abb. 179, S. 192), was nun nachgeholt werden soll.

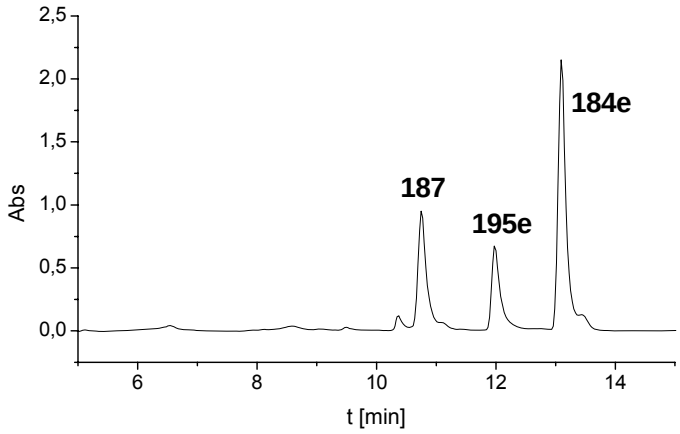


Abb. 187: Chemische Hydrolyse von BBB-d4TDP **184e** bei pH = 2.0 nach 245 h Inkubationsdauer; Methode 4; Integration bei 233 nm

Da kein d4TMP nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Pyrophosphatbrücke unter diesen Bedingungen stabil ist. Weiterhin konnte keine Entstehung von Benzoesäure (t_R = 7 min) nachgewiesen werden, d.h. eine Spaltung der Ester fand ebenso wenig statt. Damit bleibt die einzige Möglichkeit der Freisetzung von BB-d4TDP **187** der spontane Zerfall von **184e** nach dem in Abbildung 186 gezeigten Mechanismus. Diese Spaltung ist allerdings ausgesprochen langsam und wird bei höheren pH-Werten von der Spaltung der Estergruppierung

unter anschließendem Zerfall überlagert. Bei BB-d4TDP **187** konnte über den beobachteten Zeitraum kein Zerfall dieser Art festgestellt werden.
Alle Experimente zusammengenommen, konnte ein detailliertes Bild der Hydrolysemechanismen verschiedener BAB-NDP-Prodrugs gezeichnet werden. Dies war im Hinblick auf das zukünftige Design solcher Verbindungen unerlässlich. Die Schlussfolgerungen sollen im Ausblick geschildert werden, zunächst sollen jedoch die antiviralen Daten ausgewertet werden.

6.3.4 Antivirale Daten von BAB-NDP-Prodrugs

Erneut wurden die antiviralen Daten gegen HIV-1 und HIV-2 in Kooperation mit Prof. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien ermittelt und erneut lagen leider die antiviralen Daten gegen HSV, HBV und EBV, die von Frau Dr. Astrid Meerbach; Universitätsklinikum Jena, ermittelt werden zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht vor.

	EC_{50}[a] [μM]			CC_{50}[b] [μM]
	CEM/0		CEM/TK$^-$	CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	**HIV-2**	
BAB-d4TDP **184a**	1.05 ± 0.92	1.5 ± 0.7	21.0 ± 5.7	>125
BPB-d4TDP **184c**	0.78 ± 0.80	0.90 ± 0.16	14 ± 5	66 ± 1.4
BOB-d4TDP **184d**	0.90 ± 0.44	1.3 ± 0.39	2.6 ± 1.9	81.1 ± 1.4
BBB-d4TDP **184e**	0.20 ± 0.0	0.30 ± 0.14	0.85 ± 0.07	36 ± 5
BAB-AZTDP **185a**	0.065 ± 0.074	0.037 ± 0.037	25.0 ± 0.0	73 ± 14
BIB-AZTDP **185b**	0.062 ± 0.077	0.039 ± 0.036	35.0 ± 21.2	77 ± 12
BPB-AZTDP **185c**	0.028 ± 0.019	n.b.	36 ± 0	71 ± 8.5
BBB-AZTDP **185e**	0.17 ± 0.14	0.05 ± 0.025	>10	23
AZT **1**	0.54 ± 0.031	0.54 ± 0.031	>250	>250
d4T **3**	0.68 ± 0.48	1.0 ± 0.68	22 ± 10	141 ± 17

[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration
Tab. 7: Antivirale Profile BAB-NDP-Prodrugs und der entsprechenden Referenzverbindungen

Für die Interpretation der Daten gelten prinzipiell die gleichen Überlegungen, wie bereits im Kapitel über den intrazellulären Einschluss von *cyclo*Sal-Pronucleotiden angestellt. Es muss erneut darauf hingewiesen werden, dass das Auftreten von Werten wie 0.062 ± 0.077 (BIB-AZTDP **185b**) etwas irritierend, scheinbar aber eine Besonderheit biologischer Messungen ist. Daher soll der hauptsächlich diskutierte Wert die TK$^-$-Aktivität sein, da hier direkt abgeleitet werden kann, ob das Prodrug intakt in die Zelle gelangt und dort die Maskierungen abgespalten werden. Weiterhin sei darauf verwiesen, dass AZT **1** bei anderen Messreihen eine Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich von z.B. BIB-AZTDP **185b** aufwies, weshalb nicht gefolgert werden kann, die BAB-NDP wären von ihren antiviralen Profilen besser. Die einzige Verbindung, bei der eine vollständige TK$^-$-Aktivität festgestellt werden konnte, war BBB-d4TDP **184e**. Dies ist im Hinblick auf die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnittes etwas merkwürdig. Natürlich müssen aber die in Zellextrakten gemessenen Kinetiken nicht mit denen einer intakten Zelle übereinstimmen. Sehr erfreulich ist aber, dass aus diesem Wert eine Diffusion über die Zellmembran abgeleitet werden kann, d.h. trotz der negativen Ladung des Systems scheint ein passiver Transport stattfinden zu können. Eine angedeutete TK$^-$-Aktivität besitzt zudem BOB-d4TDP **184d** mit 2.6 ± 1.9 μM (also 0.7 bis 4.5), d.h. eventuell findet auch hier eine Diffusion statt, wobei in diesem Fall eine Freisetzung von d4TDP aus den gemessenen Kinetiken wahrscheinlicher anmutet. Auch dies ist ein erfreuliches Ergebnis, da eine Optimierung der Eigenschaften von BAB-NDP-Prodrugs durch Anfügen verschiedener Fettsäure-Ester nun möglich scheint. Warum die anderen Prodrugs keine TK$^-$-Aktivität aufweisen, ist unklar. Einerseits könnte dies an einer zu raschen Zersetzung der Verbindungen im RPMI/FCS-Medium liegen, andererseits könnte ebenso die Polarität der Verbindungen eine Rolle spielen. Es ist immerhin auffällig, dass die unpolareren d4TDP-Prodrugs mit Benzoyl- und Octanoyl-Modifikation die beste TK$^-$-Aktivität aufweisen. Auch dies sollte Ansporn sein, weitere Fettsäure-Modifikationen zu testen, da hier die Polarität weiter vermindert werden kann, aber dennoch eine effektive erste und zweite enzymatische Hydrolyse das NDP liefern würden. Auch soll darauf hingewiesen werden, dass die TK$^-$-Aktivität nur bei d4T-Prodrugs festgestellt werden konnte. Dies Ergebnis verweist eventuell auf die nochmals beschleunigten Zersetzungsreaktionen, die bei z.B. BBB-AZTDP **185e** nachgewiesen werden konnten und die mit einer zusätzlichen Koordination von Magnesium-Ionen zusammenhängen könnten. Damit wäre das eigentliche Ziel eines

AZTDP-Prodrugs nicht erreicht, allerdings lassen sich aus den vorgeschlagenen Mechanismen bestimmte Verbesserungsvorschläge des Systems ableiten, wie dies im Ausblick geschehen wird. Zunächst soll noch eine weitere Verbindung, welche den Tests unterzogen wurde, diskutiert werden.

	EC_{50}[a] [μM]			CC_{50}[b] [μM]
	CEM/0		CEM/TK$^-$	CEM/0
Verbindung	**HIV-1**	**HIV-2**	**HIV-2**	
BBB-3´-*O*-*i*Bu-BVdUDP **189**	6.0 ± 5.7	6.3 ± 0.64	>10	17 ± 2
BVdU **11**	>250	>250	>250	>250

[a]50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; [b]50% cytotoxische Konzentration
Tab. 8: Antivirale Profile BBB-3´-*O*-*i*Bu-BVdUDP **189** und der entsprechenden Referenzverbindung

Es sei daran erinnert, dass BVdU **11** zu den selektiven antiviral aktiven Verbindungen zählt. Dies bedeutet, dass BVdU von viralen Kinasen zum Diphosphat phosphoryliert wird und erst dann die zelluläre NDP-Kinase das entsprechende Triphosphat aufbaut. Weiterhin heißt das, BVdUTP kann eigentlich nur in Zellen entstehen, die HSV-infiziert sind (s. Kenntnisstand). Wenn nun aber das Diphosphat direkt in einer Zelle freigesetzt wird, die z.B. HIV infiziert ist, so kann das Triphosphat aufgebaut werden, was sich in einer antiviralen Aktivität niederschlagen mag. Nun sind die erhaltenen Werte für das BVdU-Prodrug **189** zwar nicht herausragend und ob ein TK$^-$-Wert >10 besser ist, als >250 sei dahingestellt; dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität (und der CEM/0 HIV-1-Wert unterliegt immerhin erheblichen Schwankungen) aus einer Freisetzung von BVdUDP resultiert. Hier muss noch einmal auf die erhöhte Stabilität von **189** in Zellextrakt hingewiesen werden. Bei den Hydrolysen war immerhin nur sehr untergeordnet der Bruch der Anhydridbindung festgestellt worden, der bei dem vergleichbaren AZT-Derivat **185e** sehr schnell stattfand. Zudem scheint die hohe Lipophilie von **189** sich begünstigend auf den Zelleintritt auszuwirken, was aus der relativ hohen Cytotoxizität abgeleitet werden kann. Es wäre daher sehr interessant, ein BAB-BVdU-Prodrug mit z.B. der Octanoyl-Modifikation darzustellen, da hier vermutlich deutlich mehr BVdUDP freigesetzt würde, was die Ergebnisse der antiviralen Tests gegen HIV eventuell

eindeutiger machte. Dies wäre ein ausgesprochen interessantes Beispiel für die Überführung einer antiviral inaktiven Verbindung in eine antiviral aktive Form.

6.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde zunächst die Darstellung von *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs diskutiert. Aus den Ergebnissen ließen sich die optimalen Trocknungsbedingungen der NMP für die Synthese von Anhydridbindungen ableiten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NDP-Prodrugs nur mit einer negativen Ladung am α-Phosphoratom stabil sein können. Aus den ungünstigen Hydrolyse-Eigenschaften der *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs konnte zudem die alternative Struktur der BAB-NDP-Prodrugs als Ausweg abgeleitet werden. Die Synthese und Reinigung dieser Verbindungen wurde ausführlich beschrieben und bis zu sehr guten Ausbeuten optimiert. Die Aufklärung der Hydrolyse-Eigenschaften von BAB-NDP-Prodrugs konnte sehr detailliert geführt werden. Mit einigen der Verbindungen dieses Typs konnte tatsächlich eine fast quantitative Freisetzung des entsprechenden NDP in zellulärem Medium erreicht werden. Damit konnte erstmals ein effektiv funktionierendes NDP-Prodrug-System etabliert werden. Weitere Untersuchungen zeigten eine Destabilisierung der Verbindungen in Kulturmedium, wobei der Beweis eines Einflusses von Magnesium-Ionen auf diese Destabilisierung geführt werden konnte. Aus den erhaltenen Ergebnissen ließen sich genaue Anforderungen an das Hydrolyseprofil von BAB-NDP-Prodrugs ableiten, was im Ausblick zur Formulierung optimierter Strukturen führen wird. Obwohl noch kein effizient funktionierendes Prodrug für die Freisetzung von AZTDP erhalten werden konnte, legen diese Untersuchungen doch den Grundstein für weiterführende Arbeiten.

7 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit drei unterschiedlichen Themengebieten; dem intrazellulären Einschluss von *cyclo*Sal-Pronucleotiden, der Analyse intrinsisch fluoreszierender Nucleoside und Pronucleotide und der Synthese von Nucleosiddiphosphat-Prodrugs. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese drei Themenbereiche miteinander verknüpfen lassen.

Zunächst wurden, auf bereits durchgeführten Arbeiten aufbauend, POM-funktionalisierte *cyclo*Sal-Pronucleotide mit erhöhter Hydrolysehalbwertszeit entwickelt und eine generalisierte Syntheseroute entworfen, um verschiedene Nucleoside mit „lock-in“-Maskierungen modifizieren zu können (s. S. 30-35). Die auf diese Weise erhaltenen Verbindungen wurden in Hydrolysestudien detailliert untersucht, wodurch ein klares Bild des Hydrolysemechanismus in unterschiedlichen Medien gezeichnet werden konnte (s. S. 35-46). Da die erhaltenen antiviralen Daten gegen HIV nicht vielversprechend waren, wurde ein weiteres, neuartiges System entwickelt. Um einen effizienten intrazellulären Einschluss von *cyclo*Sal-Pronucleotiden zu erhalten, wurden verschiedene Aminosäure-Ester mit der *cyclo*Sal-Maskierung verknüpft. Es konnte auf diese Weise eine Kombination günstiger Eigenschaften erreicht werden. Einerseits wurde durch diese Modifikation die chemische Stabilität erhöht, andererseits konnte die enzymatische Stabilität auch im Vergleich mit der POM-Funktionalisierung noch einmal deutlich gesenkt werden, was als Voraussetzung für einen effektiven „lock-in“-Mechanismus angesehen wurde (s. S. 64-77). Es wurde das Verhalten der Pronucleotide unter Variation der Aminosäure, der Konfiguration der Aminosäure und des Phosphoratoms, des Esters und des Nucleosids untersucht, woraus sowohl der chemische als auch der enzymatische Hydrolysemechanismus im Wesentlichen abgeleitet werden konnten (s. S. 50). Damit steht erstmals eine strukturell äußerst variable „lock-in“-Modifikation von *cyclo*Sal-Pronucleotiden mit einer optimierten Synthesestrategie zur Verfügung. Aus den chemisch-analytischen Ergebnissen und den biologischen Testergebnissen ließen sich die Anforderungen an Aminosäure-Ester modifizierte *cyclo*Sal-Pronucleotide ableiten (s. S. 77-81). Die Weiterentwicklung dieses Systems wird Teil zukünftiger Arbeiten sein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die analytischen Möglichkeiten von intrinsisch fluoreszierenden Nucleosidanaloga ausgeleuchtet. Zunächst wurden verschiedene Synthesen solcher Verbindungen untersucht. Dabei konnte ein intrinsisch fluoreszierendes Nucleosidanalogon der d4-Reihe erstmals synthetisiert werden (s. S. 94). Auch konnten carbocyclische Vertreter dieser analytischen Sonden in großen Mengen verlässlich dargestellt werden (s. S. 96). Diese Nucleoside wurden dann zu verschiedenen *cyclo*Sal-Triestern umgesetzt, unter anderem auch zu den eben beschriebenen POM-, AM- und Aminosäure-Ester-modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden (s. S. 101). Damit standen empfindliche analytische Sonden zur Untersuchung des „lock-in"-Effektes zur Verfügung. In einem einfach strukturierten U-Rohr-Experiment konnte eine annähernd vollständige Anreicherung eines Triesters aus einer Donorphase über eine Dichlormethan-Barriere in eine Akzeptorphase durch enzymatische Spaltung unter Fluoreszenzdetektion erreicht werden (s. S. 107-111). Dieses Beispiel illustrierte auf eine deutliche Weise die prinzipielle Machbarkeit eines intrazellulären Einschlusses von *cyclo*Sal-Pronucleotiden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass selbst aus nanomolaren Lösungen der Verbindungen ein deutlicher Nachweis durch HPLC-Fluoreszenz-Analyse möglich war. Damit konnten die Verbindungen, verglichen mit UV-Analytik, auch noch in über 300000facher Verdünnung identifiziert werden (s. S. 104). Somit konnte eventuell eine Alternative zu umständlichen und teuren *radiolabelling* Experimenten entwickelt werden. Ob dies wirklich der Fall ist, können zukünftige Experimente zeigen. Einige der Verbindungen wurden hinsichtlich verschiedener Fluoreszenzerscheinungen detailliert untersucht, wobei gemeinhin für *cyclo*Sal-Pronucleotide der dm^5K-Reihe starke Quenching-Effekte gefunden wurden, die bei der Freisetzung des Nucleotids verschwanden. Für die Nucleoside der *iso*-A-Reihe konnte bei den untersuchten Verbindungen kein Quenching festgestellt werden (s. S. 103). Ebenso war die detaillierte Aufklärung des Hydrolyseverhaltens der Verbindungen in unterschiedlichen Medien Teil dieser Arbeit und konnte erfolgreich durchgeführt werden (s. S. 105-106). Unter Anleitung von Dr. Arwyn Tomos Jones, Cardiff, Wales, wurden die Verbindungen in *in vitro* Zelltests fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei musste leider festgestellt werden, dass die UV-Absorptionsbande der Verbindungen kurz vor dem gefilterten Anregungsbereich der verwendeten UV-Lampe endete. Daher konnte die ursprünglich angestrebte direkte intrazelluläre Analyse der Verbindungen nicht

erfolgreich durchgeführt werden (s. S. 112-119). Hierfür würde zur Anregung ein durchstimmbarer UV-Laser benötigt.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Darstellung von NDP-Produgs. Zunächst wurde die Synthese von *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs herausgearbeitet und anschließend chromatographische Vorschriften zur Reinigung entwickelt (s. S. 128-138). Die sich der erfolgreichen Synthese anschließenden Hydrolyseuntersuchungen zeigten für das erste entwickelte NDP-Prodrug eine nicht zufriedenstellende Freisetzung von 1% NDP (s. S. 135). Die Freisetzung des NDPs konnte durch Optimierung des Systems auf etwa 25% erhöht werden. Aus den Schwächen der *cyclo*Sal-NDP-Prodrugs konnte schließlich die optimierte Struktur der BAB-NDP-Prodrugs abgeleitet werden. Die Synthese solcher Verbindungen wurde erstmals beschrieben und konnte trotz der komplexen Strukturen bis zu einer ausgezeichneten Ausbeute von über 70% vorangetrieben werden (s.S. 166-168). Zudem konnte die Synthesedauer durch Anwendung verschiedener Handgriffe beträchtlich verkürzt werden (s.S. 171). Mit Hilfe der verbesserten Synthese- und Reinigungsabläufe konnte eine große, strukturell verschiedene Vielfalt an BAB-NDP-Prodrugs erzeugt werden, wobei sowohl die maskierten Nucleosiddiphosphate, als auch die Estergruppierungen der Maske einer Variation unterworfen wurden (s. S. 160-167). Damit erfüllte die entwickelte Syntheseroute die an sie gestellten Anforderungen in hervorragender Weise. Es konnte gezeigt werden, dass die prozentuale Freisetzung des NDPs an die Hydrolysehalbwertszeiten der Masken gekoppelt ist (s. S. 183). Tatsächlich gelang mit der ersten untersuchten Maskierung eine annähernd quantitative Freisetzung des NDPs in zellulärem Medium innerhalb weniger Minuten bei hoher extrazellulärer Stabilität im Bereich zwischen 15 und 20 h (s. S. 172-177). Dies stellte ein ganz außergewöhnlich gutes Ergebnis dar, das in dieser Deutlichkeit nicht erwartet worden war. Die Untersuchung des Einflusses der Ester der BAB-Modifikation und der Nucleoside wurde umfangreich durchgeführt. Aus den Ergebnissen ließen sich detaillierte Spaltungsmechanismen für die einzelnen Prodrugs ableiten (s. S. 185-202). Auch die Spaltung der Anhydridbindung der BAB-NDP-Prodrugs unter dem Einfluss von Magnesium-Ionen konnte ausführlich belegt werden (s. S. 197-200). Zudem konnte einigen der antiviralen Daten das Eindringen des intakten Pronucleotids in die Zelle entnommen werden; dies trotz der relativ hohen Molmasse der Verbindungen. Die teils unbefriedigenden antiviralen

Daten konnten mit einem dramatischen Stabilitätsverlust der Verbindungen im Inkubationsmedium RPMI/FCS, erneut unter dem Einfluss von Magnesium-Ionen, erklärt werden (s. S. 197-199; 203-205). Aus all diesen Ergebnissen können die im Ausblick gezeigten optimierten Strukturen abgeleitet werden, welche hoffentlich die letzten verbliebenen Schwächen des BAB-NDP-Prodrug-Systems beseitigen werden. Damit wäre es erstmals möglich, Nucleosiddiphosphate und eventuell sogar Nucleosidtriphosphate durch die Zellmembran zu schleusen und intrazellulär freizusetzen. Dies könnte einen großen therapeutischen und analytischen Nutzen in sich tragen.

8 Summary

This thesis deals with three different topics: 1. the intracellular lock-in of modified *cyclo*Sal-pronucleotides; 2. the synthesis and analytical evaluation of intrinsically fluorescent pronucleotides; 3. the design of efficient NDP-prodrug-systems based on the *cyclo*Sal- and BAB-concept.

In the first chapter, the design of novel lock-in modified *cyclo*Sal-pronucleotides based on the POM-approach was presented. The examination of the impairments of this system led to the design of amino acid ester modified *cyclo*Sal-pronucleotides, an interesting class of new compounds with finely adjustable properties. The investigation of different amino acids, different stereochemistry, both at the amino acid and phosphorous, as well as commutation of the ester moieties, facilitated the deduction of principally beneficial modifications. Both, the mechanism of pure chemical hydrolysis and the mechanism of enzyme triggered hydrolysis, were finally unravelled. For some of the compounds full TK-bypass activity was found, underlining the highly efficient intracellular NMP delivery. Additionally, the concept was expanded to different antivirally active nucleosides.

In the second chapter, the synthesis of intrinsically fluorescent nucleoside analogs was described in detail. The following conversion of these nucleosides to a variety of prodrugs was achieved. With a simple experimental setup, the lock-in concept was exemplified, which conjoined the first and the second part of this thesis. Unfortunately, the desired in-cell analysis of different pronucleotides employing fluorescence microscopy failed due to a little gap between absorption and excitation wavelengths. Anyhow, by taking advantage of the high sensitivity of fluorescence analysis, the compounds might still be useful in cellular breakdown studies as an alternative to the radio labelling of compounds.

In the third chapter, the design of NDP-prodrug systems was described. During the course of synthesis and evaluation of the compounds, different requirements for the efficient NDP-release were derived. This finally led to the design of BAB-NDP-prodrugs with extraordinary properties. For the first time, lipophilic prodrugs of NDPs were described, that were able to enter cells by passive diffusion and that released large amounts of NDP. The breakdown mechanisms of these prodrugs were painstakingly investigated, leading to different proposals of hydrolysis in a variety of chemical and biological media. The synthesis of an intrinsically fluorescent,

enzymatically activated BAB-Prodrug interconnected all three different parts of this thesis. Taking all results into account, new classes of NDP-Prodrugs will be described in the next chapter, which may combine all beneficial properties of BAB-NDP-prodrugs and that may evade the last weaknesses left in the BAB-concept.

9 Ausblick

Vorschläge zum *„lock-in“ Konzept*

Die bisherigen Ergebnisse zum „lock-in“-Konzept legen nahe, dass die Verwendung der POM-Funktionalisierung eingestellt werden sollte, da mit der Modifikation durch Aminosäureester eine sehr gute Alternative entwickelt wurde. Da es eine Vielzahl verschiedener Aminosäuren gibt, weiterhin die Ester beliebig verändert und zudem unterschiedlichste Nucleoside maskiert werden können, resultiert eine große Vielzahl möglicher Zielverbindungen. Diese sind in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst, wobei die variablen Positionen mit einem Pfeil gekennzeichnet wurden.

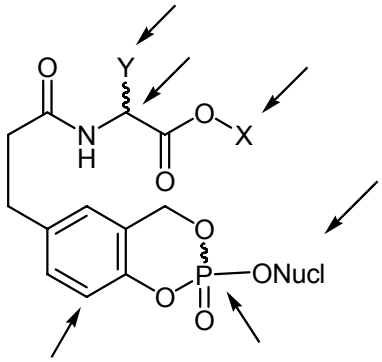


Abb. 188: Variable Positionen von Aminosäure-Ester modifizierten *cyclo*Sal-Pronucleotiden

Es muss dabei betont werden, dass diese Strukturen aufgrund ihrer Komplexität wohl eher von akademischem Interesse sind, aber dennoch eine beträchtliche Erweiterung des *cyclo*Sal-Konzepts beinhalten. Es wäre prinzipiell interessant zu untersuchen, ob verschiedene Modifikationen zu einer intrazellulären Anreicherung führen können und ob diese Anreicherung auf bestimmte Zellorganellen ausgedehnt werden kann. Hierzu bietet sich die fluoreszenzmikroskopische Analyse an.

Vorschläge zu intrinsisch fluoreszierenden Pronucleotiden

Von dem synthetischen Standpunkt aus, ist dieses Gebiet relativ umfassend bearbeitet worden. Aus analytischer Sicht sollten die dargestellten Verbindungen nun Zellaufschluss-Untersuchungen unterworfen werden. Dies könnte zu einer Alternative von teuren *radio labelling* Experimenten entwickelt werden. Um Pronucleotide

fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können, scheint z.B. die Verwendung von BCNAs als Nucleosidkomponente empfehlenswert. Die möglichen Strukturen solcher Verbindungen sind in der nächsten Abbildung gezeigt.

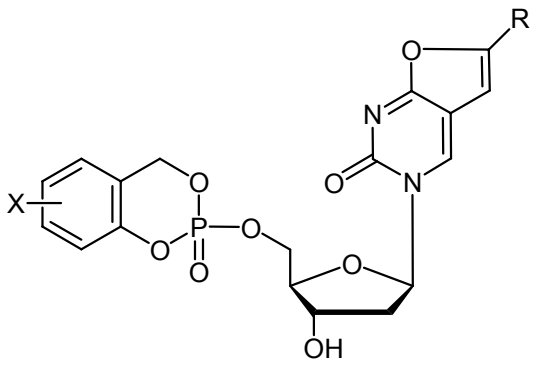


Abb. 189: Leitstruktur von *cyclo*Sal-Prodrugs für die Fluoreszenzmikroskopie

Mit den erarbeiteten Syntheseprotokollen sollte die Darstellung dieser Verbindungen eigentlich keine größeren Probleme mehr verursachen.

Vorschläge zu NDP-Prodrugs

Bei den untersuchten BAB-NDP-Prodrugs konnten einige Schwachstellen und einige Möglichkeiten zu weiterführenden Experimenten identifiziert werden. Zunächst soll auf die letzteren eingegangen werden. Konzeptionell scheint sich der BAB-Ansatz auch auf Triphosphat-Prodrugs ausdehnen zu lassen. Und tatsächlich konnte Tillman Schulz bereits zeigen, dass sich NTP mit dem BAB-Konzept maskieren lassen und dass pH-abhängig eine Freisetzung des entsprechenden NTPs erreicht werden kann. Damit wurde der BAB-Ansatz noch einmal beträchtlich erweitert. Es wird in diesem Zusammenhang zu klären sein, wie sich die Stabilität solcher Verbindungen in zellulärem Medium darstellt. Weiterhin könnte über eine Maskierung des α-Phosphats bei solchen Verbindungen nachgedacht werden. Damit würde allerdings ein großer Vorteil der bislang diskutierten BAB-Prodrugs eingebüßt werden: Die Abwesenheit asymmetrischer Atome in der Maskierungseinheit. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Grundstruktur von BAB-NTP-Prodrugs.

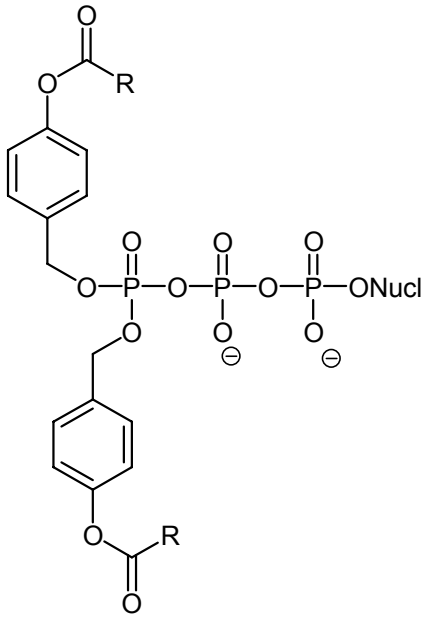


Abb. 190: BAB-NTP-Prodrugs

Weiterhin scheint die Maskierung von BVdU zu einer antiviralen Aktivität gegenüber HIV geführt zu haben. Da dies mit dem BBB-System erzielt wurde, welches nachweislich nur geringe Mengen Diphosphat freizusetzen vermag, sollte unbedingt ein BVdU-Derivat mit z.B. BIB-Maskierung dargestellt und in anti-HIV-Tests untersucht werden.

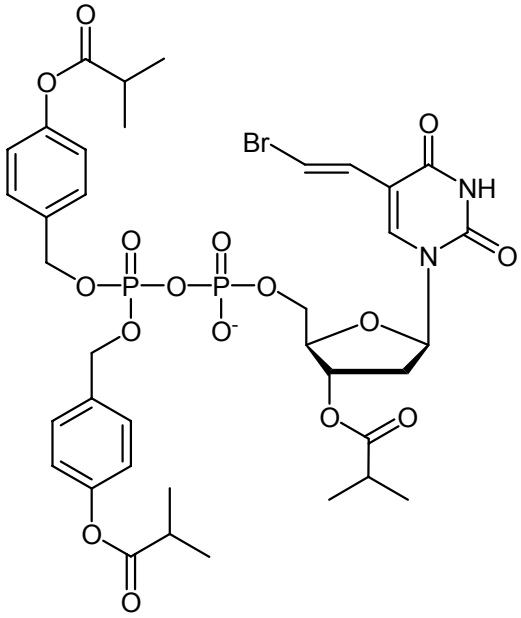


Abb. 191: BVdUDP-Derivat

Es müsste in diesem Zusammenhang geklärt werden, welche Schutzgruppe für die 3´-OH-Gruppe bei Nucleosidanaloga am besten geeignet ist.

Als größte Schwächen des Systems sind die Labilisierung der Pyrophosphatbrücke in Gegenwart von Magnesium-Ionen zu nennen und weiterhin die Abhängigkeit der Freisetzung von NDP von beiden Hydrolysehalbwertszeiten der Maskierungseinheiten. Eventuell scheint auch die zu geringe Lipophilie einiger der Verbindungen einen Einfluss auf die passive Diffusion über die Zellmembran zu haben. Bei der Fortführung der Synthesen sollte daher darauf geachtet werden, dass die Polarität und beide Hydrolysehalbwertszeiten hinreichend gering sind. Der beste Ansatz dies zu erreichen, scheint in der Veresterung mit unterschiedlichen Fettsäuren zu liegen (Ansatz 1). Weiterhin wäre es möglich, den Aromaten der Maske mit Alkylketten zu modifizieren und für die Estergruppe weiterhin Essigsäure oder *iso*-Buttersäure zu verwenden. Um einen möglichst geringen Einfluss auf die Stabilität der Prodrugs zu nehmen, sollten diese Alkylgruppen in *meta*-Position zur Benzylgruppe stehen (Ansatz 2). Eine andersartige Lösung wäre der Versuch der Verwendung einer einzigen Maske, unter der Annahme, dass beide Benzylpositionen durch eine Esterspaltung labilisiert würden (Ansatz 3). Dabei könnte das Maske:Wirkstoff-Verhältnis deutlich verbessert werden und ein Hydrolyse-Intermediat würde eventuell gar nicht auftreten. Ob ein solcher Ansatz erfolgreich sein kann, ist völlig offen. Zusätzlich sind noch weitere Positionen zur Einführung der Esterfunktion mit Pfeilen markiert.

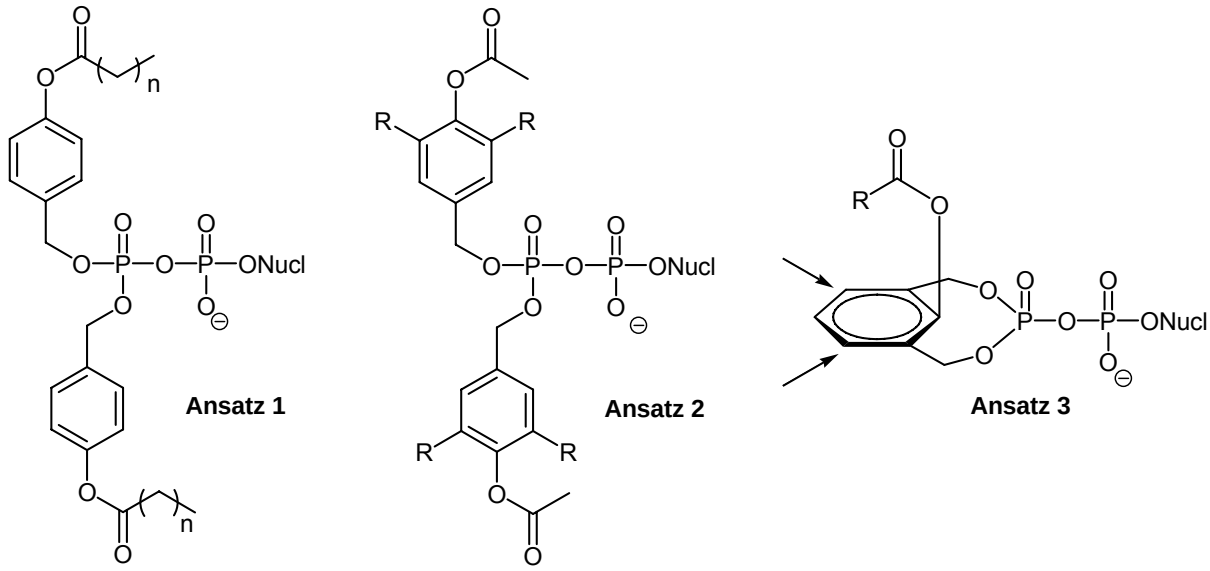


Abb. 192: Optimierte Maskierungsfunktionen

Es scheint allerdings bei all diesen Vorgehensweisen die Abhängigkeit der Hydrolyse von Magnesium-Ionen nicht ausgeschlossen werden zu können. Es könnte daher durchaus sinnvoll sein, das Sauerstoffatom des α-Phosphors zu ersetzen. Dies wäre durch Verwendung der von Barbara R. Shaw *et al.* entwickelten α-Borano-Phosphate denkbar, die als entsprechende Triphosphate starke Inhibitoren der viralen RT sein können.[118-120] Die Einführung eines α-Borano-Phosphates könnte eventuell die Magnesium-Koordination unterbinden. Man erhält andererseits erneut ein asymmetrisches P-Atom. Dennoch könnte so auch das erste Hydrolyse-Intermediat weitaus stabiler sein.

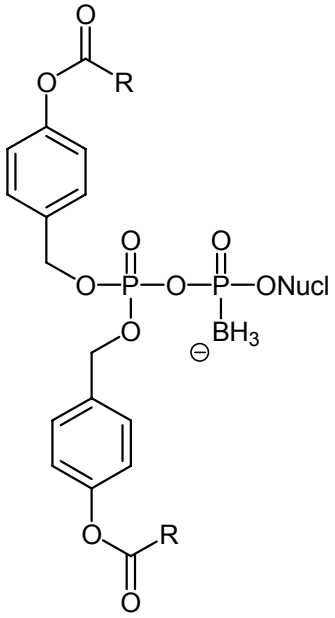


Abb. 193: α-Boranophosphat zur Vermeidung der Koordination von Magnesium

All diese Modifikationen könnten zu einer höheren Stabilität, einer verbesserten Zellaufnahme und einer vermehrten Freisetzung des entsprechenden NDP führen. Welcher Ansatz dabei der beste sein könnte, ist unklar.

Im Übrigen ist es weiterhin denkbar, die zahlreichen in der Natur vorkommenden Pyrophosphate durch entsprechende Maskierung von außen in biologische Systeme einbringen zu können, z.B. Thiaminpyrophosphat (Coenzym; prosthetische Gruppe) oder Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP; bei der Terpenbiosynthese).

10 Experimentalteil

10.1 Allgemeines

10.1.1 Edukte und Reagenzien

Acetanhydrid: unter Inertgas destilliert.

Acetylchlorid: unter Inertgas destilliert.

Benzoylchlorid: unter Inertgas destilliert.

Di-iso-*propylamin*: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert.

Di-iso-*propylethylamin*: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert.

Iso-*Butyrylchlorid*: unter Inertgas destilliert.

N-*Methylpyrrolidin*: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert.

N,N-Di-*methylanilin*: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert.

Phosphor(III)-chlorid: unter Inertgas destilliert.

Phosphor(V)-chlorid: unter Inertgas destilliert.

Pivaloylchlorid: unter Inertgas destilliert.

Tetra-n-*butylammoniumchlorid*: Zwei Tage über P_2O_5 im Vakuum im Exsikkator bei 120°C getrocknet.

Triethylamin: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert.

10.1.2 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung gereinigt. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan: über $CaCl_2$ getrocknet und destilliert.

Diethylether: Am Rotationsverdampfer destilliert.

Ethylacetat: über $CaCl_2$ getrocknet und destilliert.

Methanol: destilliert.

Petrolether 50/70: destilliert.

10.1.3 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden die unten aufgeführten absoluten Lösungsmittel verwendet.

Acetonitril: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (0.3 nm) aufbewahrt.

$CDCl_3$: über Molekularsieb (0.4 nm) getrocknet.

Dichlormethan: mehrere Tage unter Rückfluss über P_2O_5 getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Diethylether: mehrere Tage unter Rückfluss über Kalium/Benzophenon getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

1,4-Dioxan: mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium/Benzophenon getrocknet, destilliert 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.

DMSO-d_6: über Molekularsieb (0.4 nm) getrocknet.

Pyridin: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Tetrahydrofuran(THF): mehrere Tage unter Rückfluss über Kalium/Benzophenon getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Toluol: mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium/Benzophenon getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Trimethylphosphat: destilliert und über Molekularsieb (0.3 nm) getrocknet.

10.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie:

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr.: 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. 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 und 366 nm. Als Färbereagenz wurde ein Gemisch aus *p*-Methoxybenzaldehyd (0.5 mL), Ethanol (20 mL), konz. H_2SO_4 (0.5 mL), Essigsäure (0.1 mL) und Wasser (20 mL) verwendet.

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 (Merck Nr.: 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen 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.

Umkehrphasenchromatographie:

Für Dünnschichtchromatogramme wurde RP-18 $F_{254\ s}$ DC-Folie der Firma Merck verwendet. Für die Säulenchromatographie kam LiChroprep RP-18 (40-63 μm) zum Einsatz. LiChrosorb DIOL (10 μm) ließ sich leider nicht für die präparative Säulenchromatographie einsetzen.

Größenausschlusschromatographie:

Es wurden G-10 und G-15 Sephadex-Phasen verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytische HPLC wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage, Modell D-7000 durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software
Interface:	D-7000
Pumpe:	L-7100
Autosampler:	L-7200

Detektion:	Diode Array Detector (DAD) L-7455
	FL-Detektor L-7480
Analytische Säule:	LiChroCart 125-3 mit LiChrospher 100 RP 18
	(5 μm) Füllmaterial

Methoden:

Methode 1: Von 0 bis 25 min Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (5-100%), dann 10 min isokratisch Wasser mit 5% Acetonitril; Flussrate 0.5 mL/min, UV-Detektion bei 240-260 nm (sofern nicht anders angegeben). Die Fluoreszenzdetektion wurde auf die Verbindungen abgestimmt ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 304 / 355 ; 304 / 374 ; 315 / 380).
Methode 2: s. Methode 1, nur Laufpuffer statt Wasser.
Methode 3: Von 0 bis 0.5 min isokratisch 8% Acetonitril und 92% Laufpuffer. Von 0.5 bis 22 min Acetonitrilgradient bis 100% Acetonitril. Dann 5 min isokratisch Acetonitril. Von 27 bis 33 min isokratisch 8% Acetonitril und 92% Laufpuffer. Flussrate 0.6 mL/min. UV-Detektion bei 240-260 nm (sofern nicht anders angegeben). Die Fluoreszenzdetektion wurde auf die Verbindungen abgestimmt ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 304 / 355 ; 304 / 374 ; 315 / 380).
Methode 4: Von 0 bis 0.5 min isokratisch 8% Acetonitril und 92% Laufpuffer. Von 0.5 bis 15 min Acetonitrilgradient bis 70% Acetonitril. Dann 3 min isokratisch Acetonitril. Von 18 bis 22 min isokratisch 8% Acetonitril und 92% Laufpuffer. Flussrate 1.0 mL/min. UV-Detektion bei 240-260 nm (sofern nicht anders angegeben). Die Fluoreszenzdetektion wurde auf die Verbindungen abgestimmt ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 304 / 355 ; 304 / 374 ; 315 / 380).
Methode 5: s. Methode 4, Flussrate 0.5 mL/min.
Methode 6: s. Methode 4, nur Wasser statt Laufpuffer.
Methode 7: Von 0 bis 5 min isokratisch 2% Methanol und 98% Wasser. Von 5 bis 20 min Methanolgradient bis 100% Methanol. Dann 5 min isokratisch Methanol. Von 25 bis 35 min isokratisch 2% Methanol und 98% Wasser. Flussrate 0.8 mL/min. UV-Detektion bei 240-260 nm (sofern nicht anders angegeben). Die Fluoreszenzdetektion wurde auf die Verbindungen abgestimmt ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 304 / 355 ; 304 / 374 ; 315 / 380).

Methode 8: Von 0 bis 5 min isokratisch 1% Methanol und 99% Wasser. Von 5 bis 20 min Methanolgradient bis 100% Methanol. Dann 5 min isokratisch Methanol. Von 25 bis 35 min isokratisch 1% Methanol und 99% Wasser. Flussrate 0.5 mL/min. UV-Detektion bei 240-260 nm (sofern nicht anders angegeben). Die Fluoreszenzdetektion wurde auf die Verbindungen abgestimmt ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 304 / 355 ; 304 / 374 ; 315 / 380).

Lösungsmittel:
Es wurden Acetonitril und Methanol des Reinheitsgrades „HPLC grade“ (Firma J.T. Baker) und Reinstwasser (Milli-Q) verwendet.

Ionenpuffer:
Stammlösung (9.8 mM TBAH): Es wurden 1000 mL Wasser mit 6.6 mL einer Lösung von 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.

Die präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde 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. Detektion und Flussrate sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

10.1.5 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR):
Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie sowie des Instituts für Anorganische Chemie der Universität Hamburg auf Bruker-Geräten aufgenommen. Auf dem Modell AMX 400 wurden 400 MHz-^{1}H-NMR, 101 MHz-^{13}C-NMR und 162 MHz-^{31}P-NMR-Spektren gemessen. Auf dem Modell DRX 500 wurden 500 MHz-^{1}H-NMR-, 126 MHz-^{13}C-NMR und

202 MHz-^{31}P-NMR-Spektren gemessen. Zusätzlich wurden auf diesem Modell H-H-COSY, HMQC, HMBC und NOESY Korrelationsspektren aufgenommen.
Die chemische Verschiebung δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale kalibriert, wobei DMSO-d_6 auf 2.50 (^{1}H) bzw. 39.43 (^{13}C) ppm, $CDCl_3$ auf 7.26 (^{1}H) bzw. 77.00 (^{13}C) ppm, MeOD auf 3.31 (^{1}H) bzw. 49.05 (^{13}C) ppm und D_2O auf 4.79 (^{1}H) gesetzt wurden. Bei der Verwendung von D_2O wurden die ^{13}C-NMR-Spektren entweder unkalibriert belassen oder durch Zugabe geringer Mengen an DMSO-d_6 kalibriert. Die Verschiebungen der ^{31}P-NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard von 85%-iger Phosphorsäure angegeben.

Massenspektrometrie (MS):

Die EI-Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer (doppelt fokussierend) aufgenommen.

Die hr-ESI-Massenspektren wurden an einem ThermoQuest MAT 95XL Massenspektrometer der Firma Finnigan aufgenommen (Negativ oder Positiv-Modus).

Die hr-FAB-Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250-S-Spektrometer mit einer MCA Methode und einer *meta*-Nitrobenzylalkohol-Matrix gemessen

Infrarotspektroskopie (IR):

Die IR-Spektren wurden an einem AVATAR 370 FT-IR von Thermo Nicolet aufgenommen.

Ultraviolett-Spektroskopie (UV):

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (CARY 1E) der Firma Varian aufgenommen. Zudem wurden die UV-Spektren der HPLC-Analysen zur Auswertung herangezogen.

Lumineszenzspektrophotometrie:

Die Fluoreszenzspektren wurden am Fluorolog 3 der Firma Jobin Yvon aufgenommen (Bandbreite$_{ex}$= 5 nm; Bandbreite$_{em}$= 2 nm; Schrittweite= 1 nm).

10.1.6 Fluoreszenzmikroskopie

Als Fluoreszenzmikroskop kam ein Leica DMIRB mit einer EBQ 100 Fluoreszenzlampe zum Einsatz. Die Bilder wurden mit einer Q-Imaging-Camera (Retiga 1300) unter Verwendung von Openlab 5 Software aufgenommen. Zur Benetzung der Öl-Linse (40x) wurde Immersionsöl (Olympus) verwendet. Zur Analyse von Kristallen wurden Multispot Microscope Slides (PTFE coated, Hendley Essex) und Cover Glasses (Menzel Glasses) mit Nagellack (Collection 2000, Maxiflex) verklebt. Zellkulturen wurden in speziellen Trägerschalen analysiert. Alle Experimente wurden einmal im Lichtfeld (bright field, bf) und unter UV-Bestrahlung (λ_{max}= 350 nm, Filter ab 340 nm) durchgeführt. Belichtungsdauern lagen für bf-Aufnahmen bei 6 ms und für Fluoreszenzaufnahmen zwischen 60 ms bis 3 s.

10.1.7 Zellkultur

HeLa Zellen wurden in complete media (cm++), bestehend aus Nährmedium (DMEM+Glutamax GIBCO 21885 der Firma Invitrogen, 1 g/L D-Glucose+Pyruvat), Penicillin, Vancomycin und hitzedeaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS), in einem Zellinkubator (37 °C, 5% CO_2) gezüchtet. Sämtliche Arbeiten wurden, sofern nicht anders angegeben, unter einem sterilen Abzug durchgeführt, welcher vor den Arbeiten mit 70% Ethanol in Wasser desinfiziert worden war. Kontaminationen wurden mit 5% Virkon beseitigt. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien (Pipetten, Pipettenspitzen, PBS-Puffer 7.3) wurden autoklaviert. Zur Entnahme für Experimente mussten die HeLa-Zellen von dem Boden des Zuchtbehälters abgelöst werden. Dazu wurde zunächst das Nährmedium entfernt und einmal mit 8 mL PBS 7.3 gespült. Der Puffer wurde mit einer Pipette abgenommen, 2 mL Trypsinlösung auf dem Boden des Zuchtbehälters verteilt, 1 mL wieder entfernt und der Behälter daraufhin 10 min in einen Inkubator gestellt. Nun wurde die Ablösung der Zellen unter einem Mikroskop untersucht. Die Zellen wurden dann in 8 mL cm++ mehrmals resuspendiert und für

die Experimente zwischen 200 und 400 µL in Trägerschalen mit 2 mL cm++ überführt. Zur Weiterführung der Zell-Linie wurden 3 mL der Zellsuspension in einem neuen Zuchtbehälter mit 10 mL cm++ inkubiert. Die Konfluenz der Zellen lag bei den Experimenten zwischen 50 bis 70%.

10.1.8 Geräte

Gefriertrocknung:

Wässrige Lösungen wurden an einer Christ ALPHA 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophillisiert.

Thermomixer:

Hydrolysekinetiken wurden in einem Eppendorf Thermomixer 5436 durchgeführt.

10.2 Synthesen

10.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Synthese von Salicylalkoholen durch Reduktion von Carbonylverbindungen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 2.0 Äq. $LiAlH_4$ in abs. THF suspendiert. Zu dieser Suspension wurde bei RT eine Lösung von 1.0 Äq. der jeweiligen Salicylsäure in abs. THF über 30 min getropft und anschließend 2 h bei RT gerührt. Abschließend wurde noch 1 h unter Rückfluss erhitzt. Überschüssiges $LiAlH_4$ wurde bei 0 °C durch vorsichtige Zugabe von 2 M Salzsäure zerstört, bis ein pH-Wert zwischen 4 und 5 erreicht war. Nach Zugabe von Wasser wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Produkte wurden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Abschließende Reinigung erfolgte durch Kristallisation.

AAV 2: Benzylidenacetalisierung von Salicylalkoholen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.0 Äq. des jeweiligen Salicylalkohols wurden in abs. THF gelöst. Dazu wurden 1.5 Äq. Benzaldehyddimethylacetal und eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h gerührt und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rückstände wurden entweder am Chromatotron gereinigt oder als Rohgemische in der nächsten Reaktion eingesetzt.

AAV 3: Spaltung von Benzylidenacetalen

Die Benzylidenacetale wurden in Wasser/Acetonitril-Gemischen gelöst, mit drei Tropfen konz. HCl versetzt und mit einem Heißluftfön 30 sek. zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde Wasser hinzugefügt und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Rohprodukte wurden am Chromatotron gereinigt.

AAV 4: Synthese von Saligenylchlorphosphiten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äq. des jeweiligen Salicylalkohols in abs. Diethylether gelöst (wenn unlöslich in Et_2O wurde THF verwendet) und auf -20 °C gekühlt. Anschließend wurden bei -20 °C 1.2 Äq. PCl_3 zugegeben und nach ca. 5 min 2.3 Äq. abs. Pyridin, gelöst in abs. Et_2O (bzw. abs. THF), über einen Zeitraum von 45 min bis 1h zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch 1-2 h bei RT rühren gelassen. Der Kolben wurde über Nacht bei -26 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde Pyridiniumchlorid unter Inertgas durch Filtration entfernt, der Rückstand mit Et_2O mehrmals gewaschen und dann das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Die erhaltenen Öle oder Feststoffe wurden ohne weitere Reinigung für die nachfolgenden Synthesen eingesetzt.

AAV 5: Synthese von Saligenylphosphorchloridaten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äq. des jeweiligen Salicylalkohols und 2.1 Äq. Triethylamin in Et_2O oder THF gelöst und über einen Zeitraum von 30 min durch einige Körner aktiviertes Molsieb (4Å) in einem Tropftrichter getrocknet. Danach wurde diese Mischung über einen Zeitraum von 50 bis 60 min in eine auf -60 °C gekühlte Lösung von 1.1 Äq. Phosphorylchlorid in Et_2O oder THF getropft. Das Molsieb wurde mit Et_2O oder THF nachgespült und dann weitere 100 min bei -40 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Lösungsmittel vom Filtrat abdestilliert. Die Reinigung der Rohprodukte wurde am Chromatotron (Petrolether/Ethylacetat Gradienten) durchgeführt.

AAV 6: Peptidkupplungen

Variante A: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden zwei Lösungen in DMF angesetzt. Lösung 1 enthielt 2.0 Äq. Aminosäuresalz und 2.0 Äq. DIPEA. Lösung 2 enthielt 1.0 Äq. Säurekomponente und 1.1 Äq. HOBt. Bei 0 °C wurde Lösung 2 zu Lösung 1 über 5 min getropft. Dann wurden 1.3 Äq. DCC zugefügt und die Lösung 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Bei größeren Ansätzen wurde Dicyclohexylharnstoff durch Filtration abgetrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde am Chromatotron gereinigt.

Variante B: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 2.0 Äq. Aminosäuresalz wurden in wenig DMF gelöst und 2.0 Äq. DIPEA zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 1.0 Äq. Säurekomponente, 1.1 Äq. HOBt und 1.3 Äq. DCC als Feststoffe bei RT gegeben. Die Lösung wurde 16 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rohprodukte wurden am Chromatotron gereinigt.

AAV 7: Selektive Acylierung von p-Hydroxybenzylalkohol

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äq. *p*-Hydroxybenzylalkohol und 1.0 Äq. abs. TEA in abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden über 20 min die jeweiligen Säurechloride (1.1 Äq.), gelöst in abs. THF, getropft. Nach 1-2 h Reaktionsdauer bei 0 °C wurde Triethylammoniumchlorid durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen, zweimal mit gesättigter Natriumcarbonatlösung und einmal mit H_2O gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Produkte wurden entweder durch Kristallisation oder Chromatographie abschließend gereinigt.

AAV 8: Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)diisopropylaminophosphoramiditen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu 1.0 Äq. Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit, gelöst in abs. THF und auf -78 °C gekühlt, wurden 2.2 Äq. des jeweiligen Esters sowie 2.3 Äq. abs. TEA, gelöst in THF, über 1 h getropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch 16-20 h bei RT gerührt. Triethylammoniumchlorid wurde unter Inertgas abfiltriert, mit THF gewaschen und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es war u.U. nötig, die Filtration zu wiederholen. Die Rohprodukte wurden am Chromatotron mit PE und einem Ethylacetat-Gradienten gereinigt.

AAV 9: Synthese von Nucleosidmonophosphaten (NMP)

Variante A: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 2.0 Äq. $POCl_3$ in Trimethylphosphat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 1.0 Äq. Nucleosid gegeben und weitere 2 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann mit gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf pH = 8 eingestellt und weitere 10 min gerührt. Die Lösung wurde eingefroren und gefriergetrocknet. Abschließend wurde über eine RP-18 Phase mit reinem Wasser mehrfach chromatographiert.

Variante B: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 4.4 Äq. $POCl_3$ in abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dieser Lösung wurden 4.4 Äq. abs. Pyridin und 2.2 Äq. destilliertes Wasser vorsichtig hinzugefügt. Nach 5-10 min wurden 1.0 Äq. des betreffenden Nucleosides als Feststoff zugegeben. Nach 4 h bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser beendet und eine weitere Stunde im Kühlschrank gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und über eine RP-18 Phase mit Wasser und einem Acetonitril-Gradienten gereinigt. Der Nachweis von Phosphat gelang durch Fällung mit 1 M Bariumacetatlösung. Die Produkte wurden abschließend lyophillisiert.

AAV 10: Ionenaustausch an Nucleosidmonophosphaten (NMP)

Variante A: Die NMP wurden über eine protonierte Ionenaustauschersäule Dowex 50WX8 eluiert. Die protonierte Form des NMPs wurde mit der jeweiligen Kationen-hydroxidlösung zum Neutralpunkt titriert oder durch direkte Zugabe von 2.0 Äq. der jeweiligen Lösungen neutralisiert und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

Variante B: Die Diammoniumsalze der NMPs wurden in Wasser gelöst. Es wurden 2.0 Äq. Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung (40% in H_2O, m/m) zugegeben und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

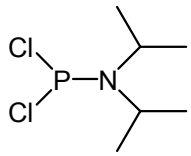
10.2.2 Synthese einiger Reagenzien

Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit 194

4.40 mL destilliertes Phosphortrichlorid (50.0 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 20 mL abs. Diethylether gelöst und auf –10 °C gekühlt. Der Reaktionsansatz wurde tropfenweise mit einer ebenfalls auf –10 °C gekühlten Lösung aus *N*,*N*-Di*iso*propylamin (100 mmol, 14.2 mL, 2.0 Äq.), gelöst in 20 mL abs. Diethylether, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 2.5 h bei –10 °C gerührt. Der Niederschlag wurde mittels einer Umkehrfritte abgetrennt und dreimal mit je 10 ml abs. Diethylether gewaschen.

Das Filtrat wurde im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Aufarbeitung wurde nicht durchgeführt.

Ausbeute: 9.40 g (46.5 mmol, 93%) einer gelblichen Flüssigkeit. Kristallisation bei -26 °C.

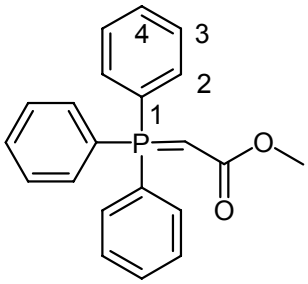


^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 3.91-3.84 (m, 2 H, 2 x CH-*i*Pr), 1.21 (d, 12 H, *J* = 6.7 Hz, 4xCH_3-*i*Pr); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 38.2 (CH-*i*Pr), 22.0 (CH_3-*i*Pr); ^{31}P-NMR (202 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 170.83; $C_6H_{14}Cl_2NP$; Mol. Wt.: 202.06

Essigsäuretriphenylphosphoranyliden-methylester (Wittig Reagenz) 65

Es wurden 50.0 g Triphenylphosphin (0.19 mol, 1.1 Äq.) in 200 mL entgastem Benzol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 17 mL Bromessigsäuremethylester (d= 1.65 g/mL, 27.7 g, 0.18 mol, 1.0 Äq.) getropft und über Nacht gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit Petrolether und Benzol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nachfolgend wurde der Feststoff in 1.5 L Wasser gelöst und mit wenig Phenolphthalein versetzt. Die Lösung wird bis zum Indikatorumschlag mit 2 M NaOH titriert. Das Präzipitat wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und aus PE/EE kristallisiert.

Ausbeute: 43 g (0.13 mol, 71%) eines farblosen Feststoffes.

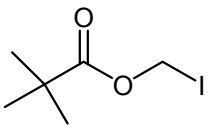


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm = 7.80 (m, 15H, H_{aryl}), 3.52 (s, 3H, OMe), 2.91 (s, 1 H, CH=P); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm = 133.4 (d, *J*= 9.7 Hz, C-2), 132.4 (C-4), 129.2 (d, *J*= 12.2 Hz, C-3), 50.2 (OMe); $C_{21}H_{19}O_2P$; Mol. Wt.: 334.35

Iodmethylpivalat (POM-I)

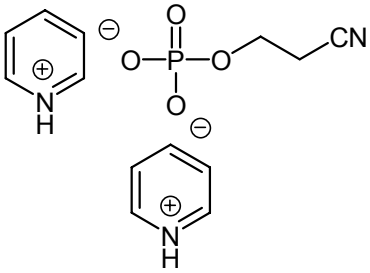
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 6.00 g NaI (0.04 mol, 1.0 Äq.) in 30 mL absolutem Acetonitril gelöst und dazu 5.7 mL Chlormethylpivalat (d= 1.05 g/mL, 5.96 g, 0.04 mol, 1.0 Äq.) pipettiert. Die Reaktion wurde unter Lichtausschluss durchgeführt, um einen Zerfall der Verbindung zu vermeiden. Nach 16 h wurde das Lösungsmittel über eine Destillationskolonne bei 85 °C entfernt und das Produkt von den Salzen durch Vakuumrektifikation befreit (Sdp.: 80 – 90 °C im Ölpumpenvakuum). Das Produkt wurde unter Lichtausschluss und Inertgas bei -26 °C verwahrt.

Ausbeute: 9.6 g (0.04 mol, 100%) einer farblosen Flüssigkeit.



^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm = 5.93 (s, 2H, CH_2), 1.19 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm = 176.3 (C=O), 44.7 (CH_2), 38.9 (C-*t*Bu), 26.5 (CH_3-*t*Bu); $C_6H_{11}IO_2$; Mol. Wt.: 242.05

Pyridinium-β-cyanoethylphosphat 165



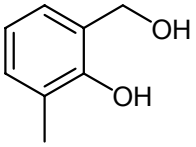
Es wurden 3.0 g Barium-(β-cyanoethylphosphat) (10 mmol) mit saurem Ionentauscher Dowex 50WX8 versetzt und in Wasser unter kräftigem Rühren gelöst. Das gelöste Salz wurde über eine Ionenaustauschsäule aus Dowex 50WX8 eluiert. Zu dem Eluat wurden 4 mL Pyridin gegeben und die Lösung dann im Vakuum bis auf 4 mL eingeengt. Um eine 1 mM Stammlösung zu erhalten, wurde mit Pyridin auf 10 mL aufgefüllt. Die Stammlösung wurde nicht weiter charakterisiert, sondern direkt für die Synthesen eingesetzt.

10.2.3 Synthesen von Salicylalkoholen

3-Methylsalicylalkohol 151

Die Reaktion wurde gemäß AAV1 durchgeführt. Es wurden 20.0 g 2-Hydroxy-3-methylbenzoesäure (0.13 mol, 1.0 Äq.) mit 10.0 g $LiAlH_4$ (0.26 mol, 2.0 Äq.) in 200 mL THF umgesetzt. Kristallisation erfolgte durch Lösen in wenig DCM und Eintropfen dieser Lösung in kalten Petrolether (50-70).

Ausbeute: 16.0 g (0.12 mol, 88%) eines farblosen Feststoffes.

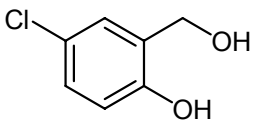


^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm = 8.38 (s, 1H, Ph-OH), 7.04 (d, *J*= 7.6 Hz, H-6), 6.95 (d, *J*= 7.6 Hz, H-4), 6.71 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 7.6 Hz, H-5), 5.27 (s, 1H, Bn-OH), 4.56 (s, 2H, H-7), 2.15 (s, 3H, Me); ^{13}C-NMR (62 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm = 152.6 (C-2), 129.0 (C-5), 127.9 (C-4), 125.0 (C-6), 124.1 (C-1), 118.9 (C-3), 59.9 (C-7), 16.1 (Me); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2920, 1469, 1486, 1213, 1085, 995, 853, 772, 679, 611; mp: 73 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.69; $C_8H_{10}O_2$; Mol. Wt.: 138.16

5-Chlorsalicylalkohol 152

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 15.0 g 5-Chlor-2-hydroxy-benzoesäure (87.2 mmol, 1.0 Äq.) mit 7.29 g $LiAlH_4$ (191 mmol, 2.2 Äq.) in 140 mL THF umgesetzt.

Ausbeute: 12.9 g (82.5 mmol, 95%) eines hellgelben Feststoffes.

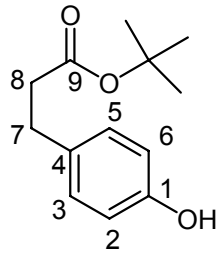


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.66 (s, 1H, Ph-OH), 7.27 (d, 1H, *J*= 2.7 Hz, H-6), 7.06 (dd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 8.5 Hz, H-4), 6.76 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-3), 5.12 (t, 1H, *J*= 5.7 Hz, Bn-OH), 4.45 (d, 2H, *J*= 5.7 Hz, CH_2); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 152.8 (C-2), 131.0 (C-1), 126.6, 126.4 (C-6, C-4), 122.3 (C-5), 115.9 (C-3), 57.6 (CH_2); mp: 93 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.52; $C_7H_7ClO_2$; Mol. Wt.: 158.58

tert-Butyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 99

Es wurden 3.81 g 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure (22.9 mmol, 1.0 Äq.) und 22.0 g *tert*-Butanol (0.30 mol, 10 Äq.) in 50 mL Toluol gelöst. Die Lösung wurde zum Sieden erhitzt und dann über einen Zeitraum von einer halben Stunde 15.9 g *N,N*-DMF-Dineopentylacetal (68.7 mmol, 3.0 Äq.) zugetropft. Nach 5 h Reaktionszeit ließ man den Ansatz auf Raumtemperatur abkühlen. Um den überschüssigen *tert*-Butylalkohol und nicht umgesetztes Edukt zu entfernen, wurde die organische Phase zweimal mit gesättigter Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat konnte das Lösungsmittel durch dreimaliges Coevaporieren mit DCM im Vakuum entfernt werden. Es wurde ein hellbraunes Öl erhalten, welches nicht weiter gereinigt wurde.

Ausbeute: 3.51 g (15.8 mmol, 69%) eines hellbraunen Öles.



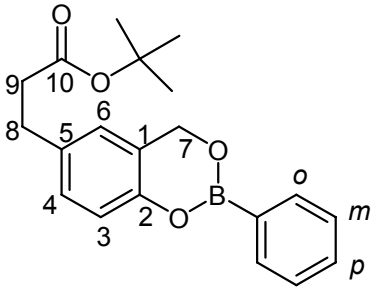
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.07 (d, 2H, *J*= 8.1 Hz, H-3, H-5), 6.76 (m, 2H, H-2, H-6), 2.84 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-7), 2.50 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 1.42 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 172.8 (C-9), 154.3 (C-1), 133.2 (C-4), 129.9 (C-5, C-3), 115.6 (C-2, C-6), 80.8 (C-*t*Bu), 37.8 (C-8), 30.7 (C-7), 28.5 (CH_3-*t*Bu); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v) = 0.70; $C_{13}H_{18}O_3$; Mol. Wt.: 222.28

tert-Butyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)propionat

In einer Dean-Stark-Apparatur mit Wasserabscheider wurden 2.36 g *tert*-Butyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat (11.1 mmol, 1.0 Äq.), 1.55 g Phenylboronsäure (12.7 mmol, 1.1 Äq.) und 0.39 mL Propionsäure (5.3 mmol) in Toluol gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Zu dieser Lösung wurden 0.64 g *p*-Formaldehyd (21.0 mmol) gegeben und 1.5 h erhitzt. Nachdem das *p*-Formaldehyd abreagiert bzw. aus dem Reaktionsgemisch entwichen war, wurden weitere 2 Äquivalente zugegeben. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt, so dass insgesamt 6 Äquivalente *p*-Formaldehyd über einen Zeitraum von 4.5 h zugegeben worden waren. Das entstehende Reaktionswasser wurde dabei azeotrop abdestilliert. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in

Dichlormethan aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es erfolgte eine Reinigung des Rohproduktes am Chromatotron mit DCM/MeOH (0-10%).

Ausbeute: 2.20 g (6.50 mmol, 61%) eines hellgelben Feststoffes.

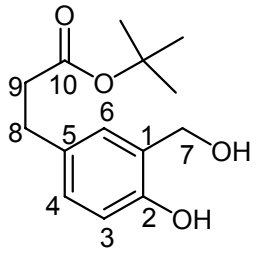


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.97 (dd, 2H, *J*= 7.9 Hz, *J*= 1.3 Hz, H-*o*), 7.50 (m, 1H, H-*p*), 7.43 (m, 2H, H-*m*), 7.08 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 2.3 Hz, H-4), 7.01 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.85 (d, 1H, *J*= 2.1 Hz, H-6), 5.21 (s, 2H, H-7), 2.87 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.53 (t, 2H, *J*= 7.9 Hz, H-9), 1.43 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 172.2 (C-10), 149.3 (C-2), 136.1 (C-5), 134.7 (2xC-*o*), 132.9 (C-1), 131.8 (C-*p*), 129.1 (C-4), 129.0 (2xC-*m*), 125.0 (C-6), 118.3 (C-3), 80.9 (C-*t*Bu), 63.3 (C-7), 37.6 (C-9), 30.9 (C-8), 28.5 (CH_3-*t*Bu); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.72; $C_{20}H_{23}BO_4$; Mol. Wt.: 338.21

tert-Butyl-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propionat; 5-(*t*Bu*prop*)salicylalkohol 100

2.20 g *tert*-Butyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)propionat (6.50 mmol) wurden in 8 mL THF gelöst und mit 6.5 mL Perhydrol bei 0 °C versetzt. Nach 40 min Reaktionsdauer wurde das Gemisch zu 60 mL H_2O gegossen. Es wurde viermal mit je 25 mL Diethylether extrahiert und mit 50 mL Natriumhydrogensulfitlösung vorsichtig gewaschen, um überschüssiges Perhydrol zu zerstören. Danach wurde mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es wurde das mit Edukt und Phenol verunreinigte Rohprodukt erhalten. Abschließende Reinigung erfolgte durch Kristallisation aus Petrolether (50-70).

Ausbeute: 1.37 g (5.42 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffes.

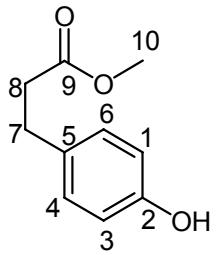


^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.11 (s, 1H, Ph-OH), 7.13 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-6), 6.88 (dd, 1H, *J*= 8.2 Hz, *J*= 2.2 Hz, H-4), 6.67 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H-3), 4.91 (s, 1H, Bn-OH), 4.45 (s, 2H, H-7), 2.71 (t, 2H, *J*= 7.3 Hz, H-8), 2.44 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 1.38 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 173.7 (C-10), 152.5 (C-2), 130.6 (C-5), 128.4 (C-1), 127.4 (C-4), 127.1 (C-6), 114.5 (C-3), 79.7 (C-*t*Bu), 58.4 (C-7), 37.1 (C-9), 30.2 (C-8), 27.9 (CH_3-*t*Bu); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.52; MS (HR-FAB): calcd. 252.136 (M^+); 253.144 ($M+H^+$), found: 252.139; 253.145; $C_{14}H_{20}O_4$; Mol. Wt.: 252.31

Methyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 102

4.00 g 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure (24.1 mmol) wurden in 50 mL Methanol gelöst, mit zehn Tropfen Oleum versetzt und eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf wenige mL entfernt und die verbliebene Lösung mit 100 mL DCM verdünnt. Abschließend wurde die organische Phase je einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt bei –26 °C kristallisiert.

Ausbeute: 4.33 g (24.0 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffes.

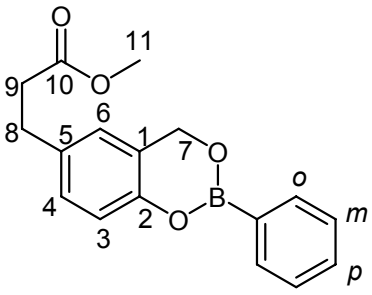


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.19 (s, 1H, OH), 7.00 (d, 2H, *J*= 8.7 Hz, H-3, H-5), 6.67 (d, 2H, *J*= 8.7 Hz, H-2, H-6), 3.58 (s, 3H, H-10), 2.74 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-7), 2.56 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 173.6 (C-9), 154.0 (C-1), 132.6 (C-4), 129.4 (C-3, C-5), 115.3 (C-2, C-6), 51.6 (C-10), 36.0 (C-8), 30.1 (C-7); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3426, 2952, 1720, 1517, 1434, 1220, 833; UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 279, 227; mp = 38-39 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.64; MS (HR-FAB): calcd. 180.079 (M^+); 181.086 ($M+H^+$), found: 180.080; 181.085; $C_{10}H_{12}O_3$; Mol. Wt.: 180.20

Methyl-3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaborinin-6-yl)propionat

4.30 g Methyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat (23.9 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 100 mL Toluol gelöst und zusammen mit 3.47 g Phenylboronsäure (28.6 mmol, 1.2 Äq.), 0.90 mL Propionsäure (12 mmol, 0.5 Äq.) und 1.40 g *p*-Formaldehyd (47.8 mmol, 2 Äq.) 1.5 h refluxiert. Das entstehende Reaktionswasser wurde in einem Wasserabscheider abgetrennt. Nun wurden erneut 2 Äquivalente *p*-Formaldehyd zugegeben und wiederum unter Rückfluss erhitzt. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis kein Edukt mehr vorhanden war. Insgesamt wurden in diesem Fall 8 Äquivalente *p*-Formaldehyd zugegeben. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt muss für die nachfolgende Oxidation unbedingt gereinigt werden. Zu diesem Zweck kann eine Säulenfiltration mit DCM / MeOH 30:1 v/v durchgeführt werden.

Ausbeute: 5.43 g (18.3 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffes.



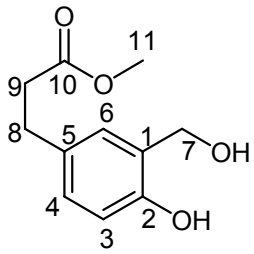
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.97 (ddd, 2H, *J*= 8.0 Hz, *J*= 3.0 Hz, *J*= 1.6 Hz, H-*o*), 7.53 – 7.48 (m, 1H, H-*p*), 7.45 – 7.40 (m, 2H, H-*m*), 7.08 (dd, 1H, *J*= 8.3 Hz, *J*= 2.2 Hz, H-4), 7.02 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 6.86 (d, 1H, *J*= 2.2 Hz, H-6), 5.22 (s, 2H, H-7), 3.69 (s, 3H, H-11), 2.92 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-8), 2.63 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 173.2 (C-10), 147.6 (C-2), 135.3 (C-5), 134.3 (2xC-*o*), 131.4 (C-*p*), 131.0 (C-1), 128.5 (C-4), 127.7 (2xC-*m*), 124.5 (C-6), 122.5 (C-*i*), 117.9 (C-3), 62.9 (C-7), 51.6 (C-11), 35.8 (C-9), 30.2 (C-8); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 2948, 1736, 1713, 1440, 1326, 1259, 700; UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 281, 228; mp = 90-93 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.75; MS (FAB): calcd. 297.2 ($M+H^+$,^{11}B), found: 297.2; $C_{17}H_{17}BO_4$; Mol. Wt.: 296.13

Methyl-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propionat 92

5.40 g Methyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaborinin-6-yl)propionat (18.2 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 35 mL Toluol gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung

wurden 18.8 mL Perhydrol (182 mmol, 10 Äq., 30% H_2O_2 in H_2O) pipettiert. Nach 40 min wurde das Reaktionsgemisch zu 120 mL Wasser gegeben und viermal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal vorsichtig mit Natriumhydrogensulfitlösung und einmal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Abtrennung von Phenol erfolgte durch kurzes Kochen der Verbindung in Petrolether (50-70) mit 1% Ethylacetat (v/v). Der dabei entstandene kristalline Feststoff wurde über eine Saugfritte isoliert, mit PE gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.44 g (16.3 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffes.

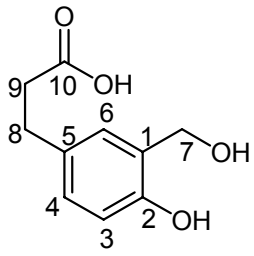


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.09 (s, 1H, Ph-OH), 7.10 (d, 1H, *J*= 2.4 Hz, H-6), 6.85 (dd, 1H, *J*= 8.1 Hz, *J*= 2.4 Hz, H-4), 6.64 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H-3), 4.88 (t, 1H, *J*= 5.0 Hz, Bn-OH), 4.43 (d, 2H, *J*= 4.9 Hz, H-7), 3.56 (s, 3H, H-11), 2.73 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-8), 2.53 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 172.9 (C-10), 152.6 (C-2), 130.5 (C-5), 128.2 (C-1), 127.3 (C-4), 127.0 (C-6), 114.6 (C-3), 58.4 (C-7), 51.4 (C-11), 35.6 (C-9), 29.9 (C-8); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 3170, 2958, 1713, 1510, 1439, 1259, 989, 825; UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 281, 228; mp = 85 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.48; MS (HR-FAB): calcd. 210.089 (M^+); 211.097 ($M+H^+$); found 210.092; 211.096; $C_{11}H_{14}O_4$; Mol. Wt.: 210.23

3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propionsäure 68a

700 mg Methyl-3-(4-hydroxy-3-[hydroxymethyl]phenyl)propionat (3.32 mmol) wurden in 35 mL THF gelöst. Dazu wurden 35 mL 2 M NaOH in H_2O gegeben und eine Stunde gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit Salzsäure neutralisiert und mit 2% Essigsäure in Wasser angesäuert. Die wässrige Phase wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zur vollständigen Entfernung von Essigsäure musste mit Toluol coevaporiert werden. Das Produkt konnte aus Toluol kristallisiert werden.

Ausbeute: 522 mg (2.67 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffes.

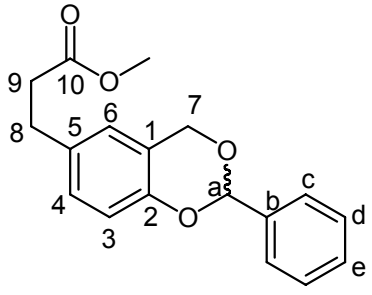


^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 12.06 (s, 1H, COOH), 9.11 (s, 1H, Ph-OH), 7.13 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-6), 6.89 (dd, 1H, *J*= 8.2 Hz, *J*= 2.1 Hz, H-4), 6.67 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H-3), 4.91 (s, 1H, Bn-OH), 4.46 (s, 2H, H-7), 2.73 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.47 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 174.1 (C-10), 152.5 (C-2), 130.9 (C-5), 128.4 (C-1), 127.3 (C-6), 127.1 (C-4), 114.6 (C-3), 58.5 (C-7), 36.0 (C-9), 30.0 (C-8); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3448, 3160, 2954, 1701, 1449, 1269, 1208, 1001, 823; UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 282, 226; mp = 114-115 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.07; MS (HR-FAB): calcd. 196.074 (M^+); found 196.077; $C_{10}H_{12}O_4$; Mol. Wt.: 196.20

Methyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionat 96

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 450 mg Methyl-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propionat (2.14 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 10 mL abs. THF gelöst. Es wurden 0.65 mL Benzaldehyddimethylacetal (4.3 mmol, 2.0 Äq.) und eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben. Die Lösung wurde drei Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit Petrolether und einem Ethylacetat-Gradienten (0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 460 mg (1.54 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm = 7.63-7.58 (m, 2H, H-d), 7.47-7.38 (m, 3H, H-c, H-d), 7.03 (dd, 1H, *J*= 2.0 Hz, *J*= 8.4 Hz, H-4), 6.88 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.86 (d, 1H, *J*= 1.7 Hz, H-6), 5.97 (s, 1H, H-a), 5.18 (d, 1H, *J*= 14.6 Hz, H-7), 4.97 (d, 1H, *J*= 14.7 Hz, H-7), 3.68 (s, 3H, Me), 2.89 (t, 1H, *J*= 7.7 Hz, H-8), 2.61 (t, 1H, *J*= 7.7 Hz, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm = 173.3 (C-10), 151.6 (C-2), 137.0 (C-b), 133.4 (C-5), 129.4 (C-e), 128.5 (C-d), 127.8 (C-4), 126.4 (C-c), 124.6 (C-6), 120.8 (C-1), 117.0 (C-3), 99.1 (C-a), 66.8 (C-7), 51.6 (Me), 35.9 (C-9), 30.2 (C-8); IR (KBr):

ν [cm^{-1}] = 3434, 1742, 1499, 1257, 1174, 972, 827, 695; mp= 72 °C; R_f (DCM)= 0.53; MS (HR-FAB): calcd. 298.121 (M^+); found 298.120; $C_{18}H_{18}O_4$; Mol. Wt.: 298.33

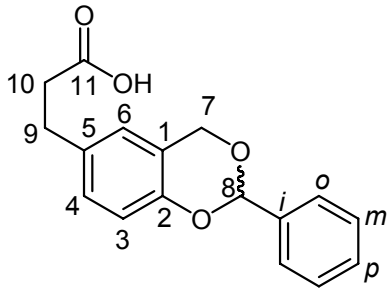
3-(2-Phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionsäure 68b

Variante A: Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. 100 mg 3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propionsäure (0.51 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 10 mL absolutem THF gelöst. Dazu wurden 0.08 mL Benzaldehyddimethylacetal (0.53 mmol, 81.0 mg, 1.1 Äq.) sowie eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure gegeben. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0-10% gereinigt.

Ausbeute A: 72 mg (0.25 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes.

Variante B: Es wurden 0.11 g Methyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionat (0.37 mmol) in 5 mL 2 M NaOH in Ethanol gelöst und 6 h gerührt. Die Lösung wurde mit 20 mL Wasser verdünnt und mit halbkonzentrierter Salzsäure bei 0 °C bis pH 2 angesäuert. Es wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute B: 0.10 g (0.36 mmol, 97%) eines farblosen Feststoffes.

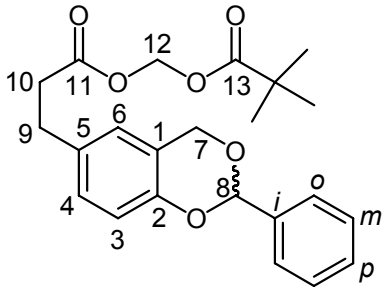


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm = 7.58-7.54 (m, 2H, 2xH-*o*), 7.48-7.44 (m, 3H, 2xH-*m*, H-*p*), 7.06 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 1.8 Hz, H-4), 6.99 (d, 1H, *J*= 1.5 Hz, H-6), 6.83 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H-3), 6.10 (s, 1H, H-8), 5.17 (d, 1H, *J*= 15.0 Hz, H-7), 4.94 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz, H-7), 2.77 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-10), 2.48 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 174.5 (C-11), 151.1 (C-2), 134.8 (C-*i*), 134.1 (C-5), 129.5 (C-*p*), 128.5 (2xC-*m*), 128.0 (C-4), 126.6 (2xC-*o*), 125.1 (C-6), 121.1 (C-1), 116.4 (C-3), 98.6 (C-8), 66.4 (C-7), 36.2 (C-9), 30.1 (C-10); mp = 142 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.40; $C_{17}H_{16}O_4$; Mol. Wt.: 284.31

Pivaloyloxymethyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionat 68c

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. 1.80 g 3-(4-Hydroxy-3-[hydroxymethyl]phenyl)propionsäure (9.17 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 50 mL absolutem THF gelöst. Dazu wurden 2.06 mL Benzaldehyddimethylacetal (13.7 mmol, 2.08 g, 1.5 Äq.) sowie eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h gerührt und dann das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in trockenen 10 mL abs. DMF gelöst. Dazu wurden 2.34 mL abs. DIPEA (13.7 mmol, 1.5 Äq.) und 3.30 g Pivaloyloxymethyl-iodid (POM-I, 13.7 mmol, 1.5 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde drei weitere Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Ölpumpenrotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit reinem DCM als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 2.49 g (6.25 mmol, 68%) eines hellgelben Öles.

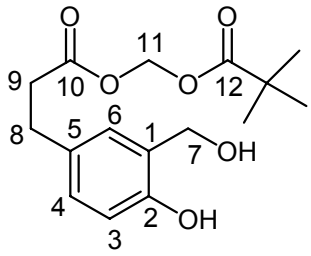


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.59 (dd, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, H-*o*), 7.46-7.39 (m, 3H, H-*p*, H-*m*), 7.02 (dd, 1H, *J*= 2.2 Hz, *J*= 8.4 Hz, H-4), 6.89-6.85 (m, 2H, H-3, H-6), 5.96 (s, 1H, H-8), 5.75 (s, 2H, H-12), 5.17 (d, 1H, *J*= 14.6 Hz, H-7), 4.97 (d, 1H, *J*= 14.7 Hz, H-7), 2.90 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-10), 2.66 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-9), 1.20 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 176.5 (C-13), 171.4 (C-11), 151.3 (C-2), 137.3 (C-*i*), 133.1 (C-5), 129.5 (C-*p*), 128.5 (2xC-*m*), 128.0 (C-4), 126.6 (2xC-*o*), 125.2 (C-6), 121.1 (C-1), 116.4 (C-3), 98.7 (C-8), 79.5 (C-12), 66.4 (C-7), 39.4 (C-*t*Bu), 35.0 (C-9), 29.4 (C-10), 26.7 (CH_3-*t*Bu); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2973, 2932, 2871, 1755, 1501, 1251, 1107, 987, 700; UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 279, 227; R_f (DCM)= 0.38; MS (HR-FAB): calcd. 398.173 (M^+); 399.181 ($M+H^+$); found 398.170; 399.177; $C_{23}H_{26}O_6$; Mol. Wt.: 398.45

Pivaloyloxymethyl-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl) propionat; 5-(POM-*prop*)salicylalkohol 68d

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. 620 mg Pivaloyloxymethyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionat (1.55 mmol) wurden in 15 mL einer Mischung von Wasser und Acetonitril (30 : 70 v/v) gelöst und mit zwei Tropfen rauchender Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 30 sek zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden weitere 15 mL Wasser hinzugegeben und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 – 5% gereinigt.

Ausbeute: 380 mg (1.22 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffes.



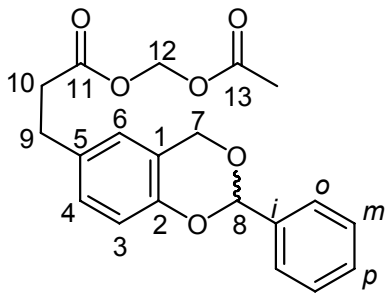
^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.14 (s, 1H, Ph-OH), 7.13 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-6), 6.88 (dd, 1H, *J*= 8.2 Hz, *J*= 2.1 Hz, H-4), 6.66 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H-3), 5.70 (s, 2H, H-11), 4.91 (t, 1H, *J*= 3.9 Hz, Bn-OH), 4.45 (d, 2H, *J*= 2.9 Hz, H-7), 2.76 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-9), 2.63 (t, 2H, *J*= 7.3 Hz, H-8), 1.14 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 176.4 (C-12), 171.4 (C-10), 152.7 (C-2), 130.1 (C-5), 128.7 (C-1), 127.4 (C-6), 127.0 (C-4), 114.6 (C-3), 79.4 (C-11), 58.4 (C-7), 38.4 (C-*t*Bu), 35.4 (C-8), 29.6 (C-9), 26.7 (CH_3-*t*Bu); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3510, 3228, 2983, 1752, 1264, 1160, 1113, 1027, 991; UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 281, 227; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.50; MS (HR-FAB): calcd. 310.142 (M^+); 311.1496 ($M+H^+$); found 310.144; 311.1497; $C_{16}H_{22}O_6$; Mol. Wt.: 310.34

Acetoxymethyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionat 138

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. 900 mg 3-(4-Hydroxy-3-[hydroxymethyl]phenyl)propionsäure (4.59 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 20 mL absolutem THF gelöst. Dazu wurden 1.03 mL Benzaldehyddimethylacetal (6.89 mmol, 1.5 Äq.) sowie eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h gerührt und dann das Lösungsmittel im

Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 15 mL trockenem abs. DMF gelöst. Dazu wurden 1.17 mL abs. DIPEA (6.89 mmol, 1.5 Äq.) und 1.11 g Acetoxymethylbromid (95%, AM-Br, d= 1.56 g/mL, 6.88 mmol, 0.71 mL, 1.5 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde drei weitere Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Ölpumpenrotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit reinem DCM als Laufmittel gereinigt. Eine weitere Trennung am Chromatotron mit DCM war erforderlich.

Ausbeute: 920 mg (2.58 mmol, 56%) eines farblosen Öles.

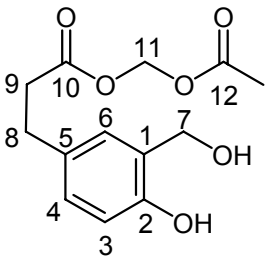


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm = 7.57-7.51 (m, 2H, H-*ortho*), 7.48-7.40 (m, 3H, H-*para*, H-*meta*), 7.05 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 2.0 Hz, H-4), 6.98 (d, 1H, *J*= 1.7 Hz, H-6), 6.82 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 6.09 (s, 1H, H-8), 5.66 (s, 2H, H-12), 5.16 (d, 1H, *J*= 14.8 Hz, H-7), 4.93 (d, 1H, *J*= 14.9 Hz, H-7), 2.80 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-10), 2.67 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, H-9), 2.06 (s, 3H, CH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm = 171.1 (C-11), 169.2 (C-13), 151.0 (C-2), 137.1 (C-*ipso*), 132.8 (C-5), 129.2 (C-*para*), 128.2 (2xC-*meta*), 127.7 (C-4), 126.3 (2xC-*ortho*), 124.9 (C-6), 120.9 (C-1), 116.2 (C-3), 98.4 (C-8), ~80 (C-12), 66.1 (C-7), 34.8 (C-9), 29.1 (C-10), 20.4 (CH_3); R_f (DCM)= 0.27; $C_{20}H_{20}O_6$; Mol. Wt.: 356.37

Acetoxymethyl-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propionat; 5-(AM-*prop*)-salicylalkohol 139

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. 620 mg Acetoxymethyl-3-(2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionat (1.74 mmol) wurden in 15 mL einer Mischung von Wasser und Acetonitril (30 : 70 v/v) gelöst und mit zwei Tropfen rauchender Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 30 sek zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden weitere 15 mL Wasser hinzugegeben und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 – 5% gereinigt.

Ausbeute: 381 mg (1.42 mmol, 82%) eines farblosen Öles.

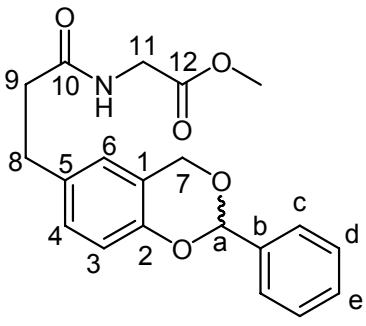


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm = 9.11 (s, 1H, Ph-OH), 7.11 (d, 1H, *J*= 1.5 Hz, H-6), 6.87 (dd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 8.1 Hz, H-4), 6.65 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-3), 5.65 (s, 2H, H-12), 4.89 (t, 1H, *J*= 5.5 Hz, Bn-OH), 4.44 (d, 2H, *J*= 5.4 Hz, H-7), 2.74 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 2.61 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-8), 2.05 (s, 3H, CH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm = 171.1 (C-10), 169.2 (C-12), 152.4 (C-2), 129.8 (C-5), 128.2 (C-1), 127.0 (C-4), 126.8 (C-6), 114.3 (C-3), 78.8 (C-11), 58.1 (C-7), 35.1 (C-8), 29.3 (C-9), 20.3 (CH_3); R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.36; $C_{13}H_{16}O_6$; Mol. Wt.: 268.26

Methyl-2-(3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamido)acetat 103a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (Variante A) durchgeführt. Es wurden 50.0 mg 3-(2-Phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionsäure (0.176 mmol, 1.0 Äq.) und 24.3 mg HOBt*H_2O (0.180 mmol, 1.1 Äq.) in 1.5 mL abs. DMF gelöst. Diese Lösung wurde bei 0 °C zu einer Lösung von 44.2 mg Glycinmethylesterhydrochlorid (0.352 mmol, 2.0 Äq.) und 60 µL DIPEA (0.35 mmol, 45.2 mg, 2.0 Äq.) in 1.5 mL DMF gegeben. Der Reaktionslösung wurden nun 47 mg DCC (0.23 mmol, 1.3 Äq.) beigefügt. Nach 16 h bei RT wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen, zweimal mit ges. $NaHCO_3$-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0-2% wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 53 mg (0.15 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffes.



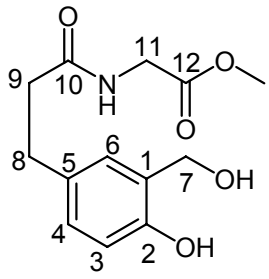
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.29 (t, 1H, *J*= 5.9 Hz, NH), 7.57-7.52 (m, 1H), 7.48-7.42 (m, 3H, H-c, H-e), 7.03 (dd, 1H, *J*= 2.0 Hz, *J*= 8.3 Hz, H-4), 6.96 (d, 1H, *J*= 1.7 Hz, H-6), 6.81 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 6.08 (s, 1H, H-a), 5.16 (d, 1H, *J*= 14.8 Hz, H-7), 4.93 (d, 1H, *J*= 14.9 Hz, H-7), 3.83 (d, 2H, *J*= 5.9 Hz, H-11), 3.63 (s, 3H, Me),

2.76 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-8), 2.41 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-8); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.9 (C-10), 170.4 (C-12), 150.9 (C-2), 137.1 (C-b), 133.9 (C-5), 129.2 (C-4), 128.2 (2xC-d), 127.7 (C-e), 126.4 (2xC-c), 124.8 (C-6), 120.8 (C-1), 116.1 (C-3), 98.4 (C-a), 66.1 (C-7), 51.6 (CH_3), 40.5 (CH_2), 36.7 (C-9), 30.1 (C-8); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3323, 2928, 2851, 1740, 1638, 1542, 1246, 1212, 974; mp= 107 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.46; MS (FAB): calcd. 356.1 ($M+H^+$); found 356.2; $C_{20}H_{21}NO_5$; Mol. Wt.: 355.38

Methyl-2-(3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)acetat; 5-(GlyOMe-*prop*)salicylalkohol 104a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. Es wurden 380 mg Methyl-2-(3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamido)acetat (1.07 mmol) umgesetzt. Die Reinigung des Produktes wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0-5% erreicht.

Ausbeute: 164 mg (0.62 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffes.

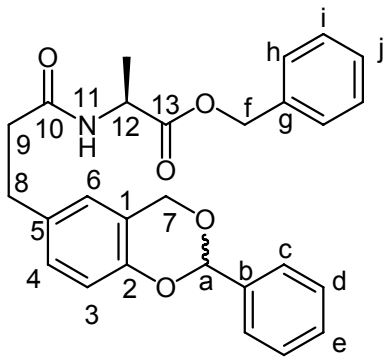


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm = 9.08 (s, 1H, Ph-OH), 8.29 (t, 1H, *J*= 5.8 Hz, NH), 7.11 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-6), 6.86 (dd, 1H, *J*= 2.2 Hz, *J*= 8.1 Hz, H-4), 6.65 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-3), 4.89 (t, 1H, *J*= 5.6 Hz, Bn-OH), 4.44 (d, 2H, *J*= 5.6 Hz, H-7), 3.82 (d, 2H, *J*= 5.9 Hz, H-11), 3.62 (s, 3H, OMe), 2.75-2.65 (m, 2H, H-8), 2.40-2.32 (m, 2H, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm = 172.6 (C-10), 170.9 (C-12), 152.7 (C-2), 131.5 (C-5), 128.8 (C-6), 128.3 (C-4), 128.2 (C-1), 115.7 (C-3), 58.2 (C-7), 51.5 (OMe), 40.4 (C-11), 37.2 (C-9), 30.4 (C-8); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3448, 3312, 3168, 1745, 1652, 1546, 1210, 998; mp= 88 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.23; MS (FAB): calcd. 250.1 (M^+-OH); found 350.1; $C_{13}H_{17}NO_5$; Mol. Wt.: 267.28

(*S*)-Benzyl-2-(3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamido)propionat 103b

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (Variante B) durchgeführt. Es wurden 340 mg 3-(2-Phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionsäure (1.20 mmol, 1.0 Äq.), 202 mg HOBt*H_2O (1.32 mmol, 1.1 Äq.), 0.41 mL DIPEA (2.4 mmol, 2.0 Äq.), 843 mg L-Alaninbenzylester-*para*-toluolsulfonat (2.40 mmol, 2.0 Äq.) und 322 mg DCC (1.56 mmol, 1.3 Äq.) in 5 mL abs. DMF umgesetzt. Nach 24 h wurde Dicyclohexylharnstoff durch Filtration abgetrennt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in EE aufgenommen. Abschließende Reinigung erfolgte am Chromatotron mit Petrolether und einem Ethylacetat-Gradienten von 10 bis 80%.

Ausbeute: 0.34 g (0.77 mmol, 64%) eines farblosen Feststoffes.



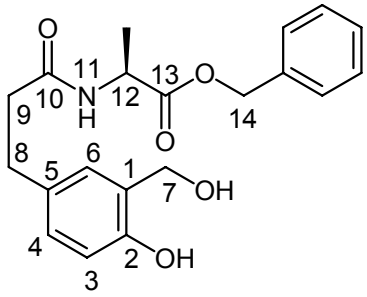
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.61-7.56 (m, 2H, H-j, H-e), 7.47-7.30 (m, 8H, H-i, H-h, H-c, H-d), 7.02 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 2.1 Hz, H-4), 6.87 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-3), 6.86 (m, 1H, H-6), 5.97 (s, 1H, NH), 5.96, 5.95 (2xs, 1H, H-a), 5.20-5.10 (m, 3H, H-f, H-7a), 4.97, 4.93 (2xd, 1H, *J*= 14.7 Hz, H-7b), 4.64 (m, 1H, H-12), 2.90 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8), 2.54-2.41 (m, 2H, H-9), 1.37, 1.36 (2xd, 3H, *J*= 7.2 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 172.9 (C-13), 171.4 (C-10), 151.5 (C-2), 137.0 (C-g), 135.3 (C-b), 133.6 (C-5), 129.4 (C-4), 128.6 (C-e, C-j), 128.5 (5xC_{aryl}), 128.1 (1xC_{aryl}), 128.0 (1xC_{aryl}), 126.4 (1xC_{aryl}), 124.7 (C-6), 120.8 (C-1), 117.0 (C-3), 99.1 (2xC-a), 67.2 (C-f), 66.8 (C-7), 48.1 (C-12), 38.3 (C-9), 30.7 (C-8), 18.5 (Me); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3342, 1745, 1649, 1535, 1250, 1162, 698; mp= 132 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.81; MS (FAB): calcd. 446.2 ($M+H^+$); found 446.3; $C_{27}H_{27}NO_5$; Mol. Wt.: 445.51

(*S*)-Benzyl-2-(3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)propionat 104b

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. Es wurden 0.33 g (*S*)-Benzyl-2-(3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamido)propanoat (0.74 mmol) umge-

setzt. Abschließende Reinigung erfolgte am Chromatotron mit Petrolether und einem DCM-Gradienten von 50 bis 100%. Zum Ende der Trennung wurden dem DCM noch 0.1% Methanol beigefügt.

Ausbeute: 0.21 g (0.57 mmol, 77%) eines farblosen Öles. Kristallisation bei -26 °C.

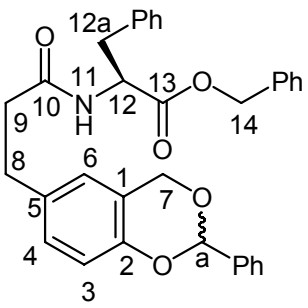


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.01 (s, 1H, Ph-OH), 8.30 (d, 1H, *J*= 7.2 Hz, NH), 7.40-7.30 (m, 5H, H_{aryl}), 7.11 (d, 1H, *J*= 2.0 Hz, H-6), 6.85 (dd, 1H, *J*= 2.1 Hz, *J*= 8.1 Hz, H-4), 6.64 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-3), 5.11 (s, 2H, H-14), 4.90 (t, 1H, *J*= 5.6 Hz, Bn-OH), 4.44 (d, 2H, *J*= 5.5 Hz, H-7), 4.30 (dq, 1H, *J*= 7.3 Hz, *J*= 7.3 Hz, H-12), 2.70-2.65 (m, 2H, H-8), 2.36-2.30 (m, 2H, H-9), 1.27 (d, 3H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 172.6 (C-13), 171.5 (C-10), 152.2 (C-2), 136.2 (C_{aryl}), 131.0 (C-5), 128.3 (2xC_{aryl}), 128.1 (C-1), 127.9 (C_{aryl}), 127.6 (2xC_{aryl}), 127.0 (C-6), 126.7 (C-4), 114.3 (C-3), 65.7 (C-14), 58.2 (C-7), 47.6 (C-12), 37.2 (C-9), 30.5 (C-8), 16.8 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3429, 3296, 1744, 1647, 1551, 1210, 1163, 695; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.21; MS (HR-FAB): calcd. 340.155 (M^+-OH); found 340.155; $C_{20}H_{23}NO_5$; Mol. Wt.: 357.40

(*S*)-Benzyl-3-phenyl-2-(3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamido)-propionat 103c

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (Variante B) durchgeführt. 488 mg L-Phenylalaninbenzylester-hydrochlorid (1.67 mmol, 2.0 Äq.) wurden in 5 mL abs. DMF suspendiert und mit 0.30 mL Di*iso*propylethylamin (DIPEA, 1.7 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 238 mg 3-(2-Phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propionsäure (0.837 mmol, 1.0 Äq.) und 141 mg HOBt*H_2O gegeben (0.921 mmol, 1.1 Äq.). Anschließend folgte die Zugabe von 224 mg DCC (1.09 mmol, 1.3 Äq.). Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und das Präzipitat abfiltriert. Die flüchtigen Komponenten wurden am Ölpumpenrotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt am Chromatotron gereinigt (PE/EE-Gradient 0-10%, v/v).

Ausbeute: 356 mg (0.683 mmol, 41%) eines farblosen Feststoffes (Diastereomerengemisch 1:1).

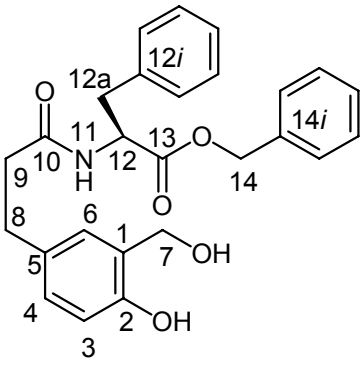


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.62-7.56 (m, 2H, H_{aryl}), 7.46-7.34 (m, 6H, H_{aryl}), 7.33-7.28 (m, 2H, H_{aryl}), 7.23-7.15 (m, 3H, H_{aryl}), 7.03-6.97 (m, 1H, H_4), 6.92-6.80 (m, 4H, H-3, H-6, H_{aryl}), 5.95, 5.91 (2xs, H-a), 5.85 (d, 1H, *J*= 7.7 Hz, H-11), 5.18-5-09 (m, 3H, H-14, H7) 4.97-4.90 (m, 2H, H-12, H-7), 3.08—3.05 (m, 2H, H-12a), 2.92-2.84 (m, 2H, H8), 2.53-2.38 (m, 2H, H9); $[\alpha]^{20}_{540}$ = 5.3° (c = 0.01 in $CHCl_3$); mp= 80 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.73; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 544.210 ($M+Na^+$); found 544.212; $C_{33}H_{31}NO_5$; Mol. Wt.: 521.60

(*S*)-Benzyl-2-(3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)-3-phenyl-propionat 104c

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. Es wurden 340 mg (S)-Benzyl-3-phenyl-2-(3-(2-phenyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamido)propionat (0.652 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 5% gereinigt.

Ausbeute: 185 mg (0.427 mmol, 66%) eines öligen Feststoffes.



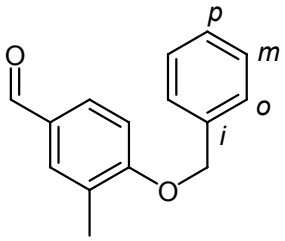
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.11 (s, 1H, Ph-OH), 8.38 (d, 1H, *J*= 7.7 Hz, H-11), 7.39-7.15 (m, 10H, H_{aryl}), 7.08 (d, 1H, *J*= 2.2 Hz, H-6), 6.79 (dd, 1H, *J*= 2.3 Hz, *J*= 8.1 Hz, H-4), 6.63 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-3), 5.12-5.03 (m, 2H, H-14), 4.95-4.87 (m, 1H, Bn-OH), 4.50 (ddd, 1H, *J*= 6.1 Hz, *J*= 7.7 Hz, *J*= 9.0 Hz, H-12), 4.43 (d, 2H, *J*= 3.9 Hz, H-7), 3.02 (dd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*= 13.7 Hz, H-12a), 2.90 (dd, 1H, *J*= 9.0 Hz, *J*= 13.7 Hz, H-12a), 2.63-2.57 (m, 2H, H-8), 2.33-2.27 (m, 2H, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.7 (C-12), 171.5 (C-10), 152.2 (C-2), 137.1 (C-12*i*), 135.7 (C-14*i*), 130.9 (C-5), 129.0, 128.3, 128.2 (6xC_{aryl}), 128.1 (C-1), 127.8 (3xC_{aryl}), 127.0 (C-6), 126.7 (C-4), 126.5 (1xC_{aryl}), 114.3 (C-3),

67.0 (C-14), 68.2 (C-7), 54 (C-12), 37.2 (C-12a), 36.7 (C-9), 30.5 (C-8); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3476, 3293, 2926, 1711, 1654, 1638, 1552, 1218, 1115, 698; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.56; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 456.1787 ($M+Na^+$); found 456.1792; $C_{26}H_{27}NO_5$; Mol. Wt.: 433.50

4-(Benzyloxy)-3-methylbenzaldehyd 62

Es wurden 891 mg 4-Hydroxy-3-methyl-benzaldehyd (6.54 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL abs. DMF gelöst und mit 1.18 mL dest. Benzylbromid (9.83 mmol, 1.5 Äq.) sowie 1.81 g Kaliumcarbonat (3 Tage bei 100 °C über P_2O_5 im Vakuum getrocknet, 13.1 mmol, 2.0 Äq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 22 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel am Ölpumpenrotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether, EE-Gradient 0-100%).

Ausbeute: 1.46 g (6.45 mmol, 99%) eines hellbraunen Öles.



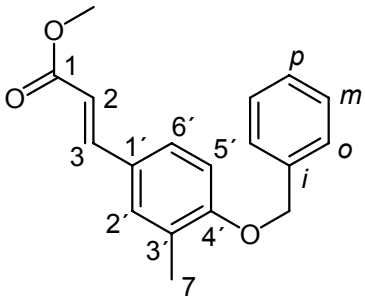
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 9.87 (s, 1H, CHO), 7.73-7.67 (m, 2H, H-2, H-6), 7.47-7.32 (m, 5H, H-*o,m,p*), 6.99 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-5), 5.18 (s, 2H, H-Bn), 2.34 (s, 3H, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 191.5 (CHO), 162.4 (C-4), 136.8 (C-*i*), 133.1 (C-2), 132.0 (C-6), 130.1 (C-1), 129.4 (C-3), 128.7 (2xC-*m*), 127.4 (C-*p*), 127.3 (2xC-*o*), 111.4 (C-5), 70.5 (C-Bn), 16.8 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 1681, 1601, 1502, 1262, 1123, 992, 813, 736; R_f (DCM/MeOH 100:1 v/v)= 0.66; MS (FAB): calcd. 227.1 ($M+H^+$); found 227.2; $C_{15}H_{14}O_2$; Mol. Wt.: 226.27

(*E*)-Methyl-3-(4-(benzyloxy)-3-methylphenyl)acrylat 66

Es wurden 0.10 g 4-Benzyloxy-3-methyl-benzaldehyd (0.44 mmol, 1.0 Äq.) in 6 mL abs. THF gelöst. Anschließend wurden 0.30 g Wittig Reagenz (0.89 mmol, 2.0 Äq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 22 h bei RT gerührt. Nach einstündigem

Erhitzen unter Rückfluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Bei Hinzufügen von Petrolether/Ethylacetat 5:1 v/v fiel das bei der Reaktion entstandene Triphenylphosphinoxid aus und wurde abfiltriert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron gereinigt (PE, EE-Gradient 0-5%). Anmerkung: Bei einem größeren Ansatz von 3.0 g Edukt entstehen beträchtliche Mengen Triphenylphosphinoxid. Bei wiederholter Fällung vermindert sich die Ausbeute auf ca. 65%.

Ausbeute: 0.12 g (0.41 mmol, 93%) eines farblosen Feststoffes.

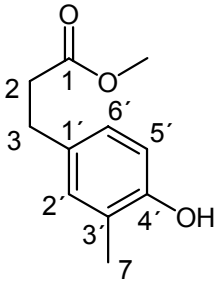


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.62 (d, 1H, *J*= 16.0 Hz, H-3), 7.44-7.30 (m, 7 H, H-*o,m,p*, H-2´, H-6´), 6.87 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-5´), 6.30 (d, 1H, *J*= 16.0 Hz, H-2), 5.12 (s, 2H, H-Bn), 3.79 (s, 3H, OMe), 2.29 (s, 3H, H-7); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 167.8 (C-1), 158.8 (C-4´), 144.8 (C-3), 136.9 (C-*i*), 130.2 (C-2´), 128.6 (2xC-*m*), 127.9 (C-*p*), 127.7 (C-3´), 127.7 (C-6´), 127.1 (2xC-*o*), 126.9 (C-1´), 115.1 (C-2), 111.4 (C-5´), 69.9 (C-Bn), 51.5 (O-CH_3), 16.4 (C-7); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2948, 1688, 1603, 1504, 1252, 1128, 1003, 811, 744; mp= 72 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.78; MS (FAB): calcd. 282.1 (M^+); found 282.2; $C_{18}H_{18}O_3$; Mol. Wt.: 282.33

Methyl-3-(4-hydroxy-3-methyl-phenyl)propionat 67

Es wurden 1.10 g (E)-Methyl-3-(4-(benzyloxy)-3-methylphenyl)acrylat (3.90 mmol) in 30 mL THF gelöst und mit Pd (10% auf Kohle) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Wasserstoffatmosphäre 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert, mit Ethylacetat gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer von den Lösungsmitteln befreit. Die Aufarbeitung erfolgte am Chromatotron (DCM, MeOH-Gradient 0-1%). Das erhaltene farblose Öl wurde im Vakuum getrocknet und bei -26 °C kristallisiert.

Ausbeute: 760 mg (3.91 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffes.

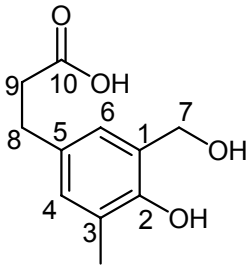


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 6.94 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-2´), 6.88 (dd, 1H, *J*= 2.0 Hz, *J*= 8.1 Hz, H-6´), 6.69 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-5´), 4.91 (s, 1H, OH), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.85 (t, 2H, *J*= 8.1 Hz, H-3), 2.60 (t, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-2), 2.22 (s, 3H, H-7); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 173.8 (C-1), 152.4 (C-4´), 132.4 (C-1´), 130.8 (C-2´), 126.6 (C-6´), 123.9 (C-3´), 114.9 (C-5´), 51.6 (OMe), 36.1 (C-2), 30.1 (C-3), 15.7 (C-7); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3417, 2949, 2911, 1717, 1437, 1246, 1193, 1176, 820; mp= 53 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.66; MS (FAB) : calcd. 194.1 (M^+), 195.1 ($M+H^+$); found 194.1, 195.1; $C_{11}H_{14}O_3$; Mol. Wt.: 194.23

3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)-5-methylphenyl)propionsäure 60

0.10 g Methyl-3-(4-hydroxy-3-methyl-phenyl)propionat (0.52 mmol, 1.0 Äq.) und 5.5 mL einer 37%-igen Formaldehydlösung wurden auf 0 °C gekühlt. Dann wurden 151 mg Kaliumhydroxid (2.69 mmol, 5.2 Äq.) zugegeben und die Kühlung entfernt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit konz. HCl auf pH= 2 eingestellt und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Der entstandene Feststoff *p*-Formaldehyd wurde abfiltriert und das Filtrat dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration vom Lösungsmittel am Rotationsverdampfer befreit. Die Aufarbeitung erfolgte am Chromatotron (EE/MeOH 9:1 + 0.5% HOAc). Das noch verunreinigte Produkt wurde zweimal mit Toluol und zweimal mit DCM coevaporiert. Das erhaltene farblose Öl wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und erneut am Chromatotron aufgearbeitet (EE/MeOH 14:1 + 0.5% HOAc). Anschließend wurde das Produkt in Acetonitril/Wasser 1:2 v/v gelöst und lyophillisiert. Anmerkung: Bei einem größeren Ansatz mit 935 mg Edukt erschwert sich die Trennung durch *p*-Formaldehyd und dessen Nebenprodukte erheblich. In diesem Fall lag die Ausbeute noch bei 90%.

Ausbeute: 0.11 g (0.52 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffes.



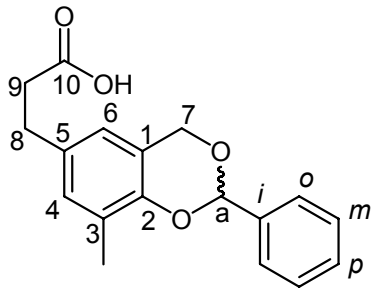
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 12.04 (s, 1H, COOH), 8.20 (s, 1H, Ph-OH), 6.90 (d, 1H, *J*= 1.8 Hz, H-6), 6.81 (d, 1H, *J*= 1.8 Hz, H-4), 5.24 (t, 1H, *J*= 5.4 Hz, Bn-OH), 4.52 (d, 2H, *J*= 5.1 Hz, H-7), 2.68 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8), 2.45 (t, 2H, *J*= 7.8 Hz, H-9),

2.11 (s, 3H, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 173.7 (C-10), 150.6 (C-2), 130.9 (C-5), 128.6 (C-4), 127.7 (C-1), 124.6 (C-6), 123.8 (C-3), 59.7 (C-7), 35.6 (C-9), 29.6 (C-8), 16.0 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3386, 2930, 1715, 1483, 1437, 1203; mp= 109 °C; R_f (EE/MeOH/HOAc 9:1:0.1 v/v)= 0.56; MS (HR-FAB): calcd. 210.089 (M^+), 193.087 (M^+-HO); found 210.089, 193.086; $C_{11}H_{14}O_4$; Mol. Wt.: 210.23

3-(8-Methyl-2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionsäure 69

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. Es wurden 873 mg 3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)-5-methylphenyl)propionsäure (4.15 mmol, 1.0 Äq.) in 30 mL abs. THF gelöst und mit einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Abweichend von AAV 2 wurden 1.9 Äquivalente Benzaldehyddimethylacetal (1.20 g, 7.85 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 Tage gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte die Reinigung am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 bis 2%.

Ausbeute: 1.06 g (3.55 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffes.

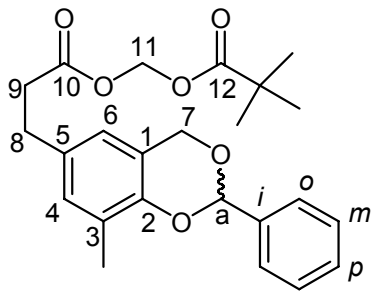


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 12.07 (s, 1H, COOH), 7.60-7.54 (m, 2H, H-*o*), 7.48-7.42 (m, 3H, H-*p*, H-*m*), 6.93 (s, 1H, H-6), 6.79 (s, 1H, H-4), 6.09 (s, 1H, H-a), 5.14 (d, 1H, *J*= 14.8 Hz, H-7), 4.89 (d, 2H, *J*= 14.8 Hz, H-7), 2.72 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8), 2.48 (t, 2H, *J*= 7.9 Hz, H-9), 2.12 (s, 3H, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 173.6 (C-10), 148.9 (C-2), 137.3 (C-*i*), 132.8 (C-5), 129.1 (C-4), 128.7 (C-*p*), 128.2 (C-*m*), 126.2 (C-*o*), 124.7 (C-3), 122.1 (C-6), 120.2 (C-1), 98.1 (C-a), 66.0 (C-7), 35.4 (C-9), 29.6 (C-8), 14.9 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3005, 2924, 1697, 1485, 1395, 1219, 961; mp= 132 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.50; MS (HR-FAB): calcd. 298.121 (M^+), found 298.121; $C_{18}H_{18}O_4$; Mol. Wt.: 298.33

POM-3-(8-methyl-2-phenyl-4*H*-benzo[*d*]-[1,3]dioxin-6-yl)propionat 70

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu 1.03 g 3-(8-Methyl-2-phenyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propionsäure (3.45 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 20 mL abs. Acetonitril, wurden 1.20 mL abs. DIPEA (d= 0.742 g/mL, 890 mg, 6.90 mmol, 2.0 Äq.) und 1.67 g POM-I (6.90 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Nach zwei Stunden bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde die Lösung eingeengt und am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit einem Ethylacetat-Gradienten 0-10%).

Ausbeute: 1.42 g (3.44 mmol, 100%) eines farblosen Öles.

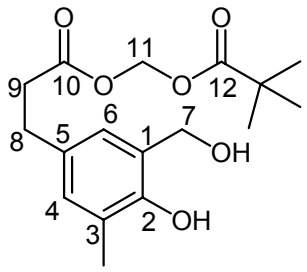


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.63-7.59 (m, 2H, H-*o*), 7.47-7.38 (m, 3H, H-*m*, H-*p*), 6.89 (s, 1H, H-6), 6.69 (s, 1H, H-4), 5.97 (s, 1H, H-a), 5.75 (s, 2H, H-11), 5.15 (d, 1H, *J*= 14.6 Hz, H-7), 4.94 (d, 2H, *J*= 14.6 Hz, H-7), 2.86 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.65 (t, 2H, *J*= 7.9 Hz, H-9), 2.22 (s, 3H, CH_3), 1.20 (s, 9H, *t*Bu); R_f (DCM)= 0.64; $C_{24}H_{28}O_6$; Mol. Wt.: 412.48

POM-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-5-methylphenyl)propionat 71

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. Es wurden 1.20 g von Pivaloyloxymethyl-3-(8-methyl-2-phenyl-4*H*-benzo[*d*]-[1,3]dioxin-6-yl)propionat (2.91 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 bis 5% gereinigt.

Ausbeute: 736 mg (2.27 mmol, 78%) eines farblosen Öles.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.23 (s, 1H, Ph-OH), 6.90 (s, 1H, H-6), 6.82 (s, 1H, H-4), 6.09 (s, 1H, H-a), 5.68 (s, 2H, H-11), 5.25 (t, 1H, *J*= 4.9 Hz, Bn-OH), 4.52 (d, 2H, *J*= 4.2 Hz, H-7), 2.72 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8), 2.61 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz,

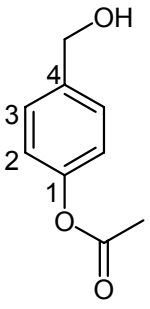
H-9), 2.11 (s, 3H, CH_3), 1.12 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 176.1 (C-12), 171.1 (C-10), 150.8 (C-2), 130.2 (C-5), 128.6 (C-4), 127.7 (C-1), 124.6 (C-6), 123.9 (C-3), 79.1 (C-11), 59.8 (C-7), 38.1 (C-*t*Bu), 35.0 (C-9), 29.2 (C-8), 26.3 (CH_3-*t*Bu), 16.0 (CH_3); R_f (DCM)= 0.08; $C_{17}H_{24}O_6$; Mol. Wt.: 324.37

10.2.4 Synthesen von 4-Acyloxybenzylalkoholen

4-(Hydroxymethyl)phenylacetat 195a

Die Synthese wurde gemäß AAV 7 durchgeführt. Es wurden 4.00 g 4-Hydroxybenzylalkohol (32.2 mmol, 1.0 Äq.) sowie 4.52 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 32.6 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch Zugabe von 2.52 mL dest. Acetylchlorid (d= 1.10 g/mL, 2.77 g, 35.3 mmol, 1.1 Äq.) bei 0 °C. Reinigung erfolgte am Chromatotron mit Petrolether und einem EE-Gradienten von 2 bis 20%.

Ausbeute: 3.43 g (20.6 mmol, 64%) eines farblosen Öles. Kristallisation bei -26 °C.

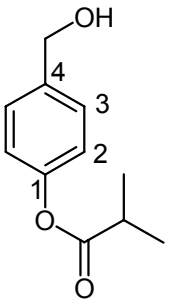


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.33 (d, 2H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 7.06 (d, 2H, *J*= 8.4 Hz, H-2), 5.21 (t, 1H, *J*= 5.7 Hz, OH), 4.48 (d, 2H, *J*= 5.7 Hz, CH_2), 2.25 (s, 3H, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 169.2 (C=O), 149.1 (C-1), 139.9 (C-4), 127.3 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (CH_2), 20.7 (Me); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3537, 2862, 1737, 1508, 1372, 1237, 1197, 1053, 1016; mp = 30 °C; R_f (PE/EE 3:2 v/v)= 0.22; MS (FAB): calcd. 166.1 (M^+), 167.1 ($M+H^+$); found 166.1, 167.1; $C_9H_{10}O_3$; Mol. Wt.: 166.17

4-(Hydroxymethyl)phenyl-*iso*-butyrat 195b

Die Synthese wurde gemäß AAV 7 durchgeführt. Es wurden 2.50 g 4-Hydroxybenzylalkohol (20.1 mmol, 1.0 Äq.) sowie 2.82 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 20.3 mmol, 2.06 g, 1.0 Äq.) in 30 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch Zugabe von 2.10 mL dest. *iso*-Butyrylchlorid (d= 1.017 g/mL, 2.14 g, 20.1 mmol, 1.0 Äq.) bei 0 °C. Reinigung erfolgte am Chromatotron mit Dichlormethan.

Ausbeute: 3.00 g (15.4 mmol, 77%) eines hellgelben Feststoffes.

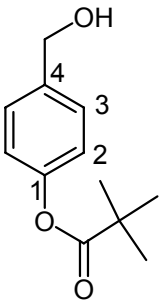


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.34 (d, 2H, *J*= 8.6Hz, H-3), 7.07-7.02 (m, 2H, H-2), 5.22 (t, 1H, *J*= 5.8 Hz, OH), 4.49 (d, 2H, *J*= 5.7 Hz, CH_2), 2.80 (sept., 1H, *J*= 7.0 Hz, CH-*i*Bu), 1.23 (d, 6H, *J*= 7.0 Hz, CH_3-*i*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 175.1 (C=O), 149.2 (C-1), 139.9 (C-4), 127.4 (C-3), 121.2 (C-2), 62.3 (CH_2), 33.2 (CH-*i*Bu), 18.6 (CH_3); R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.46; $C_{11}H_{14}O_3$; Mol. Wt.: 194.23

4-(Hydroxymethyl)phenylpivalat 195c

Die Synthese wurde gemäß AAV 7 durchgeführt. Es wurden 3.00 g 4-Hydroxybenzylalkohol (24.2 mmol, 1.0 Äq.) sowie 3.35 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 24.2 mmol, 2.45 g, 1.0 Äq.) in 30 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch Zugabe von 2.98 mL Pivaloylchlorid (d= 0.980 g/mL, 2.92 g, 24.2 mmol, 1.0 Äq.) bei 0 °C. Reinigung erfolgte am Chromatotron mit Petrolether und einem EE-Gradienten von 10 bis 60%.

Ausbeute: 3.52 g (16.9 mmol, 70%) eines farblosen Öles. Kristallisation bei -26 °C.



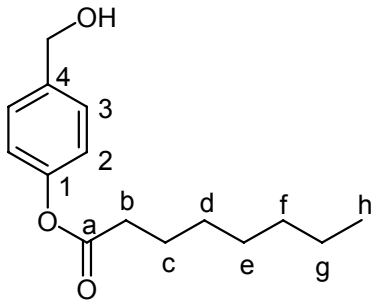
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.35 (d, 2H, *J*= 8.6 Hz, H-3), 7.03 (d, 2H, *J*= 8.5 Hz, H-2), 5.23 (s, 1H, OH), 4.50 (s, 2H, CH_2), 1.99 (s, 9H, *t*-Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 176.4 (C=O), 149.4 (C-1), 139.9 (C-4), 127.3 (C-3), 121.2 (C-2), 62.3 (CH_2), 38.4 (C-*t*-Bu), 26.7 (CH_3-*t*-Bu); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3299, 2984, 1751, 1508, 1279, 1196, 1164, 1125, 897; mp= 39 °C; MS (FAB): calcd. 208.1 (M^+), 209.1 ($M+H^+$), 191.1 (M^+-HO); found 208.1, 209.1, 191.1; $C_{12}H_{16}O_3$; Mol. Wt.: 208.25

4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat 195d

Die Synthese wurde gemäß AAV 7 durchgeführt. Es wurden 3.31 g 4-Hydroxybenzylalkohol (26.7 mmol, 1.0 Äq.) sowie 3.70 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 26.7 mmol, 2.70 g, 1.0 Äq.) in 30 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch Zugabe von 4.57 mL Octanoylchlorid (d= 0.95 g/mL, 4.30 g, 26.7 mmol, 1.0

Äq.) bei 0 °C. Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie, zunächst mit reinem DCM, dann DCM/MeOH 100:1 v/v, dann 50:1 v/v.

Ausbeute: 3.81 g (15.2 mmol, 57%) eines farblosen Feststoffes.

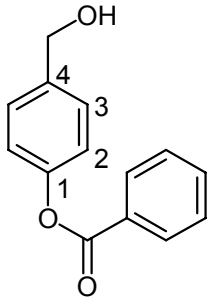


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.35 (d, 2H, *J*= 8.6 Hz, H-3), 7.07-7.02 (m, 2H, H-2), 5.24 (t, 1H, *J*= 5.7 Hz, OH), 4.50 (d, 2H, *J*= 5.7 Hz, Bn), 2.55 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-b), 1.64 (tt, 2H, *J*= 7.3 Hz, *J*= 7.3 Hz, H-c), 1.40-1.20 (m, 8H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.88 (t, 3H, *J*= 6.9 Hz, H-h); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.8 (C-a), 149.2 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (2xC-3), 121.5 (2xC-2), 62.4 (CH_2OH), 33.5 (C-b), 31.1, 28.5, 28.4, 24.3, 22.0 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g), 13.8 (C-h); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3406, 2955, 2926, 2856, 1755, 1508, 1201, 1151; mp= 35°C; R_f (DCM/MeOH 100:1 v/v)= 0.40; MS (FAB): calcd. 250.2 (M^+), 251.2 ($M+H^+$), 233.2 (M^+-HO); found 250.2, 251.2, 233.2; $C_{15}H_{22}O_3$; Mol. Wt.: 250.33

4-(Hydroxymethyl)phenylbenzoat 195e

Die Synthese wurde gemäß AAV 7 durchgeführt. Es wurden 3.31 g 4-Hydroxybenzylalkohol (26.7 mmol, 1.0 Äq.) sowie 3.70 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 26.7 mmol, 2.70 g, 1.0 Äq.) in 30 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch Zugabe von 3.10 mL dest. Benzoylchlorid (d= 1.21 g/mL, 3.75 g, 26.7 mmol, 1.0 Äq.) bei 0 °C. Reinigung erfolgte durch zweifache Kristallisation, zunächst aus Petrolether/DCM 1:1. Das Präzipitat wurde filtriert und mit PE gewaschen. Die Mutterlauge wurde eingeengt und die Kristallisation aus PE/DCM 9:1 wiederholt.

Ausbeute: 4.30 g (18.8 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.15-8.11 (m, 2H, H-*meta*), 7.75 (tt, 1H, *J*= 1.3 Hz, *J*= 6.9 Hz, H-*para*), 7.64-7.58 (m, 2H, H-*ortho*), 7.40 (d, 2H, *J*= 8.6 Hz, H-3), 7.23 (d, 2H, *J*= 8.5 Hz, H-2), 5.26 (t, 1H, *J*= 5.8 Hz, OH), 4.53 (d, 2H, *J*= 5.7 Hz, Bn); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 164.6 (C=O), 149.2 (C-1), 140.3 (C-4),

134.0 (C-*para*), 129.8 (C-*ipso*), 129.7 (2xC-*meta*), 128.9 (2xC-*ortho*), 127.5 (2xC-3), 121.4 (2xC-2), 62.3 (CH_2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3326, 1731, 1509, 1291, 1217, 1066, 700; mp= 71 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.57; MS (HR-FAB): calcd. 228.0786 (M^+), 229.0865 ($M+H^+$); found 228.0790, 229.0856; $C_{14}H_{12}O_3$; Mol. Wt.: 228.24

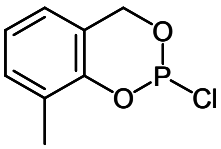
10.2.5 Synthese reaktiver Phosphorverbindungen

10.2.5.1 Synthese von Saligenylchlorphosphiten

3-Methylsaligenylchlorphosphit 134

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 2.50 g 3-Methylsalicylalkohol (18.4 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 30 mL abs. Diethylether mit 1.92 mL dest. PCl_3 (22.0 mmol, 3.03 g, 1.2 Äq.) und 3.42 mL abs. Pyridin (42.3 mmol, 3.35 g, 2.3 Äq.), gelöst in 15 mL abs. Diethylether, umgesetzt. Das als gelbes Öl anfallende Rohprodukt wurde mittels einer Kugelrohrdestillation gereinigt (Sdp.: 150 °C im Ölpumpen-Vakuum).

Ausbeute: 1.57 g (7.83 mmol, 43%) eines farblosen Öles als Enantiomerengemisch.

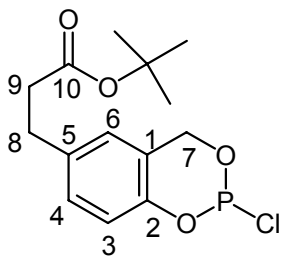


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.14 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J* = 0.6 Hz, H-6), 7.01 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 7.6 Hz, H-5), 6.82 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 0.6 Hz, H-4), 5.54 (dd, 1H, *J*= 14.1 Hz, *J*= 2.6 Hz, H-7), 5.02 (dd, 1H, *J*= 14.1 Hz, *J*= 9.4 Hz, H-7), 2.26 (s, 3H, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 130.5 (C-2), 123.4 (C-5), 123.2 (C-1), 123.2 (C-4), 121.0 (C-6), 119.1 (C-3), 61.3 (d, *J*=2.0 Hz, C-7), 15.5 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 140.91; $C_8H_8ClO_2P$; Mol. Wt.: 202.57

5-(*t*Bu*prop*)saligenylchlorphosphit 91

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 1.29 g 5(*t*Bu-*prop*)salicylalkohol (5.11 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 30 mL abs. Diethylether mit 0.54 mL dest. PCl_3 (6.2 mmol, 0.85 g, 1.2 Äq.) und 0.95 mL abs. Pyridin (12 mmol, 0.93 g, 2.3 Äq.), gelöst in 5 mL abs. Diethylether, umgesetzt.

Ausbeute: 1.49 g (4.70 mmol, 92%) eines noch verunreinigten gelblichen Öles als Enantiomerengemisch.

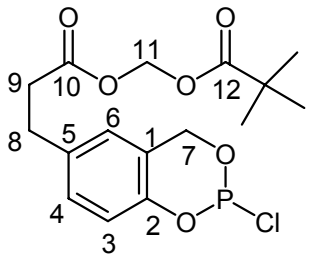


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.09 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 1.6 Hz, H-4), 6.91-6.89 (m, 1H, H-3), 6.80 (s, 1H, H-6), 5.43-5.40 (m, 1H, H-7), 5.01-4.96 (m, 1H, H-7), 2.86 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.54-2.50 (m, 2H, H-9), 1.41 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 172.0 (C=O), 144.4 (d, *J*= 5.1 Hz, C-2), 136.6 (C-5), 129.1 (C-4), 125.5 (d, *J*= 2.0 Hz, C-6), 121.2 (d, *J*= 13.2 Hz, C-1), 119.4 (d, *J*= 2.0 Hz, C-3), 80.6 (C-*t*Bu), 61.1 (d, *J*= 2.0 Hz, C-7), 36.1 (C-9), 30.3 (C-8), 28.1 (CH_3-*t*Bu); ^{31}P-NMR (202 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 141.03; $C_{14}H_{18}ClO_4P$; Mol. Wt.: 316.72

5-(POM*prop*)saligenylchlorphosphit

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 608 mg 5-(POM*prop*)salicylalkohol (1.95 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 15 mL abs. Diethylether mit 0.21 mL dest. PCl_3 (2.34 mmol, 0.32 g, 1.2 Äq.) und 0.36 mL abs. Pyridin (4.49 mmol, 355 mg, 2.3 Äq.), gelöst in 4 mL abs. Diethylether, umgesetzt.

Ausbeute: 721 mg (1.92 mmol, 98%) eines noch verunreinigten gelblichen Öles als Enantiomerengemisch.

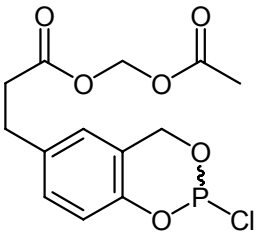


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.08 (dddd, 1H, *J*= 0.6 Hz, *J*= 0.6 Hz, *J*= 2.2 Hz, *J*= 8.3 Hz, H-4), 6.89 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.81 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-6), 5.74 (s, 2H, H-11), 5.41 (ddd, 1H, *J*= 0.8 Hz, *J*= 2.5 Hz, *J*= 14.1 Hz, H-7), 4.99 (ddd, 1H, *J*= 0.5 Hz, *J*= 9.6 Hz, *J*= 14.2 Hz, H-7), 2.90 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.65 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 1.19 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 176.2 (C-12), 171.1 (C-10), 146.4 (C-2), 136.8 (C-5), 130.1 (C-4), 125.5 (C-6), 121.3 (C-1), 119.1 (d, *J*= 7.1 Hz, C-3), 80.1 (C-11), 61.0 (d, *J*= 2.5 Hz, C-7), 35.3 (C-*t*Bu), 29.7 (C-9), 29.6 (C-8), 26.8 (CH_3-*t*Bu); ^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 140.50; $C_{16}H_{20}ClO_6P$; Mol. Wt.: 374.75

5-(AM*prop*)saligenylchlorphosphit 140

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 335 mg 5-(AM*prop*)salicylalkohol (1.25 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 10 mL abs. Diethylether mit 0.13 mL dest. PCl_3 (1.50 mmol, 1.2 Äq.) und 0.23 mL abs. Pyridin (2.88 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 3 mL abs. Diethylether, umgesetzt. Nach Schlenkfiltration wurde das Rohprodukt ohne weitere Charakterisierung und Aufarbeitung für die nächste Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 270 mg (0.81 mmol, 65%) eines gelblichen Öles als Enantiomerengemisch.

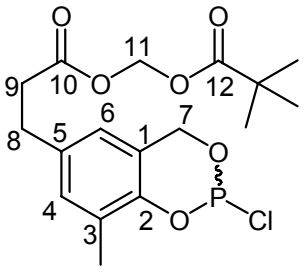


$C_{13}H_{14}ClO_6P$; Mol. Wt.: 332.67

3-Methyl-5-(POM*prop*)saligenylchlorphosphit 59

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 0.19 g 3-Methyl-5-(POM*prop*)salicylalkohol (0.59 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 5 mL abs. Diethylether mit 0.06 mL dest. PCl_3 (0.69 mmol, 1.2 Äq.) und 0.11 mL abs. Pyridin (1.4 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 4 mL abs. Diethylether, umgesetzt.

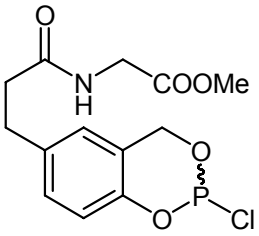
Ausbeute: 193 mg (0.50 mmol, 85%) eines farblosen Öles als Enantiomerengemisch.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 6.95 (d, 1H, *J*= 0.9 Hz, H-6), 6.64 (d, 1H, *J*= 0.9 Hz, H-4), 5.73 (s, 2H, H-11), 5.39 (dd, 1H, *J*= 13.9 Hz, *J*= 9.6 Hz, H-7), 4.97 (dd, 1H, *J*= 13.9 Hz, *J*= 9.6 Hz, H-7), 2.86 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.64 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 2.20 (s, 3H, CH_3), 1.18 (s, 9 H, *t*Bu); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= 140.80; $C_{17}H_{22}ClO_6P$; Mol. Wt.: 388.78

5-(GlyOMe-*prop*)saligenylchlorphosphit 105

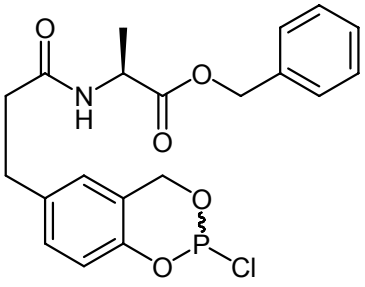
Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 100 mg 5-(GlyOMe-*prop*)salicylalkohol (0.37 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 3 mL abs. THF mit 35 µL dest. PCl_3 (0.41 mmol, 1.1 Äq.) und 66 µL abs. Pyridin (0.85 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 2 mL abs. Diethylether, umgesetzt. Die Reaktion wurde wegen der schlechten Löslichkeit des Eduktes bei -5 °C durchgeführt. Da dennoch keine vollständige Auflösung erreicht werden konnte, wurden nach der Filtration auch nur ca. 50 mg eines farblosen Öles erhalten, welches im ^{31}P-NMR nur Spuren des Produktes aufwies.



$C_{13}H_{15}ClNO_5P$; Mol. Wt.: 331.69

5-(L-AlaOBn-*prop*)saligenylchlorphosphit 95

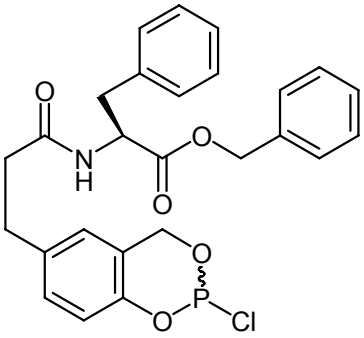
Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 0.19 g 5-(L-AlaOBn-*prop*)salicylalkohol (0.54 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 8 mL abs. THF mit 55 µL dest. PCl_3 (0.60 mmol, 1.1 Äq.) und 92 µL abs. Pyridin (1.1 mmol, 2.1 Äq.), gelöst in 4 mL abs. THF, umgesetzt. Nach Schlenkfiltration wurde wegen der Löslichkeit von Pyridiniumchlorid in THF ein stark verunreinigtes Öl erhalten. Da die maximale Ausbeute an Produkt bei 235 mg (0.54 mmol, 100%) lag, wurde eine Stammlösung in 2 mL abs. Toluol hergestellt, deren Konzentration ca. 0.27 M betrug. Eine Charakterisierung der Lösung wurde nicht vorgenommen. Sie wurde direkt für die nachfolgenden Synthesen eingesetzt.



$C_{20}H_{21}ClNO_5P$; Mol. Wt.: 421.81

5-(L-PheOBn-*prop*)saligenylchlorphosphit 106

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. 0.17 g 5-(L-PheOBn-*prop*)salicylalkohol (0.39 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 2 mL abs. THF mit 42 µL dest. PCl_3 (0.48 mmol, 1.2 Äq.) und 75 µL abs. Pyridin (0.93 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 0.5 mL abs. THF, umgesetzt. Nach Schlenkfiltration wurden wegen der Löslichkeit von Pyridiniumchlorid in THF 166 mg eines verunreinigten Öles erhalten, welches ohne weitere Charakterisierung für die nächsten Reaktionen eingesetzt wurde.



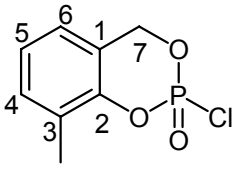
$C_{26}H_{25}ClNO_5P$; Mol. Wt.: 497.91

10.2.5.2 Synthese von Saligenylphosphorchloridaten

3-Methyl-saligenylphosphorchloridat 135

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 480 mg 3-Methylsalicylalkohol (3.47 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 1.00 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 7.29 mmol, 0.74 g, 2.1 Äq.) und 10 mL abs. THF zu 0.35 mL $POCl_3$ (d= 1.65 g/mL, 3.82 mmol, 585 mg, 1.1 Äq.), gelöst in 10 mL abs. THF, getropft. Das Produkt wurde am Chromatotron mit PE/EE 2:1 v/v gereinigt.

Ausbeute: 470 mg (2.15 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffes als Enantiomerengemisch.



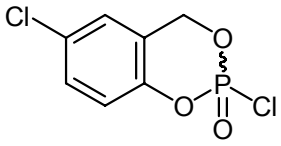
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.25-7.20 (m, 1H, H-6), 7.11 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 7.6 Hz, H-5), 6.97-6.93 (m, 1H, H-4), 5.52-5.40 (m, 2H, H-7), 2.31 (s, 3H, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm= 147.7 (C-2), 131.8 (C-6), 128.8 (C-1), 125.1 (C-5), 122.8

(C-4), 119.3 (C-3), 70.4 (C-7), 15.5 (Me); ^{31}P-NMR (^{1}H-decoupled, 162 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm = -5.04; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 1473, 1268, 1179, 1026, 945, 835, 767, 649, 570, 471; mp= 59 °C; R_f (PE/EE 2:1 v/v)= 0.33; MS (HR-FAB): calcd. 218.998 ($M+H^+$), 220.995 ($M+H^+$); found 219.002, 220.999; $C_8H_8ClO_3P$; Mol. Wt.: 218.57

5-Chlor-saligenylphosphorchloridat 162

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 502 mg 5-Chlorsalicylalkohol (3.17 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 0.93 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 6.7 mmol, 2.1 Äq.) und 10 mL abs. Et_2O zu 0.33 mL $POCl_3$ (d= 1.65 g/mL, 3.5 mmol, 1.1 Äq.), gelöst in 10 mL abs. Et_2O, getropft. Das Produkt wurde am Chromatotron mit PE/EE 2:1 v/v gereinigt.

Ausbeute: 614 mg (2.57 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffes als Enantiomerengemisch.

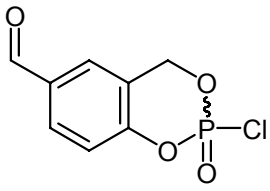


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.36-7.32 (m, 1H, H-4), 7.15-7.11 (m, 1H, H-6), 7.06 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, H-3), 6.51-6.39 (m, 2H, H-7); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 147.3 (d, *J*= 8.1 Hz, C-2), 130.9 (C-5), 130.3 (C-4), 125.2 (C-6), 120.6 (d, *J*= 9.8 Hz, C-3), 120.5 (C-1), 69.5 (d, *J*= 8.2 Hz, C-7); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= -6.62; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 1481, 1313, 1184, 1034, 953, 877, 731, 564; mp= 90 °C; R_f (PE/EE 2:1 v/v)= 0.30; MS (HR-FAB): calcd. 238.943 ($M+H^+$), 240.940 ($M+H^+$); found 238.946, 240.945; $C_7H_5Cl_2O_3P$; Mol. Wt.: 238.99

5-Formyl-saligenylphosphorchloridat 174

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 254 mg 5-Formylsalicylalkohol (1.67 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 0.49 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 3.5 mmol, 2.1 Äq.) und 10 mL abs. THF zu 0.17 mL $POCl_3$ (d= 1.65 g/mL, 1.8 mmol, 1.1 Äq.), gelöst in 10 mL abs. THF, getropft. Das Produkt wurde am Chromatotron mit PE/EE 1:1 v/v gereinigt.

Ausbeute: 362 mg (1.56 mmol, 93%) eines gelben Feststoffes als Enantiomerengemisch.

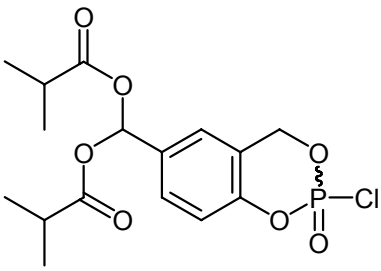


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 9.98 (s, 1H, CHO), 7.92 (dddd, 1H, *J*= 0.6 Hz, *J*= 0.6 Hz, *J*= 2.4 Hz, *J*= 4.3 Hz, H-6), 7.73-7.71 (m, 1H, H-4), 7.29 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 5.65-5.50 (m, 2H, CH_2); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= -6.77; R_f (PE/EE 1:1 v/v)= 0.30; $C_8H_6ClO_4P$; Mol. Wt.: 232.56

5-(Bis-*iso*butyryloxymethyl)saligenylphosphorchloridat 180

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 50 mg 5-Formyl-saligenylphosphorchloridat (0.22 mmol, 1.0 Äq.) in 0.5 mL abs. Acetonitril wurden 0.90 mL dest. *Iso*buttersäureanhydrid gegeben (d= 0.952 g/mL, 5.4 mmol, 25 Äq.). Zur Katalyse wurden der Lösung 25 mg Zirkoniumtetrachlorid (0.11 mmol, 0.5 Äq.) beigegeben. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung ohne vorherige Entfernung der Lösungsmittel am Chromatotron mit PE/EE 1:1 gereinigt.

Ausbeute: 22 mg (0.06 mmol, 27%) eines gelben Feststoffes als Enantiomerengemisch.

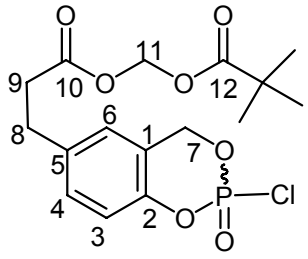


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.61 (s, 1H, OCHO), 7.56-7.54 (m, 1H, H-6), 7.29-7.27 (m, 1H, H-4), 7.15 (d, 1H, *J*= 8.6 Hz, H-3), 5.60-5.45 (m, 2H, CH_2), 2.61 (sept, 2H, *J*= 7.0 Hz, CH-*i*Bu), 1.21, 1.18 (2xd, 12H, *J*= 7.0 Hz, CH_3-*i*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 174.7 (2xC=O), 149.5 (d, *J*= 7.9 Hz, C-2), 133.5 (C-6), 128.8 (C-4), 128.5 (C-5), 123.9 (d, *J*= 31.0 Hz, C-1), 119.3 (d, *J*= 12.7 Hz, C-3), 88.5 (OCHO), 69.9 (d, *J*= 8.1 Hz, CH_2), 33.8 (2xCH-*i*Bu), 18.7, 18.5 (4xCH_3-*i*Bu); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= -6.38; R_f (PE/EE 1:1 v/v)= 0.66; $C_{16}H_{20}ClO_7P$; Mol. Wt.: 390.75

5-(POM-*prop*)saligenylphosphorchloridat 175

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 455 mg 5-(POM-*prop*)salicylalkohol (1.46 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 0.43 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 3.1 mmol, 2.1 Äq.) und 10 mL abs. THF zu 0.14 mL $POCl_3$ (d= 1.65 g/mL, 231 mg, 1.51 mmol, 1.1 Äq.), gelöst in 10 mL abs. THF, getropft. Das Produkt wurde am Chromatotron mit PE/EE 2:1 v/v gereinigt.

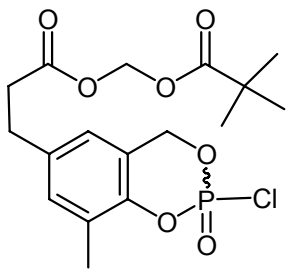
Ausbeute: 0.37 g (0.94 mmol, 64%) eines farblosen Öles als Enantiomerengemisch.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.00 (d, 2H, *J*= 8.6 Hz, H-6, H-3), 6.64 (d, 1H, *J*= 8.6 Hz, H4), 5.70 (s, 2H, H-11), 5.45 (dd, 1H, *J*= 13.5 Hz, *J*= 9.1 Hz, H-7), 5.45 (dd, 1H, *J*= 13.8 Hz, *J*= 7.1 Hz, H-7), 2.91 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.64 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 1.18 (s, 9 H, *t*Bu); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= -6.02; R_f (PE/EE 1:1 v/v)= 0.20; $C_{16}H_{20}ClO_7P$; Mol. Wt.: 390.75

3-Methyl-5-(POM-*prop*)saligenylphosphorchloridat 177

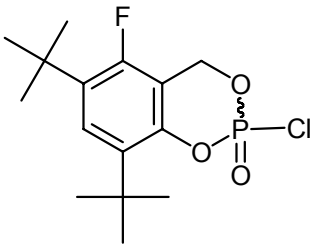
Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 0.32 g 3-Methyl-5-(POM-*prop*)salicylalkohol (0.98 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 0.29 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 2.1 mmol, 2.1 Äq.) und 10 mL abs. THF zu 100 µL $POCl_3$ (d= 1.65 g/mL, 165 mg, 1.08 mmol, 1.1 Äq.), gelöst in 10 mL abs. THF, getropft. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte keinerlei Produktbildung an.



$C_{17}H_{22}ClO_7P$; Mol. Wt.: 404.78

3,5-Di-*tert*-butyl-6-fluor-saligenylphosphorchloridat 179

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 547 mg 3,5-Di-*tert*-butyl-6-fluorsalicylalkohol (3.47 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 1.00 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 7.29 mmol, 0.74 g, 2.1 Äq.) und 10 mL abs. Et_2O zu 0.35 mL $POCl_3$ (d= 1.65 g/mL, 3.82 mmol, 585 mg, 1.1 Äq.), gelöst in 10 mL abs. Et_2O, getropft. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte keinerlei Produktbildung an.



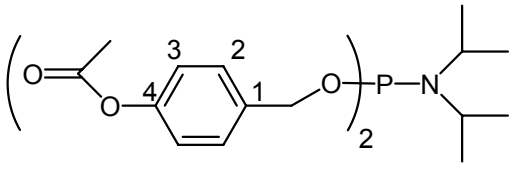
$C_{15}H_{21}ClFO_3P$; Mol. Wt.: 334.75

10.2.5.3 Synthese von Phosphoramiditen

Bis-(4-acetoxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit 197a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 2.00 g 4-(Hydroxymethyl)phenylacetat (12.0 mmol, 2.2 Äq.) und 1.82 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 13.1 mmol, 1.33 g, 2.4 Äq.), gelöst in 25 mL abs. THF mit 0.99 mL Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (d= 1.098 g/mL, 1.09 g, 5.38 mmol, 1.0 Äq.) , gelöst in 25 mL abs. THF, umgesetzt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit PE/EE 4:1 v/v als Laufmittel.

Ausbeute: 1.87 g (4.05 mmol, 75%) eines farblosen Öles. Kristallisation bei -26 °C.



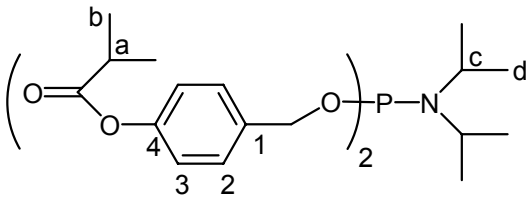
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.35 (d, 4H, *J*= 8.6 Hz, H-2), 7.07-7.01 (m, 4H, H-3), 4.79-4.63 (m, 4H, H-Bn), 3.77-3.63 (m, 2H, CH-*i*pr), 2.29 (s, 6H, Ac), 1.20 (d, 12H, *J*= 6.8 Hz, CH_3-*i*pr); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 169.5 (2xC=O), 149.8 (2xC-4), 137.1 (d, *J*= 7.5 Hz , 2xC-1), 128.0 (4xC-2), 121.3 (4xC-3), 64.8 (d, *J*= 18.4 Hz, 2xC-Bn), 43.1 (d, *J*= 12.4 Hz, 2xCH-*i*pr), 24.6 (d, *J*= 7.1 Hz, 4xCH_3-*i*pr), 21.1 (2xCH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled,

$CDCl_3$)δ/ppm= 147.97; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3483, 2966, 2931, 1756, 1509, 1222, 1035, 910, 754; mp= 35 °C; R_f (PE/EE 3:2 v/v)= 0.42; MS (HR-FAB): calcd. 462.205 ($M+H^+$); found 462.206; $C_{24}H_{32}NO_6P$; Mol. Wt.: 461.49

Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit 197b

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.00 g 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*iso*-butyrat (5.15 mmol, 2.2 Äq.) und 0.75 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 5.4 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 10 mL abs. THF mit 0.43 mL Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (d= 1.098 g/mL, 0.47 g, 2.34 mmol, 1.0 Äq.) , gelöst in 10 mL abs. THF, umgesetzt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit PE und einem Ethylacetat-Gradienten von 1-5%.

Ausbeute: 657 mg (1.27 mmol, 54%) eines farblosen Öles.

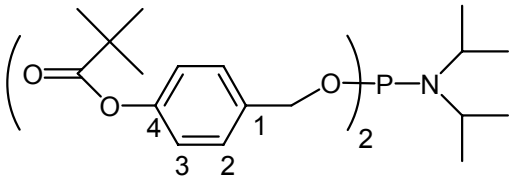


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.34 (d, 4H, *J*= 8.6 Hz, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.80-4.63 (m, 4H, H-Bn), 3.75-3.61 (m, 2H, H-c), 2.79 (sept., 2H, *J*= 7.0 Hz, H-a), 1.31 (d, 12H, *J*= 7.0 Hz, H-b), 1.20 (d, 12H, *J*= 6.8 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 175.7 (2xC=O), 150.0 (2xC-4), 136.9 (d, *J*= 7.3 Hz, 2xC-1), 128.0 (4xC-2), 121.3 (4xC-3), 64.8 (d, *J*= 18.3 Hz, 2xC-Bn), 43.1 (d, *J*= 12.6 Hz, 2xC-c), 34.2 (2xC-a), 24.6 (d, *J*= 7.2 Hz, 4xC-d), 18.9 (4xC-b); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-entkoppelt, $CDCl_3$)δ/ppm= 147.94; R_f (PE/EE 5:1 v/v)= 0.35; $C_{28}H_{40}NO_6P$; Mol. Wt.: 517.59

Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit 197c

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.04 g 4-(Hydroxymethyl)phenyl-pivalat (4.99 mmol, 2.2 Äq.) und 0.73 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 5.3 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 6 mL abs. THF, mit 0.42 mL Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (d= 1.098 g/mL, 0.46 g, 2.3 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 6 mL abs. THF, umgesetzt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit PE und einem Ethylacetat-Gradienten von 0-5%.

Ausbeute: 846 mg (1.55 mmol, 67%) eines farblosen Öles. Kristallisation bei -26 °C.

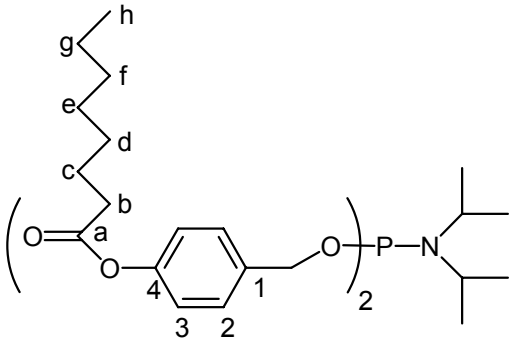


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.38-7.31 (m, 4H, H-2), 7.05-6.99 (m, 4H, H-3), 4.80-4.64 (m, 4H, H-Bn), 3.76-3.62 (m, 2H, NC-H), 1.36 (s, 18H, *t*-Bu), 1.20 (d, 12H, *J*= 6.8 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 177.1 (2xC=O), 150.2 (2xC-4), 136.8 (d, *J*= 7.3 Hz, 2xC-1), 128.0 (4xC-2), 121.2 (4xC-3), 64.8 (d, *J*= 18.4 Hz, 2xC-Bn), 43.1 (d, *J*= 12.4 Hz, 2xC-N), 39.0 (2xC-*t*Bu), 27.1 (6xCH_3-*t*-Bu), 24.6 (d, *J*= 7.1 Hz, 4xCH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= 147.93; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2969, 2934, 2872, 1749, 1508, 1196, 1115, 974, 742; mp= 25-27 °C; R_f (PE/EE 5:1 v/v)= 0.63; $C_{30}H_{44}NO_6P$; Mol. Wt.: 545.65

Bis-(4-octanoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit 197d

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.25 g 4-(Hydroxymethyl)phenyl-octanoat (4.99 mmol, 2.2 Äq.) und 0.73 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 5.3 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 6 mL abs. THF, mit 0.42 mL Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (d= 1.098 g/mL, 0.46 g, 2.3 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 6 mL abs. THF, umgesetzt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit PE und einem Ethylacetat-Gradienten von 0-5%.

Ausbeute: 760 mg (1.21 mmol, 52%) eines farblosen Öles.



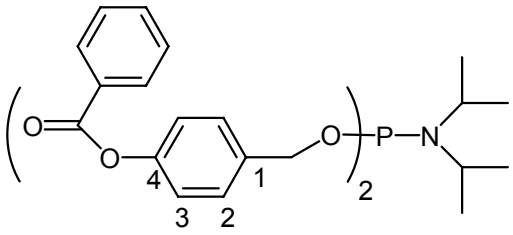
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.38-7.31 (m, 4H, H-2), 7.06-7.00 (m, 4H, H-3), 4.80-4.64 (m, 4H, H-Bn), 3.78-3.62 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, *J*= 7.5 Hz, H-b), 1.75 (tt, 4H, *J*= 7.5 Hz, *J*= 7.5 Hz, H-c), 1.48-1.24 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g), 1.20 (d, 12H, *J*= 6.8 Hz, Me), 0.90 (t, 6H, *J*= 6.8 Hz, H-h); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 172.4 (2xC-a), 149.9 (2xC-4), 136.9 (d, *J*= 7.6 Hz, 2xC-1), 128.0 (4xC-2), 121.2 (4xC-3), 64.8 (d, *J*= 18.4 Hz, 2xC-Bn), 43.1 (d, *J*= 12.4 Hz, 2xC-N),

39.0 (2xC-*t*Bu), 27.1 (6xCH_3-*t*-Bu), 24.6 (d, *J*= 7.1 Hz, 4xCH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= 147.78; R_f (PE/EE 5:1 v/v)= 0.75; $C_{36}H_{56}NO_6P$; Mol. Wt.: 629.81

Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit 197e

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 2.50 g 4-(Hydroxymethyl)phenyl-benzoylat (11.0 mmol, 2.2 Äq.) und 1.58 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 11.4 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 12 mL abs. THF, mit 0.91 mL Dichloro-*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (d= 1.098 g/mL, 1.0 g, 5.0 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 12 mL abs. THF, umgesetzt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit PE und einem Ethylacetat-Gradienten von 0-10%.

Ausbeute: 1.53 (2.61 mmol, 53%) eines farblosen Öles. Kristallisation bei -26 °C.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.23-8.17 (m, 4H, H-*ortho*), 7.67-7.60 (m, 2H, H-*para*), 7.55-7.46 (m, 4H, H-*meta*), 7.44-7.40 (m, 4H, H-2), 7.21-7.15 (m, 4H, H-3), 4.85-4.70 (m, 4H, H-Bn), 3.80-3.65 (m, 2H, NC-H), 1.23 (d, 12H, *J*= 6.8 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 165.1 (2xC=O), 150.1 (2xC-4), 137.2 (d, *J*= 7.4 Hz, 2xC-1), 133.5 (2xC-*para*), 130.2 (4xC-*ortho*), 129.7 (2xC-*ipso*), 128.5 (4xC-2), 128.1 (4xC-*meta*), 121.5 (4xC-3), 64.3 (d, *J*= 18.0 Hz, 2xC-Bn), 43.2 (d, *J*= 12.4 Hz, 2xC-N), 24.7 (d, *J*= 7.2 Hz, 4xMe); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= 147.94; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2967, 2926, 2866, 1731, 1509, 1285, 1220, 1064, 968, 700; mp= 75 °C; R_f (PE/EE 5:1 v/v)= 0.42; MS (HR-FAB): calcd. 584.220 (M^+-H), 585.228 (M^+), 586.236 (M+H^+); found 584.219, 285.225, 586.231; $C_{34}H_{36}NO_6P$; Mol. Wt.: 585.63

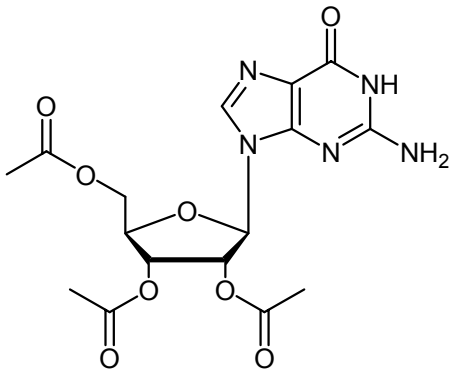
10.2.6 Synthese und Funktionalisierung von Nucleosiden

10.2.6.1 Synthese von *iso*-d4A und *iso*-ddA

2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-guanosin 120

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu einer Suspension von 11.0 g Guanosin (38.8 mmol, 1.0 Äq.) in 450 mL abs. Acetonitril und 22 mL abs. Triethylamin (d= 0.73 g/mL, 159 mmol, 4.1 Äq.), wurden 13.0 mL Acetanhydrid (d= 1.08 g/mL, 14.0 g, 138 mmol, 3.6 Äq.) gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mL Methanol abgebrochen. Nach 5 min wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in *iso*-Propanol aufgenommen. Durch Zugabe von Toluol konnte das Produkt ausgefällt werden. Nach Kristallisation bei 4 °C für 20 h wurde der Feststoff abfiltriert und mit Ethanol/Diethylether 1:1 v/v gewaschen.

Ausbeute: 13.9 g (34.0 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffes.



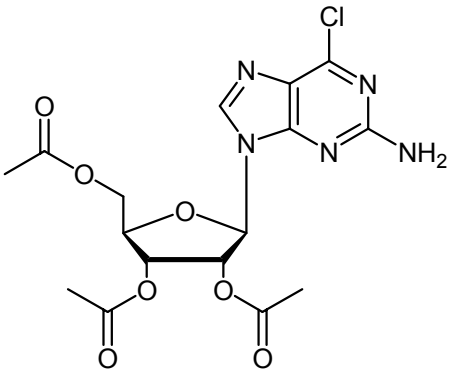
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.79 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H-8), 6.56 (s, 2H, NH_2), 5.98 (d, 1H, *J*= 6.2 Hz, H-1´), 5.79 (dd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 5.49 (dd, 1H, *J*= 4.1 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-3´), 4.40-4.21 (m, 3H, H-5´, H-4´), 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.04, 2.03 (2xs, 6H, 2xCH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 170.6 (C=O), 170.0 (C=O), 169.8 (C=O), 157.2 (C-6), 154.4 (C-2), 151.6 (C-4), 135.3 (C-8), 117.3 (C-5), 84.9 (C-1´), 80.0 (C-4´), 72.5 (C-2´), 70.9 (C-3´), 63.6 (C-5´), 21.0 (CH_3), 20.9 (CH_3), 20.7 (CH_3); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.21; $C_{16}H_{19}N_5O_8$; Mol. Wt.: 409.35

2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-6-chlorguanosin 121

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.02 g 2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-guanosin (2.49 mmol, 1.0 Äq.) und 830 mg Tetraethylammoniumchlorid (2 Tage über P_2O_5 im Exsikkator bei 120 °C im Vakuum getrocknet, 5.01 mmol, 2.0 Äq.)

wurden in 5 mL abs. Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.32 mL abs. *N,N*-Dimethylanilin (d= 0.95 g/mL, 304 mg, 2.51 mmol, 1.0 Äq.) und 1.4 mL dest. Phosphorylchlorid (d= 1.65 g/mL, 2.31 g, 15.1 mmol, 6.1 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde in ein auf 100 °C geheiztes Ölbad gestellt und die Lösung 15 min refluxiert. Nach dem Abkühlen wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in Chloroform aufgenommen. Überschüssiges Phosphorylchlorid wurde durch Zugabe von Eiswasser 15 min hydrolysiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden dreimal mit 10 mL kaltem Wasser und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 20:1 v/v).

Ausbeute: 813 mg (1.90 mmol, 76%) eines hellgelben Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.36 (s, 1H, H-8), 7.06 (s, 2H, NH_2), 6.10 (d, 1H, *J*= 5.9 Hz, H-1´), 5.87 (dd, 1H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-2´), 5.53 (dd, 1H, *J*= 4.2 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-3´), 4.42-4.24 (m, 3H, H-5´, H-4´), 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.03 (2xs, 6H, 2xCH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 170.0 (C=O), 169.4 (C=O), 169.2 (C=O), 159.8 (C-2), 153.6 (C-6), 149.8 (C-4), 141.2 (C-8), 84.8 (C-1´), 79.6 (C-4´), 71.8 (C-2´), 70.2 (C-3´), 62.9 (C-5´), 20.5 (CH_3), 20.2 (CH_3), 20.1 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3379, 3216, 1751, 1615, 1564, 1375, 1230, 1048, 910; mp= 83 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.67; MS (FAB): calcd. 428.1 ($M+H^+$); found 428.2; $C_{16}H_{18}ClN_5O_7$; Mol. Wt.: 427.80

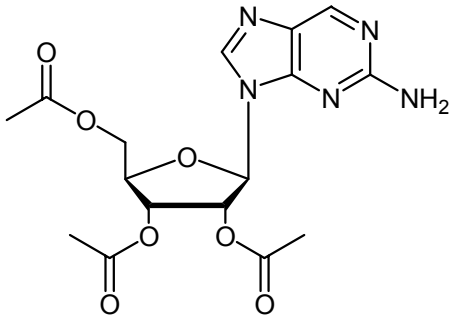
2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-*iso*-adenosin 122

Methode A: Es wurden 79 mg 2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-6-chlorguanosin (0.18 mmol) in 24 mL abs. THF und 6 mL abs. Triethylamin gelöst. Die Lösung wurde mehrfach entgast und in einen Quarzglaskolben überführt. Das Reaktionsgefäß wurde 21 h im Photoreaktor mit Licht einer Wellenlänge von 253 nm bestrahlt, daraufhin die

Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 10% gereinigt. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

Methode B: Es wurden 818 mg 2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-6-chlorguanosin (1.91 mmol) in 20 mL THF und 1.5 mL Triethylamin gelöst. Anschließend wurden 200 mg Pd/C zugegeben und die Reaktionslösung 24 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Chromatotron (DCM/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 691 mg (1.75 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffes.

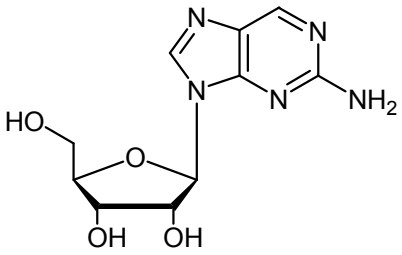


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.63 (s, 1H, H-6), 8.29 (s, 1H, H-8), 6.66 (s, 2H, NH_2), 6.12 (d, 1H, *J*= 6.0 Hz, H-1´), 5.90 (dd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 5.56 (dd, 1H, *J*= 4.2 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-3´), 4.40 (dd, 1H, *J*= 3.9 Hz, *J*= 11.4 Hz, H-5´), 4.37-4.32 (m, 1H, H-4´), 4.27 (dd, 1H, *J*= 5.6 Hz, *J*= 11.4 Hz, H-5´), 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.04, 2.03 (2xs, 6H, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 170.0 (C=O), 169.4 (C=O), 169.2 (C=O), 160.5 (C-2), 152.6 (C-4), 149.7 (C-6), 140.7 (C-8), 126.8 (C-5), 84.3 (C-1´), 79.5 (C-4´), 71.7 (C-2´), 70.2 (C-3´), 62.9 (C-5´), 20.4, 20.3 (3xCH_3); mp= 53 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.33; MS (FAB): calcd. 394.1 ($M+H^+$); found 394.2; $C_{16}H_{19}N_5O_7$; Mol. Wt.: 393.35

iso-Adenosin 42

Es wurden 1.03 g 2´, 3´, 5´-Tri-*O*-acetyl-*iso*-adenosin (2.62 mmol) in 10 mL 25%ige Ammoniaklösung gegeben. Nach 45 min wurden die flüchtigen Komponenten durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit EE/MeOH 4:1 v/v gereinigt.

Ausbeute: 676 mg (2.53 mmol, 99%) eines farblosen Feststoffes.

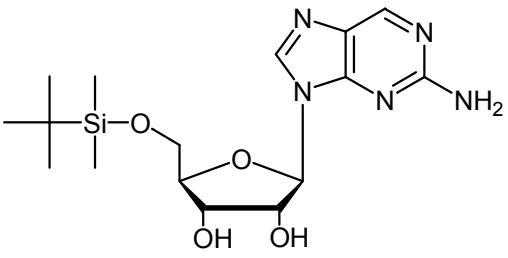


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.61 (s, 1H, H-6), 8.32 (s, 1H, H-8), 6.56 (s, 2H, NH_2), 5.85 (d, 1H, *J*= 6.1 Hz, H-1´), 5.46 (d, 1H, *J*= 6.1 Hz, 2´-OH), 5.18 (d, 1H, *J*= 4.5 Hz, 3´-OH), 5.08 (t, 1H, *J*= 5.6 Hz, 5´-OH), 4.53 (ddd, 1H, *J*= 5.8 Hz, *J*= 6.1 Hz, *J*= 6.1 Hz, H-2´), 4.13 (m, 1H, H-3´), 3.95 (ddd, 1H, *J*= 3.8 Hz, *J*= 4.5 Hz, *J*= 8.0 Hz, H-4´), 3.68-3.53 (m, 2H, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 161.0 (C-2), 153.6 (C-4), 149.9 (C-6), 141.3 (C-8), 127.6 (C-5), 86.7 (C-1´), 85.9 (C-4´), 73.9 (C-2´), 61.9 (C-5´); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3353, 2929, 1623, 1582, 1432, 1212, 1085, 1049, 794; mp= 75-80 °C; R_f (EE/MeOH 4:1 v/v)= 0.34; MS (FAB): calcd. 268.1 ($M+H^+$); found 268.1; $C_{10}H_{13}N_5O_4$; Mol. Wt.: 267.24

5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin 123

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 416 mg *iso*-Adenosin (1.56 mmol, 1.0 Äq.) wurden mehrmals mit Pyridin coevaporiert und in 5 mL Pyridin aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 250 mg TBDMS-Chlorid (1.66 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit Dichlormethan und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 20% gereinigt.

Ausbeute: 400 mg (1.05 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffes.



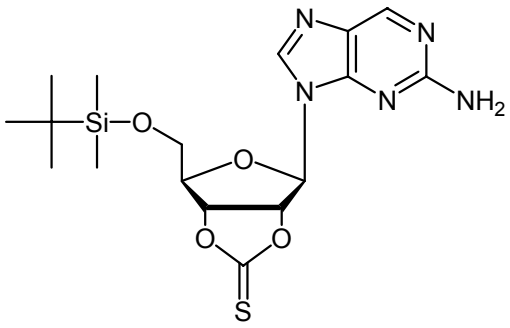
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.59 (s, 1H, H-6), 8.21 (s, 1H, H-8), 6.57 (s, 2H, NH_2), 5.85 (d, 1H, *J*= 5.4 Hz, H-1´), 5.52 (d, 1H, *J*= 5.8 Hz, 2´-OH), 5.19 (d, 1H, *J*= 5.1 Hz, 3´-OH), 4.46 (ddd, 1H, *J*= 5.4 Hz, *J*= 5.4 Hz, *J*= 5.4 Hz, H-2´), 4.13 (ddd, 1H, *J*= 4.9 Hz, *J*= 4.9 Hz, *J*= 5.1 Hz, H-3´), 3.92 (ddd, 1H, *J*= 4.1 Hz, *J*= 4.1 Hz, *J*= 4.1 Hz, H-4´), 3.82 (dd, 1H, *J*= 4.0 Hz, *J*= 11.4 Hz, H-5´), 3.73 (dd, 1H, *J*= 4.3 Hz, *J*= 11.4 Hz, H-5´), 0.87 (s, 9H, *t*Bu), 0.04 (s, 6H, CH_3); ^{13}C-NMR (101

MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.5 (C-2), 152.9 (C-4), 149.2 (C-6), 140.1 (C-8), 126.9 (C-5), 86.1 (C-1´), 84.3 (C-4´), 73.4 (C-2´), 69.9 (C-3´), 62.9 (C-5´), 25.8 (CH_3-*t*Bu), 18.0 (C-*t*Bu), -5.5 (2xCH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3357, 2929, 2857, 1617, 1580, 1430, 1117, 834; mp= 79 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.41; MS (FAB): calcd. 268.1 ($M+H^+$); found 268.1; MS (FAB): calcd. 382.2 ($M+H^+$); found 382.3; $C_{16}H_{27}N_5O_4Si$; Mol. Wt.: 381.50

5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2´,3´-*O,O*-thionocarbonyl-*iso*-adenosin 124

Zu einer Lösung aus 0.25 g 5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin (0.66 mmol, 1.0 Äq.) in 3.5 mL DMF wurden 0.13 g 1,1´-Thiocarbonyldiimidazol (0.74 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und eine Stunde bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Chloroform coevaporiert. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 2% gereinigt.

Ausbeute: 0.16 g (0.39 mmol, 59%) eines farblosen Feststoffes.



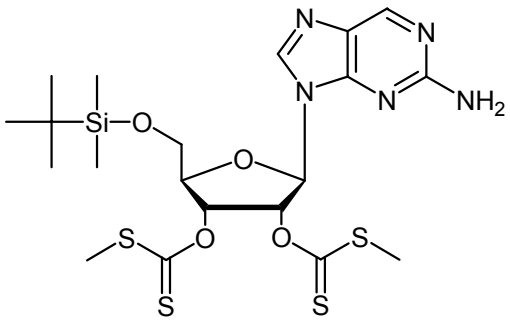
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.61 (s, 1H, H-6), 8.17 (s, 1H, H-8), 6.69 (s, 2H, NH_2), 6.49 (d, 1H, *J*= 0.9 Hz, H-1´), 6.30 (dd, 1H, *J*= 1.0 Hz, *J*= 7.2 Hz, H-2´), 6.00 (dd, 1H, *J*= 7.2 Hz, *J*= 2.8 Hz, H-3´), 4.50 (ddd, 1H, *J*= 2.8 Hz, *J*= 5.9 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-4´), 3.77-3.71 (m, 2H, H-5´), 0.75 (s, 9H, *t*Bu), -0.14, -0.15 (2xs, 6H, Si-CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3387, 2954, 2929, 2857, 1811, 1615, 1578, 1450, 1282, 1007, 837; mp= 88 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.78; MS (HR-FAB): calcd. 424.148 ($M+H^+$); found 424.149; $C_{17}H_{25}N_5O_4SSi$; Mol. Wt.: 423.56

5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2´,3´-*O*-bis-(*S*-methylcarbonodithionyl)*iso*-adenosin 125

Zu einer Lösung von 0.30 g 5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin (0.79 mmol, 1.0 Äq.) und 0.16 mL Kohlenstoffdisulfid (2.6 mmol, 3.3 Äq.) in 2 mL DMSO wurden 0.35

mL einer 5 M NaOH-Lösung getropft. Die Lösung wurde 20 min bei RT gerührt. Es folgte die tropfenweise Zugabe von 0.11 mL Methyliodid (1.7 mmol, 2.2 Äq.). Die Suspension wurde eine weitere Stunde bei RT gerührt. Die flüchtigen Komponenten wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde fünfmal mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde dann noch einmal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 9:1 v/v).

Ausbeute: 0.38 g (0.68 mmol, 86%) eines hellgelben Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.69 (s, 1H, H-6), 8.12 (s, 1H, H-8), 6.54 (dd, 1H, *J*= 5.5 Hz, *J*= 6.5 Hz, H-2´), 6.48-6.44 (m, 2H, H-3´, H-1´), 5.10 (s, 2H, NH_2), 4.51 (ddd, 1H, *J*= 2.3 Hz, *J*= 2.3 Hz, *J*= 2.3 Hz, H-4´), 4.02 (dd, 1H, *J*= 2.4 Hz, *J*= 11.4 Hz, H-5´), 3.93 (dd, 1H, *J*= 2.3 Hz, *J*= 11.4 Hz, H-5´), 2.62 (s, 3H, S-CH_3), 2.54 (s, 3H, S-CH_3), 0.94 (s, 9H, CH_3-*t*Bu), 0.14, 0.13 (2xs, 6H, Si-CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 214.8 (C=S), 214.4 (C=S), 159.9 (C-2), 153.2 (C-4), 150.1 (C-6), 140.2 (C-8), 128.3 (C-5), 84.3 (C-4´), 84.2 (C-3´), 80.5 (C-2´), 78.8 (C-1´), 63.1 (C-5´), 26.0 (CH_3-*t*Bu), 19.5, 19.4 (2xS-CH_3), 18.5 (C-*t*Bu), -5.5(Si-CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3401, 3304, 3179, 2925, 2852, 1635, 1580, 1432, 1222, 1189, 823; mp= 139 °C; $[\alpha]^{20}_{540}$ = 20° (c= 0.01 in $CHCl_3$); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.73; MS (FAB): calcd. 562.2 ($M+H^+$); found 562.3; $C_{20}H_{31}N_5O_4S_4Si$; Mol. Wt.: 561.84

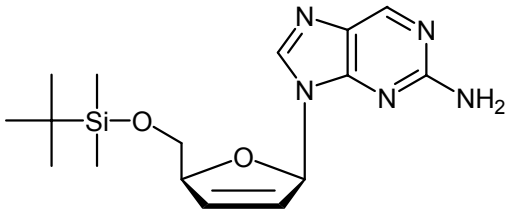
5´-*tert*-Butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin 126

Variante A: Es wurden 0.11 g 5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2´,3´-*O,O*-thionocarbonyl-*iso*-adenosin (0.26 mmol) und 0.2 mL DIPEA in 2 mL Triethylphosphit gelöst. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei 75 °C gerührt und anschließend 4 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron mit Dichlormethan und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 2% gereinigt.

Ausbeute A: 50 mg (0.14 mmol, 55%) eines farblosen Feststoffes.

Variante B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 0.25 g 5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2´,3´-*O*-bis-(*S*-methylcarbonodithionyl)-*iso*-adenosin (0.45 mmol, 1.0 Äq.) wurden zweimal mit je 1 mL Toluol coevaporiert. Anschließend wurde der Feststoff in 3 mL abs. Toluol gelöst, mehrfach entgast und zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wurde ein Ansatz aus 29 mg Azo*iso*butyronitril (0.18 mmol, 0.4 Äq.) und 0.55 mL Tris(trimethylsilyl)silan (TTMSS, 1.9 mmol, 4.2 Äq.), gelöst in 3 mL abs. Toluol, über 1 h getropft. Die Reaktionslösung wurde nach beendeter Zugabe für weitere 20 min unter Rückfluss erhitzt. Abschließend wurden die flüchtigen Komponenten im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH 20:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute B: 0.15 g (0.43 mmol, 95%) eines farblosen Feststoffes.

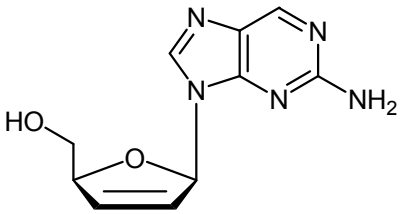


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.67 (s, 1H, H-6), 8.03 (s, 1H, H-8), 7.00 (ddd, 1H, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 3.1 Hz, H-1´), 6.41 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.03-5.99 (m, 1H, H-2´), 5.16 (s, 2H, NH_2), 5.00-4.94 (m, 1H, H-4´), 3.82 (dd, 1H, *J*= 3.7 Hz, *J*= 11.1 Hz, H-5´), 3.77 (dd, 1H, *J*= 4.3 Hz, *J*= 11.1 Hz, H-5´), 0.87 (s, 9H, *t*Bu), 0.04, 0.03 (2xSi-CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 159.9 (C-2), 153.0 (C-4), 149.8 (C-6), 140.9 (C-8), 134.8 (C-3´), 128.4 (C-5), 125.2 (C-2´), 87.6 (C-4´), 87.4 (C-1´), 64.9 (C-5´), 25.9 (CH_3-*t*Bu), 18.5 (C-*t*Bu), -5.4 (Si-CH_3); mp= 138 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.23; mp= 138 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.19; MS (HR-FAB): calcd. 348.186 ($M+H^+$); found 348.187; $C_{16}H_{25}N_5O_2Si$; Mol. Wt.: 347.49

iso-d4A 109c

Es wurden 0.13 g 5´-TBDMS-*iso*-d4A (0.37 mmol, 1.0 Äq.) in 3 mL THF gelöst und 0.56 mL TBAF in THF (1 M, 0.56 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Nach 45 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 5 bis 30% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 84 mg (0.36 mmol, 99%) eines farblosen Feststoffes.

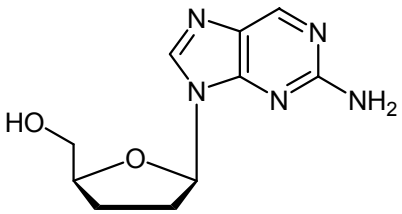


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.59 (s, 1H, H-6), 8.08 (s, 1H, H-8), 6.85 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.0 Hz, H-1´), 5.56 (s, 2H, NH_2), 6.47 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.15-6.11 (m, 1H, H-2´), 4.94 (t, 1H, *J*= 5.4 Hz, OH), 4.89-4.84 (m, 1H, H-4´), 3.56 (dd, 2H, *J*= 4.1 Hz, *J*= 5.2 Hz, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.4 (C-2), 152.5 (C-4), 149.1 (C-6), 140.4 (C-8), 134.4 (C-3´), 126.8 (C-5), 125.2 (C-2´), 87.8 (C-4´), 86.9 (C-1´), 62.6 (C-5´); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3448, 3322, 3204, 1623, 1584, 1429, 1066; mp= 146 °C; $[\alpha]^{20}_{540}$ = 2.0 ° (c = 0.01 in $CHCl_3$); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.29; MS (HR-FAB): calcd. 234.099 ($M+H^+$); found 234.099; $C_{10}H_{11}N_5O_2$; Mol. Wt.: 233.23

iso-ddA 109b

20 mg *iso*-d4A (86 μmol) wurden in 5 mL Methanol gelöst und mit fünf Tropfen Triethylamin versetzt. Diese Lösung wurde mit Pd/C versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre 16 h gerührt. Anschließend wurde die Mischung über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 5 bis 15%. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 20 mg (85 μmol, 99%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.59 (s, 1H, H-6), 8.32 (s, 1H, H-8), 6.52 (s, 2H, NH_2), 6.15 (dd, 1H, *J*= 6.6 Hz, *J*= 3.8 Hz, H-1´), 4.95 (t, 1H, *J*= 5.5 Hz, 5´-OH), 4.13-4.08 (m, 1H, H-4´), 3.62 (ddd, 1H, *J*= 9.4 Hz, *J*= 5.5 Hz, *J*= 2.1 Hz, H-5´), 3.52 (ddd, 1H, *J*= 9.4 Hz, *J*= 5.5 Hz, *J*= 2.1 Hz, H-5´), 2.46-2.36 (m, 2H, H-2´), 2.11-2.01 (m, 2H, H-3´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.6 (C2), 152.6 (C4), 149.3 (C6), 140.7 (C8), 127.3 (C5), 83.7 (C1`), 81.9 (C4`), 62.9 (C5`), 31.7 (C2`), 25.8 (C3`); UV (MeOH) λ_{max} [nm] = 305, 243, 219; $\lambda_{em,max}$ = 356 nm; mp= 159-160 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.10; MS (HR-FAB):

calcd. 235.107 (M^+); 236.115 ($M+H^+$); found 235.109, 236.116; $C_{10}H_{13}N_5O_2$; Mol. Wt.: 235.24

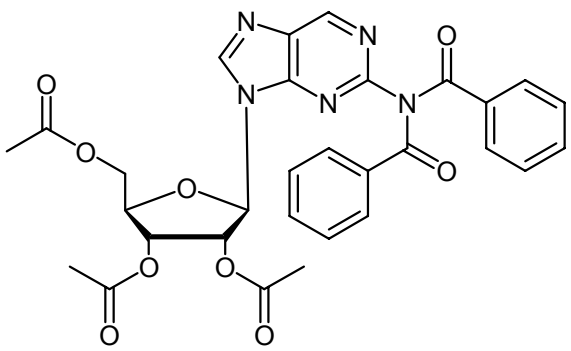
10.2.6.2 Synthese eines *iso*-A-Phosphoramidits für die RNA-Festphasensynthese

2´,3´,5´-Tri-*O*-acetyl-di-N^2-benzoyl-*iso*-adenosin 145b

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 610 mg Ac_3-*iso*-A (1.55 mmol, 1.0 Äq.) einmal mit abs. Pyridin coevaporiert und in 10 mL abs. Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden 1.10 mL dest. Benzoylchlorid (d= 1.21 g/mL, 1.33 g, 9.47 mmol, 6.1 Äq.) und 410 mg DMAP (3.36 mmol, 2.2 Äq.) bei RT gegeben und dann 20 h gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Es wurde je einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit Petrolether und einem Ethylacetat-Gradienten von 30 bis 100% und dann mit einem Methanolgradienten von 0 bis 10% gereinigt. Dabei wurden die einfach und doppelt benzoylierten Produkte **145a**/**b** erhalten.

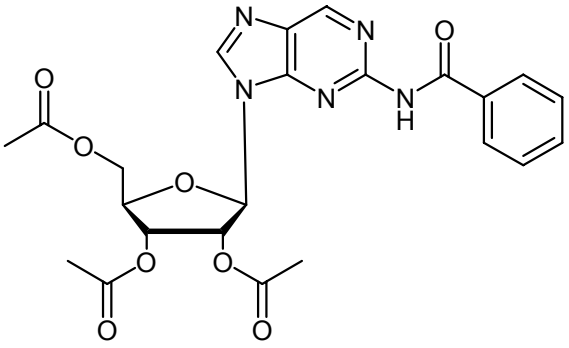
Ausbeute: 0.60 g (0.99 mmol, 64%) eines farblosen Feststoffes. Dibenzoyl **145b**.

0.21 g (0.42 mmol, 27%) eines farblosen Öles. Monobenzoyl **145a**.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.16 (s, 1H, H-6), 8.81 (s, 1H, H-8), 7.80-7.75 (m, 4H, H-*o*), 7.60-7.53 (m, 2H, H-*p*), 7.48-7.41 (m, 4H, H-*m*), 6.20 (d, 1H, *J*= 5.0 Hz, H-1´), 5.74 (dd, 1H, *J*= 5.3 Hz, *J*= 5.3 Hz, H-2´), 5.50 (dd, 1H, *J*= 5.7 Hz, *J*= 5.7 Hz, H-3´), 4.37-4.32 (m, 1H, H-4´), 4.28 (dd, 1H, *J*= 4.0 Hz, *J*= 11.9 Hz, H-5´), 4.13 (dd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*= 11.9 Hz, H-5´), 2.10 (s,

3H, CH_3), 2.02 (s, 3H, CH_3), 1.92 (s, 3H, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 172.6 (2xNC=O), 170.2 (C=O), 169.4 (C=O), 169.2 (C=O), 155.0 (C-2), 152.1 (C-4), 150.1 (C-6), 144.3 (C-8), 134.6 (C-5), 134.4 (2xC-*i*), 132.7 (2xC-*p*), 129.3 (4xC-*m*), 128.6 (4xC-*o*), 86.3 (C-1´), 80.4 (C-4´), 73.1 (C-2´), 70.5 (C-3´), 63.0 (C-5´), 20.7 (CH_3), 20.5 (CH_3), 20.3 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3369, 3068, 1688, 1603, 1529, 1397, 1303, 1076, 710; mp= 90 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.50; MS (FAB): calcd. 602.2 ($M+H^+$); found 602.2; $C_{30}H_{27}N_5O_9$; Mol. Wt.: 601.56



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.25 (s, 1H, NH), 9.26 (s, 1H, H-6), 8.83 (s, 1H, H-8), 8.11 (d, 2H, *J*= 7.1 Hz, H-*o*), 7.73 (t, 1H, *J*= 7.4 Hz, H-*p*), 7.65 (dd, 2H, *J*= 7.1 Hz, *J*= 7.4 Hz, H-*m*), 6.44 (d, 1H, *J*= 5.1 Hz, H-1´), 6.13 (dd, 1H, *J*= 5.1 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-2´), 5.96 (dd, 1H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 5.6 Hz, H-3´), 4.59-4.47 (m, 3H, H-4´, H-5´), 2.24, 2.18, 2.11 (3xs, 9H, Ac); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 170.0, 169.4, 169.3 (3xC=O), 165.3 (NC=O), 153.2 (C-2), 151.4 (C-4), 149.3 (C-6), 140.3 (C-8), 134.4 (C-*i*), 131.9 (C-*p*), 131.1 (C-5), 128.3 (2xC-*m*), 128.1 (2xC-*o*), 85.8 (C-1´), 79.9 (C-4´), 72.3 (C-3´), 70.4 (C-2´), 62.3 (C-5´), 20.4, 20.3, 20.2 (3xCH_3); R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.25; $C_{23}H_{23}N_5O_8$; Mol. Wt.: 497.46

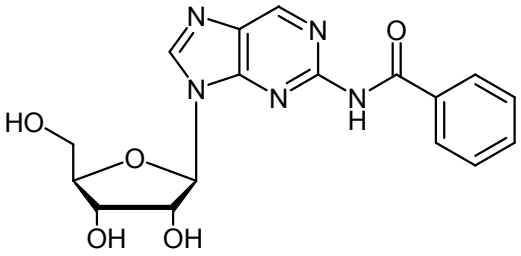
***N*^{2}-Benzoyl-*iso*-adenosin 142**

Variante A: Es wurden 0.60 g Ac_3*iso*A^{Bz2} **145b** (0.99 mmol, 1.0 Äq.) in 6 mL Methanol gelöst und 64 mg Natriummethanolat (1.2 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Nach 20 min wurde das Präzipitat abfiltriert und mit wenig kaltem Methanol gewaschen. Die Mutterlauge wurde mit Essigsäure neutralisiert und zur vollständigen Fällung bei -26 °C über Nacht gelagert. Es wurde erneut filtriert, die Niederschläge vereinigt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute A: 0.34 g (0.91 mmol , 92%) eines farblosen Feststoffes.

Variante B: Es wurden 0.21 g Ac_3*iso*A^{Bz} **145a** (0.42 mmol) in 2 mL Methanol gelöst und eine katalytische Menge Natriummethanolat zugegeben. Nach 40 min wurde das Präzipitat abfiltriert, mit wenig kaltem Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute B: 0.14 g (0.37 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffes.

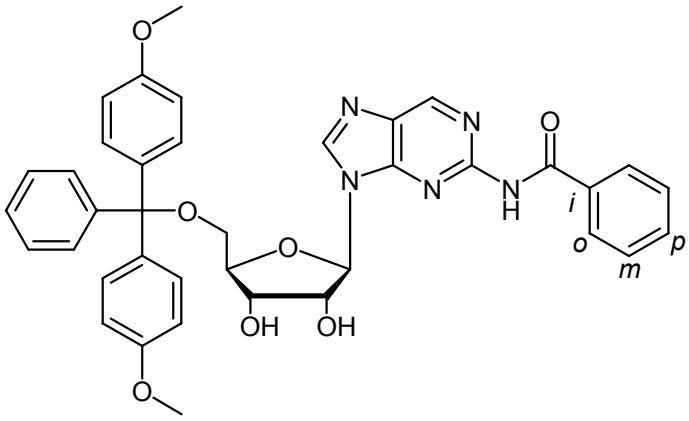


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.08 (s, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, H-6), 8.74 (s, 1H, H-8), 8.02-7.96 (m, 2H, H-*o*), 7.64-7.57 (m, 1H, H-*p*), 7.55-7.48 (m, 2H, H-*m*), 6.00 (d, 1H, *J*= 6.0 Hz, H-1´), 5.54 (d, 1H, *J*= 4.7 Hz, 2´-OH), 5.23 (d, 1H, *J*= 3.8 Hz, 3´-OH), 4.98 (dd, 1H, *J*= 5.5 Hz, *J*= 5.5 Hz, 5´-OH), 4.72-4.64 (m, 1H, H-2´), 4.24-4.18 (m, 1H, H-3´), 3.96 (ddd, 1H, *J*= 4.2 Hz, *J*= 4.2 Hz, *J*= 4.2 Hz, H-4´), 3.71-3.52 (m, 2H, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 165.5 (NC=O), 153.0 (C-2), 152.0 (C-4), 148.9 (C-6), 145.0 (C-8), 134.2 (C-5), 132.0 (C-*p*), 131.2 (C-*i*), 128.2 (2xC-*m*), 128.1 (2xC-*o*), 87.0 (C-1´), 85.8 (C-4´), 73.4 (C-2´), 70.5 (C-3´), 61.4 (C-5´); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3380, 1687, 1602, 1528, 1490, 1397, 710; mp= 111 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.15; MS (FAB): calcd. 372.1 ($M+H^+$); found 372.1; $C_{17}H_{17}N_5O_5$; Mol. Wt.: 371.35

***N*^{2}-Benzoyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-*iso*-adenosin 143**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.28 g *N*^{2}-Benzoyl-*iso*-adenosin (0.75 mmol, 1.0 Äq.) in 3 mL abs. DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.13 g Silbernitrat (0.75 mmol, 1.0 Äq.), 0.15 mL dest. *sym*-Collidin (d= 0.92 g/mL, 0.14 g, 1.1 mmol, 1.5 Äq.) und 0.25 g DMTr-Chlorid (0.75 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und eine Stunde gerührt. Es wurde mittels DC überprüft, ob die Umsetzung vollständig war. War dies nicht der Fall, wurden von allen Reagenzien weitere 0.3 Äq. zugegeben und eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit viel DCM verdünnt und je zweimal mit Wasser und ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Rohprodukt am Chromatotron gereinigt (DCM +0.5% TEA).

Ausbeute: 0.33 g (0.49 mmol, 65 %) eines farblosen Feststoffes.

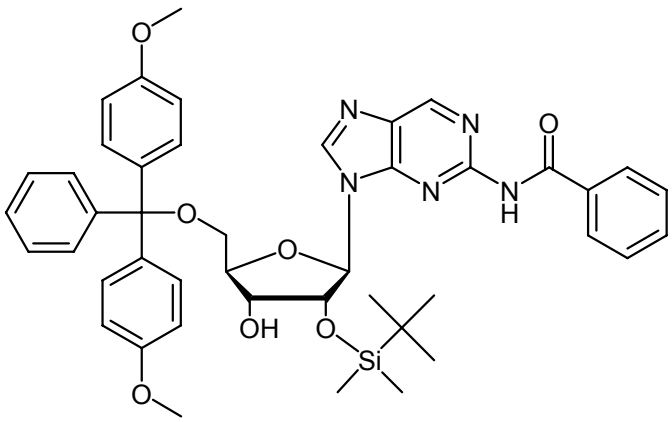


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.99 (s, 1H, NH), 9.09 (s, 1H, H-6), 8.64 (s, 1H, H-8), 7.95-7.90 (m, 2H, H-*o*Bz), 7.65-7.59 (m, 1H, H-*p*Bz), 7.57-7.50 (m, 2H, H-*m*Bz), 7.29-7.25 (m, 2H, H-DMTr), 7.17-7.07 (m, 7H, H-DMTr), 6.71-6.61 (m, 4H, H-DMTr), 6.04 (d, 1H, *J*= 4.4 Hz, H-1´), 5.61 (d, 1H, *J*= 4.3 Hz, 2´-OH), 5.17 (d, 1H, *J*= 5.2 Hz, 3´-OH), 4.80 (ddd, 1H, *J*= 4.4 Hz, *J*= 4.4 Hz, *J*= 4.4 Hz, H-2´), 4.41 (ddd, 1H, *J*= 4.7 Hz, *J*= 4.7 Hz, *J*= 4.7 Hz, H-3´), 4.09-4.03 (m, 1H, H-4´), 3.68 (s, 6H, 2xCH_3), 3.50-3.38 (m, 2H, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 165.1 (C=O), 157.8 (2xC-DMTr), 153.0 (C-2), 151.5 (C-4), 148.8 (C-6), 145.3 (C-8), 144.9 (C-DMTr), 135.6 (2xC-DMTr), 134.3 (C-*i*), 131.9 (C-*p*), 131.2 (C-5), 129.6 (2xC-DMTr, 2xC-Bz), 128.2, 128.1 (4xC-DMTr), 127.7, 127.5 (2xC-DMTr, 2xC-Bz), 126.4 (C-DMTr), 112.8 (4xC-DMTr), 88.5 (C-1´), 85.3 (C-DMTr), 84.0 (C-4´), 72.9 (C-2´), 70.6 (C-3´), 64.3 (C-5´), 54.8 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3393, 2930, 1686, 1607, 1508, 1409, 1249, 1176, 1033, 703; mp= 81 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.47; MS (FAB): calcd. 674.3 ($M+H^+$); found 674.2; $C_{38}H_{35}N_5O_7$; Mol. Wt.: 673.71

***N*^{2}-Benzoyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin 144**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 90.0 mg DMTr-*iso*A^{Bz} **143** (0.134 mmol, 1.0 Äq.) in 1 mL abs. Pyridin gelöst. Dann wurden nacheinander 30 mg TBDMS-Cl (0.20 mmol, 1.5 Äq.) und 30 mg Silbernitrat (0.18 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben und 4 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5 mL Methanol beendet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit PE/EE 2:3 gereinigt. Man erhält doppelt geschütztes Produkt, je eine Produktfraktion mit der Schutzgruppe an der 2´- und 3´-Position und Edukt.

Ausbeute: 48 mg (61 μmol, 45%) eines farblosen Feststoffes.

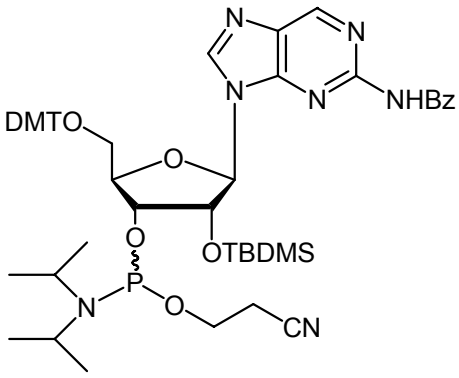


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.88 (s, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, H-6), 8.64 (s, 1H, H-8), 7.90-7.85 (m, 2H, H-*o*Bz), 7.64-7.59 (m, 1H, H-*p*Bz), 7.56-7.49 (m, 2H, H-*m*Bz), 7.32-7.27 (m, 2H, H-DMTr), 7.19-7.09 (m, 7H, H-DMTr), 6.71-6.61 (m, 4H, H-DMTr), 6.04 (d, 1H, *J*= 5.0 Hz, H-1´), 5.07-5.01 (m, 2H, 3´-OH, H-2´), 4.30 (ddd, 1H, *J*= 5.0 Hz, *J*= 5.0 Hz, *J*= 5.0 Hz, H-3´), 4.11-4.06 (m, 1H, H-4´), 3.68 (s, 6H, 2xCH_3), 3.51 (dd, 1H, *J*= 6.7 Hz, *J*= 10.3 Hz, H-5´), 3.18 (dd, 1H, *J*= 3.1 Hz, *J*= 10.5 Hz, H-5´), 0.74 (s, 9H, *t*Bu), -0.03, -0.16 (2xs, 6H, Si-CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 164.9 (C=O), 157.8 (2xC-DMTr), 153.0 (C-2), 151.5 (C-4), 148.9 (C-6), 145.1 (C-8), 144.9 (C-DMTr), 135.5 (2xC-DMTr), 134.3 (C-*i*), 131.9 (C-*p*), 131.2 (C-5), 129.6 (2xC-DMTr, 2xC-Bz), 128.2, 128.1 (4xC-DMTr), 127.7, 127.5 (2xC-DMTr, 2xC-Bz), 126.4 (C-DMTr), 112.8 (4xC-DMTr), 88.3 (C-1´), 85.3 (C-DMTr), 84.3 (C-4´), 74.4 (C-2´), 70.5 (C-3´), 64.1 (C-5´), 54.9 (CH_3), 25.5 (CH_3-*t*Bu), 17.7 (C-*t*Bu), -5.4 (Si-CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3400, 2953, 2929, 2857, 1701, 1607, 1509, 1409, 1251, 837, 780; R_f (PE/EE 2:3 v/v)= 0.49; $C_{44}H_{49}N_5O_7Si$; Mol. Wt.: 787.97

***N*^{2}-Benzoyl-3´-((*β*-cyanoethyl-diisopropylamino)phosphoramidyl)-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin 114**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu 66 mg *N*^{2}-Benzoyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-*iso*-adenosin (84 μmol, 1.0 Äq.), gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, wurden 10 mg DCI (85 μmol, 1.0 Äq.) und 35 μL 3-(Bis(di*iso*propylamino)-*β*-cyanoethyl)-phosphoramidit (d= 0.949 g/mL, 33 mg, 0.11 mmol, 1.3 Äq.) gegeben. Nach 1 h Reaktionsdauer wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron gereinigt (PE/EE 1:1 + 2% TEA). Das Produkt wurde aus Benzol lyophillisiert.

Ausbeute: 32 mg (32 μmol, 38%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomeren- und Rotamerengemisch.



^{31}P-NMR (162 MHz, C_6D_6)δ/ppm= 149.2, 151.6

Eine weitere Charakterisierung wurde nicht vorgenommen.

10.2.6.3 Synthese carbocyclischer Nucleoside

carba-iso-d4A 128

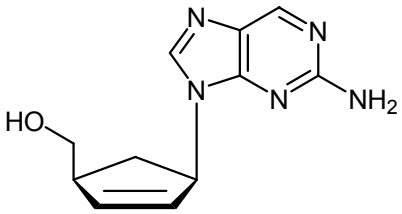
Variante A: Eine Suspension von 1.00 g 6-Chlor-*carba*-d4G (3.76 mmol) und 12.3 g Zinkstaub in 130 mL konzentrierter Ammoniaklösung wurde 6 h refluxiert. Nach jeder vergangenen Stunde wurden 35 mL konz. Ammoniaklösung zugegeben, um den verdampfenden Ammoniak zu kompensieren. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat gefriergetrocknet. Säulenchromatographische Reinigung mit Chloroform/Methanol 9:1 v/v führte zur Isolierung zweier Produkte. Diese wurden lyophillisiert.

Ausbeute A: 307 mg (1.33 mmol, 35%) eines farblosen Feststoffes. *carba-iso*-d4A.

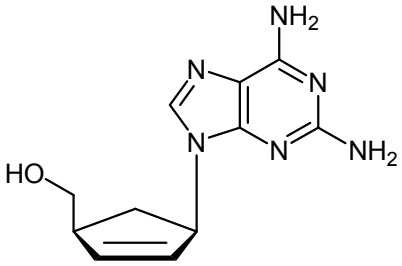
252 mg (1.02 mmol, 27%) eines farblosen Feststoffes. *carba*-d4-2,6-Diaminonebularine **129**

Variante B: Um die Entstehung des Nebenproduktes zu vermeiden, wurde statt konz. Ammoniaklösung eine 25%ige Lösung von Triethylamin in Wasser verwendet. Das Edukt wurde unter diesen Bedingungen nicht umgesetzt.

Ausbeute B: Es konnte nur Edukt reisoliert werden.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.57 (s, 1H, H-6), 7.98 (s, 1H, H-8), 6.50 (s, 2H, NH_2), 6.14 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 5.1 Hz, H-3´), 5.90 (ddd, 1H, *J*= 1.9 Hz, *J*= 1.9 Hz, *J*= 4.7 Hz, H-2´), 5.52-5.41 (m, 1H, H-1´), 4.73 (t, 1H, *J*= 5.3 Hz, OH), 3.46 (dd, 2H, *J*= 5.4 Hz, *J*= 5.4 Hz, H-6´), 2.95-2.83 (m, 1H, H-4´), 2.63 (ddd, 1H, *J*= 8.7 Hz, *J*= 8.7 Hz, *J*= 13.8 Hz, H-5´), 1.62 (ddd, 1H, *J*= 5.6 Hz, *J*= 5.6 Hz, *J*= 13.7 Hz, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 159.2 (C-2), 152.5 (C-4), 148.8 (C-6), 140.5 (C-8), 138.4 (C-3´), 129.4 (C-2´), 127.0 (C-5), 63.8 (C-6´), 58.2 (C-1´), 47.6 (C-4´), 33.9 (C-5´); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3322, 3199, 2869, 1612, 1577, 1468, 1426, 1200, 1036; mp= 145-150 °C; R_f ($CHCl_3$/MeOH 9:1 v/v)= 0.18; MS (HR-FAB): calcd. 232.120 ($M+H^+$); found 232.121; $C_{11}H_{13}N_5O$; Mol. Wt.: 231.25

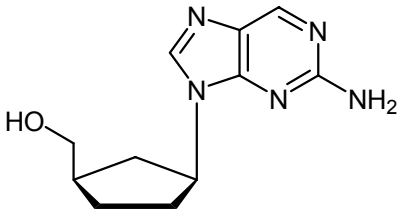


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.60 (s, 1H, H-8), 6.64 (s, 2H, NH_2-6), 6.10 (ddd, 1H, *J*= 2.0 Hz, *J*= 2.0 Hz, *J*= 4.2 Hz, H-3´), 5.90 (ddd, 1H, *J*= 2.0 Hz, *J*= 2.0 Hz, *J*= 4.5 Hz, H-2´), 5.74 (s, 2H, NH_2-2), 5.41-5.34 (m, 1H, H-1´), 4.75 (t, 1H, *J*= 5.2 Hz, OH), 3.48-3.40 (m, 2H, H-6´), 2.91-2.80 (m, 1H, H-4´), 2.59 (ddd, 1H, *J*= 8.7 Hz, *J*= 8.7 Hz, *J*= 13.7 Hz, H-5´), 1.58 (ddd, 1H, *J*= 5.8 Hz, *J*= 5.8 Hz, *J*= 13.6 Hz, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.1 (C-2), 156.0 (C-6), 151.3 (C-4), 138.0 (C-3´), 135.1 (C-8), 130.0 (C-2´), 113.3 (C-5), 64.0 (C-6´), 58.1 (C-1´), 47.6 (C-4´), 34.2 (C-5´); mp= 102-104 °C; R_f ($CHCl_3$/MeOH 9:1 v/v)= 0.10; MS (HR-FAB): calcd. 247.131 ($M+H^+$); found 247.129; $C_{11}H_{14}N_6O$; Mol. Wt.: 246.27

carba-iso-ddA 130

Zu einer Suspension von 0.25 g 6-Chlor-*carba*-d4G (0.94 mmol) und 50 mg Pd/C 10% in 10 mL THF wurden 0.8 mL Triethylamin gegeben, um freiwerdenden Chlorwasserstoff abzufangen. Die Suspension wurde 24 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 5 bis 15 % gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 0.18 g (0.78 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffes.



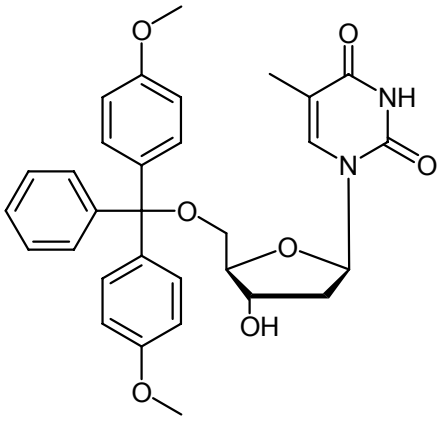
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.56 (s, 1H, H-6), 8.18 (s, 1H, H-8), 6.47 (s, 2H, NH_2), 4.74 (t, 1H, *J*= 5.2 Hz, 6´-OH), 4.74-4.63 (m, 1H, H-1´), 3.45-3.36 (m, 2H, H-6´), 2.30-2.18 (m, 1H, H-5´), 2.20-2.10 (m, 1H, H-4´), 2.14-2.02 (m, 1H, H-2´), 2.01-1.89 (m, 1H, H-2´), 1.80-1.55 (m, 3H, H-3´, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.3 (C-2), 152.9 (C-4), 149.0 (C-6), 141.0 (C-8), 127.2 (C-5), 64.7 (C-6´), 54.3 (C-1´), 39.8 (C-4´), 35.2 (C-5´), 30.9 (C-2´), 26.2 (C-3´); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 2939, 1618, 1578, 1466, 1428, 1053; mp= 50 °C; R_f (EE/MeOH 4:1 v/v)= 0.29; MS (HR-FAB): calcd. 234.136 ($M+H^+$); found 234.135; $C_{11}H_{15}N_5O$; Mol. Wt.: 233.27

10.2.6.4 Synthese von AZT

5´-*O*-Dimethoxytrityl-2´-desoxythymidin

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 4.82 g dT (20.0 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit 4 mL abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in 140 mL abs. Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden 127 mg DMAP (1.04 mmol, 0.05 Äq.), 3.80 mL Triethylamin (28.0 mmol, 1.4 Äq.) und 8.26 g DMTr-Chlorid (24.4 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und zunächst für 18 h gerührt. Zu der Lösung wurden 60 mL Methanol gegeben und anschließend das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 200 mL Chloroform (+1% Triethylamin) aufgenommen, zweimal mit je 100 mL dest. Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert, die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Feststoff wurde aus 200 mL Toluol und 20 mL Ethylacetat umkristallisiert. Es wurde filtriert, erneut mit Toluol gewaschen und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 10.6 g (19.5 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffes.

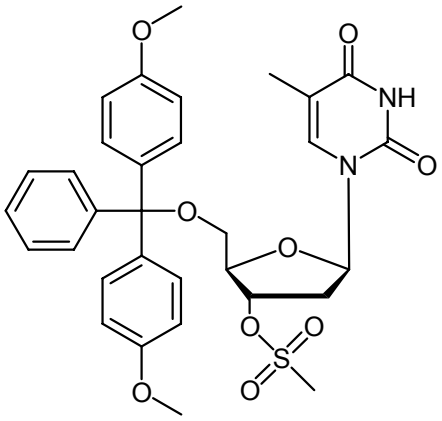


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.35 (s, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, H-6), 7.42-7.10 (m, 9H, H_{aryl}), 6.93-6.85 (m, 4H, H_{aryl}), 6.21 (dd, 1H, *J*= 6.9 Hz, *J*= 6.9 Hz, H-1´), 5.34 (d, 1H, *J*= 4.5 Hz, 3´-OH), 4.33 (m, 1H, H-3´), 3.92-3.86 (m, 1H, H-4´), 3.73 (s, 6H, 2xOCH_3), 3.22 (dd, 1H, *J*= 10.3 Hz, *J*= 4.4 Hz, H-5´), 3.17 (dd, 1H, *J*= 10.3 Hz, *J*= 2.8 Hz, H-5´), 2.27-2.21 (m, 1H, H-2´), 2.18-2.12 (m, 1H, H-2´), 1.39 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 163.7 (C-4), 150.4 (C-2), 135.4 (C-6), 129.7 (Aryl-C), 128.9 (Aryl-C), 128.2 (Aryl-C), 127.9 (Aryl-C), 127.6 (Aryl-C), 126.8 (Aryl-C), 125.3 (Aryl-C), 113.2 (C-5), 85.5 (C-1'), 83.7 (C-4'), 70.5 (C-5'), 63.8 (C-3'), 55.0 (-OCH_3), 21.0 (C-2'), 11.7 (Me_{het}); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3449, 3171, 3033, 2925, 1699, 1606, 1509, 1296, 1177, 1055, 962; mp= 105 °C; $C_{31}H_{32}N_2O_7$; Mol. Wt.: 544.59

3´-Mesyl-5´-*O*-(dimethoxytrityl)-2´-desoxythymidin 154

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 10.9 g 5´-*O*-Dimethoxytrityl-2´-desoxythymidin (20.1 mmol, 1.0 Äq.) in 40 mL abs. Pyridin gelöst und unter Eiskühlung 5.72 mL Methansulfonsäurechlorid (75.0 mmol, 3.7 Äq.) zugetropft. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 mL dest Wasser beendet. Die Reaktionsmischung wurde weitere 16 h gerührt, wobei sich ein farbloser Niederschlag abschied. Die Fällung wurde durch Zutropfen der Reaktionsmischung zu 870 mL Eiswasser vervollständigt. Der Feststoff wurde kalt filtriert, in ca. 30 mL Aceton gelöst und anschließend aus 250 mL Eiswasser gefällt. Das Produkt wurde wiederum filtriert, mit Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 11.0 g (17.6 mmol, 88%) eines hellgelben Feststoffes.

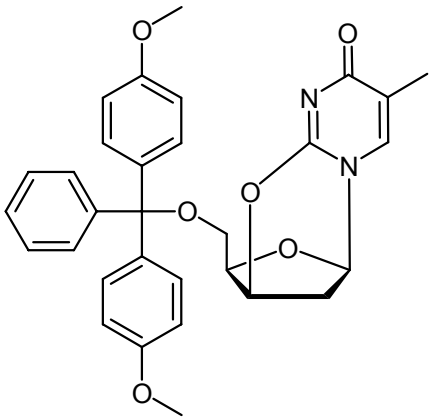


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.64 (s, 1H, NH), 7.48 (s, 1H, H-6), 7.22-7.10 (m, 9H, H_{aryl}), 6.79-6.75 (m, 4H, H_{aryl}), 6.37 (dd, 1H, *J*= 8.8 Hz, *J*= 5.5 Hz, H-1´), 5.31 (m, 1H, H-3´), 4.25 (m, 1H, H-4´), 3.73 (s, 6H, 2xOCH_3), 3.48 (dd, 1H, *J*= 10.8 Hz, *J*= 3.0 Hz, H-5´), 3.38 (dd, 1H, *J*= 10.8 Hz, *J*= 2.3 Hz, H-5´), 2.96 (s, 3H, -SCH_3) , 2.61-2.58 (m, 1H, H-2´), 2.44-2.37 (m, 1H, H-2´), 1.39 (s, 3H, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 163.5 (C-4), 150.3 (C-2), 135.1 (C-6), 130.1 (Aryl-C), 130.1 (Aryl-C), 129.2 (Aryl-C), 128.1 (Aryl-C), 128.1 (Aryl-C), 127.9 (Aryl-C), 127.8 (Aryl-C), 127.4 (Aryl-C), 127.1 (Aryl-C), 113.2 (C-5), 84.3 (C-1'), 83.8 (C-4'), 80.0 (-SCH_3), 76.7 (C-5'), 63.0 (C-3'), 55.3 (OCH_3), 38.5 (C-2'), 11.8 (Me_{het}); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3446, 3185, 3056, 2932, 1607, 1582, 1512, 1250, 1070, 829, 634; mp= 92 °C; $C_{32}H_{34}N_2O_9S$; Mol. Wt.: 622.69

2,3´-Anhydro-5´-*O*-(dimethoxytrityl)-2´-desoxythymidin 155

Zu einer Lösung aus 16.2 g Phthalimid-Kaliumsalz (87.7 mmol, 5.0 Äq.) in 150 mL Dimethylformamid und 44 mL dest. Wasser wurden 11.0 g 3´-Mesyl-5´-*O*-(dimethoxytrityl)-2´-desoxythymidin (17.6 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min auf 150 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde in 700 mL Eiswasser getropft, wobei sich ein farbloser, feinkristalliner Niederschlag bildete, der durch Vakuumfiltration isoliert wurde. Das Produkt wurde mit kaltem Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.99 g (5.68 mmol, 32%) eines farblosen Feststoffes



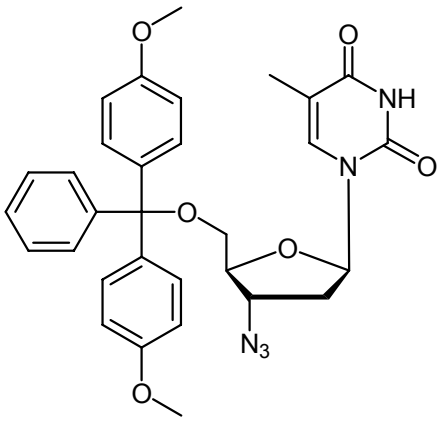
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 7.41 (d, 1H, *J*= 0.8 Hz, H-6), 7.27-7.15 (m, 9H, H_{aryl}), 6.91-6.78 (m, 4H, H_{aryl}), 5.44 (d, 1H, *J*= 3.8 Hz, H-1´), 5.14 (m, 1H, H-3´), 4.27-4.24 (m, 1H, H-4´), 3.79-3.77 (m, 6H, 2xOCH_3), 3.35-3.30 (m, 2H, H-5´), 2.41-2.36 (m, 1H, H-2´), 1.93 (d, 3H, *J*= 0.8 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 159.0 (C-4), 152.5 (C-2) , 134.9

(C-6), 130.1 (Aryl-C), 130.0 (Aryl-C), 129.2 (Aryl-C), 128.0 (Aryl-C), 127.9 (Aryl-C), 127.9 (Aryl-C), 127.8 (Aryl-C), 127.1 (Aryl-C), 126.9 (Aryl-C), 113.2 (C-5), 87.4 (C-1´), 84.6 (C-4'), 76.7 (C-5'), 62.5 (C-3'), 55.3 (OCH_3), 34.5 (C-2'), 13.5 (Me_{het}); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3059, 3033, 3002, 2953, 2836, 1770, 1727, 1661, 1608, 1412, 1382, 1177, 1136, 934; mp= 68 °C; $C_{31}H_{30}N_2O_6$; Mol. Wt.: 526.58

3´-Azido-2´, 3´-didesoxy-5´-*O*-(dimethoxytrityl)thymidin 156

Es wurden 2.99 g 2,3´-Anhydro-5´-*O*-(dimethoxytrityl)-2´-desoxythymidin (5.68 mmol, 1.0 Äq.) in 30 mL Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wurden 6.4 mL Lithiumazid (20%ige Lösung in Wasser m/m, 31 mmol, 5.3 Äq.) getropft und 16 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung 2 d unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde zu 300 mL Ethylacetat gegeben und mit jeweils 60 mL 2%-iger $NaHCO_3$-Lösung, dest Wasser und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltende Produktgemisch wurde am Chromatotron (DCM/MeOH; 0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 1.76 g (3.09 mmol, 31%) eines gelben Öles

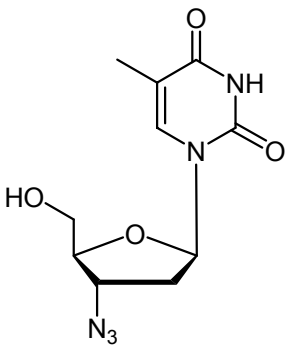


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 9.37 (s, 1H, NH), 7.50 (d, 1H, *J*= 1.0 Hz, H-6), 7.40-7.09 (m, 13H, H_{aryl}), 6.20 (dd, 1H, *J*= 6.3 Hz, *J*= 6.3 Hz, H-1'), 4.30-4.26 (m, 1H, H-3´), 3.91-3.89 (m, 1H, H-4´), 3.71 (s, 6H, 2xOCH_3), 3.27-3.23 (m, 2H, H-5´), 2.43-2.31 (m, 2H, H-2´), 1.42 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 162.6 (C-4), 150.6 (C-2), 135.2 (C-6), 130.1 (Aryl-C), 130.0 (Aryl-C), 129.2 (Aryl-C), 128.0 (Aryl-C), 127.9 (Aryl-C), 127.9 (Aryl-C), 127.8 (Aryl-C), 127.1 (Aryl-C), 126.9 (Aryl-C), 113.1 (C-5), 84.5 (C-1'), 83.5 (C-4'), 61.7 (C-5'), 60.6 (C-3'), 55.2 (OCH_3), 36.5 (C-2'), 12.9 (Me_{het}); $C_{31}H_{31}N_5O_6$; Mol. Wt.: 569.61

AZT 1

Es wurden 1.76 g 3´-Azido-2´, 3´-didesoxy-5´-*O*-(dimethoxytrityl)thymidin (3.09 mmol, 1.0 Äq.) in 30 mL Dichlormethan gelöst, 0.70 mL TFA (9.1 mmol, 2.9 Äq.) hinzugetropft und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Reaktionslösung wurden 5 mL Methanol gegeben. Anschließend wurde das gesamte Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron (DCM/MeOH; 0-5%) gereinigt, anschließend in wenig Aceton gelöst, mit DCM verdünnt und durch Zugabe von PE langsam kristallisiert. Die Entfernung von DCM am Rotationsverdampfer führte zur vollständigen Kristallisation.

Ausbeute: 450 mg (1.63 mmol, 53%) eines farblosen Feststoffes



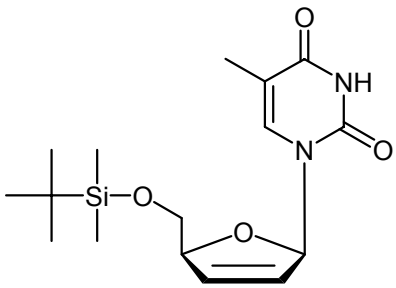
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.31 (s, 1H, NH), 7.67 (d, 1H, *J*= 1.0 Hz, H-6), 6.09 (dd, 1H, *J*= 6.6 Hz, *J*= 6.6 Hz, H-1´) , 5.21 (t, 1H, *J*= 5.3 Hz, 5´-OH), 4.42-4.38 (m, 1H, H-3´), 3.81 (dd, 1H, *J*= 8.6 Hz, *J*= 3.8 Hz, H-4´), 3.67-3.56 (m, 2H, H-5´), 2.41-2.23 (m, 2H, H-2´), 1.77 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 164.1 (C-4), 150.8 (C-2), 136.4 (C-6), 109.9 (C-5), 84.3 (C-1'), 83.7 (C-4'), 61.2 (C-5'), 60.5 (C-3'), 36.5 (C-2'), 12.6 (Me_{het}); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3474, 3403, 3176, 3060, 2925, 2497, 1709, 1659, 1388, 1248, 1050, 959, 757; mp= 103 °C; $C_{10}H_{13}N_5O_4$; Mol. Wt.: 267.24

10.2.6.5 Versuch der Synthese von d4m^{5}K

5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-d4T

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.00 g d4T (4.46 mmol, 1.0 Äq.) wurden zweimal mit je 5 mL abs. Pyridin coevaporiert. Der Rückstand wurde in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Es wurden 940 mg TBDMS-Cl (6.24 mmol, 1.4 Äq.) zugegeben und 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und zweimal mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde durch eine Säulenfiltration mit DCM/MeOH 20:1 gereinigt.

Ausbeute: 1.32 g (3.90 mmol, 87%) eines farblosen Feststoffes.

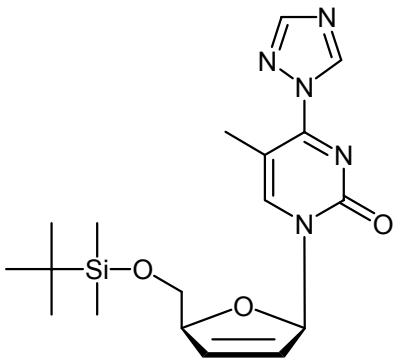


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.68 (s, 1H, NH), 7.34 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 6.98 (ddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J* = 1.8 Hz, *J* = 3.6 Hz, H-1´), 6.29 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 5.84 (ddd, *J*= 1.4 Hz, *J*= 2.0 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 4.89-4.84 (m, 1H, H-4´), 3.90-3.80 (m, 2H, H-5´), 1.99 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, Me_{het}), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08 (s, 6H, 2xCH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 163.7 (C-4), 150.7 (C-2), 135.9 (C-6), 134.5 (C-3´), 126.4 (C-2´), 110.8 (C-5), 89.8 (C-1´), 87.0 (C-4´), 64.7 (C-5´), 25.9 (CH_3-*t*-Bu), 18.6 (C-*t*-Bu), 12.5 (CH_3), -5.2 (Si-CH_3), -5.3 (Si-CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3433, 3191, 3052, 2929, 2856, 1691, 1465, 1119, 835, 781; mp= 173 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.68; MS (FAB): calcd. 339.2 ($M+H^+$); found 239.3; $C_{16}H_{26}N_2O_4Si$; Mol. Wt.: 338.47

5´-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-4-(1,2,4-1*H*-triazol-1-yl)d4T 115

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 3.86 g 1,2,4-1*H*-Triazol (55.8 mmol, 15 Äq.) in 40 mL abs. Acetonitril suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der Suspension wurden langsam 1.2 mL dest. $POCl_3$ (d= 1.67 g/mL, 2.0 g, 13 mmol, 3.5 Äq.) und dann 7.9 mL abs. TEA (55.8 mmol, 15 Äq.) gegeben. Nach einer halben Stunde wurden 1.26 g TBDMS-d4T (3.72 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 20 mL abs. Acetonitril und 10 mL abs. THF, langsam zugetropft. Nach 16 h wurden die festen Bestandteile abfiltriert und mit THF gespült. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit ges. Natriumcarbonatlösung und einmal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Eine weitere Reinigung war nicht notwendig.

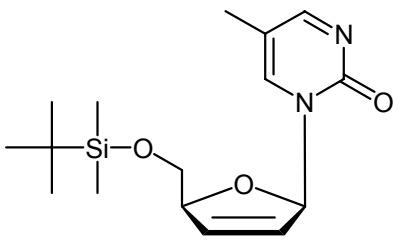
Ausbeute: 1.33 g (3.41 mmol, 92%) eines grünen Öles.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 9.29 (s, 1H, H_{Tri}-5), 8.23 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz, H-6), 8.10 (s, 1H, H_{Tri}-3), 6.91 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, H-1´), 6.18-6.15 (m, 2H, H-2´, H-3´), 5.04 (ddd, 1H, *J*= 3.1 Hz, *J*= 5.4 Hz, *J*= 0.9 Hz, H-4´), 4.02 (dd, 1H, *J*= 11.8 Hz, *J*= 3.1 Hz, H-5´), 3.87 (dd, 1H, *J*= 11.8 Hz, *J*= 3.1 Hz, H-5´), 2.44 (d, 3H, *J*= 0.9 Hz, CH_3), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.10 (s, 3H, Si-CH_3), 0.05 (s, 3H, Si-CH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 158.1, 157.8 (C-2, C-4), 153.5 (C_{Tri}-3), 147.2 (C-6), 145.1 (C_{Tri}-5), 132.8 (C-3´), 127.3 (C-2´), 105.4 (C-5), 92.9 (C-1´), 88.5 (C-4´), 64.2 (C-5´), 25.9 (CH_3-*t*-Bu), 19.5 (C-*t*Bu), 17.3 (CH_3), -5.2 (2xSi-CH_3); R_f (DCM/MeOH 30:1 v/v)= 0.40; $C_{18}H_{27}N_5O_3Si$; Mol. Wt.: 389.52

5´-*tert*-Butyldimethylsilyl-d4m^{5}K 133

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.03 g TBDMS-d4T^{Tri} (2.63 mmol, 1.0 Äq.) wurden zweimal mit abs. Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in 35 mL abs. 1,4-Dioxan aufgenommen und mehrfach entgast. Die Lösung wurde auf 6 °C gekühlt und dann 5.3 mL Hydrazin (1M in THF, 5.3 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach einer halben Stunde wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und 30 mL frisches, entgastes 1,4-Dioxan zugegeben. In einem Tropftrichter wurden 0.92 g PTAD (5.3 mmol, 2.0 Äq.) in 25 mL abs. 1,4-Dioxan gelöst und bei 60 bis 70 °C zu der Lösung getropft. Das PTAD wurde nur so lange zugetropft, bis keine Entfärbung der roten Lösung mehr zu erkennen war. Dann wurde noch eine halbe Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit EE und einem Methanolgradienten von 0-30% gereinigt. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.



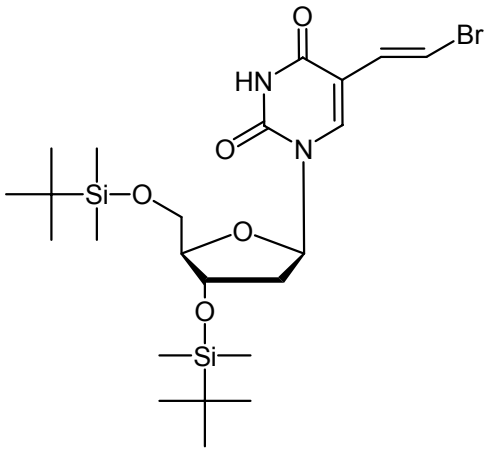
$C_{16}H_{26}N_2O_3Si$; Mol. Wt.: 322.47

10.2.6.6 Versuch der Synthese von BVdm^{5}K

3´,5´-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-BVdU

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.2 g BVdU (0.60 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert und in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden 271 mg TBDMS-Cl (1.79 mmol, 3.0 Äq.) und 82 mg Imidazol (1.2 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und 2 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit DCM als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 0.27 g (0.48 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffes.

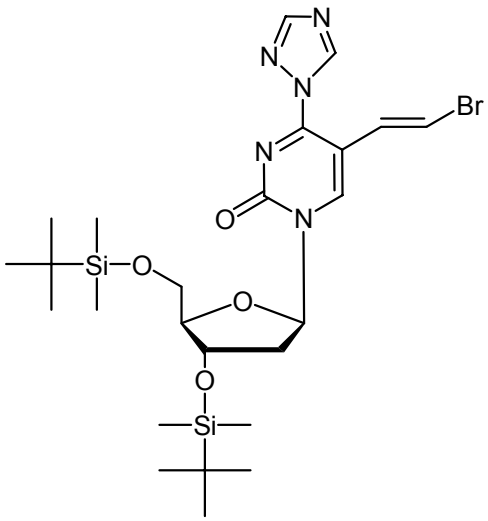


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.23 (s, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, H-6), 7.39 (d, 1H, *J*= 13.5 Hz, BVU-H-8), 6.65 (d, 1H, *J*= 13.5 Hz, BVU-H-7), 6.28 (dd, 1H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 7.4 Hz, H-1´), 4.39 (ddd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*=2.7 Hz, *J*= 5.6 Hz, H-3´), 3.97 (ddd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 2.5 Hz, *J*= 2.5 Hz, H-4´), 3.90 (dd, 1H, *J*= 2.6 Hz, *J*= 11.5 Hz, H-5´), 3.77 (dd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 11.5 Hz, H-5´), 2.33 (ddd, 1H, *J*= 2.8 Hz, *J*= 5.8 Hz, *J*= 13.2 Hz, H-2´), 2.01 (ddd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*= 7.5 Hz, *J*= 13.3 Hz, H-2´), 0.94, 0.90 (2xs, 18H, *t*-Bu), 0.14, 0.12, 0.08, 0.07 (4xs, 12H, Si-CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 160.9 (C-4), 148.8 (C-2), 137.7 (C-6), 128.4 (BVU-C-7), 111.2 (C-5), 110.0 (BVU-C-8), 88.3 (C-4´), 85.6 (C-1´), 72.2 (C-3´), 63.0 (C-5´), 41.9 (C-2´), 26.0, 25.7 (6xCH_3-*t*-Bu), 18.5, 18.0 (2xC-*t*-Bu), -4.6, -4.9, -5.3, -5.4 (4xSi-CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2954, 2930, 2858, 1705, 1471, 1256, 1118, 837, 778; mp= 74 °C; R_f (DCM/MeOH 30:1 v/v)= 0.80; $C_{23}H_{41}BrN_2O_5Si_2$; Mol. Wt.: 561.66

3´,5´-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-4-(1,2,4-1*H*-triazol-1-yl)BVdU 131

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 490 mg 1,2,4-1*H*-Triazol (7.08 mmol, 15 Äq.) in 6 mL abs. Acetonitril suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der Suspension wurden langsam 0.15 mL dest. $POCl_3$ (d= 1.67 g/mL, 1.63 mmol, 3.5 Äq.) und dann 0.98 mL abs. TEA (7.1 mmol, 15 Äq.) gegeben. Nach einer halben Stunde wurden 0.25 g $(TBDMS)_2$-BVdU (0.45 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 2.8 mL abs. Acetonitril, langsam zugetropft. Nach 16 h wurden die festen Bestandteile abfiltriert und mit THF gespült. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 bis 2% gereinigt.

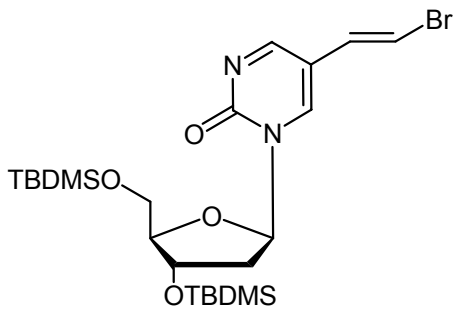
Ausbeute: 0.22 g (0.36 mmol, 80%) eines farblosen Öles.



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 9.27 (s, 1H, H_{Tri}-5), 8.40 (d, 1H, *J* = 0.6 Hz, H-6), 8.10 (s, 1H, H_{Tri}-3), 7.73 (dd, 1H, *J*= 0.7 Hz, *J*= 13.8 Hz, BVU-H-8), 6.41 (d, 1H, *J*= 13.9 Hz, BVU-H-7), 6.26 (dd, 1H, *J*= 6.4 Hz, *J*= 6.4 Hz, H-1´), 4.39 (ddd, 1H, *J*= 2.9 Hz, *J*=2.9 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-3´), 4.11 (ddd, 1H, *J*= 2.6 Hz, *J*= 2.6 Hz, *J*= 2.6 Hz, H-4´), 3.95 (dd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 11.6 Hz, H-5´), 3.78 (dd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 11.6 Hz, H-5´), 2.69 (ddd, 1H, *J*= 3.1 Hz, *J*= 6.0 Hz, *J*= 13.5 Hz, H-2´), 2.11-2.03 (m, 1H, H-2´), 0.90, 0.89 (2xs, 18H, *t*-Bu), 0.09, 0.08 (2xs, 12H, Si-CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 155.3 (C-4), 153.9 (C_{Tri}-3), 153.3 (C-2), 145.0, 144.9 (C_{Tri}-5, C-6), 130.7 (BVU-C-7), 107.3 (BVU-C-8), 106.9 (C-5), 89.3 (C-4´), 88.5 (C-1´), 72.2 (C-3´), 62.8 (C-5´), 42.8 (C-2´), 25.9, 25.7 (6xCH_3-*t*-Bu), 18.4, 18.0 (2xC-*t*-Bu), -4.6, -4.9, -5.4, -5.5 (4xSi-CH_3); R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.56; $C_{25}H_{42}BrN_5O_4Si_2$; Mol. Wt.: 612.71

Di-*tert*-butyldimethylsilyl-BVdm^{5}K 132

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 0.21 g $(TBDMS)_2$-BVdU^{Tri} (0.34 mmol, 1.0 Äq.) wurden zweimal mit abs. Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in 6 mL abs. 1,4-Dioxan aufgenommen und mehrfach entgast. Die Lösung wurde auf 6 °C gekühlt und dann 0.58 mL Hydrazin (1M in THF, 0.58 mmol, 1.7 Äq.) zugegeben. Nach einer halben Stunde wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und 6 mL frisches, entgastes 1,4-Dioxan zugegeben. In einem Tropftrichter wurden 0.12 g PTAD (0.69 mmol, 2.0 Äq.) in 4 mL abs. 1,4-Dioxan gelöst und bei 60 bis 70 °C zu der Lösung getropft. Das PTAD wurde nur so lange zugetropft, bis keine Entfärbung der roten Lösung mehr zu erkennen war. Dann wurde noch eine halbe Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0-20% gereinigt. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.



$C_{23}H_{41}BrN_2O_4Si_2$; Mol. Wt.: 545.66

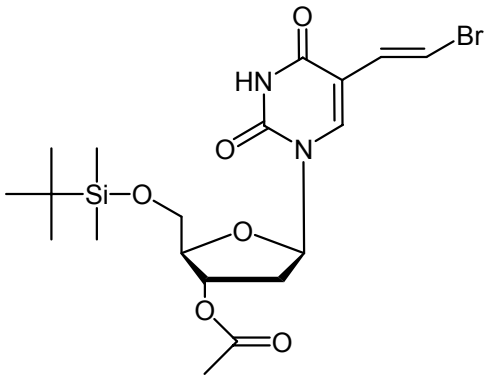
10.2.6.7 Synthese von 3´-*O*-Acyl-BVdU-Derivaten

3´-Acetyl-5´-*tert*-butyldimethylsilyl-BVdU 198

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.30 g BVdU (3.90 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert und der Rückstand in 25 mL abs. Pyridin aufgenommen. Der Lösung wurden 693 mg TBDMS-Cl (4.60 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt und 16 h bei RT gerührt. Danach wurden zu der Lösung 1.47 mL dest. Acetanhydrid (d= 1.08 g/mL, 1.60 g, 15.6 mmol, 4.0 Äq.) gegeben und 4 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mL Methanol beendet, die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das

Rohprodukt am Chromatotron mit Petrolether und einem DCM-Gradienten von 40 bis 100% gereinigt.

Ausbeute: 1.86 g (3.80 mmol, 97%) eines farblosen Feststoffes.

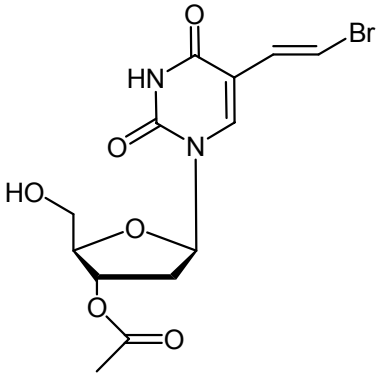


^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD/DMSO-d_6)δ/ppm= 7.84 (s, 1H, H-6), 7.35 (d, 1H, *J*= 13.5 Hz, BVU-H-8), 6.78 (d, 1H, *J*= 13.5 Hz, BVU-H-7), 6.22 (dd, 1H, *J*= 5.7 Hz, *J*= 8.2 Hz, H-1´), 5.30-5.25 (m, 1H, H-3´), 4.19 (dt, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 4.8 Hz, H-4´), 3.97 (dd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 11.5 Hz, H-5´), 3.93 (dd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 11.5 Hz, H-5´), 2.55-2.45 (m, 1H, H-2´), 2.32-2.22 (m, 1H, H-2´), 2.11 (s, 3H, Ac), 0.96 (s, 9H, *t*-Bu), 0.17, 0.16 (2xs, 6H, 2xSi-CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD/DMSO-d_6)δ/ppm= 172.1 (C=O), 163.4 (C-4), 151.0 (C-2), 139.6 (C-6), 130.7 (BVU-C-7), 112.0 (C-5), 109.2 (BVU-C-8), 87.1 (C-1´, C-4´), 76.3 (C-3´), 64.7 (C-5´), 39.3 (C-2´), 26.6 (CH_3-*t*-Bu), 21.1 (Ac), 19.3 (C-*t*-Bu), -5.0, -5.1 (Si-CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2954, 2930, 2857, 1718, 1464, 1237, 1127, 833; mp= 62 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.66; MS (FAB): calcd. 489.1, 491.1 ($M+H^+$); found 489.3, 491.3; $C_{19}H_{29}BrN_2O_6Si$; Mol. Wt.: 489.43

3´-*O*-Acetyl-BVdU 200

Es wurden 1.11 g 3´-OAc-5´-OTBDMS-BVdU (2.27 mmol, 1.0 Äq.) in 14 mL THF gelöst und 2.72 mL TBAF (1M Lösung in THF, 2.72 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 2% gereinigt.

Ausbeute: 749 mg (2.00 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.62 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, H-6), 7.25 (d, 1H, *J*= 13.6 Hz, BVU-H-8), 6.85 (d, 1H, *J*= 13.5 Hz, BVU-H-7), 6.15 (dd, 1H, *J*= 7.1 Hz, *J*= 7.1 Hz, H-1´), 5.25 (s, 1H, OH), 5.24-5.19 (m, 1H, H-3´), 4.04-4.00 (m, 1H, H-4´), 3.70-3.56 (m, 2H, H-5´), 2.40-2.25 (m, 2H, H-2´), 2.06 (s, 3H, Ac); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 169.9 (C=O), 161.5 (C-4), 149.2 (C-2), 139.0 (C-6), 129.6 (BVU-C-7), 109.9 (C-5), 106.7 (BVU-C-8), 84.9 (C-4´), 84.4 (C-1´), 74.3 (C-3´), 61.1 (C-5´), 36.9 (C-2´), 20.7 (Ac); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3442, 3062, 2930, 1707, 1466, 1368, 1240, 1103, 1061; mp= 79 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.39; MS (HR-FAB): calcd. 374.011, 376.009 (M^+), 375.019, 377.017 ($M+H^+$); found 374.009, 376.007, 375.005, 377.017; $C_{13}H_{15}BrN_2O_6$; Mol. Wt.: 375.17

3´-*O*-*iso*-Butyryl-BVdU 201

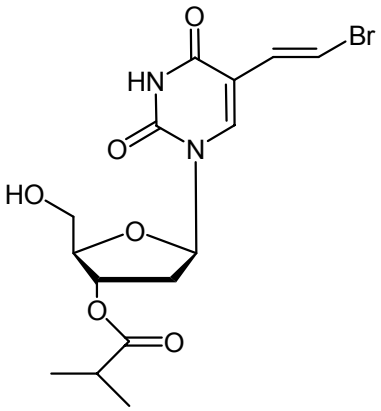
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.00 g BVdU (3.00 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert und der Rückstand in 10 mL abs. Pyridin aufgenommen. Der Lösung wurden 497 mg TBDMS-Cl (3.30 mmol, 1.1 Äq.) hinzugefügt und 16 h bei RT gerührt. Danach wurden zu der Lösung 2.0 mL dest. *iso*-Buttersäureanhydrid (d= 0.95 g/mL, 1.9 g, 12 mmol, 4.0 Äq.) gegeben und 3 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mL Methanol beendet, die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Rohprodukt am Chromatotron mit Petrolether und einem Ethylacetat-Gradienten von 2 bis 40% gereinigt.

Ausbeute: 1.62 g (3.13 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffes.

Der Feststoff wurde nach der Isolierung sofort in 50 mL THF gelöst und mit 4.2 mL TBAF (1M in THF, 4.2 mmol, 1.3 Äq.) 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mL Methanol beendet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst am Chromatotron mit reinem DCM als Laufmittel

und dann mit Petrolether und einem Ethylacetat-Gradienten von 20 bis 70% abschließend gereinigt.

Ausbeute: 935 mg (2.32 mmol, 77% ausgehend von BVdU) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.64 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, H-6), 7.26 (d, 1H, *J*= 13.6 Hz, BVU-H-8), 6.85 (d, 1H, *J*= 13.6 Hz, BVU-H-7), 6.16 (dd, 1H, *J*= 6.1 Hz, *J*= 8.1 Hz, H-1´), 5.25 (s, 1H, OH), 5.25-5.18 (m, 1H, H-3´), 4.01-3.97 (m, 1H, H-4´), 3.70-3.60 (m, 2H, H-5´), 2.58 (sept, 1H, *J*= 7.0 Hz, CH-*i*-Bu), 2.46-2.22 (m, 2H, H-2´), 1.10 (d, 6H, *J*= 7.0 Hz, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 175.6 (C=O), 161.5 (C-4), 149.2 (C-2), 139.1 (C-6), 129.7 (BVU-C-7), 109.9 (C-5), 106.7 (BVU-C-8), 84.9 (C-1´), 84.4 (C-4´), 74.3 (C-3´), 61.1 (C-5´), 36.9 (C-2´), 33.0 (CH-*i*-Bu), 18.5 (CH_3); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3473, 3200, 3062, 2975, 1716, 1666, 1467, 1282, 1190, 1102; mp= 57 °C; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.57; MS (HR-FAB): calcd. 402.043, 404.041 (M^+), 403.050, 405.048 ($M+H^+$); found 402.043, 404.043, 403.046, 405.048; $C_{15}H_{19}BrN_2O_6$; Mol. Wt.: 403.23

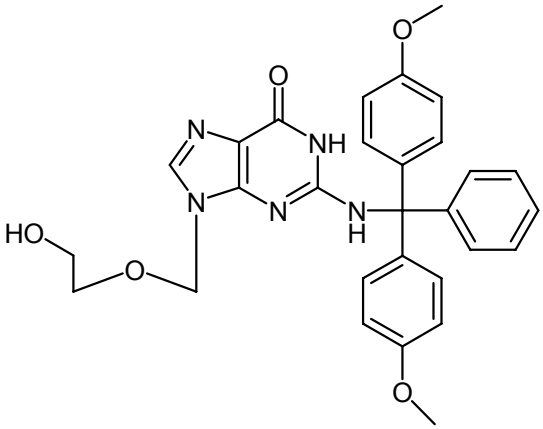
10.2.6.8 Synthese von *N*^{2}-Dimethoxytrityl-ACV 73

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 380 mg ACV (1.68 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 30 mL abs. Pyridin gelöst und mit 1.53 g DMTr-Chlorid (4.54 mmol, 2.5 Äq.) versetzt. Nach 16 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL Methanol abgebrochen und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (+0.5% TEA) aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0-10% gereinigt.

Ausbeute: 1.32 g (1.59 mmol, 94%)

Das isolierte Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung in der nächsten Reaktion eingesetzt. 1.30 g DMTr-ACV^{DMTr} (1.57 mmol) wurden in 40 mL einer 6%igen Lösung von TFA in DCM/MeOH 7:3 v/v aufgenommen und 5 min bei RT gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 5 bis 20% gereinigt.

Ausbeute: 593 mg (1.12 mmol, 67% ausgehend von ACV) eines hellgelben Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.62 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, H-8), 7.62 (s, 1H, NH), 7.31-7.18 (m, 9H, H-DMTr), 6.89-6.86 (m, 4H, H-DMTr), 4.88 (s, 2H, H-1´), 4.49 (t, 1H, *J*= 5.5 Hz, OH), 3.73 (s, 6H, OMe), 3.24-3.18 (m, 2H, H-3´), 2.95 (t, 2H, *J*= 4.5 Hz, H-2´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.3 (C-6), 158.0 (C-DMTr), 151.4 (C-2), 150.5 (C-4), 138.2 (C-8), 137.3 (C-DMTr), 130.1 (C-DMTr), 128.7 (C-DMTr), 127.9 (C-DMTr), 126.8 (C-DMTr), 116.8 (C-5), 113.2 (C-DMTr), 71.8 (C-2´), 71.5 (C-1´), 69.6 (C-DMTr), 60.2 (C-3´), 55.3 (OMe); R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.25; $C_{29}H_{29}N_5O_5$; Mol. Wt.: 527.57

10.2.7 Synthese von Nucleotiden und Nucleotid-Derivaten

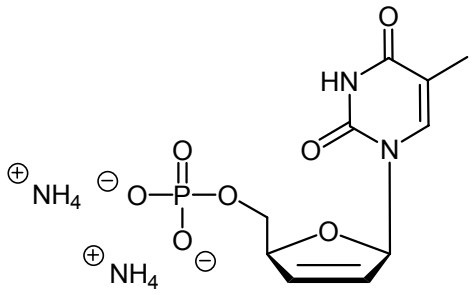
Anmerkung: Bei den Nucleotiden ist nicht genau bekannt, wie viele Gegenionen tatsächlich vorliegen. Bei der Titration von H_2d4TMP mit TEA ergeben sich aus den NMR-Integralen ca. 1.6 Gegenionen pro d4TMP. Für Ammoniumionen lässt sich eine solche Aussage nicht treffen, weil im NMR-Spektrum keine Integrale auftreten. Da die Nucleotide durch Gefriertrocknung erhalten werden, ist ein Ausgasen von Ammoniak und damit einhergehend die Protonierung des Monophosphates wahrscheinlich. Eine Verbrennungsanalyse wäre wegen des Kristallwassers nicht aussagekräftig. Bei Tetra-*n*-butylammonium als Kation lässt sich der Wert aus dem NMR-Integral bestimmen. Generell soll davon ausgegangen werden, dass zwei Gegenionen vorliegen.

Di-ammonium-d4TMP 159a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 224 mg d4T (1.00 mmol, 1.0 Äq.) zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 0.18 mL dest. $POCl_3$ (d= 1.67 g/mL, 0.30 g, 2.0 mmol, 2.0 Äq.) in 10 mL dest. Trimethylphosphat gegeben. Nach mehrfacher chromatographischer Aufarbeitung an einer RP-18 Phase mit Wasser als Laufmittel wurde ein farbloser Feststoff erhalten, der große Mengen an Phosphat als Verunreinigung aufwies.

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 1.06 g d4T (4.72 mmol, 1.0 Äq.) in 9.5 mL abs. Acetonitril mit 1.90 mL dest. $POCl_3$ (20.7 mmol, 4.4 Äq.), 1.7 mL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 1.67 g, 21.1 mmol, 4.4 Äq.) und 0.19 mL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 0.19 g, 11 mmol, 2.2 Äq.) umgesetzt. Durch dreimalige RP-18 Chromatographie mit Wasser wurde das Produkt abschließend gereinigt.

Ausbeute: 1.58 g (4.68 mmol, 99%) eines farblosen Feststoffes.

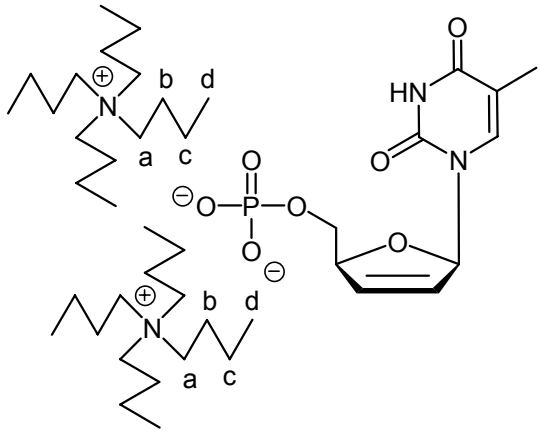


^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O)δ/ppm= 7.61 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 6.96 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.3 Hz, H-1´), 6.48 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.2 Hz, H-3´), 5.94 (ddd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 2.2 Hz, *J*= 6.2 Hz, H-2´), 5.11-5.06 (m, 1H, H-4´), 4.02 (dd, 2H, *J*= 3.4 Hz, *J*= 5.7 Hz, H-5´), 1.88 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O)δ/ppm= 167.2 (C-4), 152.7 (C-2), 138.6 (C-6), 134.8 (C-3´), 125.4 (C-2´), 111.8 (C-5), 90.4 (C-1´), 86.6 (d, *J*= 8.5 Hz, C-4´), 65.8 (d, *J*= 4.8 Hz, C-5´), 11.8 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O)δ/ppm= 0.00; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3423, 2816, 1700, 1477, 1256, 1228, 1114, 1086, 1047, 910; mp= 128 °C; R_f (*iso*-Propanol/H_2O/NH_3 (25% in H_2O) 14:7:1 v/v)= 0.38; $C_{10}H_{19}N_4O_7P$; Mol. Wt.: 338.25

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP 159b

Der Ionenaustausch wurde gemäß AAV 10 (Variante *A*) durchgeführt. Es wurden 0.17 g Di-ammonium-d4TMP (0.50 mmol) zunächst protoniert und dann mit $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m) zum Neutralpunkt titriert. Das Produkt wurde durch Gefriertrocknung isoliert.

Ausbeute: 0.37 g (0.47 mmol, 95%) eines stark hygroskopischen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.25-7.20 (m, 1H, H-6), 6.76 (ddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 3.3 Hz, H-1´), 6.23 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 5.8 Hz, H-3´), 5.68 (ddd, 1H, *J*= 1.4 Hz, *J*= 2.2 Hz, *J*= 5.9 Hz, H-2´), 4.72-4.66 (m, 1H, H-4´), 3.77-3.70 (m, 1H, H-5´), 3.67-3.60 (m, 1H, H-5´), 3.20-3.10 (m, 16H, H-a), 1.73 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me), 1.65-1.54 (m, 16H, H-b), 1.33 (tq, 16H, *J*= 7.2 Hz, *J*= 7.2 Hz, H-c), 0.97 (t, 24H, *J*= 7.1 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 167.4 (C-4), 153.0 (C-2), 135.1-134.9 (m, C-3´), 134.2 (C-6), 126.3 (C-2´), 109.5 (C-5), 88.7 (C-1´), 85.4 (d, *J*= 7.6 Hz, C-4´), 64.9 (d, *J*= 5.0 Hz, C-5´), 57.4 (C-a), 23.0 (C-b), 19.1 (C-c), 13.4 (C-d), 13.0 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= 0.01; $C_{42}H_{83}N_4O_7P$; Mol. Wt.: 787.10

Tetra-*n*-butylammonium-*β*-cyanoethyl-d4TMP 166b

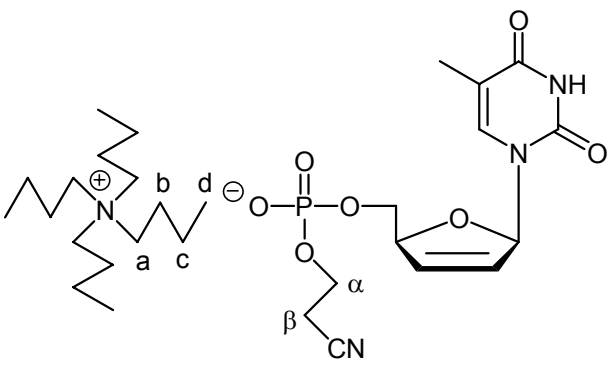
Es wurden 448 mg d4T (2.00 mmol, 1.0 Äq.) und 4.0 mL Pyridinium-*β*-cyanoethylphosphat (1 mM Stammlösung, 4.0 mmol, 2.0 Äq.) zweimal mit je 10 mL Pyridin coevaporiert und in 15 mL Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden 2.48 g DCC (12.0 mmol, 6.0 Äq.) gegeben und 3 d gerührt. Dann wurden 6 mL dest. Wasser zugegeben und 0.5 h gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL dest Wasser aufgenommen. Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und das Filtrat lyophillisiert. Das Rohprodukt wurde über eine Ionentauschersäule (Dowex 50WX8, NH_4^+) eluiert und das Lösungsmittel

durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels RP-18 Chromatographie mit Wasser/Methanol 4:1 gereinigt und die vereinten Fraktionen lyophillisiert.

Ausbeute: 0.33 g (0.88 mmol, 44%) eines farblosen Öles als Ammoniumsalz.

Von dem so erhaltenen Ammoniumsalz wurden 55 mg (0.15 mmol) gemäß AAV 10 (*Variante A*) in das entsprechende Tetra-*n*-butylammonium-β-cyanoethyl-d4TMP überführt. Das Produkt wurde zur Isolierung lyophillisiert.

Ausbeute: 78 mg (0.13 mmol, 87% ausgehend von dem Intermediat) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

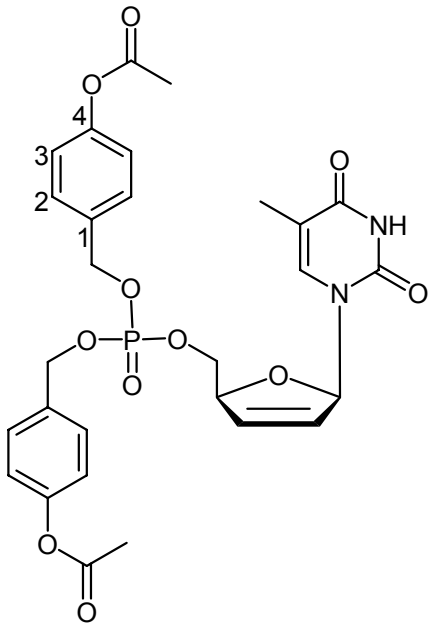


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.20 (s, 1H, NH), 7.77 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 6.83 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.4 Hz, H-1´), 6.37 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 5.90-5.85 (m, 1H, H-2´), 4.87-4.82 (m, 1H, H-4´), 3.90-3.64 (m, 4H, H-5´, H-α), 3.20-3.10 (m, 8H, H-a), 2.68 (t, 2H, *J*= 6.1 Hz, H-β), 1.62 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, CH_3), 1.64-1.50 (m, 8H, H-b), 1.36-1.25 (m, 8H, H-c), 0.93 (t, 12H, *J*= 7.3 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 164.5 (C-4), 151.2 (C-2), 137.3 (C-6), 134.9 (C-3´), 126.4 (C-2´), 119.8 (CN), 110.1 (C-5), 88.9 (C-1´), 86.3 (d, *J*= 7.3 Hz, C-4´), 65.2 (d, *J*= 5.5 Hz, C-5´), 59.4 (d, *J*= 5.4 Hz, C-α), 57.8 (C-a), 23.4 (C-b), 19.6 (C-β), 19.6 (C-c), 13.8 (C-d), 12.2 (CH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -0.54; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3431, 2962, 1701, 1466, 1250, 1084, 1060; R_f (*iso*-Propanol/H_2O/NH_3 (25% in H_2O) 14:7:1 v/v)= 0.63; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 356.065 (M^-); found 356.065; $C_{29}H_{51}N_4O_7P$; Mol. Wt.: 598.71

Bis(4-acetoxybenzyl)d4TMP; (BAB-d4TMP) 208

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.10 g d4T (0.45 mmol, 1.0 Äq.) und 0.21 g Bis-(4-acetoxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylamino-phosphoramidit (0.45 mmol, 1.0 Äq.) in 1 mL abs. THF gelöst. Nun wurden 0.45 mL 4,5-Dicyanoimidazol (DCI, 0.25 M in Acetonitril, 0.56 mmol, 1.2 Äq.) zugetropft. Nach 40 min Rühren bei RT wurde die Lösung auf -40 °C gekühlt. Es wurden 89 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 0.49 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft und 1 h bei RT gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit DCM/MeOH 9:1 gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 0.14 g (0.24 mmol, 53%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.33 (s, 1H, NH), 7.41-7.37 (m, 4H, H-2), 7.25 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.15-7.11 (m, 4H, H-3), 6.83 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.6 Hz, H-1´), 6.38 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.00 (ddd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 2.3 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 5.01 (d, 4H, *J*= 8.3 Hz, H-Bn), 4.96-4.91 (m, 1H, H-4´), 4.22-4.12 (m, 2H, H-5´), 2.27 (s, 6H, Ac), 1.64 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -0.85; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.32; $C_{28}H_{29}N_2O_{11}P$; Mol. Wt.: 600.51

Tetra-*n*-butylammonium-4-acetoxybenzyl-d4TMP 209b

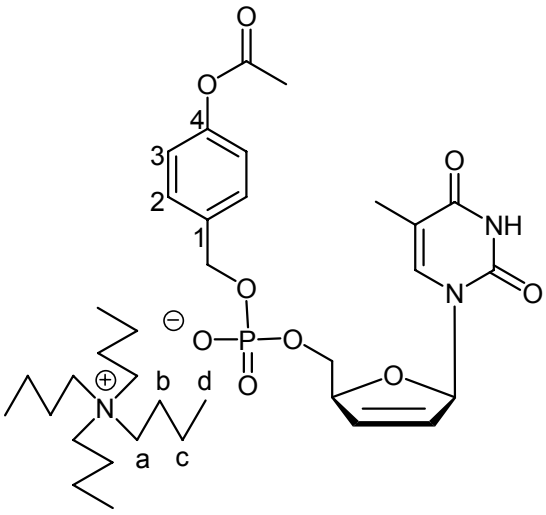
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Reaktion wurde unter Lichtausschluss durchgeführt. Es wurden 0.14 g BAB-d4TMP (0.24 mmol, 1.0 Äq.) in 1 mL abs. Aceton (über Molekularsieb 0.3 nm getrocknet) gelöst und 36 mg Lithiumiodid (0.27 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 16 h gerührt und anschließend 2 mL eines gekühlten Gemisches aus Aceton/Hexan 1:1 v/v zugesetzt.

Das Präzipitat wurde filtriert, mit Aceton/Hexan 1:1 v/v gewaschen und die Kristalle im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 60 mg (0.13 mmol, 55% als Lithiumsalz) eines farblosen Feststoffes.

Die 55 mg des Lithiumsalzes (0.13 mmol) wurden nach AAV 10 (*Variante A*) in das Tetra-*n*-Butylammoniumsalz übergeführt. Das Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 84 mg (0.12 mmol, 93% ausgehend von dem Intermediat) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.



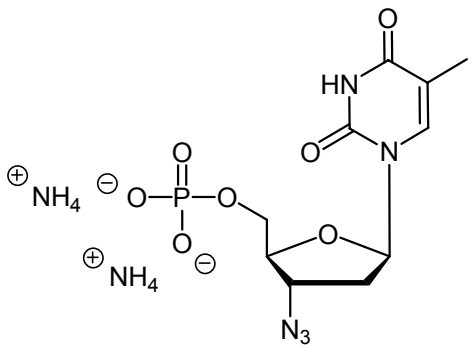
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.79 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.35-7.30 (m, 2H, H-2), 7.06-7.02 (m, 2H, H-3), 6.83 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.3 Hz, H-1´), 6.34 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 5.90-5.86 (m, 1H, H-2´), 4.87-4.81 (m, 1H, H-4´), 4.64-4.60 (m, 2H, H-Bn), 3.90-3.71 (m, 2H, H-5´), 3.20-3.11 (m, 8H, H-a), 2.25 (s, 3H, Ac), 1.81 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}), 1.62-1.50 (m, 8H, H-b), 1.30 (tq, 8H, *J*= 7.3 Hz, *J*= 7.3 Hz, H-c), 0.93 (t, 12H, *J*= 7.4 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 169.2 (C=O-Ac), 163.9 (C_{het}-4), 150.7 (C-4), 149.3 (C_{het}-2), 137.4 (d, *J*= 7.6 Hz, C-1), 137.0 (C_{het}-6), 134.6 (C-3´), 127.9 (2xC-2), 125.9 (C-2´), 121.3 (2xC-3), 109.6 (C_{het}-5), 88.5 (C-1´), 85.9 (d, *J*= 8.6 Hz, C-4´), 65.0-64.7 (m, C-Bn, C-5´), 57.5 (C-a), 23.0 (C-b), 20.8 (CH_3-Ac), 19.2 (C-c), 13.4 (C-d), 11.8 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -0.85; $C_{35}H_{56}N_3O_9P$; Mol. Wt.: 693.81

Di-ammonium-AZTMP 160a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 1.22 g AZT (4.58 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL abs. Acetonitril mit 1.83 mL dest. $POCl_3$ (20.1 mmol, 4.4 Äq.), 1.65 mL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 1.62 g, 20.4 mmol, 4.4 Äq.) und 183 µL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 183 mg, 10.2 mmol, 2.2 Äq.) umgesetzt. Durch

zweimalige RP-18 Chromatographie mit Wasser wurde das Produkt abschließend gereinigt.

Ausbeute: 1.58 g (4.14 mmol, 90%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O)δ/ppm= 7.80 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 6.28 (dd, 1H, *J*= 6.7 Hz, *J*= 6.7 Hz, H-1´), 4.51 (ddd, 1H, *J*= 4.3 Hz, *J*= 4.3 Hz, *J*= 6.4 Hz, H-3´), 4.20 (dddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 3.5 Hz, *J*= 3.5 Hz, *J*= 3.5 Hz, H-4´), 4.10-3.99 (m, 2H, H-5´), 2.57-2.43 (m, 2H, H-2´), 1.93 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O)δ/ppm= 166.9 (C-4), 152.1 (C-2), 137.8 (C-6), 112.1 (C-5), 85.2 (C-1´), 83.6 (d, *J*= 8.7 Hz, C-4´), 64.8 (d, *J*= 4.7 Hz, C-5´), 61.1 (C-3´), 36.7 (C-2´), 12.0 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O)δ/ppm= 0.07; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3186, 3074, 2111, 1713, 1660, 1273, 1112, 1061; mp= 133 °C; R_f (*iso*-Propanol/H_2O/NH_3 (25% in H_2O) 12:6:0.5 v/v)= 0.55; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 346.056 (M^-+H); found 346.056; $C_{10}H_{20}N_7O_7P$; Mol. Wt.: 381.28

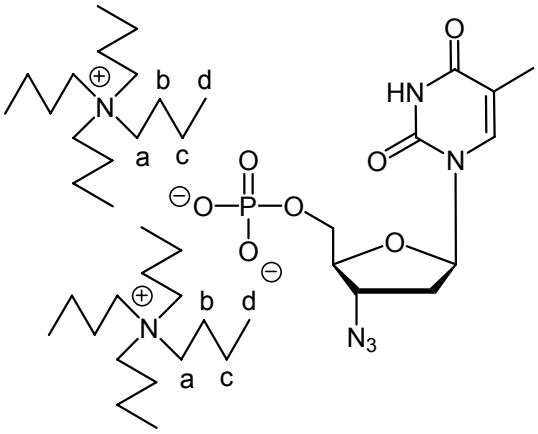
Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP 160b

Der Ionenaustausch wurde gemäß AAV 10 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 550 mg Di-Ammonium-AZTMP (1.44 mmol) zunächst protoniert und mit $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m) bis zum Neutralpunkt titriert. Das Produkt wurde zur Isolierung lyophillisiert.

Ausbeute: 1.17 g (1.42 mmol, 99%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

Der Ionenaustausch wurde gemäß AAV 10 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden zu 100 mg Di-Ammonium-AZTMP (0.262 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 10 mL dest. Wasser, 340 mg $N(Bu)_4OH$-Lösung (40%ig in Wasser m/m, entsprechend 136 mg $N(Bu)_4OH$, 0.524 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in 5 mL dest. Wasser, gegeben, kräftig durchmischt und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 219 mg (0.264 mmol, 100%) eines gelben Öles.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.40-7.22 (m, 1H, H-6), 6.23 (dd, 1H, *J*= 5.7 Hz, *J*= 8.6 Hz, H-1´), 4.48 (ddd, 1H, *J*= 2.4 Hz, *J*= 2.4 Hz, *J*= 5.8 Hz, H-3´), 3.86-3.81 (m, 1H, H-4´), 3.77-3.62 (m, 2H, H-5´), 3.20-3.10 (m, 16H, H-a), 2.27-2.15 (m, 1H, H-2´), 2.03 (ddd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 5.7 Hz, *J*= 13.5 Hz, H-2´), 1.67 (d, 3H, *J*= 0.7 Hz, Me), 1.62-1.51 (m, 16H, H-b), 1.30 (tq, 16H, *J*= 7.3 Hz, *J*= 7.3 Hz, H-c), 0.93 (t, 24H, *J*= 7.3 Hz, H-d); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= 0.01; $C_{42}H_{84}N_7O_7P$; Mol. Wt.: 830.13

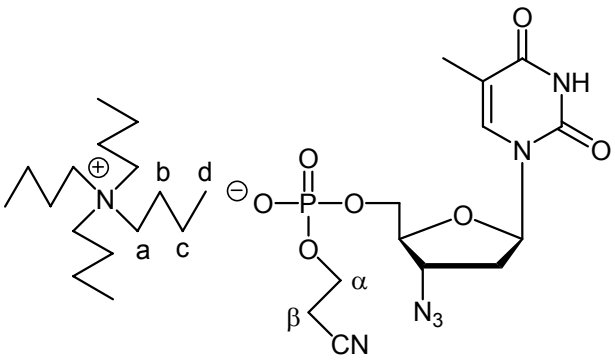
Tetra-*n*-butylammonium-*β*-cyanoethyl-AZTMP 167b

Es wurden 0.10 g AZT (0.37 mmol, 1.0 Äq.) und 0.75 mL Pyridinium-β-cyanoethylphosphat (1mM Stammlösung, 0.75 mmol, 2.0 Äq.) zweimal mit je 5 mL Pyridin coevaporiert und in 5 mL Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden 460 g DCC (2.22 mmol, 6.0 Äq.) gegeben und 3 d gerührt. Dann wurden 1.5 mL dest. Wasser zugegeben und 0.5 h gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 10 mL dest Wasser aufgenommen. Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und das Filtrat lyophillisiert. Das Rohprodukt wurde mittels RP-18 Chromatographie mit Wasser/Methanol 4:1 gereinigt und die vereinten Fraktionen lyophillisiert.

Ausbeute: 0.12 g (0.26 mmol, 69%) eines farblosen Öles als Pyridiniumsalz.

Von dem so erhaltenen Pyridiniumsalz wurden 0.12 g (0.26 mmol) gemäß AAV 10 (*Variante A*) in das entsprechende Tetra-*n*-butylammonium-β-cyanoethyl-AZTMP übergeführt. Das Produkt wurde zur Isolierung lyophillisiert.

Ausbeute: 0.14 g (0.22 mmol, 85% ausgehend von dem Intermediat) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

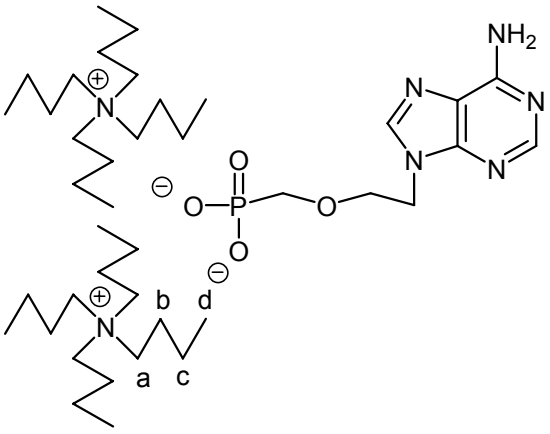


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.28 (s, 1H, NH), 7.88 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 6.13 (dd, 1H, *J*= 6.7 Hz, *J*= 6.7 Hz, H-1´), 4.55-4.49 (m, 1H, H-3´), 3.96-3.91 (m, 1H, H-4´), 3.86-3.71 (m, 4H, H-5´, H-α), 3.20-3.10 (m, 8H, H-a), 2.72 (t, 2H, *J*= 6.1 Hz, H-β), 2.41-2.20 (m, 2H, H-2´), 1.62 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, CH_3), 1.63-1.50 (m, 8H, H-b), 1.36-1.25 (m, 8H, H-c), 0.93 (t, 12H, *J*= 7.3 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 163.7 (C-4), 150.4 (C-2), 136.1 (C-6), 119.4 (CN), 109.9 (C-5), 83.3 (C-1´), 83.0 (d, *J*= 7.3 Hz, C-4´), 64.0 (d, *J*= 5.5 Hz, C-5´), 60.9 (C-3´), 59.2 (d, *J*= 5.4 Hz, C-α), 57.4 (C-a), 36.2 (C-2´), 23.0 (C-b), 19.3 (C-β), 19.1 (C-c), 13.4 (C-d), 12.0 (CH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6) δ/ppm = -1.20; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3421, 2963, 2876, 2107, 1701, 1471, 1253, 1059; R_f (H_2O/MeOH 4:1 v/v, RP-18)= 0.63; $C_{29}H_{52}N_7O_7P$; Mol. Wt.: 641.74

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)PMEA 207b

Es wurden 0.17 g PMEA (0.62 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 10 mL dest. Wasser, mit 807 mg $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m, entsprechend 323 mg, 1.24 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in 10 mL dest. Wasser, versetzt. Das Produkt wurde zur Isolierung lyophillisiert.

Ausbeute: 0.46 g (0.61 mmol, 98%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.



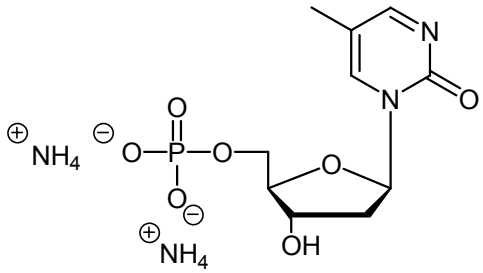
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.71 (s, 1H, H-8), 8.07 (s, 1H, H-2), 4.39 (t, 2H, *J*= 5.1 Hz, H-1´), 3.80 (t, 2H, *J*= 5.2 Hz, H-2´), 3.24 (d, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-3´), 3.20-3.14 (m, 16H, H-a), 1.60-1.50 (m, 16H, H-b), 1.35-1.24 (m, 16H, H-c), 0.91 (t, 24H, *J*= 7.3 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 155.7 (C-6), 151.8 (C-2), 149.2 (C-4), 142.9 (C-8), 118.3 (C-5), 71.4 (d, *J*= 140.5 Hz, C-3´), 68.7 (d, *J*= 4.8 Hz, C-2´),

57.4 (C-a), 42.9 (C-1´), 23.0 (C-b), 19.1 (C-c), 13.4 (C-d); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-entkoppelt, DMSO-d_6)δ/ppm= 9.04; $C_{40}H_{82}N_7O_4P$; Mol. Wt.: 756.10

Di-ammonium-dm^{5}KMP 205

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 25 mg dm^{5}K (0.11 mmol, 1.0 Äq.) in 0.5 mL abs. Acetonitril mit 45 µL dest. $POCl_3$ (0.49 mmol, 4.5 Äq.), 40 µL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 0.49 mmol, 4.5 Äq.) und 4.4 µL dest. Wasser (d=1.00 g/mL, 0.25 mmol, 2.3 Äq.) umgesetzt. Durch RP-18 Chromatographie mit Wasser wurde das Produkt abschließend gereinigt und anschließend lyophillisiert.

Ausbeute: 46 mg (0.13 mmol, 100%; geringe Verunreinigung durch Phosphat) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.



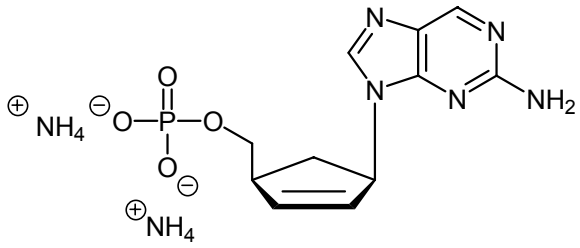
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm = 8.52 (d, 1H, *J*= 3.0 Hz, H-4), 8.44 (dd, 1H, *J*= 0.7 Hz, *J*= 3.0 Hz, H-6), 6.27 (dd, 1H, *J*= 6.2 Hz, *J*= 6.2 Hz, H-1´), 4.55 (ddd, 1H, *J*= 4.3 Hz, *J*= 4.3 Hz, *J*= 6.3 Hz, H-3´), 4.30-4.25 (m, 1H, H-4´), 4.12-3.97 (m, 2H, H-5´), 2.62 (ddd, 1H, *J*= 4.5 Hz, *J*= 6.4 Hz, *J*= 14.1 Hz, H-2´), 2.37 (ddd, 1H, *J*= 6.2 Hz, *J*= 6.2 Hz, *J*= 14.0 Hz, H-2´), 2.22 (d, 3H, *J*= 0.7 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm = 167.6 (C-4), 155.5 (C-2), 143.4 (C-6), 117.1 (C-5), 88.2 (C-1´), 87.0 (d, *J*= 8.6 Hz, C-4´), 70.6 (C-3´), 63.8 (d, *J*= 4.8 Hz, C-5´), 40.3 (C-2´), 13.9 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O) δ/ppm = 1.27; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3415, 3215, 1655, 1449, 1400, 1059, 973, 535; $C_{10}H_{21}N_4O_7P$; Mol. Wt.: 340.27

Di-ammonium-*carba-iso*-d4AMP 206a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 50 mg *carba-iso*-d4A (0.21 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL abs. Acetonitril mit 87 µL dest. $POCl_3$ (0.94 mmol, 4.4 Äq.), 76 µL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 0.94 mmol, 4.4 Äq.) und 8.5 µL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 0.47 mmol, 2.2 Äq.) umgesetzt. Durch RP-18

Chromatographie mit Wasser wurde das Produkt abschließend gereinigt und anschließend lyophillisiert.

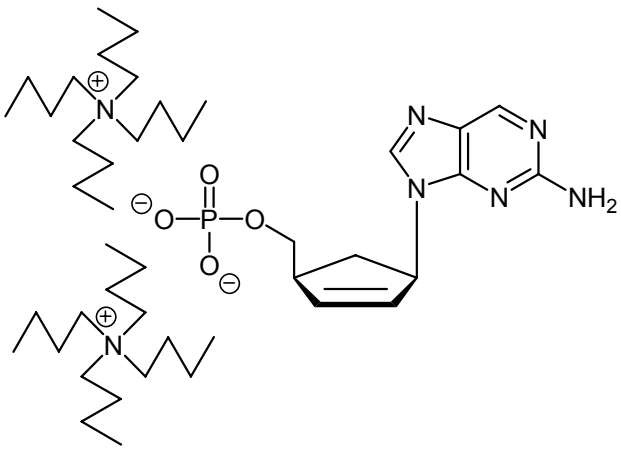
Ausbeute: 34 mg (0.10 mmol, 47%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O)δ/ppm= 8.61 (s, 1H, H-6), 8.20 (s, 1H, H-8), 6.34-.27 (m, 1H, H-3´), 6.02-6.95 (m, 1H, H-2´), 5.65-5.58 (m, 1H, H-1´), 3.95-3.87 (m, 2H, H-6´), 3.24-3.15 (m, 1H, H-4´), 2.84 (ddd, 1H, *J*= 8.7 Hz, *J*= 8.7 Hz, *J*= 14.1 Hz, H-5´), 1.74 (ddd, 1H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 5.9 Hz, *J*= 12.8 Hz, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O)δ/ppm= 161.0 (C-2), 154.1 (C-4), 150.5 (C-6), 140.1 (C-8), 139.9 (C-3´), 130.8 (C-2´), 128.7 (C-5), 68.9 (d, *J*= 5.2 Hz, C-6´), 60.9 (C-1´), 47.3 (d, *J*= 8.0 Hz, C-4´), 35.3 (C-5´); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O)δ/ppm= 1.15; mp= 152 °C; $C_{11}H_{20}N_7O_4P$; Mol. Wt.: 345.29

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)*carba-iso*-d4A 206b

Der Ionenaustausch wurde gemäß AAV 10 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 34 mg Di-Ammonium-*carba-iso*-d4AMP (0.10 mmol) zunächst protoniert und mit $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m) bis zum Neutralpunkt titriert. Nach der Gefriertrocknung konnten nur Zersetzungsprodukte gefunden werden.

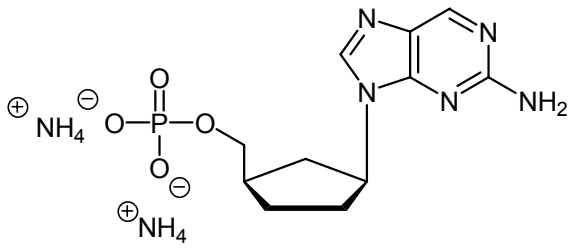


$C_{43}H_{84}N_7O_4P$; Mol. Wt.: 794.15

Di-ammonium-*carba-iso*-ddAMP 202a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 750 mg *carba-iso*-ddA (3.21 mmol, 1.0 Äq.) in 5.8 mL abs. Acetonitril mit 1.31 mL dest. $POCl_3$ (14.2 mmol, 4.4 Äq.), 1.18 mL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 14.6 mmol, 4.5 Äq.) und 131 µL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 7.28 mmol, 2.3 Äq.) umgesetzt. Durch zweifache RP-18 Chromatographie mit Wasser wurde das Produkt abschließend gereinigt und anschließend lyophillisiert.

Ausbeute: 1.02 g (2.94 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.48 (s, 1H, H-6), 8.16 (s, 1H, H-8), 4.65 (dddd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 8.4 Hz, *J*= 8.4 Hz, *J*= 8.4 Hz, H-1´), 3.73-3.62 (m, 2H, H-6´), 2.35-2.20 (m, 2H, H-5´, H-4´), 2.14-2.03 (m, 1H, H-2´), 1.92-1.54 (m, 4H, H-2´, H-3´, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.7 (C-2), 154.0 (C-4), 150.0 (C-6), 141.0 (C-8), 128.0 (C-5), 69.0 (d, *J*= 5.3 Hz, C-6´), 56.1 (C-1´), 39.1 (d, *J*= 7.6 Hz, C-4´), 36.0 (C-5´), 32.2 (C-2´), 27.3 (C-3´); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= 0.30; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3444, 3325, 3170, 2949, 1651, 1619, 1579, 1430, 1131, 964; mp= 225-230 °C; MS (HR-FAB): calcd. 314.102 ($M+3H^+$); found 314.102; $C_{11}H_{22}N_7O_4P$; Mol. Wt.: 347.31

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)*carba-iso*-ddA 202b

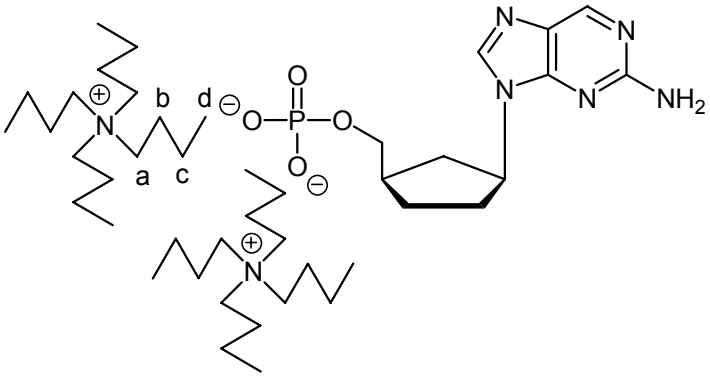
Die Reaktion wurde nach AAV 10 (*Variante A*) durchgeführt. 0.1 g Di-ammonium-*carba-iso*-ddAMP (0.29 mmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst protoniert und dann mit $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m) bis zum Neutralpunkt titriert. Nach Gefriertrocknung konnten nur Zersetzungsprodukte gefunden werden.

Die Reaktion wurde nach AAV 10 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 70 mg Di-ammonium-*carba-iso*-ddAMP (0.20 mmol, 1.0 Äq.) in einem Schlenk-Kolben in 5 mL dest. Wasser gelöst und 218 mg $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m,

entsprechend 87 mg, 0.34 mmol, 1.7 Äq.), gelöst in 5 mL dest. Wasser, versetzt. Das Produkt wurde zur Isolierung lyophillisiert.

Anmerkung: Der Einfachheit halber ist in der Überschrift vom doppelten Gegenion die Rede. Tatsächlich wurden nur 1.6 Gegenionen ausgetauscht. Bei den verbliebenen 0.4 Gegenionen müsste es sich um ein Ammoniumion oder ein Proton handeln. Die Molmasse wurde aus den anteilig gewichteten Massen errechnet.

Ausbeute: 140 mg (gewichtete Molmasse 724.6 g/mol; 0.193 mmol, 96%) eines gelben Feststoffes.

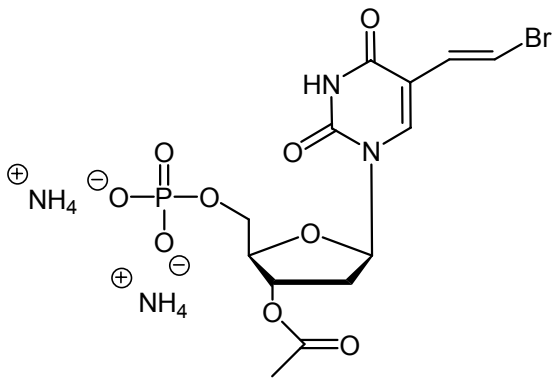


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.53 (s, 1H, H-6), 8.25 (s, 1H, H-8), 6.51 (s, 2H, NH_2), 4.74-4.62 (m, 1H, H-1´), 3.65-3.58 (m, 2H, H-6´), 3.20-3.10 (m, 12H, H-a), 2.30-2.16 (m, 2H, H-5´, H-4´), 2.08-1.92 (m, 2H, H-2´, H-5´), 1.88-1.60 (m, 3H, H-2´, H-3´), 1.62-1.48 (m, 12H, H-b), 1.36-1.22 (m, 12H, H-c), 0.92 (t, 19H, *J*= 7.4 Hz, H-d); $C_{43}H_{86}N_7O_4P$; Mol. Wt.: 796.16

Di-ammonium-3´-*O*-acetyl-BVdUMP 203a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 375 mg 3´-*0*-Acetyl-BVdU (1.00 mmol, 1.0 Äq.) in 2.0 mL abs. Acetonitril mit 0.40 mL dest. $POCl_3$ (4.4 mmol, 4.4 Äq.), 0.36 mL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 4.4 mmol, 4.4 Äq.) und 40 µL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 2.22 mmol, 2.2 Äq.) umgesetzt. Durch RP-18 Chromatographie mit Wasser wurde das Produkt zunächst gereinigt. Nachdem der Kolben mit Produkt auf dem Boden zerschlagen und die Reste aufgefegt waren, wurde eine erneute RP-18 Chromatographie mit Wasser (+2% Acetonitril) durchgeführt. Die Chromatographie war recht umständlich, da während der Reaktion die Acetylgruppe anteilig abgespalten worden war. Es konnte daher nur wenig reines Produkt wegen zahlreicher Mischfraktionen isoliert werden.

Ausbeute: 40.0 mg (0.082 mmol, 8%) eines farblosen Feststoffes.

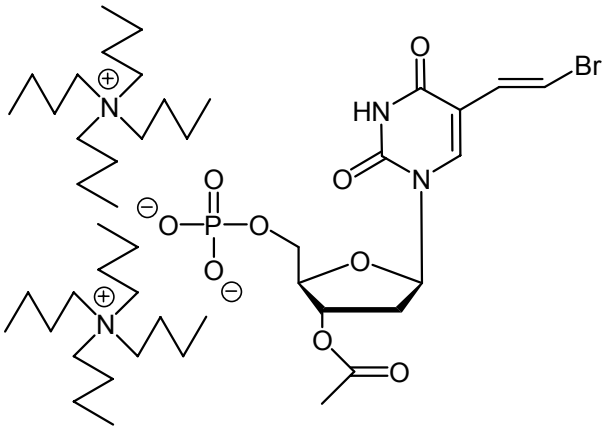


^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O)δ/ppm= 7.98 (s, 1H, H-6), 7.29 (d, 1H, *J*= 13.8 Hz, BVU-H-8), 6.95 (d, 1H, *J*= 13.8 Hz, BVU-H-7), 6.37 (dd, 1H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 8.6 Hz, H-1´), 5.43-5.38 (m, 1H, H-3´), 4.45-4.37 (m, 1H, H-4´), 4.17-4.12 (m, 2H, H-5´), 2.60-2.38 (m, 2H, H-2´), 2.16 (s, 3H, Ac); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O)δ/ppm= 173.6 (C=O), 163.7 (C-4), 150.7 (C-2), 138.7 (C-6), 128.2 (BVU-C-7), 112.0 (C-5), 109.2 (BVU-C-8), 85.6 (C-1´), 83.7 (d, *J*= 8.7 Hz, C-4´), 75.5 (C-3´), 65.0 (d, *J*= 4.8 Hz, C-5´), 36.9 (C-2´), 20.5 (Ac); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O)δ/ppm= 0.03; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3431, 3230, 1708, 1605, 1243, 1064; mp = 190 °C (decomposition); R_f (H_2O, RP-18)= 0.33; MS (ESI$^-$): calcd. 453, 455 (M^-); found 453, 455; $C_{13}H_{22}BrN_4O_9P$; Mol. Wt.: 489.21

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)3´-*O*-acetyl-BVdUMP 203b

Die Reaktion wurde nach AAV 10 (*Variante A*) durchgeführt. 10 mg Di-Ammonium-3´-*O*-acetyl-BVdUMP (20 μmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst protoniert und dann mit $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m) bis zum Neutralpunkt titriert. Nach Gefriertrocknung wurde im NMR-Spektrum ein Gemisch aus Bis-(tetra-*n*-butylammonium)3´-*O*-acetyl-BVdUMP und dem deacetylierten Produkt Bis-(tetra-*n*-butylammonium)BVdUMP gefunden. Nach einem Tag wurde erneut ein NMR-Spektrum aufgenommen, in welchem eine fast vollständige Deacetylierung festgestellt werden konnte. Nach Gefriertrocknung und erneuter Aufnahme eines NMR-Spektrums war das Signal der Acetylgruppe im ^{1}H-NMR verschwunden. Für die nachfolgende Synthese wurde daher das frisch hergestellte Bis-(tetra-*n*-butylammonium)3´-*O*-acetyl-BVdUMP ohne Charakterisierung sofort eingesetzt.

Ausbeute: n.b.

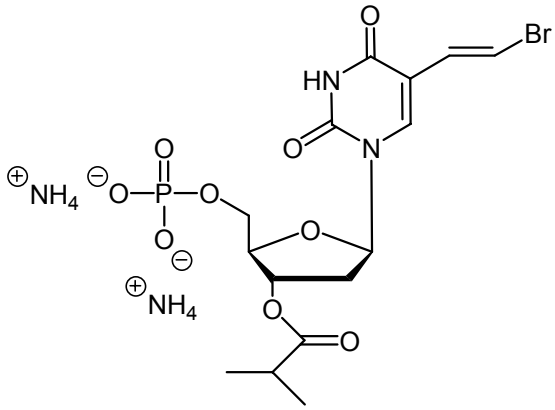


$C_{45}H_{86}BrN_4O_9P$; Mol. Wt.: 938.06

Di-ammonium-3´-*O*-*iso*-butyryl-BVdUMP 204a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 9 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 455 mg 3´-*0*-*iso*-butyryl-BVdU (1.13 mmol, 1.0 Äq.) in 2.0 mL abs. Acetonitril mit 0.45 mL dest. $POCl_3$ (5.0 mmol, 4.4 Äq.), 0.41 mL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 5.0 mmol, 4.4 Äq.) und 45 µL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 2.5 mmol, 2.2 Äq.) umgesetzt. Zur Neutralisation wurden in diesem Fall genau 2.73 g Ammoniumhydrogencarbonat (ca. 35 mmol) zugegeben und nicht durch einen Überschuss neutralisiert. Durch RP-18 Chromatographie mit Wasser wurden zunächst die Phosphatsalze abgetrennt. Dann wurde das Produkt mit Wasser/Acetonitril 9:1 v/v eluiert. Da beim Auftragen auf die Säule relativ viel Acetonitril zum Lösen zugegeben werden musste, eluierte ein Teil des Produktes mit den Phosphatsalzen. Diese Fraktion wurde lyophillisiert und auf die gleiche Weise erneut chromatographiert. Das Produkt wurde vereint und lyophillisiert. Es wurden zudem einige Mischfraktionen erhalten, die das vermutlich anteilig deacylierte Produkt enthielten.

Ausbeute: 0.25 g (0.49 mmol, 43%) eines farblosen Feststoffes.



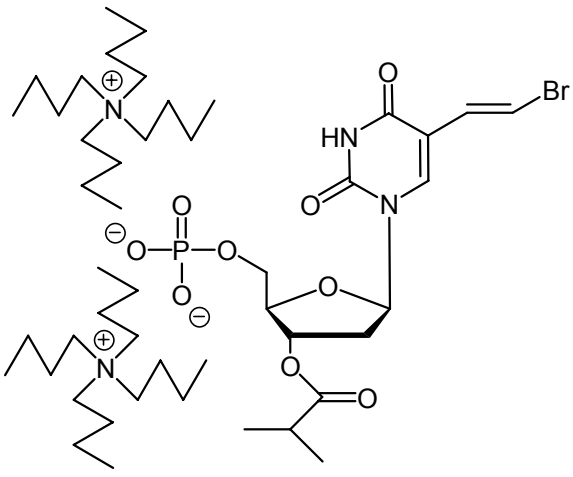
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.36 (s, 1H, H-6), 7.41 (d, 1H, *J*= 13.6 Hz, BVU-H-8), 7.13 (d, 1H, *J*= 13.6 Hz, BVU-H-7), 6.24 (dd, 1H, *J*= 5.6 Hz, *J*= 9.1 Hz, H-1´), 5.31-5.25 (m, 1H, H-3´), 4.10-4.05 (m, 1H, H-4´), 3.93-3.84 (m, 2H, H-5´), 2.57 (sept, 1H, *J*= 7.0 Hz, CH-*i*-Bu), 2.42-2.15 (m, 2H,

H-2´), 1.10 (d, 6H, *J*= 7.0 Hz, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 175.6 (C=O), 161.7 (C-4), 149.4 (C-2), 139.3 (C-6), 129.9 (BVU-C-7), 110.6 (C-5), 107.2 (BVU-C-8), 84.1 (C-1´), 83.7 (d, *J*= 7.5 Hz, C-4´), 75.4 (C-3´), 64.1 (d, *J*= 4.5 Hz, C-5´), 36.8 (C-2´), 33.0 (CH-*i*-Bu), 18.6 (CH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -0.64; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3421, 3205, 3069, 2976, 2360, 1720, 1469, 1191, 1115, 953; mp=191 °C; R_f (H_2O/MeCN 9:1 v/v, RP-18)= 0.50; MS (HR-FAB): calcd. 483.017, 485.015 ($M+3H^+$); found 483.018, 485.017; $C_{15}H_{26}BrN_4O_9P$; Mol. Wt.: 517.27

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)3´-*O*-*iso*-butyryl-BVdUMP 204b

Die Reaktion wurde nach AAV 10 (*Variante A*) durchgeführt. 0.10 g Di-ammonium-3´-*O*-*iso*-butyryl-BVdUMP (0.19 mmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst protoniert und dann mit 213 mg $N(Bu)_4OH$ (40%ige Lösung in Wasser m/m, entsprechend 85 mg, 0.33 mmol, 1.7 Äq.), gelöst in 5 mL dest. Wasser, versetzt. Wegen der Erfahrungen bei dem 3´-*O*-Acetyl-BVdUMP-Derivat wurde das Produkt sofort für die weitere Umsetzung verwendet.

Ausbeute: 0.15 g (gewichtete Molmasse 925.1 g/mol, 0.16 mmol, 85%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.



$C_{47}H_{90}BrN_4O_9P$; Mol. Wt.: 966.12

Anmerkung: Der Einfachheit halber ist in der Überschrift vom doppelten Gegenion die Rede. Tatsächlich wurden nur 1.66 Gegenionen ausgetauscht. Bei den verbliebenen 0.34 Gegenionen müsste es sich um ein Proton handeln.

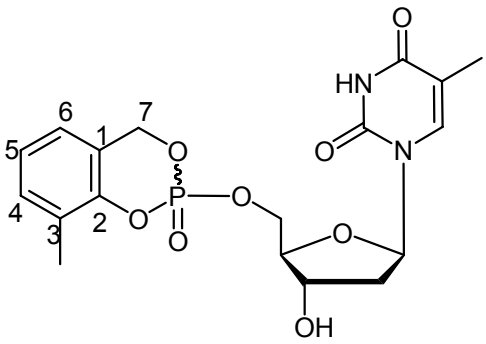
10.2.8 Synthese der Zielverbindungen

10.2.8.1 Synthese von *cyclo*Sal-Triestern

3-Methyl-*cyclo*Sal-dTMP (für Modellreaktionen) 98a

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 25 mg dT (103 μmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Toluol coevaporiert, in 1 mL abs. DMF aufgenommen und mit 36 μL abs. DIPEA (206 μmol, 2.0 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde auf -20 °C gekühlt und dann 25 mg 3-Methylsaligenylchlorphosphit (124 μmol, 1.2 Äq.), gelöst in 0.5 mL abs. Toluol, über 30 min zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde eine Stunde bei RT gerührt. Die Lösung wurde erneut auf -20 °C gekühlt und mit 22 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 121 μmol, 1.2 Äq.) versetzt. Es wurde auf RT erwärmt und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 bis 15% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 29 mg (68 μmol, 66%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch (1.0:0.9).

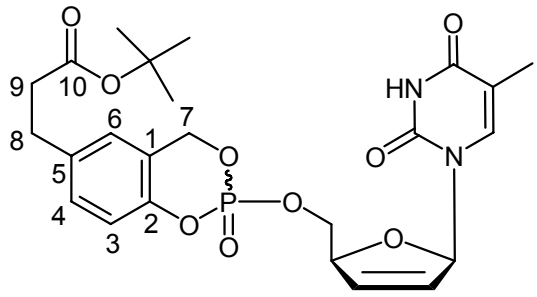


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.31, 11.30 (2xs, 1H, NH), 7.43, 7.41 (2xq, 1H, *J*= 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.29-7.21 (m, 1H, H-6), 7.15-7.05 (m, 2H, H-4, H-5), 6.17 (2xdd, 1H, *J*= 6.8 Hz, *J*= 6.8 Hz, H-1´), 5.55-5.35 (m, 3H, H-7, OH), 4.39-4.17 (m, 3H, H-5´, H-3´), 3.95-3.86 (m, 1H, H-4´), 2.21, 2.20 (2xs, 3H, CH_3), 2.19-2.00 (m, 2H, H-2´), 1.73, 1.70 (2xd, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 163.5 (C_{het}-4), 150.2 (C_{het}-2), 149 (C-2), 135.7, 135.6 (2xC_{het}-6), 130.8 (C-4), 127.8 (C-3), 123.8 (2xC-6), 123.5 (C-5), 120.9 (2xC-1), 109.6, 109.5 (2xC_{het}-5), 84.0 (2xd, *J*= 6.7 Hz, C-4´), 83.9, 83.8 (2xC-1´), 69.8, 69.7 (2xC-3´), 68.3, 68.2 (2xd, *J*= 7.1 Hz, C-7), 67.7-67.5 (m, C-5´), 38.5, 38.3 (2xC-2´), 14.7 (2xCH_3), 11.9, 11.8 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.97 (D1), -8.99 (D2); $C_{18}H_{21}N_2O_8P$; Mol. Wt.: 424.34

5-(*tert*-Butyl-propionyl)*cyclo*Sal-d4TMP 101

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 224 mg d4T (1.00 mmol, 1.0 Äq.) in 15 mL abs. Acetonitril gelöst, 0.27 mL abs. DIPEA (1.6 mmol, 1.6 Äq.) zugegeben und auf -20 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden innerhalb von 20 min 367 mg 5-(*t*Bu-*prop*)saligenylchlorphosphit (1.16 mmol, 1.2 Äq.), gelöst in 2 mL abs. THF, getropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch eine Stunde bei RT gerührt, erneut auf -20 °C gekühlt und 0.20 mL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 1.1 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Nach 30 min bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM gelöst und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wurde das Rohprodukt am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 bis 5% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 0.41 g (0.78 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch.

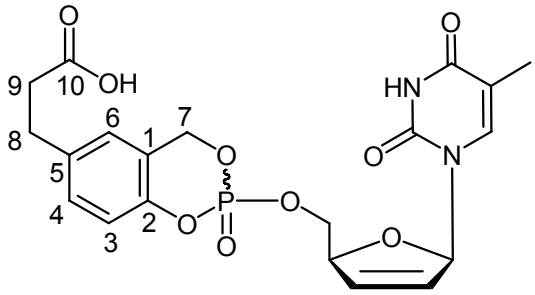


^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.35 (s, 1H, NH), 7.25-7.14 (m, 3H, H-4, H-6, H_{het}-6), 7.06, 7.03 (2xd, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-3), 6.82, 6.80 (2xddd, 1H, *J*= 1.9 Hz, *J*= 1.9 Hz, *J*= 3.8 Hz, H-1´), 6.43, 6.36 (2xddd, 1H, *J*= 1.9 Hz, *J*= 1.9 Hz, *J*= 5.7 Hz, H-3´), 6.04-6.01 (m, 1H, H-2´), 5.49-5.34 (m, 2H, H-7), 4.97-4.95 (m, 1H, H-4´), 4.35-4.25 (m, 2H, H-5´), 2.79 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-8), 2.54-2.50 (m, 2H, H-9), 1.69, 1.63 (2xs, 3H, Me_{het}), 1.37, 1.36 (2xs, 9H, *t*-Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.5 (C-10), 163.9 (2xC_{het}-4), 150.9 (2xC_{het}-2), 147.9 (d, *J*= 6.1 Hz, C-2), 137.1 (C-5), 135.9, 135.8 (2xC_{het}-6), 133.0 (C-3´), 129.9, 129.8 (2xC-4), 129.1 (d, *J*= 4.1 Hz, C-1), 127.6, 127.5 (2xC-2´), 126.0 (2xC-6), 118.1 (d, *J*= 7.1 Hz, C-3), 109.9 (C_{het}-5), 89.4 (C-1´), 84.4, 84.3 (2xd, *J*= 3.1 Hz, 2xC-4´), 80.0 (C-*t*Bu), 68.5-68.4 (m, C-5´, C-7), 36.3 (C-9), 29.8 (C-8), 27.9 (CH_3-*t*Bu), 12.1, 12.0 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (202 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.02; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.37; $C_{24}H_{29}N_2O_9P$; Mol. Wt.: 520.47

5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP 49

Es wurden 0.40 g 5-(*tert*-Butyl-propionyl)*cyclo*Sal-d4TMP (0.77 mmol) in 120 mL Dichlormethan gelöst und 19 mL TFA zugegeben. Nach 45 min wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit DCM/MeOH(+0.5 % HOAc) 9:1 gereinigt. Das Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0.34 g (0.73 mmol, 95 %) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1:0.9

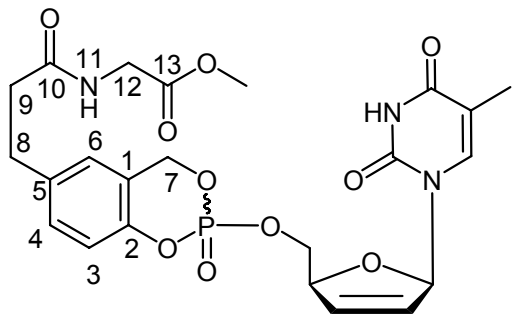


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 12.18 (s, 1H, COOH), 11.34 (2xs, 1H, NH), 7.31-7.25 (m, 1H, H-4), 7.22-7.18 (m, 1H, H_{het}-6), 7.17-7.08 (m, 2H, H-3, H-6), 6.80 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.5 Hz, H-1´), 6.41, 6.36 (2xddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.05-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.54-5.30 (m, 2H, H-7), 5.00-4.92 (m, 1H, H-4´), 4.38-4.25 (m, 2H, H-5´), 2.90-2.74 (m, 2H, H-8), 2.55-2.46 (m, 2H, H-9), 1.66, 1.59 (2xd, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 173.4 (C-10), 163.6 (2xC_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.7 (d, *J*= 5.4 Hz, C-2), 135.6, 135.5 (2xC_{het}-6), 132.8, 312.7 (C-3´), 130.0 (2xC-4), 129.7, 129.6 (2xC-5), 127.3 (2xC-2´), 124.1 (2xC-6, 2xC-3), 121.4 (d, *J*= 8.9 Hz, C-1), 109.6 (C_{het}-5), 89.1, 89.0 (2xC-1´), 84.1, 84.0 (2xC-4´), 68.6-68.1 (m, C-5´, C-7), 33.3, 33.2 (C-9), 24.0 (C-8), 11.8, 11.7 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (202 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.73, -8.79; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.10; $C_{20}H_{21}N_2O_9P$; Mol. Wt.: 464.36

5-(GlyOMe-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 87a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 30 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (65 μmol, 1.0 Äq.), 22 μL DIPEA (0.13 mmol, 2.0 Äq.), 16 mg Glycinmethylester-hydrochlorid (0.13 mmol, 2.0 Äq.), 11 mg HOBt (72 μmol, 1.1 Äq.) und 18 mg DCC (85 μmol, 1.3 Äq.) in insgesamt 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 29 mg (54 μmol, 83%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.8

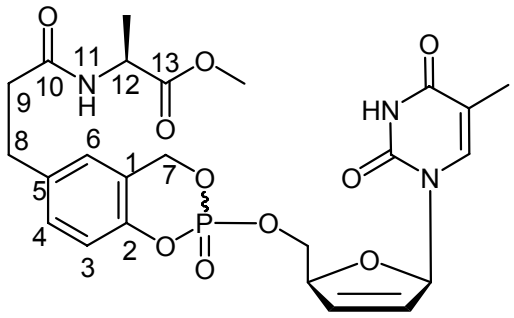


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.34 (2xs, 1H, NH_{het}), 8.33 (t, 1H, *J*= 5.8 Hz, NH-11), 7.30-7.24 (m, 1H, H-4), 7.20, 7.19 (2xq, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6_{het}), 7.15-7.08 (m, 2H, H-6, H-3), 6.82-6.76 (m, 1H, H-1´), 6.42, 6.36 (2xddd, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.05-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.53-5.30 (m, 2H, H-7), 5.00-4.90 (m, 1H, H-4´), 4.40-4.21 (m, 3H, H-12, H-5´), 3.82 (2xd, 2H, *J*= 5.8 Hz, H-12), 3.61 (s, 3H, OMe), 2.90-2.77 (m, 2H, H-8), 2.47-2.36 (m, 2H, H-9), 1.66, 1.59 (2xd, 3H, *J*= 0.9 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.5 (2xC-10), 170.4 (C-13), 163.6 (C_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.6 (m, C-2), 135.7, 135.5 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 130.1 (m, C-5), 130.0 (2xC-4), 127.3 (2xC-2´), 124.1, 123.9 (C-6, C-3), 121.3 (d, *J*= 9.1 Hz, C-1), 109.6 (2xC_{het}-5), 89.1 (2xC-1´), 84.1 (d, *J*= 7.5 Hz, C-4´), 68.6-68.4 (m, C-5´), 68.3-68.1 (m, C-7), 51.6 (OMe), 40.5 (C-12), 34.5, 34.4 (2xC-9), 24.3 (C-8), 11.8, 11.7 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.71 (D1), -8.77 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3338, 3072, 2953, 1748, 1690, 1466, 1288, 1247, 1187, 1026, 944; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 10.56, 10.80; mp= 68-69 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.31; MS (HR-FAB): calcd. 536.143 ($M+H^+$); found 536.143; $C_{23}H_{26}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 535.44

5-(L-AlaOMe-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 88a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 50 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (108 μmol, 1.0 Äq.), 38 μL DIPEA (0.22 mmol, 2.0 Äq.), 30 mg L-Alaninmethylester-hydrochlorid (0.22 mmol, 2.0 Äq.), 18 mg HOBt (0.12 mmol, 1.1 Äq.) und 30 mg DCC (0.14 mmol, 1.3 Äq.) in insgesamt 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit DCM/MeOH 9:1 v/v gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 56 mg (102 μmol, 94%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9

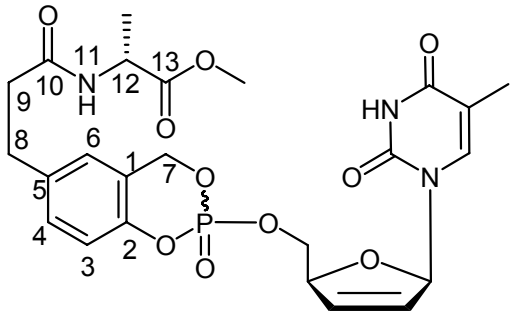


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.34, 11.33 (2xs, 1H, NH_{het}), 8.31, 8.30 (2xd, 1H, *J*= 6.9 Hz, NH-11), 7.28-7.22 (m, 1H, H-4), 7.20, 7.19 (2xq, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6_{het}), 7.15-7.08 (m, 2H, H-6, H-3), 6.82-6.76 (m, 1H, H-1´), 6.42, 6.35 (2xddd, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.05-5.99 (m, 1H, H-2´), 5.52-5.30 (m, 2H, H-7), 5.00-4.90 (m, 1H, H-4´), 4.40-4.20 (m, 3H, H-12, H-5´), 3.61, 3.60 (2xs, 3H, OMe), 2.87-2.75 (m, 2H, H-8), 2.47-2.35 (m, 2H, H-9), 1.66, 1.59 (2xd, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}), 1.25, 1.23 (2xd, 3H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 173.1 (C-13), 170.9, 170.8 (2xC-10), 163.6 (2xC_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.6 (2xd, *J*= 7.1 Hz, C-2), 135.6, 135.5 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 130.1 (2xd, *J*= 5.6 Hz, C-5), 130.0 (C-4), 127.3, 127.2 (2xC-2´), 124.1-123.9 (m, C-6, C-3), 121.3 (d, *J*= 8.8 Hz, C-1), 109.6 (C_{het}-5), 89.1, 89.0 (2xC-1´), 84.0 (d, *J*= 7.4 Hz, C-4´), 68.5-68.0 (m, C-7, C-5´), 51.7 (OMe), 47.4 (2xC-12), 34.4, 34.2 (C-9), 24.2 (2xC-8), 16.9 (Me), 11.8, 11.6 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.71 (D1), -8.74 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3354, 3186, 2952, 1743, 1712, 1669, 1467, 1299, 1248, 996, 943; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 11.17, 11.47; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.42; MS (HR-FAB): calcd. 550.159 ($M+H^+$); found 550.161; $C_{24}H_{28}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 549.47

5-(D-AlaOMe-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 88b

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 40 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (86 μmol, 1.0 Äq.), 30 μL DIPEA (0.17 mmol, 2.0 Äq.), 25 mg D-Alaninmethylester-hydrochlorid (0.18 mmol, 2.0 Äq.), 15 mg HOBt (112 μmol, 1.3 Äq.) und 24 mg DCC (112 μmol, 1.3 Äq.) in 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Produkt wurde am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 0 bis 2% gereinigt Da das Produkt immer noch DCC enthielt, wurde es in Acetonitril aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde erneut, diesmal mit DCM, am Chromatotron gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 17 mg (31 μmol, 36%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9

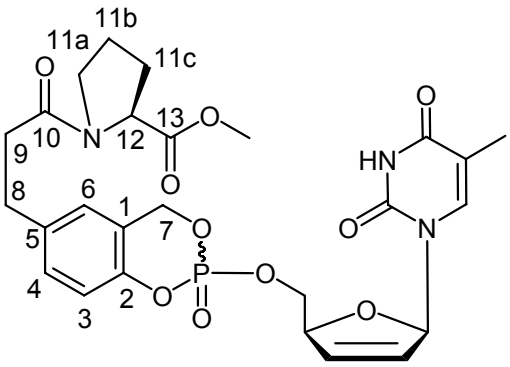


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.35, 11.34 (2xs, 1H, NH_{het}), 8.27 (d, 1H, *J*= 6.5 Hz, NH-11), 7.23-7.15 (m, 2H, H_{het}-6, H-4), 7.11-7.09 (m, 1H, H-6), 7.03, 7.00 (2xd, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.82-6.75 (m, 1H, H-1´), 6.42, 6.35 (2xddd, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 6.1 Hz, H-3´), 6.04-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.50-5.30 (m, 2H, H-7), 5.00-4.90 (m, 1H, H-4´), 4.35-4.20 (m, 3H, H-12, H-5´), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.78 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, H-8), 2.39 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 1.68, 1.62 (2xd, 3H, *J*= 0.9 Hz, Me_{het}), 1.23, 1.22 (2xd, 3H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 173.1 (C-13), 171.1 (C-10), 163.7 (C_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.7, 147.6 (2xd, *J*= 7.0 Hz, C-2), 137.5 (C-5), 135.6 (2xC_{het}-6), 132.8 (2xC-3´), 129.5 (2xC-4), 127.2 (2xC-2´), 125.7 (C-6), 120.8 (d, *J*= 8.7 Hz, C-1), 117.8, 117.7 (2xd, *J*= 8.5 Hz, C-3), 109.6 (C_{het}-5), 89.1 (C-1´), 84.0 (d, *J*= 7.6 Hz, C-4´), 68.5-68.1 (m, C-7, C-5´), 51.7 (OMe), 47.4 (C-12), 36.2 (C-9), 29.9 (C-8), 16.9 (Me), 11.9, 11.8 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.25 (D1), -9.28 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3434, 3066, 2936, 1741, 1691, 1670, 1458, 1288, 1251, 1206, 1029, 996; UV (HPLC): λ_{max}= 266 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 13.63; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.45; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 572.141 (M+Na^+); found 572.142; $C_{24}H_{28}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 549.47

5-(L-ProOMe-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 90a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 50 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (108 µmol, 1.0 Äq.), 38 µL DIPEA (0.22 mmol, 2.0 Äq.), 37 mg L-Prolinmethylester-hydrochlorid (0.22 mmol, 2.0 Äq.), 18 mg HOBt (0.12 mmol, 1.1 Äq.) und 30 mg DCC (0.14 mmol, 1.3 Äq.) in insgesamt 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde zunächst säulenchromatographisch mit DCM/MeOH 9:1 v/v gereinigt. Es wurde eine weitere Chromatographie am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 5% durchgeführt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 51 mg (89 µmol, 82%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomeren- und Rotamerengemisch.

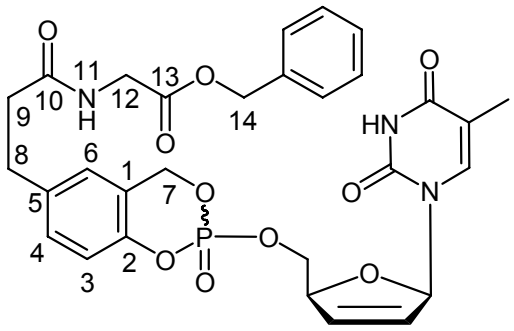


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.34 (s, 1H, NH_{het}), 7.35-7.25 (m, 1H, H-4), 7.22, 7.19 (2xq, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6_{het}), 7.16-7.07 (m, 2H, H-6, H-3), 6.82-6.78 (m, 1H, H-1´), 6.42, 6.35 (2xddd, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.06-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.54-5.30 (m, 2H, H-7), 5.00-4.90 (m, 1H, H-4´), 4.60-4.20 (m, 3H, H-12, H-5´), 3.67, 3.54, 3.61, 3.60 (4xs, 3H, OMe), 3.55-3.37 (m, 2H, H-11a), 2.81, 2.80 (2xt, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8), 2.55 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 2.34-2.08 (m, 1H, H-11c), 2.06-1.70 (m, 3H, H-11b, H-11c), 1.65, 1.62, 1.60, 1.59 (4xd, 3H, *J*= 0.8 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 172.4 (2xC-13), 169.6, 169.5 (C-10), 163.6 (C_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.7, 147.6 (2xd, *J*= 7.4 Hz, C-2), 136.7 (C-5), 135.6, 135.5 (2xC_{het}-6), 132.7, 132.6 (2xC-3´), 130.3, 130.2 (2xC-4), 127.3, 127.2 (2xC-2´), 124.0 (C-6, C-3), 121.4, 121.3 (2xd, *J*= 8.6 Hz, C-1), 109.6 (2xC_{het}-5), 89.1, 89.0 (C-1´), 84.0 (d, C-4´, *J*= 7.6 Hz), 68.5-68.1 (m, C-7, C-5´), 58.1 (2xC-12), 51.6 (OMe), 46.3 (2xC-11a), 33.4, 33.2 (2xC-9), 28.7 (C-11c), 24.2 (C-11b), 23.7 (C-8), 11.7, 11.6 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.47 (D1), -8.75 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3448, 3189, 2954, 1742, 1691, 1643, 1464, 1289, 1190, 1025, 941; UV (HPLC): λ_{max}= 264 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 11.92, 12.16; mp= 68-71 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.34; MS (HR-FAB): calcd. 576.175 ($M+H^+$); found 576.178; $C_{26}H_{30}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 575.50

5-(GlyOBn-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 87b

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 50 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (108 µmol, 1.0 Äq.), 38 µL DIPEA (0.22 mmol, 2.0 Äq.), 73 mg Glycinbenzylester-*para*-toluolsulfonat (0.22 mmol, 2.0 Äq.), 18 mg HOBt (0.12 mmol, 1.1 Äq.) und 30 mg DCC (0.14 mmol, 1.3 Äq.) in insgesamt 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit DCM/MeOH 15:1 v/v gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 51 mg (84 µmol, 78%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9



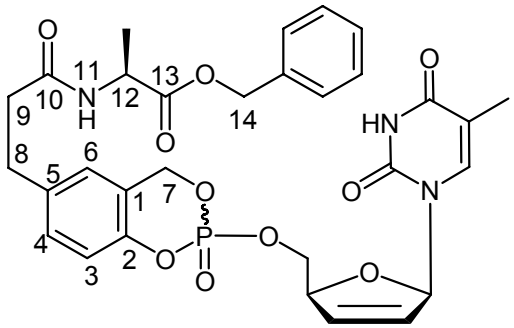
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.34, 11.33 (2xs, 1H, NH_{het}), 8.38 (2xt, 1H, *J*= 5.8 Hz, NH-11), 7.40-7.30 (m, 5H, H_{aryl}), 7.28-7.23 (m, 1H, H-4), 7.20, 7.19 (2xq, 1H, *J*= 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.14-7.06 (m, 2H, H-6, H-3), 6.81-6.78 (m, 1H, H-1´), 6.41, 6.35 (2xddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.05-5.97 (m, 1H, H-2´), 5.51-5.30 (m, 2H, H-7), 5.12 (s, 2H, H-14), 4.98-4.92 (m, 1H, H-4´), 4.38-4.22 (m, 2H, H-5´), 3.89, 3.88 (2xd, 2H, *J*= 5.9 Hz, H-12), 2.89-2.75 (m, 2H, H-8), 2.47-2.40 (m, 2H, H-9), 1.66, 1.58 (2xd, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.6 (2xC-10), 169.8 (C-13), 163.7 (2xC_{het}-4), 150.7 (2xC_{het}-2), 147.7-147.6 (m, C-2), 135.9 (C-5), 135.7, 135.6 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 130.1 (C_{aryl}), 130.0 (2xC-4),128.4 (2xC_{aryl}), 128.0 (C_{aryl}), 127.9 (2xC_{aryl}), 127.3 (2xC-2´), 124.1 (2xC-6), 121.3 (d, *J*= 9.3 Hz, C-1), 117.5 (m, C-3), 109.7 (2xC_{het}-5), 89.1 (2xC-1´), 84.1 (d, *J*= 7.3 Hz, C-4´), 68.5-68.1 (m, C-7, C-5´), 65.8 (C-14), 40.7 (C-12), 34.6, 34.5 (2xC-9), 24.3 (C-8), 11.8, 11.7 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.70 (D1), -8.77 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3337, 3068, 2945, 1747, 1690, 1466, 1286, 1248, 1189, 1016, 994; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 14.16, 14.37; mp= 79-81 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.41; MS (HR-FAB): calcd. 612.175 ($M+H^+$); found 612.178; $C_{29}H_{30}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 611.54

5-(L-AlaOBn-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 88c

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante A*) durchgeführt. Es wurden 30 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (65 μmol, 1.0 Äq.), 22.3 μL DIPEA (0.13 mmol, 2.0 Äq.), 46 mg L-Alaninbenzylester-*para*-toluolsulfonat (0.13 mmol, 2.0 Äq.), 11 mg HOBt (72 μmol, 1.1 Äq.) und 18 mg DCC (85 μmol, 1.3 Äq.) in insgesamt 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 0 bis 5% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 36 mg (58 μmol, 88%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9

Anmerkung: Die einzelnen Diastereomere konnten an der präparativen HPLC bis zu einem Verhältnis von je 9:1 angereichert werden. Die Konfiguration am Phosphoratom konnte jedoch weder durch NOESY-Spektroskopie noch durch CD-Spektroskopie zugeordnet werden. Die Daten sind als zwei Sätze angegeben (**fast**/**slow**). Diese Bezeichnung bezieht sich auf die HPLC-Retentionszeit. Das IR bezieht sich auf das nicht angereicherte Diastereomerengemisch.



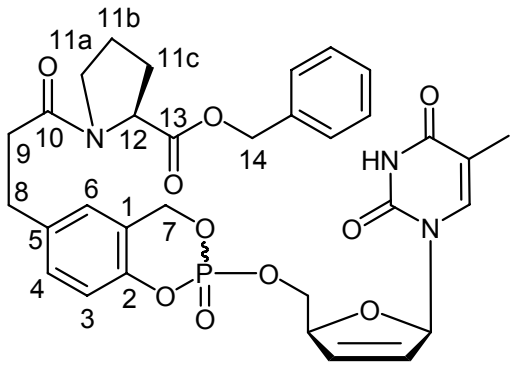
fast: ^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.40-7.27 (m, 6H, H_{het}-6, H_{aryl}), 7.20 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-4), 7.06 (s, 1H, H-6), 6.98 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.90 (ddd, 1H, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 3.5 Hz, H-1´), 6.41 (ddd, 1H, *J*= 1.4 Hz, *J*= 1.4 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.01-5.96 (m, 1H, H-2´), 5.37 (dd, 2H, *J*= 9.4 Hz, *J*= 14.0 Hz, H-7), 5.15 (s, 2H, H-14), 5.02-4.96 (m, 1H, H-4´), 4.45-4.37 (q, 1H, *J*= 7.3 Hz, H-12), 4.40-4.30 (m, 2H, H-5´), 2.95-2.80 (m, 2H, H-8), 2.50 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-9), 1.77 (s, 3H, Me_{het}), 1.33 (d, 3H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 174.8 (C-13), 174.1 (C-10), 166.4 (C_{het}-4), 152.8 (C_{het}-2), 149.6 (d, *J*= 6.9 Hz, C-2),139.2 (C_{aryl}), 137.8 (C_{het}-6), 137.4 (C-5), 134.2 (C-3´), 131.2 (d, *J*=1.0 Hz, C-4), 129.6 (2xC_{aryl}), 129.3 (C-6), 129.1 (C-2´), 128.6 (2xC_{aryl}), 126.9 (C_{aryl}), 122.4 (d, *J*= 9.4 Hz, C-1), 119.3 (d, *J*= 8.7 Hz, C-3), 111.8 (C_{het}-5), 91.3 (C-1´), 86.0 (d, *J*= 7.8 Hz, C-4´), 70.1 (d, *J*= 6.7 Hz, C-7), 68.9 (d, *J*= 5.9 Hz, C-5´), 67.9 (C-14), 48.4 (C-12), 38.1 (C-9), 31.7 (C-8), 17.3 (Me), 12.5 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -8.23; **slow**: ^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.36-7.29 (m, 6H, H_{het}-6, H_{aryl}), 7.18 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-4), 7.05 (d, 1H, *J*= 1.7 Hz , H-6), 6.94 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.87 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.4 Hz, H-1´), 6.35 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.00-5.96 (m, 1H, H-2´), 5.40-5.34 (m, 2H, H-7), 5.15 (s, 2H, H-14), 5.02-4.96 (m, 1H, H-4´), 4.45-4.30 (m, 3H, H-12, H-5´), 2.95-2.80 (m, 2H, H-8), 2.50 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 1.77 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}), 1.34 (d, 3H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 174.8 (C-13), 174.1 (C-10), 166.3 (C_{het}-4), 152.7 (C_{het}-2), 149.7 (C-2), 139.2 (C_{aryl}), 137.7 (C_{het}-6, C-5), 134.0 (C-3´), 131.1 (C-4), 129.6 (2xC_{aryl}), 129.3 (C-6), 129.1 (C-2´), 128.6 (2xC_{aryl}), 126.9 (C_{aryl}), 120.0 (C-1), 119.3 (d, *J*= 9.0 Hz, C-3), 111.8 (C_{het}-5), 91.4 (C-1´), 86.0 (d, *J*= 7.6 Hz, C-4´), 70.2 (d, *J*= 6.6 Hz, C-7), 69.8 (d, *J*= 5.9 Hz, C-5´), 67.9 (C-14), 48.4 (C-12), 38.0 (C-9), 31.7 (C-8), 17.3 (Me), 12.4

(Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -8.55; (**fast**/**slow**): IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3327, 3066, 2931, 1742, 1691, 1670, 1458, 1286, 1085, 954; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 15.16, 14.93; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.44; MS (HR-FAB): calcd. 626.190 ($M+H^+$); found 626.194; $C_{30}H_{32}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 625.56

5-(L-ProOBn-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 90b

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 40 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (86 μmol, 1.0 Äq.), 30 μL DIPEA (0.17 mmol, 2.0 Äq.), 42 mg L-Prolinbenzylester-hydrochlorid (0.17 mmol, 2.0 Äq.), 15 mg HOBt (112 μmol, 1.3 Äq.) und 24 mg DCC (112 μmol, 1.3 Äq.) in 2 mL abs. DMF umgesetzt. Das Produkt wurde am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 0 bis 2% gereinigt und anschließend lyophillisiert.

Ausbeute: 46 mg (71 μmol, 83%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomeren- und Rotamerengemisch.



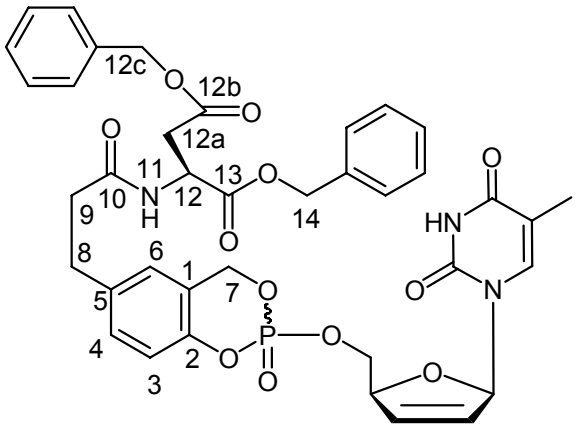
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.35, 11.34 (2xs, 1H, NH_{het}), 7.40-7.30 (m, 5H, H_{aryl}), 7.27-7.19 (m, 1H, H-4), 7.19, 7.16 (2xq, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6_{het}), 7.15-7.10 (m, 1H, H-6), 7.05-6.95 (m, 1H, H-3), 6.82-6.76 (m, 1H, H-1´), 6.41, 6.35 (2xddd, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.05-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.50-5.27 (m, 2H, H-7), 5.11 (s, 2H, H-14), 4.99-4.91 (m, 1H, H-4´), 4.40-4.20 (m, 3H, H-12, H-5´), 3.55-3.37 (m, 2H, H-11a), 2.78 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-8), 2.57 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 2.25-2.10 (m, 1H, H-$11c_1$), 1.94-1.78 (m, 3H, H-11b, H-$11c_2$), 1.68, 1.61 (2xd, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.8 (C-13), 169.9 (C-10), 163.6 (C_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.7-147.5 (m, C-2), 137.6, 137.5 (2xC_{aryl}), 136.0 (C-5), 135.6, 135.5 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 129.7, 129.6 (2xC-4), 128.3 (2xC_{aryl}), 127.9 (C_{aryl}), 127.5 (2xC_{aryl}), 127.2 (2xC-2´), 125.8, 125.7 (2xC-6), 120.7, 120.6 (2xd, *J*= 9.2 Hz, C-1), 117.8, 117.7 (2xC-3), 109.6 (2xC_{het}-5), 89.1 (C-1´), 84.0 (d, *J*= 7.5 Hz, C-4´), 68.5-68.0 (m, C-7, C-5´), 65.6 (C-14), 58.5, 58.2 (2xC-12), 46.4,

45.9 (2xC-11a), 35.0, 34.8 (2xC-9), 29.2 (C-8), 28.7 (C-11c), 24.3 (C-11b), 11.8, 11.7 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.23 (D1), -9.29 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3435, 3067, 2953, 1742, 1691, 1647, 1452, 1299, 1249, 1029, 996; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min]= 15.55; mp= 83 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.58; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 674.188 (M+Na^+); found 674.191; $C_{32}H_{34}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 651.60

5-(L-Asp-di-OBn-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 89a

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 18 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (39 μmol, 1.0 Äq.), 14 μL DIPEA (78 μmol, 2.0 Äq.), 38 mg L-Asparaginsäuredibenzylester-*para*-toluolsulfonat (78 μmol, 2.0 Äq.), 6 mg HOBt (61 μmol, 1.5 Äq.) und 11 mg DCC (51 μmol, 1.3 Äq.) in 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Produkt wurde am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanolgradienten von 0 bis 2% gereinigt und anschließend lyophillisiert.

Ausbeute: 25 mg (33 μmol, 85%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:1.0



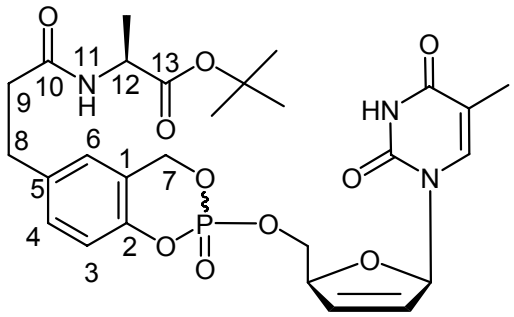
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.36, 11.35 (2xs, 1H, NH_{het}), 8.46 (2xd, 1H, *J*= 7.9 Hz, NH-11), 7.40-7.27 (m, 10H, H_{aryl}), 7.22-7.12 (m, 2H, H-4, H_{het}-6), 7.10-7.05 (m, 1H, H-6), 7.00, 6.97 (2xd, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.82-6.76 (m, 1H, H-1´), 6.41, 6.35 (2xddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.04-5.97 (m, 1H, H-2´), 5.48-5.28 (m, 2H, H-7), 5.11-5.03 (m, 4H, H-14, H-12c), 4.97-4.97 (m, 1H, H-4´), 4.77-4.68 (m, 1H, H-12), 4.38-4.20 (m, 2H, H-5´), 2.93-2.70 (m, 4H, H-12a, H-8), 2.38 (t, 2H, *J*= 7.7 Hz, H-9), 1.68, 1.62 (2xd, 3H, *J*= 0.8 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.3 (2xC-10), 170.5 (C-12b), 169.7 (C-13), 163.7 (2xC_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.7, 147.6 (2xd, *J*= 4.3 Hz, C-2), 137.3 (C_5), 135.8, 135.7 (2xC_{aryl}), 135.6 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 129.5, 129.4 (2xC-4), 128.3 (4xC_{aryl}), 128.0 (2xC_{aryl}), 127.9 (2xC_{aryl}), 127.7 (2xC_{aryl}), 127.3, 127.2 (2xC-2´), 125.6

(2xC-6), 120.7 (2xd, *J*= 9.4 Hz, C-1), 117.8 (2xd, *J*= 8,9 Hz, C-3), 109.6 (2xC_{het}-5), 89.1 (C-1´), 84.0 (d, *J*= 7.6 Hz, C-4´), 68.4-68.0 (m, C-7, C-5´), 66.2 (C-12c), 65.8 (C-14), 48.6 (C-12), 36.3 (C-12a), 35.7 (C-9), 29.9 (C-8), 11.9, 11.8 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.25 (D1), -9.31 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3431, 3065, 2930, 1736, 1690, 1498, 1456, 1287, 1206, 1029, 995; mp= 77 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.59; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 782.209 (M+Na^+); found 782.207; $C_{38}H_{38}N_3O_{12}P$; Mol. Wt.: 759.69

5-(L-AlaO*t*Bu-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 88d

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 (*Variante B*) durchgeführt. Es wurden 60 mg 5-(2-Carboxyethyl)*cyclo*Sal-d4TMP (129 μmol, 1.0 Äq.), 45 μL DIPEA (0.26 mmol, 2.0 Äq.), 47 mg L-Alanin-*tert*-butylester-hydrochlorid (0.26 mmol, 2.0 Äq.), 22 mg HOBt (142 μmol, 1.1 Äq.) und 36 mg DCC (0.17 mmol, 1.3 Äq.) in 1 mL abs. DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten von 0 bis 2% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 53 mg (90 μmol, 70%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9



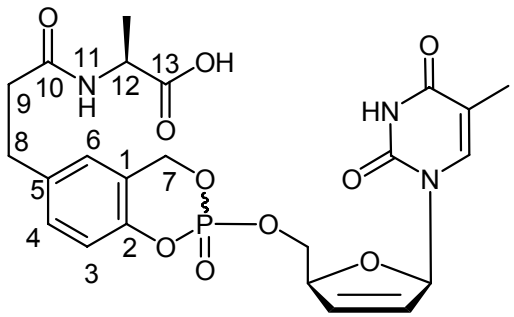
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.35, 11.34 (s, 1H, NH_{het}), 8.14 (d, 1H, *J*= 7.0 Hz, NH-11), 7.24-7.15 (m, 2H, H_{het}-6, H-4), 7.12-7.07 (m, 1H, H-6), 7.02, 7.00 (2xd, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 6.82-6.75 (m, 1H, H-1´), 6.41, 6.34 (2xddd, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.03-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.48-5.30 (m, 2H, H-7), 4.99-4.90 (m, 1H, H-4´), 4.36-4.20 (m, 2H, H-12, H-5´), 4.09 (m, 1H, H-12), 2.82-2.70 (m, 2H, H-8), 2.38 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 1.68, 1.62 (2xs, 3H, Me_{het}), 1.38 (s, 9H, *t*-Bu), 1.23, 1.22 (2xd, 3H, *J*= 7.1 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.9 (C-13), 170.9 (C-10), 163.6 (C_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.6 (m, C-2), 137.5 (C-5), 135.6 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 129.5 (2xC-4), 127.2 (2xC-2´), 125.7, 125.6 (2xC-6), 120.7 (d, *J*= 9.4 Hz, C-1), 117.8, 117.7 (2xd, *J*= 9.0 Hz, C-3), 109.6 (C_{het}-5), 89.1 (C-1´), 84.0 (d, *J*= 7.5 Hz, C-4´), 80.1 (C-*t*-Bu), 68.3-68.1 (m, C-7, C-5´), 48.1 (C-12), 36.3 (C-9), 30.0 (C-8),

27.5 (CH_3-*t*-Bu), 16.9 (Me), 11.8, 11.7 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.15 (D1), -9.52 (D2); UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 14.40, 14.77; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.59; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 614.188 (M+Na^+); found 614.190; $C_{27}H_{34}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 591.55

5-(L-Ala-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 88e

Es wurden 28 mg 5-(L-AlaO*t*Bu-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP (47 μmol) in 10 mL DCM gelöst und 2 mL TFA zugegeben. Nach 2.5 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Dichlormethan (+0.5% HOAc) und einem Methanolgradienten von 1 bis 10% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 21 mg (39 μmol, 83%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9

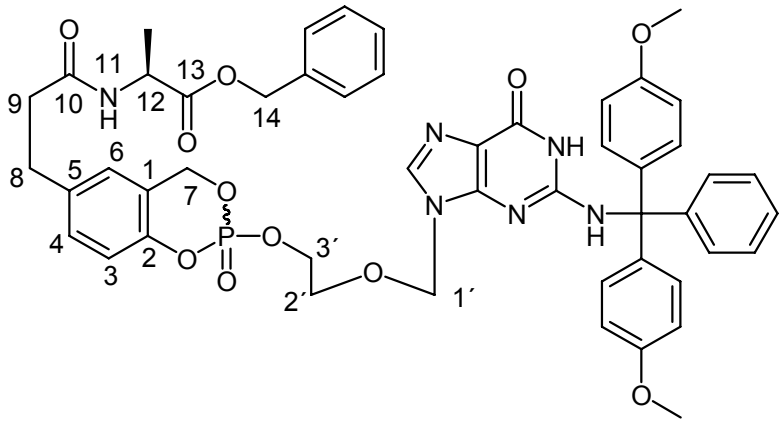


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 12.39 (s, 1H, COOH), 11.35, 11.34 (2xs, 1H, NH_{het}), 8.14 (d, 1H, *J*= 7.2 Hz, NH-11), 7.24-7.15 (m, 2H, H_{het}-6, H-4), 7.12-7.07 (m, 1H, H-6), 7.02, 7.00 (2xd, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.81-6.77 (m, 1H, H-1´), 6.41, 6.35 (2xddd, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.03-5.98 (m, 1H, H-2´), 5.48-5.30 (m, 2H, H-7), 4.99-4.90 (m, 1H, H-4´), 4.36-4.14 (m, 3H, H-12, H-5´), 2.82-2.70 (m, 2H, H-8), 2.38 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 1.68, 1.62 (2xd, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}), 1.23, 1.22 (2xd, 3H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 174.2 (C-13), 170.9 (C-10), 163.7 (C_{het}-4), 150.6 (2xC_{het}-2), 147.6 (m, C-2), 137.6 (C-5), 135.6 (2xC_{het}-6), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 129.5 (2xC-4), 127.3, 127.2 (2xC-2´), 125.7, 125.6 (2xC-6), 120.8 (d, *J*= 9.4 Hz, C-1), 117.8, 117.7 (2xd, *J*= 9.0 Hz, C-3), 109.6 (C_{het}-5), 89.1 (C-1´), 84.0 (d, *J*= 7.7 Hz, C-4´), 68.4-68.1 (m, C-7, C-5´), 47.3 (C-12), 36.3 (C-9), 30.0 (C-8), 17.1 (Me), 11.9, 11.8 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.27 (D1), -9.30 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3432, 3071, 2935, 1691, 1498, 1458, 1289, 1252, 1205, 1027, 996; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 8.45; mp= 82 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.30; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 558.125 (M+Na^+); found 558.122; $C_{23}H_{26}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 535.44

5-(L-AlaOBn-*prop*)*cyclo*Sal-ACV^{DMTr}MP 107

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 95 mg N^2-Dimethoxytrityl-ACV (0.18 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Toluol coevaporiert und in 1 mL abs. DMF aufgenommen. Zu der Lösung wurden 46 µL abs. DIPEA (0.27 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und auf -25 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde nun 1 mL 5-(L-AlaOBn-*prop*)saligenylchlorphosphit (0.27 M in Toluol, 0.27 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde erneut auf -25 °C gekühlt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 49 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.27 mmol, 1.5 Äq.). Es wurde noch 10 min bei RT gerührt und dann die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Abschließende Reinigung erfolgte am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 3%.

Ausbeute: 40 mg (43 µmol, 24%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch



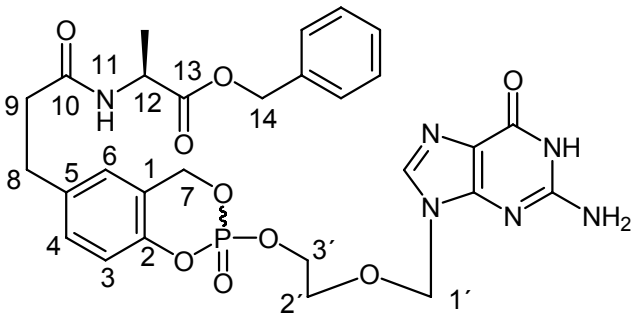
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.66 (s, 1H, NH_{het}-1), 8.35 (d, 1H, *J*= 6.8 Hz, NH-11), 7.67 (2xs, 2H, H_{het}-8, NH_{het}-2), 7.39-7.31 (m, 5H, H_{aryl}), 7.31-7.15 (m, 10H, H-DMT, H-4), 7.08 (m, 1H, H-6), 6.99 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.84 (d, 4H, *J*= 8.7 Hz, H-DMT),5.38 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 14.3 Hz, H-7a), 5.24 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 14.3 Hz , H-7b), 5.11 (s, 2H, H-14), 4.86 (s, 2H, H-1´), 4.35-4.29 (m, 1H, H-12), 3.90-3.80 (m, 2H, H-3´), 3.70 (s, 6H, OMe), 3.09-3.03 (m, 2H, H-2´), 2.80 (t, 2H, *J*= 7.3 Hz, H-8), 2.42 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 1.26 (d, 1H, *J*= 7.2 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 172.5 (C-13), 171.2 (C-10), 157.6 (2xC-O-DMT), 156.4 (C_{het} -6), 151.0 (C_{het}-2), 150.0 (C_{het}-4), 147.6 (d, *J*= 6.9 Hz, C-2), 144.9 (C-DMT), 137.7 (C_{het}-8), 137.4 (2xC-DMT), 136.8 (C-5), 136.0 (C_{aryl}),

129.6 (4xC-DMT), 129.3 (C-4), 128.3 (2xC-DMT), 128.2 (2xC_{aryl}), 127.9 (C-6), 127.6-127.5 (2xC-DMT, 2xC_{aryl}), 126.3 (C-DMT), 125.5 (C_{aryl}), 120.4 (d, *J*= 9.6 Hz, C-1), 117.8 (d, *J*= 8.9 Hz, C-3), 116.4 (C_{het}-5), 112.8 (4xC-DMT), 71.2 (C-1´), 69.1 (C-DMT), 68.2 (d, *J*= 7.0 Hz, C-7), 67.7 (d, *J*= 6.2 Hz, C-2´), 66.6 (d, *J*= 5.5 Hz, C-3´), 65.7 (C-14), 54.9 (OMe), 47.6 (C-12), 36.3 (C-9), 30.0 (C-8), 16.8 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.93; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3367, 3061, 2935, 1742, 1686, 1607, 1571, 1509, 1460, 1252, 1033; mp= 119-122 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.60; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 927.312 (M-H$^+$); found 927.318; $C_{49}H_{49}N_6O_{11}P$; Mol. Wt.: 928.92

5-(L-AlaOBn-*prop*)*cyclo*Sal-ACVMP 94a

Es wurden 36 mg 5-(L-AlaOBn-*prop*)*cyclo*Sal-ACV^{DMTr}MP (39 μmol) in 2 mL DCM gelöst und 0.3 mL TFA zugegeben. Nach 20 min Reaktionszeit wurde der Lösung 1 mL Methanol hinzugefügt und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 0 bis 10% gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 25 mg (40 μmol, 100%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch.



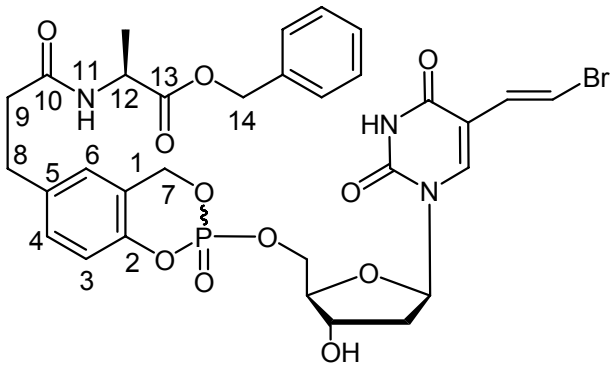
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.89 (s, 1H, NH_{het}-1), 8.38 (d, 1H, *J*= 6.4 Hz, NH-11), 7.77 (s, 1H, H_{het}-8), 7.42-7.39 (m, 5H, H_{aryl}), 7.17 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 1.6 Hz, H-4), 7.05 (d, 1H, *J*= 1.6 Hz, H-6), 6.98 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-3), 6.72 (s, 2H, NH_2), 5.41-5.28 (m, 2H, H-7), 5.33 (s, 2H, H-1´), 5.10 (s, 2H, H-14), 4.32-4.25 (dq, *J*= 7.4 Hz, *J*=6.4 Hz, 1H, H-12), 4.24-4.12 (m, 2H, H-3´), 3.65 (t, 2H, *J*= 4.1 Hz, H-2´), 2.77 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-8), 2.39 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-9), 1.26 (d, 1H, *J*= 7.3 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 172.6 (C-13), 171.3 (C-10), 156.8 (C_{het}-6), 154.1 (C_{het}-2), 151.4 (C_{het}-4), 147.7 (d, *J*= 7.2 Hz, C-2), 137.5 (C_{het}-8), 137.4 (C_{aryl}), 136.0 (C-5), 129.4 (C-4), 128.4 (2xC_{aryl}), 128.0 (C-6), 127.6 (2xC_{aryl}), 125.5 (C_{aryl}), 120.5 (C-1), 118.6 (C_{het}-5), 117.9 (d, *J*= 8.8 Hz, C-3),

71.7 (C-1´), 68.3 (d, *J*= 7.2 Hz, C-7), 67.3 (d, *J*= 6.2 Hz, C-2´), 66.8 (d, *J*= 5.4 Hz, C-3´), 65.8 (C-14), 47.7 (C-12), 36.3 (C-9), 30.0 (C-8), 16.8 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.78; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 1716, 1689, 1449, 1208, 1185, 1136, 1028, 977, 832, 721; UV (HPLC): λ_{max}= 251 nm, 273 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 13.67, 14.05; mp= 198 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.17; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 649.179 (M+Na$^+$); found 649.178; $C_{28}H_{31}N_6O_9P$; Mol. Wt.: 626.55

5-(L-AlaOBn-*prop*)*cyclo*Sal-BVdUMP 93a

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 60 mg BVdU (0.18 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Toluol coevaporiert und in 1 mL abs. DMF aufgenommen. Zu der Lösung wurden 46 µL abs. DIPEA (0.27 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und auf -25 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde nun 1 mL 5-(L-AlaOBn-*prop*)saligenylchlorphosphit (0.27 M in Toluol, 0.27 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde erneut auf -25 °C gekühlt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 49 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.27 mmol, 1.5 Äq.). Es wurde noch 10 min bei RT gerührt und dann die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 3%. Da das Produkt immer noch verunreinigt war, wurde erneut am Chromatotron getrennt, diesmal mit Ethylacetat und einem Methanol-Gradienten von 0- bis 1%. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 33 mg (45 µmol, 25%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9



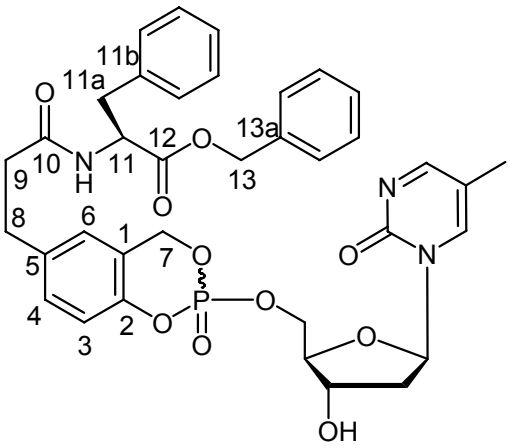
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.61 (s, 1H, NH_{het}), 8.31 (d, 1H, *J*= 7.0 Hz, NH-11), 7.80, 7.77 (2xs, 1H, H_{het}-6), 7.39-7.28 (m, 6H, H_{aryl}, BVU-H-8), 7.20-7.16 (m, 1H, H-4), 7.10-7.05 (m, 1H, H-6), 7.01, 6.99 (2xd, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-3), 7.90, 6.86 (2xd, 1H, *J*= 13.6 Hz, BVU-H-7), 6.16, 6.15 (2xdd, 1H, *J*= 6.6 Hz, *J*= 6.6 Hz, H-1´), 5.52-5.37 (m, 3H, H-7, OH), 5.11 (s, 2H, H-14), 4.40-4.20 (m, 4H, H-5´, H-12, H-3´), 3.95-3.92 (m, 1H, H-4´), 2.77 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-8), 2.39 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 2.22-2.12 (m, 2H, H-2´), 1.26 (d, 1H, *J*= 7.3 Hz, NH-11); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 172.5 (C-13), 171.1 (C-10), 161.5 (C_{het}-4), 149.1 (C_{het}-2), 147.6, 147.5 (2xd, *J*= 7.4 Hz, C-2), 139.3, 139.2 (C_{het}-6), 137.4 (C_{aryl}), 136.0 (C-5), 129.7 (BVU-C-7), 129.4 (C-4), 128.3 (2xC_{aryl}), 127.9 (C-6), 127.6 (2xC_{aryl}), 125.5 (C_{aryl}), 120.5 (d, *J*= 8.9 Hz, C-1), 117.8 (d, *J*= 8.7 Hz, C-3), 110.1 (C_{het}-5), 106.9 (BVU-C-8), 84.6 (C-4´), 84.4, 84.3 (2xC-1´), 69.6, 69.5 (2xC-3´), 68.4, 68.3 (2xd, *J*= 7.0 Hz, 2xC-7), 67.6 (m, C-5´), 65.7 (C-14), 47.6 (C-12), 38.6 (C-2´), 36.2 (C-9), 30.0 (C-8), 16.8 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.46 (D1), -9.54 (D2); UV (HPLC): λ_{max}= 292 nm, 250 nm; HPLC, Methode 4: t_R [min]= 11.73, 11.84; mp= 103 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.33; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 756.093 (M+Na$^+$); found 756.091; $C_{31}H_{33}BrN_3O_{11}P$; Mol. Wt.: 734.48

5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP 112g

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 35 mg dm^{5}K (0.15 mmol, 1.0 Äq) wurden in 0.5 mL abs. THF und 0.5 mL abs. DMF gelöst und auf -20 °C gekühlt. Zu dieser Mischung wurden 40 µL abs. DIPEA (0.23 mmol, 1.5 Äq) gegeben und innerhalb von 30 min 80 mg 5-(L-PheOBn-*prop*)saligenylchlorphosphit (gelöst in 1 mL abs. Toluol, 0.17 mmol, 1.1 Äq) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und noch eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung erneut auf - 20 °C abgekühlt und 40 µL *tert*-BuOOH (5.5 M Lösung in *n*-Decan, 0.22 mmol, 1.5 Äq) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Mischung nochmals eine Stunde

gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde zweimal am Chromatotron gereinigt (DCM/MeOH-Gradient 0 bis 3%) und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 15 mg (21 μmol, 14%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9

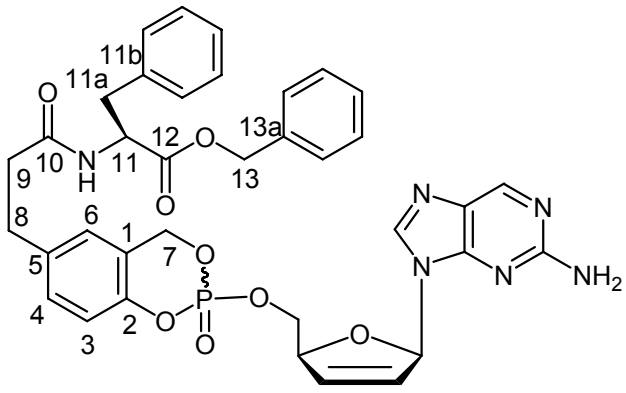


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.45, 8.42 (2xd, 1H, *J*= 3.3 Hz, H_{het}-4), 8.38 (2xd, 1H, *J*= 7.4 Hz, NH), 7.95, 7.93 (2xdd, 1H, *J*= 3.3 Hz, *J*= 0.8 Hz, H_{het}-6), 7.38-7.14 (m, 10H, H-aryl), 7.13-7.08 (m, 1H, H-4), 7.04-7.00 (m, 1H, H-6), 6.96 (2xd, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 6.08 (2xdd, 1H, *J*= 6.5 Hz, *J*= 6.5 Hz, H-1´), 5.48 (2xd, 1H, *J*= 4.0 Hz, OH), 5.46-5.30 (m, 2H, H-7), 5.09, 5.04 (2xd, 2H, *J*= 12.6 Hz, H-13), 4.55-4.46 (m, 1H, H-11), 4.45-4.25 (m, 2H, H-5´), 4.23-4.16 (m, 1H, H-3´), 4.08-4.02 (m, 1H, H-4´), 3.02 (dd, 1H, *J*= 5.8 Hz, *J*= 13.8 Hz, H-11a), 2.88 (dd, 1H, *J*= 9.0 Hz, *J*= 13.5 Hz, H-11a), 2.69 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-8), 2.35 (t, 2H, *J*= 7.9 Hz, H-9), 2.38-2.29 (m, 1H, H-2´), 2.06-1.92 (m, 1H, H-2´), 1.99, 1.95 (2xd, 3H, *J*= 0.5 Hz, CH_3); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.6 (C-10), 171.4 (C-12), 167.8 (2xC_{het}-4), 154.2 (C_{het}-2), 147.7-147.6 (m, C-2), 141.2, 141.1 (2xC_{het}-6), 137.5 (C-5), 137.1 (C-11b), 135.8 (C-13a), 129.5 (2xC-4), 129.1, 128.4, 128.2, 128.0, 127.8, 126.5 (10xC_{aryl}), 125.6 (2xC-6), 120.5 (2xd, *J*= 9.2 Hz, C-1), 117.9 (2xd, *J*= 8.4 Hz, C-3), 112.4 (2xC_{het}-5), 86.9 (2xC-1´), 85.2 (2xd, *J*= 7.6 Hz, C-4´), 69.8, 69.7 (2xC-3´), 68.5, 68.4 (2xd, *J*= 6.9 Hz, C-7), 67.6-67.5 (m, C-5´), 66.0 (C-13), 53.7 (C-11), 40.3 (C-2´), 36.7 (C-11a), 36.3 (C-9), 30.0 (C-8), 13.6 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-entkoppelt, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.38 (D1), -9.46 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3421, 2929, 1741, 1659, 1619, 1530, 1498, 1291, 1206, 1029; mp= 117 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.38; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 726.219 (M+Na^+); found 726.219; $C_{36}H_{38}N_3O_{10}P$; Mol. Wt.: 703.67

5-(L-PheOBn-*prop*)*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP 111e

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 40 mg *iso*-d4A (0.17 mmol, 1.0 Äq) wurden in 0.5 mL abs. THF und 0.5 mL abs. DMF gelöst und auf -20 °C gekühlt. Zu dieser Mischung wurden 40 µL abs. DIPEA (0.23 mmol, 1.3 Äq) gegeben und innerhalb von 30 min 86 mg 5-(L-PheOBn-*prop*)saligenylchlorphosphit (gelöst in 1 mL abs. Toluol, 0.18 mmol, 1.1 Äq) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und noch eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung erneut auf - 20 °C abgekühlt und 40 µL *tert*-BuOOH (5.5 M Lösung in *n*-Decan, 0.22 mmol, 1.3 Äq) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Mischung nochmals eine Stunde gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (DCM/MeOH-Gradient 0 bis 2%) und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 25 mg (35 µmol, 21%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9



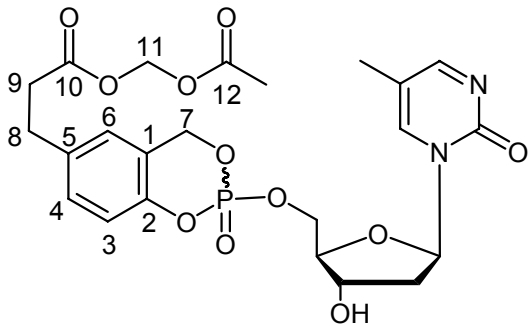
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.60, 8.58 (2xs, 1H, H_{het}-6), 8.38 (2xd, 1H, *J*= 7.8 Hz, NH), 7.85, 7.80 (2xs, 1H, H-8), 7.40-7.13 (m, 10H, H-aryl), 7.12-7.01 (m, 1H, H-4), 7.00-6.80 (m, 3H, H-6, H-3, H-1´), 6.58, 6.57 (2xs, 2H, NH_2), 6.46, 6.42 (2xddd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 1.5 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 6.24-6.17 (m, 1H, H-2´), 5.40-5.20 (m, 2H, H-7), 5.09, 5.05 (2xd, 2H, *J*= 12.6 Hz, H-13), 5.07-5.01 (m, 1H, H-4´), 4.55-4.47 (m, 1H, H-11), 4.37-4.20 (m, 2H, H-5´), 3.02 (dd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*= 13.8 Hz, H-11a), 2.88 (dd, 1H, *J*= 9.3 Hz, *J*= 13.8 Hz, H-11a), 2.68 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, H-8), 2.35 (t, 2H, *J*= 7.8 Hz, H-9); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 171.9 (C-10), 171.8 (C-12), 161.0 (C_{het}-2), 153.0 (2xC_{het}-4), 149.8, 149.7 (2xC_{het}-6), 147.9 (2xd, *J*= 7.6 Hz, C-2), 140.3 (2xC_{het}-8), 137.8, 137.7 (2xC-5), 137.4 (C-11b), 136.1 (C-13a), 132.8, 132.7 (2xC-3´), 129.8, 129.7 (2xC-4), 129.4, 128.7,

128.6, 128.4, 128.2 (10xC_{aryl}), 127.3 (2xC_{het}-5), 126.9 (2xC-2´), 125.8 (C-6), 120.9, 120.7 (2xd, *J*= 9.9 Hz, C-1), 118.3 (2xd, *J*= 8.4 Hz, C-3), 87.6 (2xC-1´), 85.2 (2xd, *J*= 6.9 Hz, H-4´), 69.0-68.5 (m, C-7, C-5´), 66.3 (C-13), 54.0 (C-11), 37.0 (C-11a), 36.7 (C-9), 30.4 (C-8); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.57 (D1), -9.80 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3334, 3063, 2932, 1740, 1656, 1614, 1577, 1498, 1426, 1205, 1030; UV (HPLC): λ_{max}= 305 nm, 245 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 16.75; mp= 117 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.38; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 733.215 (M+Na^+); found 733.215; $C_{36}H_{35}N_6O_8P$; Mol. Wt.: 710.67

5-(AM-*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP 112f

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 50 mg dm^{5}K (0.22 mmol, 1.0 Äq) wurden zweimal mit abs. Toluol coevaporiert, in 2 mL abs. Acetonitril und 1.5 mL abs. DMF gelöst und auf -20 °C gekühlt. Zu dieser Mischung wurden 61 µL abs. DIPEA (0.35 mmol, 1.6 Äq) gegeben und innerhalb von 30 min 0.10 g 5-(AM-*prop*)saligenylchlorphosphit (gelöst in 0.4 mL abs. Acetonitril, 0.31 mmol, 1.4 Äq) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und noch eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung erneut auf - 20 °C abgekühlt und 80 µL *tert*-BuOOH (5.5 M Lösung in *n*-Decan, 0.44 mmol, 2.0 Äq) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Mischung drei Stunden gerührt. Nun wurde die gesamte Reaktionslösung auf 50 mL DCM (+0.2 mL HOAc) gegeben und zweimal mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann noch einmal mit DCM extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf ca. 2 mL entfernt. Diese wurden direkt auf das Chromatotron aufgetragen und mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 10% chromatographiert. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 28 mg (52 µmol, 24%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes als Diastereomerengemisch.

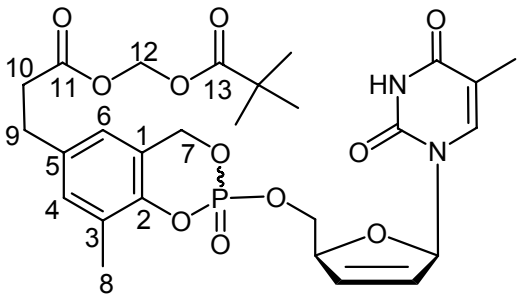


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm = 8.47, 8.44 (2xd, 1H, *J*= 3.2 Hz, H_{het}-4), 7.96, 7.94 (2xdd, 1H, *J*= 0.7 Hz, *J*= 3.2 Hz, H_{het}-6), 7.26-7.20 (m, 1H, H-4), 7.15-7.12 (m, 1H, H-6), 7.03 (2xd, 1H, *J*= 8.3 Hz, H-3), 6.09, 6.08 (2xdd, 1H, *J*= 6.3 Hz, *J*= 6.3 Hz, H-1´), 5.65 (2xs, 2H, H-11), 5.51-5.35 (m, 3H, OH, H-7), 4.45-4.27 (m, 2H, H-5´), 4.24-4.16 (m, 1H, H-3´), 4.08-4.02 (m, 1H, H-4´), 2.82 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, H-8), 2.68 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, H-9), 2.38-2.29 (m, 1H, H-2´), 2.08-1.99 (m, 1H, H-2´), 2.05 (2xs, 3H, Ac), 2.00, 1.96 (2xm, 3H, Me_{het}); ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm = 172 (C-10), 170 (C-12), 167.7 (2xC_{het}-4), 153.7 (C_{het}-2), 149 (C-2), 141.1, 140.0 (2xC_{het}-6), 136.4 (C-5), 129.6 (C-4), 125.7, 125.6 (2xC-6), 122 (C-1), 118.0, 117.9 (2xC-3), 112.3, 112.2 (2xC_{het}-5), 86.8, 86.7 (2xC-1´), 85.0 (2xC-4´), 79 (C-11), 69.7, 69.6 (C-3´), 68.3-68.2 (m, C-7), 67.5-67.2 (m, C-5), 40.2 (C-2´), 34.3 (C-9), 28.9 (C-8), 20.4 (CH_3), 13.5, 13.4 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6) δ/ppm = -9.31 (D1), -9.38 (D2); UV (HPLC): λ_{max}= 316 nm, 276 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 12.78; R_f (DCM/MeOH 4:1 v/v)= 0.58; $C_{23}H_{27}N_2O_{11}P$; Mol. Wt.: 538.44

3-Methyl-5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-d4TMP 56

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 52 mg d4T (0.23 mmol, 1.5 Äq.) zweimal mit je 2 mL abs. Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in 1 mL abs. DMF aufgenommen, auf -40 °C gekühlt und mit 40 µL abs. DIPEA (0.23 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. 60 mg 3-Methyl-5-(POM-*prop*)saligenylchlorphosphit (0.15 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 0.5 mL abs. Acetonitril, wurden über einen Zeitraum von 10 min hinzugetropft. Danach wurde die Kühlung entfernt und 1 h bei RT gerührt. Nun wurden bei -20 °C 70 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.39 mmol, 2.6 Äq.) zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nachfolgend wurde 1.5 h bei RT gerührt. Die gesamte Reaktionslösung wurde auf 50 mL DCM (+0.2 mL HOAc) gegeben und zweimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt, bis ca. 2 mL Flüssigkeit verblieben. Diese wurden direkt auf das Chromatotron aufgetragen und mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 5% chromatographiert. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 55 mg (93 μmol, 61%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9



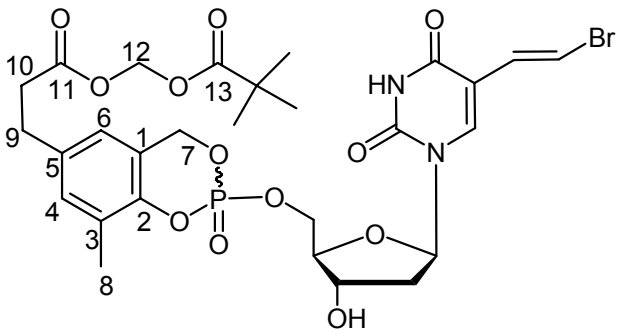
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.00 (s, 1H, NH), 7.22 (2xd, 1H, *J*= 1.3 Hz, H_{het}-6), 7.02-7.01 (m, 1H, H-4), 7.00-6.98 (m, 1H, H-1´), 6.77-6.75 (m, 1H, H-6), 6.39, 6.35 (2xdd, 1H, *J*= 6.1 Hz, *J*= 3.5 Hz, H-3´), 5.94-5.92 (m, 1H, H-2´), 5.74 (2xs, 2H, H-12), 5.35-5.18 (m, 2H, H-7), 5.03-4.99 (m, 1H, H-4´), 4.46-4.27 (m, 2H, H-5´), 2.88 (2xt, 2H, *J*= 7.5 Hz, H-9), 2.64 (2xt, 2H, *J*= 7.4 Hz, H-10), 2.25, 2.21 (2xs, 3H, H-8), 1.79, 1.68 (2xd, 3H, *J*= 1.2 Hz, Me_{het}), 1.19 (s, 9 H, *t*-Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 180.0 (C-13), 176.0 (C-11), 165 (C_{het}-4), 151 (C_{het}-2), 147 (C-2), 135.9, 135.6 (2x C_{het}-6), 133.1 (C-3´), 132.9 (C-5), 131.6 (C-4), 127.9 (C-2´), 128.0 (C-3), 123.0 (C-6), 121 (C-1), 112 (C_{het}-5), 89.9 (C-1´), 84.7 (d, *J*= 7.0 Hz, C-4´), 80 (C-12), 70 (C-7), 69 (C-5´), 40 (C-*t*Bu), 37 (C-10), 29.9, 29.8 (2xC-9), 27.0 (CH_3-*t*Bu), 17.4 (C-8), 13.9 (2xMe_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-entkoppelt, $CDCl_3$)δ/ppm= -7.52 (D1), -7.84 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3433, 2927, 1751, 1701, 1284, 1112, 1030, 992; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 3: t_R [min]= 14.51; mp= 62 °C; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.28; MS (HR-FAB): calcd. 593.190 ($M+H^+$); found 593.191; $C_{27}H_{33}N_2O_{11}P$; Mol. Wt.: 592.53

3-Methyl-5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-BVdUMP 57

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 77 mg BVdU (0.23 mmol, 1.5 Äq.) zweimal mit je 1 mL abs. Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in 1 mL abs. DMF aufgenommen, auf -40 °C gekühlt und mit 40 µL abs. DIPEA (0.23 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. 60 mg 3-Methyl-5-(POM-*prop*)saligenylchlorphosphit (0.15 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 0.5 mL abs. Acetonitril, wurden über einen Zeitraum von 15 min hinzugetropft. Danach wurde die Kühlung entfernt und 1 h bei RT gerührt. Nun wurden bei -20 °C 70 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.39 mmol, 2.6 Äq.) zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nachfolgend wurde 1.5 h bei RT gerührt. Die gesamte Reaktionslösung wurde auf 50 mL DCM (+0.2 mL HOAc) gegeben und dreimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt, bis ca.

2 mL Flüssigkeit verblieben. Diese wurden direkt auf das Chromatotron aufgetragen und mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 5% chromatographiert. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 37 mg (53 μmol, 35%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9



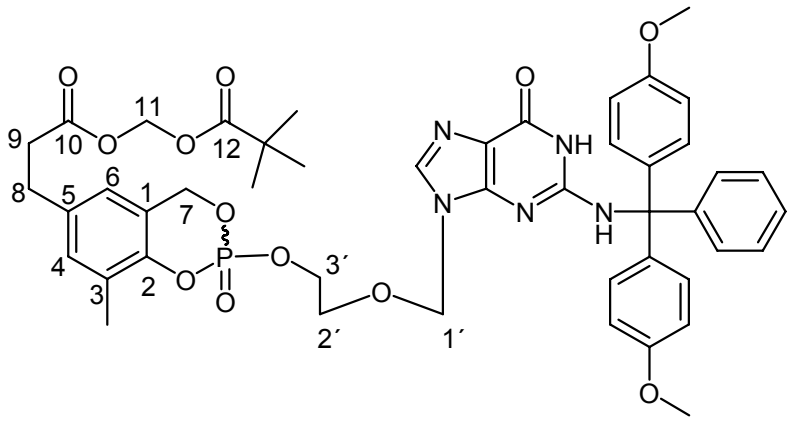
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.59 (s, 1H, NH), 7.77, 7.76 (2xs, 1H, H_{het}-6), 7.28 (2xd, 1H, *J*= 13.5 Hz, H-BVU-7), 7.11, 7.10 (2xs, 1H, H-6), 6.93 (2xs, 1H, H-4), 6.87, 6.86 (2xd, 1H, *J*= 13.5 Hz, H-BVU-8), 6.15 (2xdd, 1H, *J*= 6.6 Hz, H-1´), 5.68 (s, 2H, H-12), 5.47-5.32 (m, 3H, H-7, OH), 4.39-4.21 (m, 3H, H-5´, H-3´), 3.94-3.91 (m, 1H, H-4´), 2.77 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, H-9), 2.68 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, H-10), 2.19-2.15 (m, 5H, H-2´, H-8), 1.09 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 178.6 (C-13), 173.5 (C-11), 162 (C_{het}-4), 150 (C_{het}-2), 147.2 (C-2), 139.2 (C_{het}-6), 132 (C-5), 130.7 (C-6), 130 (C-1), 129.7 (C-BVU-8), 128 (C-3), 123.1 (C-4), 110.1 (C_{het}-5), 106.9 (C-BVU-7), 84.6, 84.4 (C-1´,C-4´), 80 (C-12), 70.1 (C-3´), 69.7 (C-7), 69.6 (C-5´), 40 (C-*t*Bu), 38.3 (C-2´), 34.3 (C-10), 28.9 (C-9), 26.4 (CH_3-*t*Bu), 14.8 (C-8); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -8.83 (D1), -8.93 (D2); UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 3: t_R [min]= 15.87; R_f (DCM/MeOH 20:1 v/v)= 0.10; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 723.093 (M+Na$^+$); found 723.091; $C_{28}H_{34}BrN_2O_{12}P$; Mol. Wt.: 701.45

3-Methyl-5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-ACV^{DMTr}MP 74

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.12 g ACV^{DMTr} (0.23 mmol, 1.5 Äq.) einmal mit 1 mL abs. Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in 1 mL abs. DMF aufgenommen, auf -20 °C gekühlt und mit 52 µL abs. DIPEA (0.31 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. 60 mg 3-Methyl-5-(POM-*prop*)saligenylchlorphosphit (0.15 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 0.6 mL abs. THF, wurden über einen Zeitraum von 10 min hinzugetropft. Danach wurde die Kühlung entfernt und 1.5 h bei RT gerührt. Nun wurden bei -20 °C 70 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan,

0.39 mmol, 2.6 Äq.) zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nachfolgend wurde 2 h bei RT gerührt. Die gesamte Reaktionslösung wurde auf 50 mL DCM (+0.2 mL HOAc) gegeben, einmal mit ges. Natriumchloridlösung und zweimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt, bis ca. 1 mL Flüssigkeit verblieb. Diese wurde direkt auf das Chromatotron aufgetragen und mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 1 bis 5% chromatographiert. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 48 mg (54 μmol, 36%) eines farblosen Feststoffes als Enantiomerengemisch.

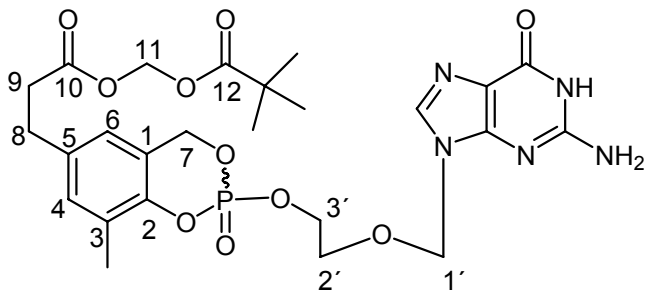


^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm = 11.27 (s, 1H, NH), 7.71 (s, 1H, NH), 7.33-7.30 (m, 2H, H_{DMT}), 7.26-7.22 (m, 4H, H_{DMT}), 7.20-7.08 (m, 4H, H_{het}-8, H_{DMT}), 6.99 (s, 1H, H-4), 6.75-6.66 (m, 5H, H_{DMT}, H-6), 5.71 (s, 2H, H-11), 5.22 (dd, 2H, *J*= 13.2Hz, *J*= 16.3Hz, H-7), 4.86 (s, 2H, H-1´), 4.10-3.90 (m, 2H, H-3´), 3.70 (s, 6H, OMe), 3.20-3.10 (m, 2H, H-2´), 2.86 (t, 2H, *J*= 6.9Hz, H-8), 2.63 (t, 2H, *J*= 6.9Hz, H-9), 2.23 (s, 3H, Me), 1.18 (s, 9H, *t*-Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm = 177.1 (C-12), 171.2 (C-10), 158.7 (C_{het}-6), 158.2 (2xC-O-DMT), 151.6 (C_{het}-2), 150.9 (C_{het}-4), 147.2 (d, *J*= 7.1 Hz, C-2), 144.9 (C-DMT), 136.9 (2xC-DMT), 135.7 (C-5), 131.0 (C-4), 130.1 (4xC-DMT), 128.7 (2xC-DMT), 127.9 (d, *J*= 8.2 Hz, C-3), 127.7 (2xC-DMT), 126.6 (C-DMT), 122.6 (C-6), 120.5 (d, *J*= 9.4 Hz, C-1), 116.7 (C_{het}-5), 113.0 (4xC-DMT), 79.6 (C-11), 71.9 (C-1´), 70.1 (C-DMT), 68.5 (d, *J*= 6.8 Hz, C-7), 68.2 (d, *J*= 6.6 Hz, C-2´), 67.0 (d, *J*= 5.6 Hz, C-3´), 55.1 (2xOMe), 38.7 (C-*t*Bu), 35.3 (C-9), 29.6 (C-8), 26.8 (CH_3-*t*Bu), 15.3 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$) δ/ppm = -8.56; R_f (DCM/MeOH 9:1 v/v)= 0.46; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 918.309 (M+Na^+); found 918.310; $C_{46}H_{50}N_5O_{12}P$; Mol. Wt.: 895.89

3-Methyl-5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-ACVMP 58

Es wurden 44 mg 3-Methyl-5-(POM-*prop*)*cyclo*Sal-ACV^{DMTr}MP (49 μmol) in 5 mL Ethanol gelöst und mit 0.5 mL TFA versetzt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit DCM und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 15% gereinigt. Da das Produkt noch Verunreinigungen aufwies, wurde es erneut am Chromatotron, dieses mal mit Ethylacetat und einem Methanol-Gradienten von 0 bis 10% abschließend gereinigt. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 29 mg (49 μmol, 100%) eines farblosen Feststoffes als Enantiomerengemisch.

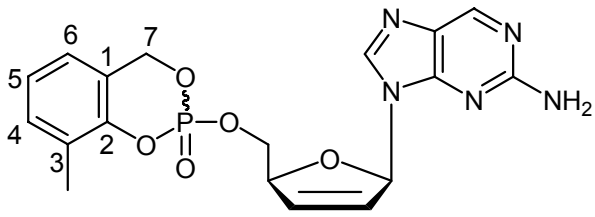


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 10.62 (s, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, H-8_{het}), 7.11 (d, 1H, *J*= 1.4Hz, H-4), 6.92 (d, 1H, *J*= 1.4Hz, H-6), 6.50 (s, 2H, NH_2), 5.68 (s, 2H, H-11), 5.33 (s, 2H, H-1´), 5.40-5.24 (m, 2H, H-7), 4.24-4.10 (m, 2H, H-3´), 3.65 (t, 2H, *J*= 4.3Hz, H-2´), 2.78 (t, 2H, *J*= 7.1Hz, H-8), 2.69 (t, 2H, *J*= 7.1Hz, H-9), 2.15 (s, 3H, Me), 1.09 (s, 9H, *t*-Bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm = 177.1 (C-12), 171.2 (C-10), 157.1 (C_{het}-6), 153.4 (C_{het}-2), 151.5 (C_{het}-4), 147.1 (d, *J*= 6.9 Hz, C-2), 137.9 (C_{het}-8), 135.9 (C-5), 131.0 (C-4), 127.8 (d, *J*= 8.5 Hz, C-3), 122.7 (C-6), 120.7-120.5 (m, C-1), 116.8 (C_{het}-5), 79.6 (C-11), 72.8 (C-1´), 68.9-68.0 (m, C-2´, C-3´, C-7), 38.7 (C-*t*Bu), 35.2 (C-9), 29.6 (C-8), 26.8 (CH_3-*t*Bu), 15.3 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= -8.51; IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3448, 3193, 2975, 2728, 1755, 1730, 1630, 1485, 1109, 1032, 988; UV (HPLC): λ_{max}= 251 nm, 271 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 15.23; mp= 105-109 °C; R_f (EE/MeOH 4:1 v/v)= 0.29; MS (HR-FAB): calcd. 594.197 ($M+H^+$); found 594.203; $C_{25}H_{32}N_5O_{10}P$; Mol. Wt.: 593.52

3-Methyl-*cyclo*Sal-*iso*-d4AMP 111c

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 70 mg *iso*-d4A (0.30 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Toluol coevaporiert und der Rückstand in 3 mL abs. Acetonitril sowie 3 mL abs. DMF aufgenommen. Zu der Lösung wurden 73 µL abs. DIPEA (d= 0.742 g/mL, 54 mg, 0.42 mmol, 1.4 Äq.) gegeben und auf -40 °C gekühlt. Nun wurden 73 mg 3-Methylsaligenylchlorphosphit (0.36 mmol, 1.2 Äq.), gelöst in 0.11 mL abs. Acetonitril, langsam zugetropft. Nach 1.5 h bei -20 °C wurden der Lösung einige Körner aktivierten Molsiebs 0.3 nm beigegeben und bei -40 °C mit 71 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.39 mmol, 1.3 Äq.) oxidiert. Nach einer Stunde bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Gemisch zunächst am Chromatotron mit Ethylacetat und einem Methanol-Gradienten von 10 bis 20% gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereint, im Vakuum getrocknet und erneut chromatographiert. Diesmal wurde DCM mit einem Methanol-Gradienten von 5 bis 10% verwendet. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 37 mg (89 µmol, 30%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:1.0
Es konnten 30 mg Edukt reisoliert werden.



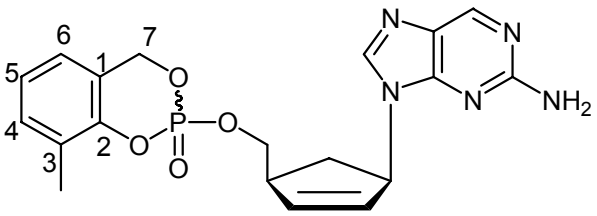
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 8.59, 8.57 (2xs, 1H, H_{het}-6), 7.82, 7.81 (2xs, 1H, H_{het}-8), 7.25-7.17 (m, 1H, H-6), 7.09-6.98 (m, 2H, H-5, H-4), 6.86-6.82 (m, 1H, H-1´), 6.58, 6.57 (2xs, 2H, NH_2), 6.48, 6.43 (2xddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 6.25-6.20 (m, 1H, H-3´), 5.50-5.21 (m, 2H, H-7), 5.10-5.03 (m, 1H, H-4´), 4.37-4.21 (m, 2H, H-5´), 2.20, 2.13 (2xs, 3H, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 160.6 (C_{het}-2), 152.6 (C_{het}-4), 149.3 (2xC_{het}-6), 147.7 (C_{het}-2), 139.8, 139.7 (2xC_{het}-8), 132.4, 132.3 (2xC-2´), 130.8 (C-4), 126.9 (C_{het}-5), 126.8 (2xd, *J*= 2.5 Hz, 2xC-3), 126.5 (2xC-3´), 123.9 (C-6), 123.5, 123.4 (C-5), 120.8, 120.6 (2xd, *J*= 9.5 Hz, 2xC-1), 87.1 (C-1´), 84.9, 84.8 (2xd, *J*= 8.1 Hz, 2xC-4´), 68.4-68.0 (m, C-5´, C-7), 14.9, 14.7 (2xCH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -9.00 (D1), -9.31 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3338, 3206, 2925, 1614, 1578, 1472, 1427, 1292, 1191, 1025, 944; UV (HPLC): λ_{max}= 243 nm, 305 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]=

11.41; mp= 95-97 °C; R_f (EE/MeOH 4:1 v/v)= 0.36; MS (HR-ESI$^+$): calcd. 438.094 (M+Na$^+$); found 438.094; $C_{18}H_{18}N_5O_5P$; Mol. Wt.: 415.34

3-Methyl-*cyclo*Sal-*carba-iso*-d4AMP 137

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 49 mg *carba-iso*-d4A (0.21 mmol, 1.0 Äq.) in 0.5 mL abs. Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden drei Kügelchen Molsieb 0.4 nm gegeben und auf -40 °C gekühlt. Es wurde eine weitere Lösung, bestehend aus 83 mg 3-Methylsaligenylphosphorchloridat (0.38 mmol, 1.8 Äq.) in 0.5 mL abs. THF, zu dem Nucleosid über einen Zeitraum von einer Stunde getropft. Die Reaktion wurde 4.5 h bei -40 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 2 bis 20%. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 71 mg (0.17 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:0.9

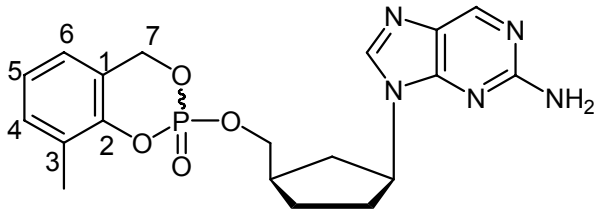


^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)δ/ppm= 8.57 (s, 1H, H$_{het}$-6), 7.85, 7.84 (2xs, 1H, H$_{het}$-8), 7.24-7.16 (m, 1H, H-4), 7.10-6.99 (m, 2H, H-6, H-5), 6.47 (s, 2H, NH$_2$), 6.09-6.02 (m, 1H, H-3´), 5.99-5.93 (m, 1H, H-2´), 5.52-5.30 (m, 1H, H-1´, H-7), 4.31-4.11 (m, 2H, H-6´), 3.18-3.06 (m, 1H, H-4´), 2.72-2.60 (m, 1H, H-5´), 2.20, 2.16 (2xs, 3H, CH$_3$), 1.65-1.53 (m, 1H, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, CDCl$_3$)δ/ppm= 159.7 (2xC$_{het}$-2), 152.7 (C$_{het}$-4), 149.4, 149.3 (2xC$_{het}$-6), 148.4 (2xC-2), 141.7, 141.5 (2xC$_{het}$-8), 136.8, 136.7 (2xC-3´), 131.3, 131.1 (2xC-4), 130.4 (2xC-2´), 127.8 (2xd, *J*= 6.2 Hz, C-3), 127.3 (C$_{het}$-5), 124.1-123.8 (m, C-6), 123.1-122.7 (m, C-5), 120.5 (d, *J*= 9.9 Hz, C-1), 69.8, 69.6 (2xd, *J*= 5.9 Hz, C-6´), 68.8 (2xd, *J*= 6.6 Hz, C-7), 59.8 (C-1´), 45.7 (d, *J*= 7.0 Hz, C-4´), 33.3, 33.1 (2xC-5´), 15.3 (CH$_3$); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d$_6$)δ/ppm= -9.19 (D1), -9.25 (D2); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3334, 3210, 2952, 1613, 1578, 1472, 1428, 1293, 1191, 1019, 939; UV (HPLC): λ_{max}= 243 nm, 305 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 13.11, 13.46; mp= 135-140 °C; MS (HR-FAB): calcd. 414.133 (M+H$^+$); found 414.132; $C_{19}H_{20}N_5O_4P$; Mol. Wt.: 413.37

3-Methyl-*cyclo*Sal-*carba*-*iso*-ddAMP 136

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 50 mg *carba*-*iso*-ddA (0.21 mmol, 1.0 Äq.) in 0.5 mL abs. Pyridin und 0.2 mL abs. THF gelöst. Zu der Lösung wurden drei Kügelchen Molsieb 0.4 nm gegeben und auf -40 °C gekühlt. Es wurde eine weitere Lösung, bestehend aus 73 mg 3-Methylsaligenylphosphorchloridat (0.34 mmol, 1.6 Äq.) in 0.5 mL abs. THF, zu dem Nucleosid über einen Zeitraum von einer Stunde getropft. Die Reaktion wurde 4.5 h bei -40 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produktes erfolgte am Chromatotron mit DCM und einem Methanolgradienten von 2 bis 20%. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Ausbeute: 62 mg (0.15 mmol, 71%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1.0:1.0



^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 8.73 (s, 1H, H_{het}-6), 7.83, 7.82 (2xs, 1H, H_{het}-8), 7.20-7.13 (m, 1H, H-4), 7.05-6.98 (m, 1H, H-6), 6.95-6.88 (m, 1H, H-5), 5.41-5.24 (m, 4H, NH_2, H-7), 4.80-4.70 (m, 1H, H-1´), 4.40-4.25 (m, 2H, H-6´), 2.58-2.47 (m, 1H, H-4´), 2.45-2.35 (m, 1H, H-5´),2.28, 2.24 (2xs, 3H, CH_3), 2.27-2.09 (m, 2H, H-2´), 2.03-1.77 (m, 3H, H-3´, H-5´); ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$)δ/ppm= 159.5 (C_{het}-2), 153.0 (C_{het}-4), 149.6 (2xC_{het}-6), 148.7 (2xC-2), 140.9 (C_{het}-8), 131.3, 131.1 (2xC-4), 127.9, 127.8 (C_{het}-5, C-3), 124.0-123.7 (m, C-6), 123.0-122.5 (m, C-5), 120.6-120.5 (m, C-1), 71.5, 71.3 (2xd, *J*= 6.0 Hz, C-6´), 68.6 (2xd, *J*= 6.3 Hz, C-7), 55.9 (2xC-1´), 38.1, 38.0 (2xd, *J*= 6.9 Hz, C-4´), 34.2, 34.1 (2xC-5´), 31.1 (C-2´), 26.6 (C-3´), 15.4, 15.3 (CH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$)δ/ppm= -8.22 (D1), -8.27 (D2); UV (HPLC): λ_{max}= 243 nm, 305 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 14.13, 13.46; mp= 118 °C; MS (HR-FAB): calcd. 416.149 ($M+H^+$); found 416.149; $C_{19}H_{22}N_5O_4P$; Mol. Wt.: 415.38

10.2.8.2 Synthese von *cyclo*Sal-Diphosphat-Prodrugs

Vorbemerkung: Bei den im Folgenden beschriebenen Synthesen musste zunächst ein gewisser Lernprozess durchschritten werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die einzelnen Synthesen besser funktioniert hätten, wären die kleinen Feinheiten, die zu beachten sind, von Anfang an bekannt gewesen. Da keine der Verbindungen rein erhalten wurde, sind nur die ^{31}P-NMR-Spektren beschrieben. Hier konnte die Entstehung der Verbindungen gezeigt und mit Massenspektren untermauert werden. Alle Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt.

Ammonium-3-methyl-*cyclo*Sal-AZTDP 148a

Variante 1: Es wurden 0.30 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (0.36 mmol, 1.0 Äq.) je dreimal mit abs. Pyridin und abs. Toluol coevaporiert und in 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Es wurden nun 0.10 g dest. 3-Methylsaligenylchlorphosphit (0.50 mmol, 1.4 Äq.), gelöst in 0.5 mL abs. Acetonitril, zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurden noch 8 mg DMAP (70 μmol, 0.2 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde drei Tage gerührt. Oxidation erfolgte durch Zugabe von 80 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.43 mmol, 1.2 Äq.). Nach 24 h wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 1 mL DMF aufgenommen und über eine RP-18 Säule mit reinem Wasser und einem Acetonitril-Gradienten von 0 bis 100% gereinigt. Es konnten 25 mg aus einer Fraktion isoliert werden, die geringe Mengen an Produkt enthielt.

Variante 2: s. *Variante 1*; es wurden 3 mL DMF als Lösungsmittel verwendet. Auch hier konnten nicht nennenswerte Mengen verunreinigten Produktes isoliert werden.

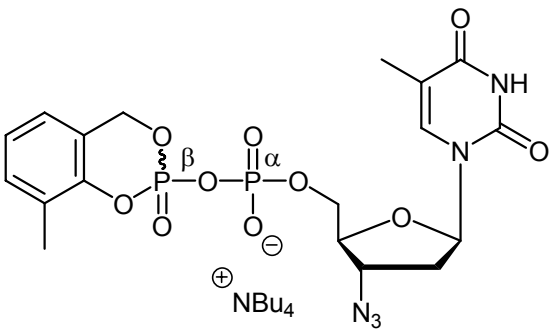
Variante 3: *s. Variante 2*; Das Nucleosid wurde vor dem Coevaporieren in 2 mL abs. Acetonitril gelöst und 2 h über Molsieb 0.3 nm getrocknet. Zur Oxidation wurden 1.7 Äq. *t*-BuOOH verwendet. Die Menge an Produkt wurde durch dieses Vorgehen leicht verbessert. Von dem P(III)-Intermediat wurden ^{31}P-NMR-Spektren aufgenommen, die zeigten, dass die Kupplung vermutlich mit relativ guten Ausbeuten verlief, wenn das Nucleosid vorher über Molsieb getrocknet wurde. Bei der Oxidation traten dann allerdings erhebliche Nebenreaktionen auf.

Variante 4: Die Oxidation wurde mit über P_2O_5 getrocknetem Sauerstoff durchgeführt. Es konnte kein Produkt isoliert werden.

Variante 5: Es wurden 0.26 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (0.31 mmol, 1.0 Äq.) viermal mit abs. Pyridin coevaporiert. Der Rückstand wurde in 2.7 mL abs. DMF und 0.3 mL abs. Pyridin aufgenommen und einige Kügelchen Molsieb 0.4 nm zugegeben. Die Lösung wurde auf -50 bis -60 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden über einen Zeitraum von 3.5 h 0.42 mL 3-Methyl-saligenylphosphorchloridat (1.2 M Stammlösung in abs. Toluol, 0.50 mmol, 1.6 Äq.) zugetropft und dann 2 weitere Stunden bei -35 °C gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und anschließend zweimal mit abs. Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in abs. Acetonitril aufgenommen und von dem Molsieb abpipettiert. Zu der Lösung wurde dest. Wasser gegeben und das Rohprodukt gefriergetrocknet. Es wurde versucht, das Gemisch an der präparativen HPLC (Laufmittel: Wasser/Acetonitril 50:50 (+0.1 % HOAc), Flussrate 10 mL/min, Detektion bei 265 nm) zu trennen. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

Variante 6: Es wurden 0.29 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (0.34 mmol, 1.0 Äq.) in abs. Acetonitril gelöst und 1 h über Molekularsieb 0.3 nm getrocknet. Das Molsieb wurde entfernt, das Edukt dreimal mit abs. Pyridin coevaporiert und in 2 mL abs. DMF aufgenommen. Der Lösung wurden einige Kügelchen Molsieb 0.4 nm zugefügt. Nach einer halben Stunde wurde zu der Lösung 0.1 mL abs. Pyridin gegeben. 78 mg 3-Methylsaligenylphosphorchloridat (0.36 mmol, 1.1 Äq.) wurden in 0.5 mL abs. DMF gelöst und über 1 h zu der auf -60 °C gekühlten Lösung getropft. Es wurde noch 2 h bei -60 °C gerührt, dann auf 0 °C erwärmt, zweimal mit abs. Toluol coevaporiert und der Rückstand mit Wasser/Acetonitril 1:1 gefriergetrocknet. Ein Teil des Feststoffes wurde für Trennungen am Chromatotron verwendet, die aber alle misslangen. Auch die präparative Dünnschichtchromatographie lieferte keine guten Ergebnisse, ebenso Trennungen über Sephadex G15 und G10. Ein weiterer Teil wurde für eine ^{31}P-NMR-Hydrolysestudie verwendet.

Ausbeute: n.b.; farbloser Feststoff als Gemisch von zwei Diastereomeren.

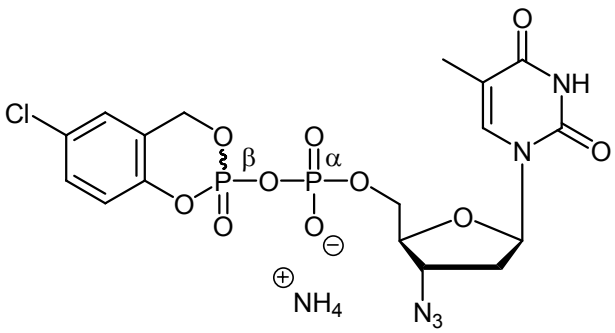


^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -11.88 (d, 0.5 P, *J*= 24.7 Hz, P-α), -11.93 (d, 0.5 P, *J*= 24.7 Hz, P-α), -21.25 (d, 0.5 P, *J*= 25.2 Hz, P-β), -21.30 (d, 0.5 P, *J*= 24.6 Hz, P-β); $C_{34}H_{56}N_6O_{10}P_2$; Mol. Wt.: 770.79

Ammonium-5-chlor-*cyclo*Sal-AZTDP 148b

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.17 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (0.20 mmol, 1.0 Äq.) in abs. Acetonitril gelöst und 2 h über Molekularsieb 0.3 nm getrocknet. Das Molsieb wurde entfernt, das Edukt dreimal mit abs. Pyridin coevaporiert und in 2 mL abs. DMF über Molekularsieb 0.4 nm aufgenommen. Der Lösung wurden 60 µL abs. Pyridin zugefügt und auf -60 °C gekühlt. 71 mg 3-Methylsaligenylphosphorchloridat (0.33 mmol, 1.6 Äq.) wurden in 0.5 mL abs. DMF gelöst und über 1 h zu der auf -60 °C gekühlten Lösung getropft. Es wurde noch 2 h bei -60 °C gerührt, dann auf 0 °C erwärmt, zweimal mit abs. Toluol coevaporiert und der Rückstand mit Wasser/Acetonitril 1:1 gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde zweimal über eine Ionenaustauschsäule (Dowex50WX8, NH_4^+) eluiert und danach gefriergetrocknet. Es wurde eine RP-18 Chromatographie durchgeführt, zunächst mit reinem Wasser, dann Wasser/Acetonitril 1:1. Die Fraktionen wurden in eisgekühlten Reagenzgläsern aufgefangen. In diesem ersten Schritt konnten große Teile AZTMP und 5-Chlorsaligenylphosphat abgetrennt werden. Das Rohprodukt wurde lyophillisiert und erneut RP-18 chromatographiert, diesmal mit H_2O/MeOH 1:1 v/v. Die isolierten Produktfraktionen wurden noch zweimal mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch RP-18 chromatographiert und lyophillisiert.

Ausbeute: n.b.; farbloser Feststoff als Gemisch von zwei Diastereomeren.

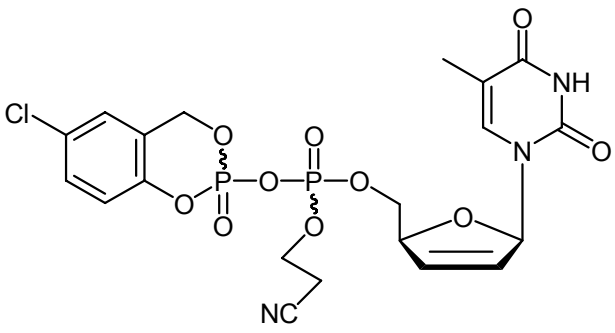


^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d$_6$)δ/ppm= -12.30 (d, 0.5 P, *J*= 25.1 Hz, P-α), -12.35 (d, 0.5 P, *J*= 24.9 Hz, P-α), -22.76 (d, 0.5 P, *J*= 24.9 Hz, P-β), -22.85 (d, 0.5 P, *J*= 25.1 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3420, 3150, 3049, 2111, 1701, 1481, 1406, 1252, 1106, 960; R_f (EE/MeOH 3:2 v/v)= 0.55; R_f (H_2O/MeOH 1:1 v/v, RP-18)= 0.32; MS (ESI$^-$): calcd. 548.0, 550.0 (M$^-$); found 548.0, 550.0; $C_{17}H_{21}ClN_6O_{10}P_2$; Mol. Wt.: 566.78

Anmerkung: Das Produkt zersetzt sich über Nacht in DMSO-d$_6$.

P-α-(β-Cyanoethyl)-5-chlor-*cyclo*Sal-d4TDP 168

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 70 mg Tetra-*n*-butylammonium-*β*-cyanoethyl-d4TMP (0.12 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit je 2 mL abs. Toluol coevaporiert, in 2 mL abs. THF und 1 mL abs. DMF aufgenommen, mit einigen Kügelchen Molsieb 0.4 nm versetzt und auf -70 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 11 µL abs. Pyridin (d= 0.981, 0.14 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und 1 h bei -70 °C gerührt. Nun wurden 42 mg 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat (0.18 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in 0.7 mL abs. Toluol, über einen Zeitraum von 1.5 h zugetropft. Es wurde 2 h bei -50 °C gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und von dem Rückstand ein ^{31}P-NMR-Spektrum aufgenommen. Das Produkt konnte nicht identifiziert werden.

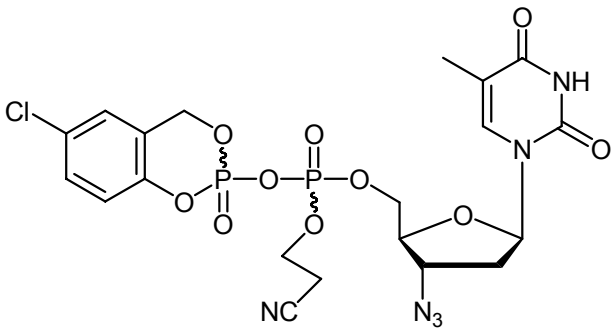


$C_{20}H_{20}ClN_3O_{10}P_2$; Mol. Wt.: 559.79

P-α-(β-Cyanoethyl)-5-chlor-*cyclo*Sal-AZTDP 169

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 70 mg Tetra-*n*-butylammonium-β-cyanoethyl-AZTMP (0.11 mmol) zweimal mit je 2 mL abs. Acetonitril und dreimal mit je 2 mL abs. Toluol coevaporiert, in 2 mL abs. DMF aufgenommen, mit einigen Kügelchen Molsieb 0.4 nm versetzt und auf -70 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 10 µL abs. Pyridin (d= 0.981, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und 1 h bei -70 °C gerührt. Nun wurden 39 mg 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat (0.17 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in 1 mL abs. Toluol, über einen Zeitraum von 1.5 h zugetropft. Von der Lösung wurde ein ^{31}P-NMR-Spektrum in abs. $CDCl_3$ unter Schutzgasbedingungen aufgenommen. Das Produkt konnte identifiziert werden. Es wurde 2 h bei -50 °C gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und von dem Rückstand ein ^{31}P-NMR-Spektrum aufgenommen. Das Produkt konnte nicht mehr identifiziert werden.

Ausbeute: n.b. (Produkt nicht luftstabil), Gemisch von zwei Diastereomerenpaaren.



^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, $CDCl_3$, N_2)δ/ppm= -12.02 (d, 0.25 P, *J*= 16.1 Hz, P-α), -12.06 (d, 0.25 P, *J*= 16.4 Hz, P-α), -12.16 (d, 0.25 P, *J*= 17.1 Hz, P-α), -12.20 (d, 0.25 P, *J*= 16.4 Hz, P-α), -22.17 (d, 0.25 P, *J*= 16.5 Hz, P-β), -22.18 (d, 0.25 P, *J*= 15.9 Hz, P-β), -22.21 (d, 0.25 P, *J*= 16.7 Hz, P-β), -22.22 (d, 0.25 P, *J*= 16.1 Hz, P-β); $C_{20}H_{21}ClN_6O_{10}P_2$; Mol. Wt.: 602.82

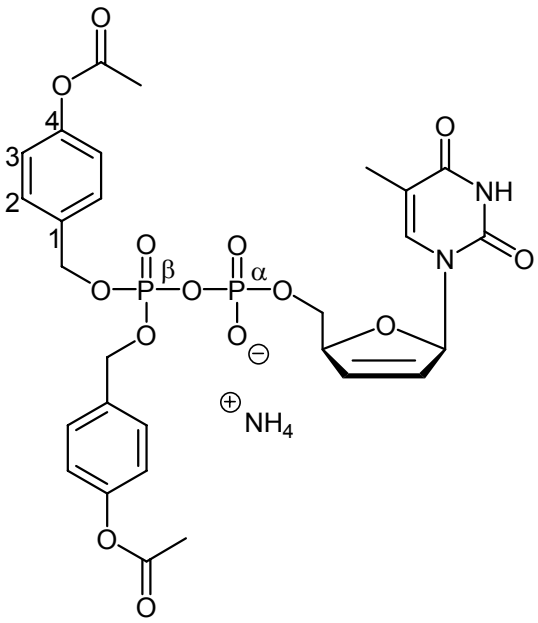
10.2.8.3 Synthese von Bis(4-acyloxybenzyl)-diphosphat-Prodrugs

Ammonium-ß-bis-(4-acetoxybenzyl)d4TDP; (BAB-d4TDP) 184a

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.16 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP (0.20 mmol, 1.0 Äq.) und 94 mg Bis-(4-acetoxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (0.20 mmol, 1.0 Äq.) in 3 mL abs. Acetonitril gelöst. Zu der Lösung wurden 36 mg DCI (0.30 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und 0.5 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde auf -25 °C gekühlt und mit 51 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.28 mmol, 1.4 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wurde auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine RP-18 Säule gereinigt, erst mit Wasser/Methanol 2:1, dann 1:1. Das Produkt wurde lyophillisiert. Die Gegenionen wurden ausgetauscht (Dowex 50WX8, NH_4^+). Das Eluat wurde lyophillisiert. Das Produkt wurde erneut RP-18 chromatographiert, zunächst mit Wasser/Methanol 2:1, dann 1:1. Das Produkt wurde erneut gefriergetrocknet.

Ausbeute: 14 mg (20 μmol, 10%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

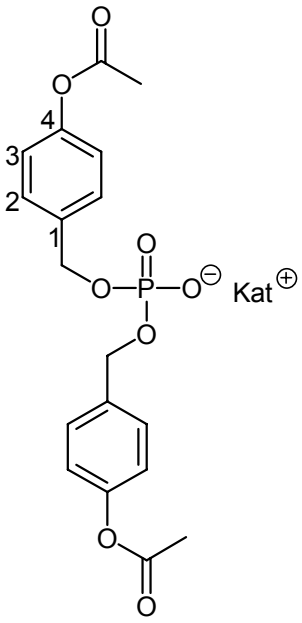
Anmerkung: Es wurde versucht, das Produkt durch Extraktion zu reinigen. Wegen der Oberflächenaktivität der Verbindung sollte dieser Schritt unbedingt ausgelassen werden.



^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.63 (q, 1H, *J*= 0.5 Hz, H_{het}-6), 7.40-7.34 (m, 4H, H-2), 7.08-7.02 (m, 4H, H-3), 6.94 (ddd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 1.5 Hz, *J*= 3.3 Hz, H-1´), 6.38-6.34 (m, 1H, H-3´), 5.83 (ddd, 1H, *J*=2.0 Hz, *J*= 3.5 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 5.09 (dd, 4H, *J*= 6.2 Hz, *J*= 8.3 Hz, H-Bn), 4.96-4.92 (m, 1H, H-4´), 4.23-4.11 (m, 2H, H-5´), 2.27 (s, 6H, Ac), 1.89 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 171.1 (2xC=O-Ac), 166.6 (C_{het}-4), 152.9 (C_{het}-2), 152.4 (2xC-4),

138.7 (C_{het}-6), 135.3 (C-3´), 134.9 (dd, *J*= 1.4 Hz, *J*= 7.1 Hz, 2xC-1), 130.4 (d, *J*= 2.9 Hz, 4xC-2), 127.6 (C-2´), 123.0 (4xC-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.9 (C-1´), 86.9 (d, *J*= 9.2 Hz, C-4´), 70.3 (dd, *J*= 1.7 Hz, *J*= 5.9 Hz, 2xC-Bn), 68.1 (dd, *J*= 6.8 Hz, *J*= 6.8 Hz, C-5´), 21.0 (2xCH_3), 12.5 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.20 (d, 1P, *J*= 19.6 Hz, P-α), -12.96 (d, 1P, *J*= 19.6 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3435, 2930, 1762, 1701, 1266, 1220, 1190, 1044, 1009, 912; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 9.41; R_f (EE/MeOH 3:2 v/v)= 0.59; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 679.13 (M^-); found 679.11; $C_{28}H_{33}N_3O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 697.52

Es konnte ein Nebenprodukt **210** isoliert werden. Dies entsteht vermutlich schon während der Kupplung bei unvollständiger Trocknung des Nucleosides.



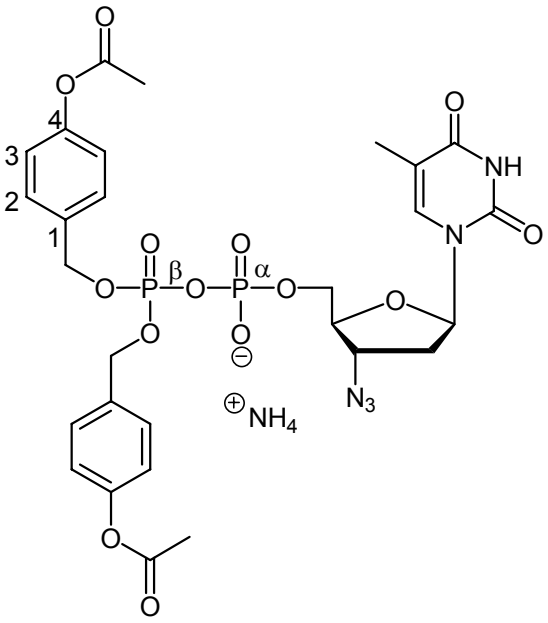
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 7.39-7.34 (m, 4H, H-2), 7.10-7.06 (m, 4H, H-3), 4.82 (d, 4H, *J*= 7.3 Hz, H-Bn), 2.26 (s, 6H, Ac); ^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 169.2 (2xC=O), 149.9 (2xC-4), 135.6 (2xC-1), 128.5 (4xC-2), 121.6 (4xC-3), 66.1 (d, *J*= 5.3 Hz, 2xC-Bn), 20.9 (2xCH_3); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, DMSO-d_6)δ/ppm= -1.42; ^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= -1.20- (-1.60) (m); $C_{18}H_{18}O_8P^-$; Mol. Wt.: 393.31

Ammonium-*ß*-bis-(4-acetoxybenzyl)AZTDP; (BAB-AZTDP) 185a

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 213 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (0.26 mmol, 1.0 Äq.) in 3 mL abs. Acetonitril gelöst: Nun wurden 0.16 g Bis-(4-acetoxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (0.35 mmol, 1.4 Äq.) und 44 mg DCI (0.38 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde auf -25 °C gekühlt und durch Zugabe von 46 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wurde auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung

des Rohproduktes erfolgte über eine RP-18 Umkehrphase (Wasser/Methanol, zunächst 2:1, dann 1:1, dann reiner Methanol). Die Produktfraktionen wurden lyophillisiert. An dem Rohprodukt wurde ein Ionenaustausch vollzogen (Dowex 50WX8, NH_4^+). Das Eluat wurde lyophillisiert. Es wurde eine abschließende Reinigung an einer RP-18 Umkehrphase vollzogen (Wasser/Methanol 1:2). Das Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 56 mg (76 μmol, 29%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

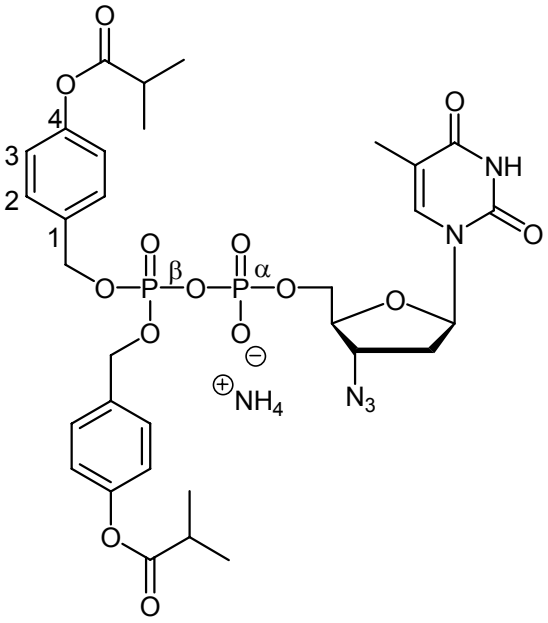


^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.71 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.45-7.37 (m, 4H, H-2), 7.10-7.05 (m, 4H, H-3), 6.20 (dd, 1H, *J*= 6.3 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-1´), 5.18-5.08 (m, 4H, H-Bn), 4.40 (ddd, 1H, *J*= 3.5 Hz, *J*= 3.5 Hz, *J*= 7.1 Hz, H-3´), 4.20 (ddd, 1H, *J*= 3.0 Hz, *J*= 4.9 Hz, *J*= 11.5 Hz, H-5´), 4.12 (ddd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 5.5 Hz, *J*= 11.6 Hz, H-5´), 4.03 (ddd, 1H, *J*= 2.8 Hz, *J*= 2.8 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-4´), 2.40-2.23 (m, 2H, H-2´), 2.27 (s, 6H, CH_3), 1.89 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 171.0 (2xC=O), 166.4 (C_{het}-4), 152.6 (2xC-4), 152.5 (C_{het}-2), 137.8 (C_{het}-6), 134.9 (dd, *J*= 1.9 Hz, *J*= 7.5 Hz, 2xC-1), 130.5 (d, *J*= 2.0 Hz, 4xC-2), 123.0 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.8 (C-1´), 84.4 (d, *J*= 9.0 Hz, C-4´), 70.4 (d, *J*= 5.6 Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, *J*= 6.0 Hz, C-5´), 62.5 (C-3´), 38.1 (C-2´), 20.1 (2xCH_3), 12.7 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.17 (d, 1P, *J*= 21.1 Hz, P-α), -12.80 (d, 1P, *J*= 20.6 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3431, 3196, 3071, 1760, 1699, 1509, 1469, 1274, 1220, 1010, 967; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 10.32; mp= 90-92 °C; R_f (H_2O/MeOH 1:2 v/v, RP-18)= 0.63; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 722.126 (M^-); found 722.126; $C_{28}H_{34}N_6O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 740.55

Ammonium-*ß*-bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)AZTDP; (BIB-AZTDP) 185b

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 115 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (139 μmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wurde in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wurde noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wurde noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wurde in 1.5 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 109 mg Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (211 μmol, 1.5 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 26 mg DCI (0.22 mmol, 1.6 Äq.) gestartet. Nach 1.5 h bei RT wurde die Reaktionslösung auf -25 °C gekühlt und durch Zugabe von 38 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.21 mmol, 1.5 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wurde auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden zunächst durch RP-18 Chromatographie mit Wasser/Methanol 1:1 restliches Edukt und DCI aus dem Rohprodukt entfernt und dann das Produkt mit reinem Methanol von der RP-18 Phase gewaschen. Teile des Methanols wurden am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur entfernt, dann wurde mit dest. Wasser aufgefüllt und gefriergetrocknet. Die auf diese Weise erhaltenen 144 mg Rohprodukt wurden über einen Ionentauscher gegeben (Dowex 50WX8, NH_4^+, dem Wasser wurden 10% Acetonitril zugesetzt, um das Rohprodukt zu lösen). Das Eluat wurde lyophillisiert. Mit den erhaltenen 102 mg Rohprodukt wurde erneut eine RP-18 Chromatographie durchgeführt, diesmal mit Methanol/Wasser 3:1. Das Produkt wurde abschließend lyophillisiert.

Ausbeute: 53 mg (67 μmol, 48%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.72 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 7.46-7.34 (m, 4H, H-2), 7.10-7.00 (m, 4H, H-3), 6.21 (dd, 1H, *J*= 6.2 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-1´), 5.18-5.10 (m, 4H, H-Bn), 4.40 (ddd, 1H, *J*= 3.2 Hz, *J*= 3.5 Hz, *J*= 6.4 Hz, H-3´), 4.26-4.08 (m, 2H, H-5´), 4.04 (ddd, 1H, *J*= 2.8 Hz, *J*= 2.8 Hz, *J*= 5.8 Hz, H-4´), 2.82 (sept., 2H, *J*= 7.0 Hz, CH-*i*-bu), 2.38-2.20 (m, 2H, H-2´) 1.91 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}), 1.30 (d, 12H, *J*= 7.0 Hz, CH_3-*i*-bu); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 177.1 (2xC=O), 165.0 (C_{het}-4), 152.6 (2xC-4), 152.4 (C_{het}-2), 137.8 (C_{het}-6), 134.9 (m, 2xC-1), 130.5 (4xC-2), 122.9 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.8 (C-1´), 84.4 (d, *J*= 9.2 Hz, C-4´), 70.4 (d, *J*= 5.6 Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, *J*= 5.9 Hz, C-5´), 62.5 (C-3´), 38.1 (C-2´), 35.3 (2xCH-*i*-bu), 19.3 (4xCH_3-*i*-bu), 12.7 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-entkoppelt, MeOD)δ/ppm= -12.16 (d, 1P, *J*= 21.1 Hz, P-α), -12.77 (d, 1P, *J*= 20.9 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3431, 3194, 3069, 2976, 2109, 1757, 1700, 1470, 1273, 1112, 1011; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min]= 17.65; mp= 79 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.47; R_f (H_2O/MeOH 1:3 v/v, RP-18)= 0.64; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 778.189 (M^-); found 778.195; $C_{32}H_{42}N_6O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 796.66

Ammonium-ß-bis-(4-pivaloyloxybenzyl)AZTDP; (BPB-AZTDP) 185c

Anmerkung: In der Überschrift ist von Ammonium als Gegenion die Rede. Das trifft nur teilweise zu, da das Produkt am Ende mit gemischten Gegenionen in etwa der Zusammensetzung NBu_4/NH_4 1:3 erhalten wurde. In dieser Form sind dann auch die NMR-Daten angegeben. Auf einen erneuten Ionenaustausch wurde verzichtet, da bei einmaligem Ionenaustausch ca. 7% Zersetzungsprodukt in dem vormals reinen Produkt auftraten.

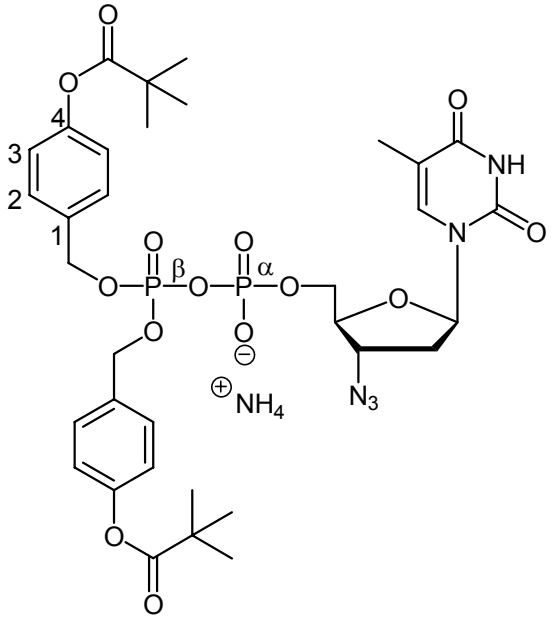
Variante A: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 146 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (176 μmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung

wurde in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wurde noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wurde noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wurde in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu der Lösung wurden 0.15 g Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (0.28 mmol, 1.6 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 36 mg DCI (0.30 mmol, 1.7 Äq.) gestartet. Nach 1.75 h bei RT wurden der Reaktionslösung weitere 50 mg Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (88 μmol, 0.5 Äq.) und 10 mg DCI (88 μmol, 0.5 Äq.) zugefügt und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung auf -25 °C gekühlt und durch Zugabe von 64 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wurde auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine RP-18 Phase angereichert. Hierzu wurden zunächst Edukt und DCI mit Wasser/Methanol 1:1 eluiert, dann wurde isokratisch nacheinander zunächst mit Wasser/Methanol 2:1, 3:1 und 5:1 eluiert. Ein Großteil des Produktes wurde mit dem letzten Laufmittelgemisch von der Säule eluiert (F2, 105 mg). Anteilig wurde das Produkt jedoch auch schon in den Fraktionen erhalten, die mit Wasser/Methanol 2:1 eluiert worden waren. Interessanterweise waren dies die reineren Fraktionen (F1, 67 mg). F1 und F2 wurden getrennt über einen Ionentauscher in das Ammoniumsalz überführt. F1 wurde erneut an einer RP-18 Phase getrennt, diesmal mit Methanol/Wasser 2:1, dann 3:1. Es konnten 29 mg des reinen Produktes isoliert werden sowie 20 mg einer Mischfraktion. F2 wurde über eine Sephadex G10 Phase eluiert, konnte auf diese Weise aber nicht sauber erhalten werden. Auch eine Trennung über die präparative HPLC (Acetonitril/Wasser 1.5:1, RP-18, 10 mL/min) misslang. Erneute Chromatographie über RP-18 Kieselgel mit Wasser/Methanol 1.00:2.25, dann 1:2.5, dann 1:3 lieferte nicht das reine Produkt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden stets an der Lyophille gefriergetrocknet. Das erhaltene reine Produkt wurde nochmals an einem Ionentauscher umgesalzen (Dowex 50WX8, NH_4^+) und lyophillisiert. Dabei trat eine anteilige Zersetzung (ca. 7%) des Produktes auf.

Ausbeute: 29 mg (35 μmol, 20%) eines farblosen Feststoffes, sowie erhebliche Mengen Produkt in Mischfraktionen.

Variante B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 26 mg Di-ammonium-AZTMP (68 μmol, 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Acetonitril coevaporiert, der Rückstand in 3 mL abs. DMF aufgenommen und einige Kügelchen Molsieb 0.4 nm zugegeben. Zu der Lösung wurden 52 mg Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (95 μmol, 1.4 Äq.) und 13 mg DCI (0.11 mmol, 1.6 Äq.) gegeben und 1 h bei RT gerührt. Es wurden weitere 15 mg Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (27 μmol, 0.4 Äq.) und 5 mg DCI (42 μmol, 0.6 Äq.) zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 22 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.12 mmol, 1.8 Äq.) bei -30 °C. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril aufgenommen und lyophillisiert. Von dem Rohprodukt wurde ein ^{31}P-NMR-Spektrum aufgenommen. Obwohl das Produkt entstanden war, zeigte sich, dass *Variante A* deutlich bessere Ausbeuten bei weniger Nebenprodukten lieferte. Auf eine Trennung des Rohgemisches wurde daher verzichtet.



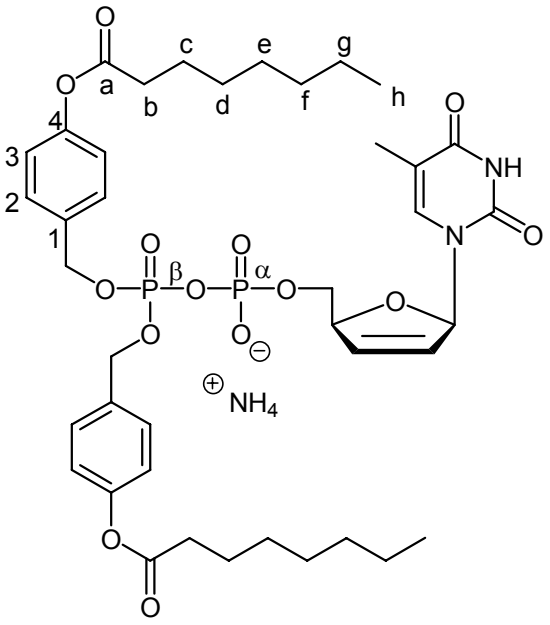
^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.72 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 7.45-7.36 (m, 4H, H-2), 7.06-7.00 (m, 4H, H-3), 6.21 (dd, 1H, *J*= 6.8 Hz, *J*= 6.8 Hz, H-1´), 5.20-5.08 (m, 4H, H-Bn), 4.42-4.36 (m, 1H, H-3´), 4.20 (ddd, 1H, *J*= 11.5 Hz, *J*= 3.0 Hz, *J*= 4.8 Hz, H-5´), 4.12 (ddd, 1H, *J*= 11.5 Hz, *J*= 2.7 Hz, *J*= 5.3 Hz, H-5´), 4.04 (ddd, 1H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 2.7 Hz, *J*= 5.6 Hz, H-4´), 3.26-3.18 (m, 3.2H, NBu_4), 2.39-2.23 (m, 2H, H-2´), 1.91 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me_{het}), 1.70-1.60 (m, 3.2H, NBu_4), 1.46-1.36 (m, 3.2H, NBu_4), 1.35 (s, 18H, *t*-Bu), 1.02 (t, 4.9H, *J*= 7.3 Hz, NBu_4); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 178.5 (2xC=O), 166.4 (C_{het}-4), 152.8 (2xC-4), 152.4 (C_{het}-2), 137.8 (C_{het}-6), 135.0-134.8 (m, 2xC-1), 130.5 (d, *J*= 2.1 Hz, 4xC-2), 122.9 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.8 (C-1´), 84.4 (d, *J*= 9.1 Hz, C-4´), 70.4 (d, *J*= 5.7 Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, *J*= 5.8 Hz, C-5´), 62.5 (C-3´), 59.6-59.5 (m, NBu_4), 40.1 (2xC-*t*Bu), 38.0 (C-2´), 27.5 (6xCH_3-*t*-Bu), 24.8, 20.8, 13.9 (NBu_4), 12.7 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.18 (d, 1P, *J*= 20.3 Hz, P-α), -12.76 (d, 1P, *J*= 20.2 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3423, 3186,

2975, 2108, 1751, 1701, 1479, 1277, 1119, 1012, 968; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min]= 18.08; mp= 98-101 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.70; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 806.221 (M^-); found 806.222; $C_{34}H_{46}N_6O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 824.71

Ammonium-*ß*-bis-(4-octanoyloxybenzyl)d4TDP; (BOB-d4TDP) 184d

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 160 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP (203 μmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wurde in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wurde noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wurde noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wurde in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu der Lösung wurden 0.22 g Bis-(4-octanoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (0.35 mmol, 1.7 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 43 mg DCI (0.37 mmol, 1.8 Äq.) gestartet. Nach 3 h bei RT wurde durch Zugabe von 63 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 1.7 Äq.) bei -25 °C oxidiert. Nach 15 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in wenig Methanol gelöst und über eine RP-18 Phase chromatographiert, jeweils isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1, 2:1, 5:1 und schließlich 6:1. Bei dem 1:1 Gemisch konnten verbliebenes Edukt und DCI abgetrennt werden. Die Produktfraktionen wurden vereint und der Methanol am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur bis auf einige mL entfernt. Es wurde mit Wasser aufgefüllt und die Lösung lyophillisiert. Die erhaltenen 150 mg wurden über einen Ionentauscher (Dowex 50WX8, NH_4^+, 30% Acetonitril in Wasser) gegeben und das Eluat lyophillisiert. Eine weitere RP-18 Chromatographie mit Methanol/Wasser 5:1 lieferte das reine Produkt. Dieses wurde erneut gefriergetrocknet.

Ausbeute: 114 mg (132 μmol, 65%) eines farblosen Feststoffes.



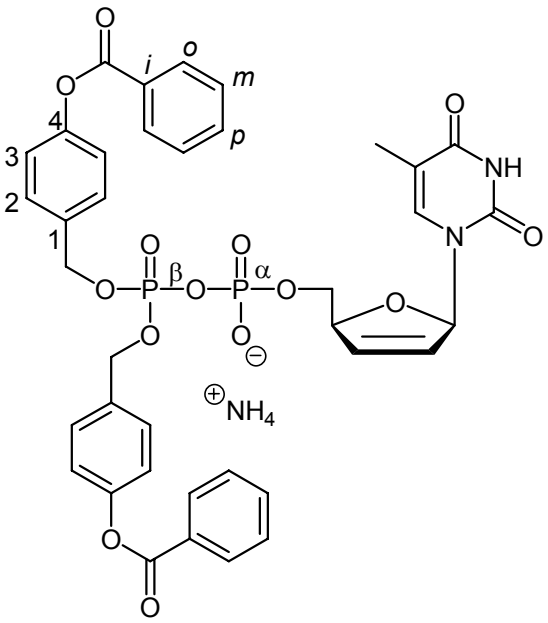
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)δ/ppm= 11.21 (s, 1H, NH), 7.65 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.44-7.35 (m, 4H, H-2), 7.10-7.03 (m, 4H, H-3), 6.82 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 3.4 Hz, H-1´), 6.34 (ddd, 1H, *J*= 1.6 Hz, *J*= 1.6 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 5.86 (ddd, 1H, *J*=2.0 Hz, *J*= 3.1 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 5.02 (dd, 4H, *J*= 3.8 Hz, *J*= 6.5 Hz, H-Bn), 4.88-4.84 (m, 1H, H-4´), 4.10-3.88 (m, 2H, H-5´), 2.56 (t, 4H, *J*= 7.4 Hz, H-b), 1.78 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}), 1.65 (tt, 4H, *J*= 7.3 Hz, *J*= 7.3 Hz, H-c), 1.40-1.20 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.87 (t, 6H, *J*= 6.8 Hz, H-h); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 173.8 (2xC-a), 166.6 (C_{het}-4), 152.9 (C_{het}-2), 152.4 (2xC-4), 138.7 (C_{het}-6), 135.3 (C-3´), 134.9 (d, *J*= 7.0 Hz, 2xC-1), 130.4 (d, *J*=2.7 Hz, 4xC-2), 127.6 (C-2´), 122.9 (4xC-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.9 (C-1´), 87.0 (d, *J*= 9.3 Hz, C-4´), 70.3 (dd, *J*= 1.8 Hz, *J*= 5.6 Hz, 2xC-Bn), 68.2 (dd, *J*= 6.2 Hz, *J*= 6.2 Hz, C-5´), 35.1 (2xC-b), 32.9, 30.2, 30.1, 23.7 (2xC-d, 2xC-e, 2xC-f, 2xC-g), 26.0 (2xC-c), 14.4 (2xC-h), 12.5 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.11 (d, 1P, *J*= 20.6 Hz, P-α), -12.92 (d, 1P, *J*= 20.3 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3188, 3071, 2956, 2927, 2856, 1756, 1701, 1467, 1263, 1112, 1010; UV (HPLC): λ_{max}= 264 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min]= 21.52; mp= 73-75 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.40; R_f (H_2O/MeOH 1:5 v/v, RP-18)= 0.40; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 847.297 (M^-); found 847.296; $C_{40}H_{57}N_3O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 865.84

Ammonium-*ß*-bis-(4-benzoyloxybenzyl)d4TDP; (BBB-d4TDP) 184e

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 178 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP (226 μmol, 1.0 Äq.) wurden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wurde in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wurde noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wurde noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wurde in 2.0 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 216 mg Bis-(4-

benzoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (369 μmol, 1.6 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 46 mg DCI (0.39 mmol, 1.7 Äq.) gestartet. Nach 1.5 h bei RT wurde die Reaktionslösung auf -25 °C gekühlt und durch Zugabe von 64 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 1.5 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wurde auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in wenig Methanol gelöst und an einer RP-18 Phase getrennt, zunächst isokratisch mit Wasser/Methanol 1:1, um nicht umgesetztes Edukt und DCI zu entfernen, dann isokratisch mit Wasser/Methanol 5:1. Die Produktfraktionen wurden lyophillisiert und das Rohprodukt über einen Ionentauscher gegeben (Dowex 50WX8, NH_4^+, 30% Acetonitril in Wasser). Das Eluat wurde erneut lyophillisiert und der Rückstand mit Wasser/Methanol 1:4 erneut an einer RP-18 Phase getrennt. Das Produkt wurde abschließend lyophillisiert.

Ausbeute: 62 mg (75 μmol, 33%) eines farblosen Feststoffes.



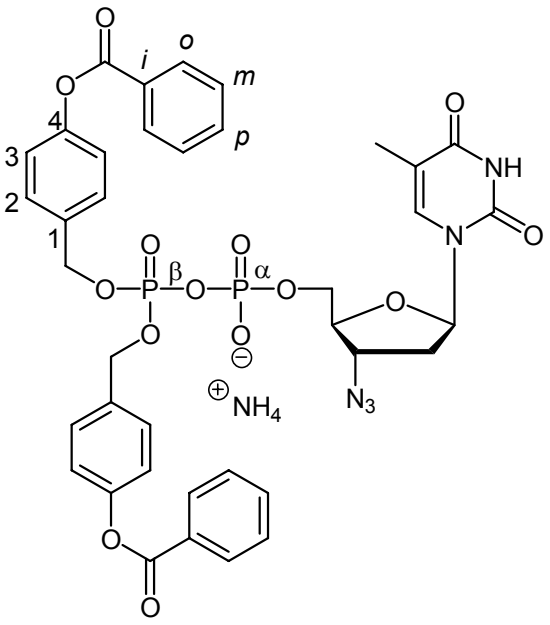
^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 8.19-8.13 (m, 4H, H-*ortho*), 7.70-7.64 (m, 3H, H-6, H-*para*), 7.56-7.50 (m, 4H, H-*meta*), 7.50-7.42 (m, 4H, H-2), 7.25-7.19 (m, 4H, H-3), 6.97 (ddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 3.6 Hz, H-1´), 6.42 (ddd, 1H, *J*= 1.7 Hz, *J*= 1.7 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-3´), 5.86 (ddd, 1H, *J*=2.2 Hz, *J*= 3.6 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2´), 5.16 (dd, 4H, *J*= 5.6 Hz, *J*= 8.5 Hz, H-Bn), 5.01-4.95 (m, 1H, H-4´), 4.28-4.17 (m, 2H, H-5´), 1.92 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 166.6 (C_{het}-4), 166.5 (2x C=O), 152.9 (C_{het}-2), 152.6 (2xC-4), 138.8 (C_{het}-6), 135.4 (C-3´), 135.2 (d, *J*= 7.0 Hz, 2xC-1), 134.9 (2xC-*para*), 131.1 (4xC-*ortho*), 130.8 (2xC-*ipso*), 130.6 (4xC-2), 130.5 (4xC-*meta*), 127.7 (C-2´), 123.1 (4xC-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.9 (C-1´), 87.0 (d, *J*= 9.2 Hz, C-4´), 70.3 (dd, *J*= 2.3 Hz, *J*= 5.6 Hz, 2xC-Bn), 68.2 (d, *J*= 6.2 Hz, C-5´), 12.5 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.07 (d, 1P, *J*= 20.5 Hz, P-α), -12.86 (d, 1P, *J*= 20.5 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3435, 3199, 1734, 1692, 1452, 1268, 1202, 1063, 1025, 704; UV (HPLC): λ_{max}= 263 nm, 231 nm; HPLC,

Methode 2: t_R [min]= 17.71; mp= 92 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.38; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 803.141 (M^-); found 803.139; $C_{38}H_{37}N_3O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 821.66

Ammonium-ß-bis-(4-benzoyloxybenzyl)AZTDP; (BBB-AZTDP) 185e

Die Reaktion wurde wie für BBB-d4TDP beschrieben durchgeführt. Es wurden folgende Mengen eingesetzt: 96.0 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (116 μmol, 1.0 Äq.), 108 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (184 μmol, 1.6 Äq.) und 25 mg DCI (0.21 mmol, 1.8 Äq.). Oxidiert wurde durch Zugabe von 36 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.20 mmol, 1.7 Äq.).
Die Aufarbeitung wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in wenig Acetonitril gelöst. Diese Lösung wurde an einer RP-18 Phase isokratisch mit Wasser/Methanol 1:1 chromatographiert, bis Edukt und DCI entfernt waren. Nun wurde isokratisch mit Wasser/Methanol 3:1 und dann 4:1 eluiert. Bei beiden Mischungen konnte das Produkt nachgewiesen werden. Die sauberen Fraktionen (F1) wurden vereint und am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur vom Methanol befreit, mit Wasser aufgefüllt und gefriergetrocknet. Es wurden 58 mg aus den sauberen Fraktionen (F1) als Tetra-*n*-butylammoniumsalz erhalten. Die verunreinigten Fraktionen (F2) wurden zweimal über einen Ionentauscher gegeben (Dowex 50WX8, NH_4^+, 30% Acetonitril in Wasser), lyophillisiert und erneut RP-18 chromatographiert (Acetonitril/Wasser 2:1). Das erhaltene Rohprodukt (F2) wurde an der präparativen HPLC chromatographiert (Wasser/Acetonitril 1:1, 10 mL/min, RP-18). Bei einer aufgetragenen Menge von 5 mg konnte das Produkt rein erhalten werden. Bei einer größeren Menge versagte die Trennung jedoch.

Ausbeute: 58 mg (53 μmol, 46%) eines farblosen Feststoffes als Tetra-*n*-butylammoniumsalz; 3 mg (3 μmol, 3%) eines farblosen Feststoffes als Ammoniumsalz. Die NMR-Daten sind für das Ammoniumsalz angegeben.



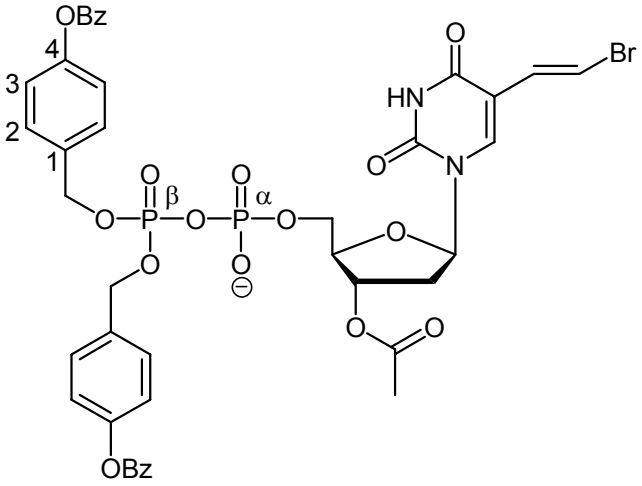
^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 8.18-8.13 (m, 4H, H-*ortho*), 7.74 (q, 1H, *J*= 0.5 Hz, H-6), 7.67 (tt, 2H, *J*= 7.3 Hz, *J*= 2.5 Hz, H-*para*), 7.57-7.45 (m, 8H, H-2, H-*meta*), 7.25-7.19 (m, 4H, H-3), 6.23 (dd, 1H, *J*= 6.8 Hz, *J*= 6.8 Hz, H-1´), 5.25-5.10 (m, 4H, H-Bn), 4.46-4.40 (m, 1H, H-3´), 4.30-4.11 (m, 2H, H-5´), 4.10-4.02 (m, 1H, H-4´), 2.44-2.26 (m, 2H, H-2´), 1.91 (d, 3H, *J*= 0.9 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 166.5 (C_{het}-4), 166.4 (2xC=O), 152.6 (C_{het}-2, 2xC-4), 137.8 (C_{het}-6), 135.1 (d, *J*= 5.6 Hz, 2xC-1), 134.9 (2xC-*para*), 131.1 (4xC-*ortho*), 130.8 (2xC-*ipso*), 130.6 (d, *J*= 1.6 Hz, 4xC-2), 129.9 (4xC-*meta*), 123.1 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.9 (C-1´), 84.4 (d, *J*= 9.1 Hz, C-4´), 70.4 (d, *J*= 5.4 Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, *J*= 5.8 Hz, C-5´), 62.5 (C-3´), 38.1 (C-2´), 12.7 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.18 (d, 1P, *J*= 19.4 Hz, P-α), -12.59 (d, 1P, *J*= 19.5 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3432, 3191, 3065, 2108, 1736, 1700, 1452, 1268, 1202, 1062, 1011, 707; UV (HPLC): λ_{max}= 261 nm, 231 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min]= 17.79; mp= 98 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.61; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 846.158 (M^-); found 846.157; $C_{38}H_{38}N_6O_{14}P_2$; Mol. Wt.: 864.69

Ammonium-*ß*-bis-(4-benzoyloxybenzyl)3´-*O*-acetyl-BVdUDP 188

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleotides und die Reaktionsdurchführung erfolgten wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben. Es wurden 50 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)3´-*O*-acetyl-BVdUMP (53 μmol, 1.0 Äq., *in time* für die Reaktion) mit 48 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (85 μmol, 1.6 Äq.) und 12 mg DCI (102 μmol, 1.9 Äq.) umgesetzt. Später wurden noch einmal 10 mg Amidit (0.4 Äq.) und 4 mg DCI (0.5 Äq.) zugegeben. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 16 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.90 μmol, 1.7 Äq.) bei -25 °C. Das DC zeigte eindeutig Produktbildung an. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Die Reinigung des Rohgemisches wurde an einer RP-18 Phase durchgeführt: zunächst isokratisch mit Wasser/Methanol 1:1, dann 1:3. Die Produktfraktionen

wurden vereint und lyophillisiert. Im ^{31}P-NMR-Spektrum konnte das Produkt identifiziert werden. Es war jedoch immer noch verunreinigt. Nach einer weiteren Umkehrphasenchromatographie konnte das Produkt nicht mehr identifiziert werden.

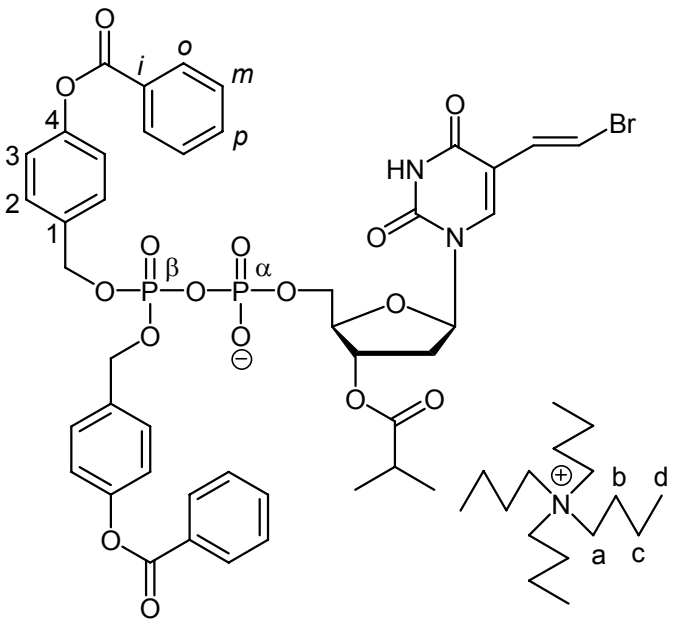


$C_{41}H_{36}BrN_2O_{16}P_2^-$; Mol. Wt.: 954.58

Tetra-*n*-butylammonium-*ß*-bis-(4-benzoyloxybenzyl)3´-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP; (*i*bu-BBB-BVdUDP) 189

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleotides und die Reaktionsdurchführung erfolgten wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben. Es wurden 134 mg $[NBu_4]_{1.66}[H]_{0.34}$-BVdUMP (gewichtete Molmasse ca. 926 g/mol, 145 μmol, 1.0 Äq.) in 2 mL abs. Acetonitril mit 136 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (232 μmol, 1.6 Äq.) und 30.0 mg DCI (247 μmol, 1.7 Äq.) bei 0° C zusammengegeben und dann auf RT erwärmt. Nach 40 min wurden weitere 6.0 mg DCI (51 μmol, 0.4 Äq.) und 26 mg Amidit (44 μmol, 0.3 Äq.) zugegeben und 1 h gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 50.0 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 276 μmol, 1.9 Äq.) bei -25 °C. Nach 15 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Acetonitril gelöst und an einer RP-18 Phase chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser 1:1, dann 6:1. Methanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt, mit Wasser aufgefüllt und lyophillisiert. Das Rohprodukt wurde erneut über eine RP-18 Phase mit Methanol/Wasser 5:1 getrennt. Das Produkt wurde abschließend lyophillisiert. Eine sehr gute Reinigung wurde durch zusätzliche Chromatographie unter Verwendung von 0.25 M Ammoniumformiat-Puffer anstelle von Wasser erzielt.

Ausbeute: 128 mg (104 μmol, 72%) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 8.17-8.12 (m, 4H, H-*ortho*), 8.02 (s, 1H, H-6), 7.67 (tt, 2H, *J*= 7.0 Hz, *J*= 1.3 Hz, H-*para*), 7.56-7.41 (m, 9H, H-2, H-*meta*, BVU-H-8), 7.25-7.17 (m, 4H, H-3), 7.05 (d, 1H, *J*= 13.5 Hz, BVU-H-7), 6.33 (dd, 1H, *J*= 5.7 Hz, *J*= 9.0 Hz, H-1´), 5.40-5.36 (m, 1H, H-3´), 5.25-5.15 (m, 4H, H-Bn), 4.32-4.22 (m, 2H, H-5´), 4.22-4.17 (m, 1H, H-4´), 3.25-3.16 (m, 7H, H-a), 2.59 (sept, 1H, *J*= 7.0 Hz, CH-*i*bu), 2.41-2.25 (m, 2H, H-2´), 1.70-1.58 (m, 7H, H-b), 1.40 (tq, 7H, *J*= 7.5 Hz, *J*= 7.5 Hz, H-c), 1.16 (d, 6H, *J*= 7.1 Hz, CH_3-*i*bu), 1.00 (t, 11H, *J*= 7.4 Hz, H-d); ^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 177.8 (C=O-*i*bu), 166.4 (2xC=O-Bz), 163.6 (C_{het}-4), 152.5 (2xC-4), 151.4 (C_{het}-2), 140.0 (C_{het}-6), 135.1 (dd, *J*= 3.2 Hz, *J*= 7.1 Hz, 2xC-1), 134.9 (2xC-*para*), 131.1 (4xC-*ortho*), 130.8 (BVU-C-7), 130.7 (2xC-*ipso*), 130.6 (d, *J*= 2.1 Hz, 4xC-2), 129.8 (4xC-*meta*), 123.0 (4xC-3), 112.8 (C_{het}-5), 109.4 (BVU-C-8), 86.3 (C-1´), 85.2 (d, *J*= 9.0 Hz, C-4´), 76.8 (C-3´), 70.4 (dd , *J*= 2.7 Hz, *J*= 5.7 Hz, 2xC-Bn), 67.6 (d, *J*= 6.1 Hz, C-5´), 59.6-59.5 (m, 4xC-a), 38.5 (C-2´), 35.0 (CH-*i*bu), 24.8 (C-b), 20.8-20.7 (m, 4xC-c), 19.2 (2xCH_3-*i*bu), 14.0 (C-d); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD)δ/ppm= -12.02 (d, 1P, *J*= 20.2 Hz, P-α), -12.64 (d, 1P, *J*= 20.4 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3434, 3063, 2964, 1876, 1736, 1712, 1682, 1465, 1267, 1200, 968; UV (HPLC): λ_{max}= 284 nm, 234 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 15.01; R_f (EE/MeOH 4:1 v/v)= 0.70; R_f (H_2O/MeOH 1:6 v/v, RP-18)= 0.45; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 981.104 (M^-); found 981.105; $C_{59}H_{76}BrN_3O_{16}P_2$; Mol. Wt.: 1225.10

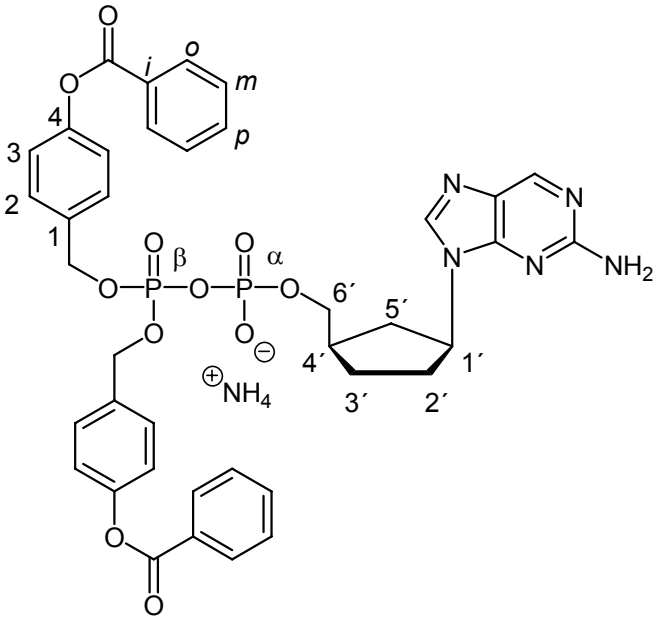
Ammonium-*ß*-bis-(4-benzoyloxybenzyl)*carba-iso*-ddADP; (BBB-*carba-iso*-ddADP) 190

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleotides und die Reaktionsdurchführung erfolgten wie in den vorangehenden

Versuchen beschrieben. Es wurden 85.0 mg $[NBu_4]_{1.5}[H]_{0.5}$-BVdUMP (gewichtete Molmasse ca. 736 g/mol, 115 μmol, 1.0 Äq.) in 2 mL abs. Acetonitril und 2 mL abs. DMF mit 109 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (186 μmol, 1.6 Äq.) und 24.0 mg DCI (203 μmol, 1.8 Äq.) bei 0°C zusammengegeben und dann auf RT erwärmt. Nach 40 min wurden weitere 6.0 mg DCI (51 μmol, 0.4 Äq.) und 28 mg Amidit (48 μmol, 0.4 Äq.) zugegeben und 1 h gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 42.0 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 232 μmol, 2.0 Äq.) bei -25 °C. Nach 15 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Acetonitril gelöst und an einer RP-18 Phase chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser 1:1, dann 4:1. Methanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt, mit Wasser aufgefüllt und lyophillisiert. Das Rohprodukt wurde erneut über eine RP-18 Phase mit Methanol/Wasser 2.5:1.0 getrennt. Das Produkt wurde lyophillisiert und an der präparativen HPLC chromatographiert (40 mM Ammoniumformiat in H_2O/Acetonitril 1:1, Flussrate 10 mL/min, RP-18).

Anmerkung: Unter den Bedingungen an der präparativen HPLC wurde das Gegenion ausgetauscht. Man erspart sich so einen Ionenaustausch über Dowex. Das Produkt konnte dennoch niemals vollständig rein isoliert werden. Wegen der geringen Mengen, die an der HPLC isoliert wurden, ist das ^{13}C-NMR für das Tetra-*n*-butylammoniumsalz angegeben. Die anderen Daten gelten für das Ammoniumsalz.

Ausbeute: 36 mg (29 μmol, 25%, NBu_4-Salz) eines farblosen Feststoffes.

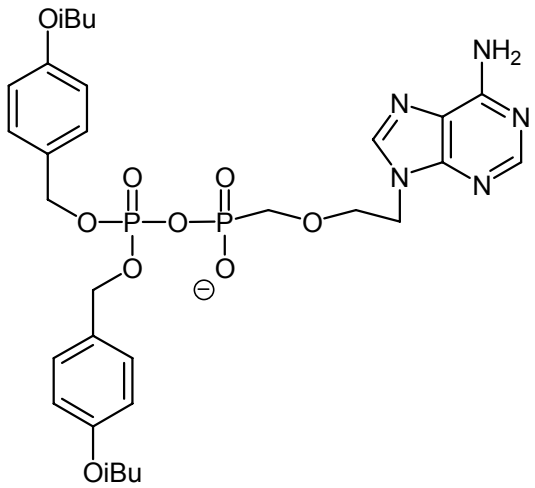


^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 8.48 (s, 1H, H_{het}-6), 8.21 (s, 1H, H_{het}-8), 8.17-8.09 (m, 4H, H-*ortho*), 7.70-7.63 (m, 2H, H-*para*), 7.57-7.40 (m, 8H, H-2, H-*meta*), 7.24-7.15 (m, 4H, H-3), 5.17 (d, 4H, *J*= 8.5 Hz, H-Bn), 4.83-4.73 (m, 1H, H-1´), 4.10-3.95 (m, 2H, H-6´), 2.50-2.27 (m, 2H, H-5´, H-4´), 2.25-2.05 (m, 2H, H-2´), 2.04-1.76 (m, 3H, H-3´, H-5´); ^{13}C-

NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 166.5 (2xC=O-Bz), 161.6 (C_{het}-2), 152.6 (C_{het}-4), 151.9 (2xC-4), 149.4 (C_{het}-6), 142.3 (C_{het}-8), 135.3 (d, *J*= 7.2 Hz, C-1), 134.9 (2xC-*para*), 131.1 (4xC-*ortho*), 130.8 (2xC-*ipso*), 130.6 (4xC-2), 129.8 (4xC-*meta*), 128.6 (C_{het}-5), 123.0 (4xC-3), 71.0 (d, *J*= 6.5 Hz, C-6´), 70.3 (d, *J*= 5.8 Hz, 2xC-Bn), 59.7-59.5 (m, C-NBu_4), 57.1 (C-1´), 39.7 (d, *J*= 8.3 Hz, C-4´), 35.8 (C-5´), 32.1 (C-2´), 27.6 (C-3´), 24.8 (C-NBu_4), 20.8 (C-NBu_4), 14.0 (C-NBu_4); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, MeOD) δ/ppm = -11.18 (d, 1P, *J*= 21.8 Hz, P-α), -13.00 (d, 1P, *J*= 20.9 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3423, 3210, 2955, 1733, 1617, 1510, 1426, 1268, 1202, 1063, 964, 700; UV (HPLC): λ_{max}= 305 nm, 225 nm; HPLC, Methode 4: t_R [min]= 12.53; mp= 102 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.22; MS (HR-ESI^-): calcd. 812.189 (M^-); found 812.184; $C_{39}H_{40}N_6O_{11}P_2$; Mol. Wt.: 830.72

Tetra-*n*-butylammonium-*ß*-bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)PMEAMP 207c

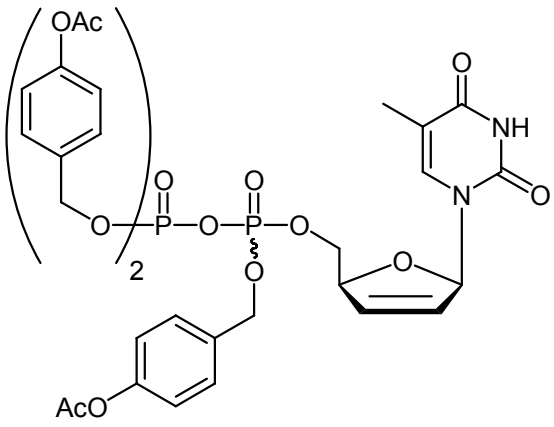
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleosides und die Reaktionsdurchführung erfolgten, wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben. Es wurden 0.29 g $[NBu_4]_2$PMEA (0.38 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL abs. Acetonitril und 3 mL abs. DMF mit 0.25 g Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (0.49 mmol, 1.3 Äq.) und 63 mg DCI (0.53 mmol, 1.4 Äq.) zusammengegeben und dann auf RT erwärmt. Nach 45 min wurde bei -20 °C mit 89 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.49 mmol, 1.3 Äq.) oxidiert. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril/Wasser aufgenommen und lyophillisiert. Das ^{31}P-NMR-Spektrum enthielt keine Produktsignale.



$C_{30}H_{36}N_5O_{11}P_2^-$; Mol. Wt.: 704.58

α,β,β-Tris-(4-acetoxybenzyl)d4TDP 191

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 84 mg Tetra-*n*-butylammonium-4-Acetoxybenzyl-d4TMP (121 μmol, 1.0 Äq.) dreimal mit abs. Acetonitril coevaporiert und in 3 mL abs. Acetonitril gelöst. Zu der Lösung wurden 23 mg DCI (195 μmol, 1.6 Äq.) und 89 mg Bis-(4-acetoxybenzyl)*N*,*N*-di*iso*propylaminophosphoramidit (0.19 mmol, 1.6 Äq.) gegeben und 24 h bei RT gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 35.0 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 192 μmol, 1.6 Äq.). Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden war, wurde der Rückstand in Acetonitril/Wasser aufgenommen und lyophillisiert. Das ^{31}P-NMR-Spektrum zeigte keine Produktsignale.



$C_{37}H_{38}N_2O_{16}P_2$; Mol. Wt.: 828.65

10.2.8.4 Isolierung von Hydrolyse-Intermediaten

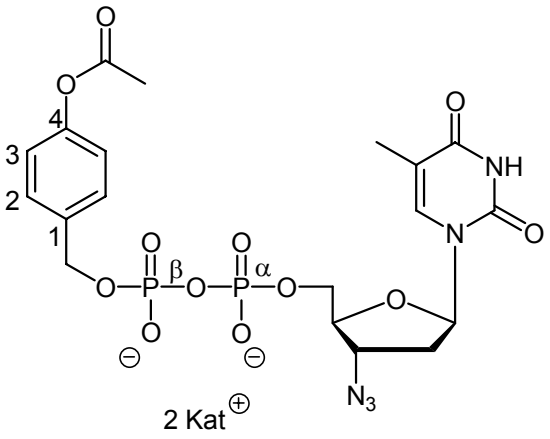
β-(4-Acetoxybenzyl)AZTDP 186

Es wurden 7.9 mg Ammonium-β-bis-(4-acetoxybenzyl)AZTDP (11 μmol) in 0.3 mL D_2O gelöst und mit 0.3 mL 50 mM PBS-Puffer pH= 7.3 versetzt. Die Hydrolyse wurde ^{31}P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Nach einer Woche wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung des Rohgemisches erfolgte an einer RP-18 Umkehrphase mit Wasser und einem Acetonitril-Gradienten von 0 bis 10%. Das Produkt wurde lyophillisiert.

Anmerkung: Da der Puffer Natrium und Kalium als Kationen enthält, ist nicht klar, was für Gegenionen vorliegen. Zudem konnte das Produkt nicht vollständig rein

isoliert werden. Da Verunreinigungen im aromatischen Bereich zu sehen waren, handelt es sich vermutlich um Benzylalkohol.

Ausbeute: 5.2 mg (ca. 9 μmol, 82%, ohne Gegenionen berechnet) eines farblosen Feststoffes.



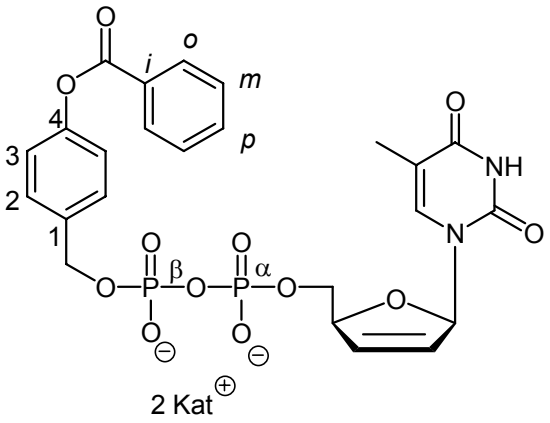
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O)δ/ppm= 7.61 (q, 1H, *J*= 1.1 Hz, H-6), 7.47-7.43 (m, 2H, H-2), 7.11-7.06 (m, 2H, H-3), 6.22 (dd, 1H, *J*= 6.8 Hz, *J*= 6.8 Hz, H-1´), 4.98 (d, 2H, *J*= 6.2 Hz, H-Bn), 4.40 (ddd, 1H, *J*= 4.0 Hz, *J*= 4.0 Hz, *J*= 7.4 Hz, H-3´), 4.30-4.10 (m, 3H, H-5´, H-4´), 2.42-2.30 (m, 2H, H-2´), 2.35 (s, 3H, Me), 1.83 (d, 3H, *J*= 0.9 Hz, Me_{het}); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O)δ/ppm= 173.4 (C=O), 166.2 (C_{het}-4), 151.5 (C-4), 149.7 (C_{het}-2), 137.2 (C_{het}-6), 135.6 (d, *J*= 8.7 Hz, C-1), 128.7 (2xC-2), 121.5 (2xC-3), 111.6 (C_{het}-5), 84.7 (C-1´), 83.0 (d, *J*= 9.3 Hz, C-4´), 67.0 (d, *J*= 5.2 Hz, C-Bn), 65.4 (d, *J*= 5.3 Hz, C-5´), 60.6 (C-3´), 36.4 (C-2´), 20.5 (Me), 11.7 (Me_{het}); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O)δ/ppm= -11.23 (d, 1P, *J*= 21.7 Hz, P-β), -11.73 (d, 1P, *J*= 22.0 Hz, P-α); UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 4.59; Methode 2: t_R [min]= 14.77; R_f (H_2O/MeOH 8:1 v/v, RP-18)= 0.63; MS (HR-ESI$^-$): calcd. 574.074 (M^-+H); found 574.076; $C_{19}H_{21}N_5O_{12}P_2^{2-}$; Mol. Wt.: 573.34

β-(4-Benzoyloxybenzyl)d4TDP 187

Es wurden 9 mg Ammonium-BBB-d4TDP (11 μmol) in 0.3 mL DMSO-d_6 gelöst und mit 0.3 mL 50 mM PBS-Puffer pH= 7.3 versetzt. Die Hydrolyse wurde ^{31}P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Nach drei Monaten wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung des Rohgemisches erfolgte an einer RP-18 Umkehrphase zunächst mit reinem Wasser, um die Puffersalze zu eluieren. Dem Laufmittel wurden daraufhin 10%, dann 30% Acetonitril zugesetzt. Das Produkt wurde gefriergetrocknet, in Wasser gelöst und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die wässrige Phase wurde erneut lyophillisiert.

Anmerkung: Da der Puffer Natrium und Kalium als Kationen enthält, ist nicht klar, was für Gegenionen vorliegen. Zudem konnte das Produkt nicht vollständig rein isoliert werden. Da Verunreinigungen im aromatischen Bereich zu sehen waren, handelt es sich vermutlich um Benzylalkohol und/oder Benzoesäure.

Ausbeute: 3.7 mg (ca. 6 μmol, 54%, ohne Gegenionen berechnet) eines farblosen Feststoffes.



^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O)δ/ppm= 8.28-8.23 (m, 2H, H-*ortho*), 7.80 (tt, 1H, *J*= 7.5 Hz, *J*= 1.3 Hz, H-*para*), 7.69-7.62 (m, 2H, H-*meta*), 7.55 (q, 1H, *J*= 1.2 Hz, H-6), 7.52-7.47 (m, 2H, H-2), 7.27-7.22 (m, 2H, H-3), 6.96 (ddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 3.4 Hz, H-1´), 6.47 (ddd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*= 6.2 Hz, H-3´), 5.90-5.81 (m, 1H, H-2´), 5.15-5.08 (m, 1H, H-4´), 4.99 (dd, 2H, *J*= 2.7 Hz, *J*= 6.1 Hz, H-Bn), 4.27-4.15 (m, 2H, H-5´), 1.83 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, Me); ^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O)δ/ppm= 167.5 (C=O), 166.2 (C_{het}-4), 151.7 (C_{het}-2), 149.9 (C-4), 138.5 (C_{het}-6), 134.8 (C-3´), 134.3 (C-*para*), 131.4 (2xC-*ortho*), 129.9 (2xC-2), 129.3 (2xC-*meta*), 129.0 (C-1), 128.9 (C-2´), 122.0 (2xC-3), 115.8 (C_{het}-5), 90.2 (C-1´), 86.4-86.2 (m, C-4´), 67.4 (d, *J*= 5.1 Hz, C-5´), 67.0-66.8 (m, C-Bn), 11.8 (Me); ^{31}P-NMR (162 MHz, ^{1}H-decoupled, D_2O)δ/ppm= -10.30 (d, 1P, *J*= 20.2 Hz, P-α), -10.65 (d, 1P, *J*= 20.2 Hz, P-β); UV (HPLC): λ_{max}= 263 nm, 230 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min]= 14.59; R_f (H_2O/MeCN 9:1 v/v, RP-18)= 0.50; MS (ESI$^-$): calcd. 593.1 (M^-+H); found 593.2; $C_{24}H_{22}N_2O_{12}P_2^{2-}$; Mol. Wt.: 592.39

10.3 Hydrolysestudien

pH abhängige Hydrolysekinetiken

Es wurden 50 mM Stammlösungen der Zielverbindungen in DMSO angesetzt. Von diesen Stammlösungen wurden je 11 μL mit 189 μL deionisiertem Wasser und weiteren 100 μL DMSO verdünnt, so dass 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösungen erhalten wurden. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 300 μL

Phosphatpufferlösung (PBS, 50 mM, pH=7.3, 37 °C) gestartet. Auf die Zugabe von internem Standard wurde verzichtet. Die Proben wurden in einem Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Es wurden nun nach verschiedenen Zeiträumen Aliquote der Kinetiklösung entnommen (je 60 μL) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden einzeln aufgetaut und sofort analysiert. Hierzu wurden 40 μL in die analytische RP-HPLC injiziert. Zur Auswertung der Kinetiken wurden die Chromatogramme bei verschiedenen UV-Wellenlängen ausgewertet. Die Peakflächen wurden gegen die Hydrolysedauer graphisch aufgetragen. Zur Auswertung wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms exponentielle Ausgleichskurven durch die einzelnen Messpunkte gelegt, so dass die Geschwindigkeitskonstanten *k* der Hydrolysen ermittelt werden konnten. Die Hydrolysehalbwertszeiten konnten nun mit der Formel

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

ermittelt werden, da es sich durch den großen Wasserüberschuss um Kinetiken Pseudo-erster-Ordnung handelte. Dies wurde für alle Kinetiken angenommen; sowohl für die Hydrolysen der *cyclo*Sal-Nucleotide, als auch für die Diphosphat-Prodrugs.

Diese Versuche wurden analog für die Ermittlung der Hydrolysehalbwertszeiten bei anderen pH-Werten durchgeführt.

50 mM Phosphatpuffer (pH= 6.8, pH= 7.3, pH= 7.5, pH= 8.7 nach Sörensen):

Es wurden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat mit deionisiertem Wasser auf 100 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit Phosphorsäure bzw. NaOH eingestellt.

50 mM Citrat-HCl-Puffer (pH= 2.0):

Es wurden 1.22 g Ammoniumcitrat in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst und mit konz. HCl auf pH= 2.0 eingestellt.

Hydrolysekinetiken in Zellextrakten

Es wurden 30 μL der 50 mM DMSO-Stammlösung der Verbindungen mit 220 μL DMSO auf eine Konzentration von 6.0 mM verdünnt. Im Folgenden wurden 100 μL Zellextrakt (CEM/0 für d4T, P3HR1 für BVdU und ACV, Mausleberextrakt für verschiedene Verbindungen) mit 20 μL 70 mM Magnesiumchloridlösung versetzt und 20 μL der 6.0 mM Stammlösung hinzu pipettiert. Für jeden Messwert wurde eine solche Lösung angesetzt und bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Nach den entsprechenden für eine Messung gewählten Zeiträumen wurden die Hydrolysen durch Zugabe von 300 μL Methanol abgebrochen und für 5 min bei 0 °C gelagert. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde in Spritzen aufgenommen und filtriert (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 μm) und in flüssigem Stickstoff eingefroren (-196 °C). Die Proben wurden an der analytischen RP-HPLC in ihre Bestandteile gespalten (Injektion: 90 μL). Die Auswertung erfolgte ohne Normierung der Peakflächen.

Hydrolysekinetiken in humanem Blutplasma

Die Hydrolysekinetiken in humanem Blutplasma erfolgten analog den Kinetiken in Zellextrakten. Im Unterschied wurde jedoch keine $MgCl_2$-Lösung zugegeben. Anstelle des Zellextraktes wurde verdünntes Blutserum (20% oder 50% in 50 mM PBS pH 6.8, bei den einzelnen Experimenten angegeben) zu den Proben gegeben.

Hydrolysekinetiken in Kulturmedium

Die Hydrolysekinetiken in Kulturmedium erfolgten analog den Kinetiken in Zellextrakten. Im Unterschied wurde jedoch keine $MgCl_2$-Lösung zugegeben. Anstelle des Zellextraktes wurde Kulturmedium (RPMI) mit 10% hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) zugegeben.

^{31}P-NMR Hydrolysestudien

Es wurden ca. 10 μmol der zu untersuchenden Verbindung in 350 μL DMSO-d_6 gelöst und 350 μL 50 mM PBS-Puffer des gewünschten pH Wertes zugegeben. Die Proben wurden bei RT aufbewahrt und regelmäßig NMR-spektroskopisch untersucht.

10.4 U-Rohr-Diffusionsversuche

a) H_2O (pH= 6.8) / DCM / H_2O (pH= 8.7) Diffusion von 5-(Am*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP

In ein U-Rohr (Durchmesser 0.9 mm) wurden 1.1 mL Dichlormethan als Diffusionsbarriere pipettiert und ein Rührfisch hinzu gegeben (Rotation 500 rpm). In den einen Arm wurde die Donorlösung (38.0 μL 50 mM DMSO-Stammlösung + 962 μL 50 mM PBS pH= 6.8), in den anderen Arm die Acceptorlösung (38.0 μL DMSO + 962 μL 50 mM PBS pH= 8.7) gegeben. Nach verschiedenen Zeiträumen wurden nun Proben der wässrigen Phasen entnommen (1 μL), mit 499 μL Wasser verdünnt und an der analytischen RP-HPLC untersucht (Injektion: 40 μL). Die DCM-Phase wurde kontinuierlich durchmischt, während die wässrigen Phasen bei jeder Probenentnahme mit einer Pipette gerührt wurden. Zum Nachweis der Verbindungen wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet.

b) H_2O / DCM / PLE Diffusion von 5-(Am*prop*)*cyclo*Sal-dm^{5}KMP

s. a). Unterschied: Die Donorlösung enthielt statt PBS-Puffer deionisiertes Wasser. Die Acceptorlösung setzte sich aus 990 μL PBS-Puffer pH= 7.3 und 10 μL 275 U/mL Schweineleber-Esterase (PLE) zusammen (Gesamtaktivität 2.75 U).

10.5 Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop

Von den Verbindungen wurden Stammlösungen verschiedener Konzentrationen angefertigt (8 mM; 50 mM). Diese wurden mit 1 mL cm ++ auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt (8 μM bis 150 μM, Inkubationslösung). Das über den HeLa-Zellen in den Trägerschalen stehende Medium (cm ++) wurde über eine Saugvorrichtung entfernt und durch die Inkubationslösung ersetzt. Für jede

Verbindung wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Die Trägerschalen wurden für verschiedene Zeiträume in einen Inkubator (37 °C, 5% CO_2) gestellt. Bei Inkubationsdauern von mehr als 6 h wurden die Lösungen und Waschvorgänge unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurde das cm ++ über den Zellen abgesaugt und zweimal mit je 1 mL cm ++ gewaschen. Nun wurde noch zweimal mit je 1 mL imaging media (IM; klares Medium, ohne Phenolrot) gewaschen und die Zellen mit 1 mL IM bedeckt. Die Trägerschalen wurden auf die mit Immersionsöl benetzte Linse gestellt und das Bild im Lichtfeld (bf) scharf gestellt. Mit der Kamera wurden nun Anhäufungen lebendiger Zellen gesucht und im bf mit einer Belichtungsdauer von 6 ms photographiert. Das bf wurde ausgestellt und mit einer UV-Lampe bei 340-350 nm auf die Zellen eingestrahlt. Die Bilder wurden nun mit längeren Belichtungsdauern (60 ms bis 3 s) aufgenommen.
Bei der Untersuchung von Leukämiezellen konnte wegen fehlender Adhäsion der Zellen nicht wie oben beschrieben gewaschen werden. Die Zellen wurden daher mit den Inkubations- und Waschlösungen durchmischt, 2 min zentrifugiert und der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt. Ansonsten wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

10.6 Reaktionsoptimierung

Um die Ausbeute bei der Synthese von *cyclo*Sal-Triestern über die Chlorphosphitmethode zu verbessern, wurde eine Reaktionsoptimierung an der analytischen HPLC durchgeführt. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

1) Erstellung einer Kalibrierfunktion
2) Variation der Reaktionsparameter
3) Quantifizierung der Ausbeute anhand der Kalibrierfunktion

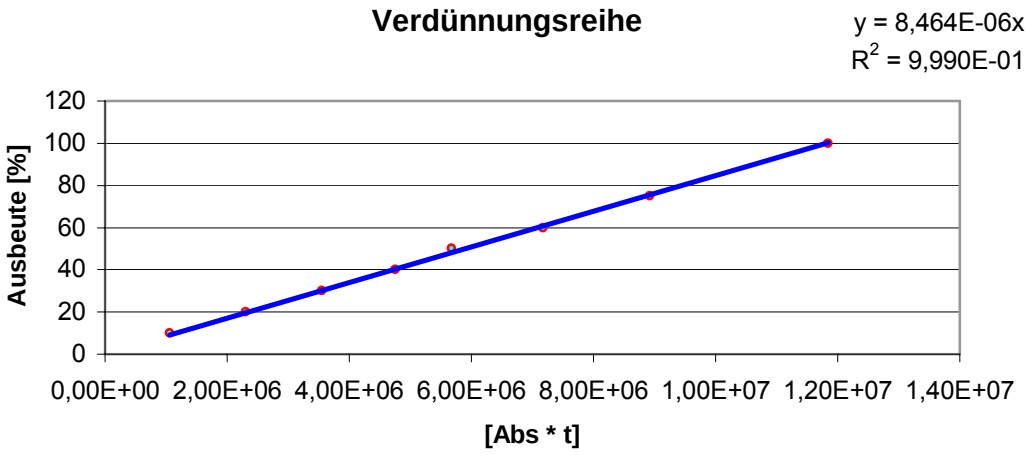
Als Modell-Nucleosid wurde dT gewählt, als Zielverbindung somit 3-Methyl-*cyclo*Sal-dTMP.

Zur Erstellung der Kalibrierfunktion wurden aus einer 50 mM DMSO-Stammlösung zwei 1.0 mM Stammlösungen von 3-Methyl-*cyclo*Sal-dTMP in H_2O angesetzt. Von jeder Lösung wurden 40 µL an der HPLC analysiert. Von den Stammlösungen wurde

eine Verdünnungsreihe angefertigt, um auf diese Weise 0.75, 0.6, 0.5, 0.4, …, 0.1 mM Lösungen zu erhalten. Von allen Lösungen wurde ein HPL-Chromatogramm angefertigt. Die entsprechenden Integrale beider Verdünnungsreihen wurden gemittelt und gegen die Konzentration (bzw. Ausbeute in %, s.u.) aufgetragen. In dem untersuchten Bereich zeigte die Kalibrierfunktion Linearität bei hoher Präzision.

Es wurden nun Synthesen der Zielverbindung unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Dazu wurden je 49 mg dT (202 μmol, 1.0 Äq.) je zweimal mit abs. Toluol coevaporiert, in 1 mL trockenem DMF aufgenommen und mit einer Menge 2 Äq. abs. DIPEA versetzt. Die Lösung wurde auf eine Temperatur T_1 gekühlt und dann langsam mit einer Menge m_1 3-Methylsaligenylchlorphosphit, gelöst in verschiedenen abs. Lösungsmitteln (LM), getropft. Es wurde eine Zeit t_1 bei einer Temperatur T_2 gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf -20 °C gekühlt, mit einer Menge m_2 *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) versetzt und 1 h bei einer Temperatur T_3 gerührt. Zum Ende der Reaktion wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt lyophillisiert.

Zur Analyse der Testansätze wurde wie folgt vorgegangen: Das lyophillisierte Rohprodukt wurde in 10 mL eines 1:1 Gemisches von Wasser/Acetonitril aufgenommen und somit zu einer maximalen Produktkonzentration von 20.2 mM verdünnt. Von dieser Lösung wurden 5 μL entnommen und mit 95 μL deionisiertem Wasser auf eine maximale Konzentration von 1.0 mM verdünnt. 40 μL dieser Lösung wurden an der HPLC analysiert. Aus der Verdünnungsreihe konnte somit die Ausbeute abgelesen werden. Sie entsprach der jeweiligen Verdünnung.



No	T_1 [°C]	LM	m_1	t_1 [h]	T_2 [°C]	m_2	T_3 [°C]	Ausbeute
1	- 20	Et_2O	1.2 Äq	1	20	2 Äq	20	52%
2	- 20	Et_2O	1.2 Äq	1	0	1 Äq	20	-
3	- 20	Et_2O	1.9 Äq	1	0	1 Äq	20	23%
4	- 20	Et_2O	1.3 Äq	1	0	1.5 Äq	20	70%
5	- 20	MeCN	1.7 Äq	1	0	1 Äq	20	51%
6	- 20	MeCN	0.7 Äq	1	0	1.5 Äq	20	62%
7	- 40	MeCN	1.0 Äq	1	- 20	1.5 Äq	20	30%
8	- 30	MeCN	0.7 Äq	1	- 20	1.5 Äq	- 20	31%
9	- 20	Et_2O	0.5 Äq	1	- 20	1.5 Äq	20	0%
10	- 40	Et_2O	1.2 Äq	1	- 20	1.5 Äq	20	0%
11	- 20	Toluol	1.2 Äq	1	- 20	1.5 Äq	20	43%
12	- 20	Toluol	1.0 Äq	1.5	- 20	1.5 Äq	20	39%
13	- 40	Toluol	0.8 Äq	1.5	- 30	1.5 Äq	20	27%
14	- 20	Toluol	1.2 Äq	1.5	0	1.5 Äq	20	67%
15	- 40	Toluol	1.5 Äq	1	20	1.5 Äq	20	-
16	- 20	Toluol	1.2 Äq	1.5	- 20	1.5 Äq	- 20	42%
17	- 20	Toluol	1.1 Äq	1.5	- 20	1.5 Äq	- 20	52%

10.7 Bestimmung von LogP-Werten

Es wurde die Verteilung einer Probe zwischen gleichen Volumina Wasser und DCM bestimmt. Hierzu wurde die Probe in 500 µL Wasser gelöst und für 10 min mit 500 µL DCM intensiv durchmischt (Vortex). Hinterher wurde die Probe 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, die Phasen getrennt und je ein Aliquot an der HPLC mit Methode 2 analysiert. Es wurde der dekadische Logarithmus der Verhältnisse der Absolutflächen von DCM zu Wasser gebildet.

11 Gefahrstoffverzeichnis

Die folgende Liste umfasst Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Arbeit umgegangen wurde. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, dass man sich mit diesen Stoffen in irgendeiner Weise kontaminiert und dass diese Stoffe in die Umwelt eingebracht werden.

Substanz	Gefahren-symbol	R-Sätze	S-Sätze
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	(2-)9-16-36/37-46
3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure	Xi	36/37/38	26-36
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	Xi	36/37/38	26-36
3-Methylsalicylsäure	Xn, Xi	22-37/38-41	26-36/39
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
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
Ammoniaklösung 25%	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Ammoniumchlorid	Xn, Xi	22-36	22
Benzol	T, F	45-46-11-36/38-48/23/24/25-65	53-45
Benzophenon	Xi, N	36/37/38-50/53	26-36-60-61
Benzoylchlorid	C	34	26-45
Calciumchlorid	Xi	36	22-24
Calciumhydrid	F	15	24/25-43.1-7/8
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
DCC	T	24-22-41-43	24-26-37/39-45
Dichlormethan	Xn	40	23-24/25-36/37
Diethylether	F+	12-19-22-66-67	9-16-29-33
DIPA	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45

Substanz	Gefahren-symbol	R-Sätze	S-Sätze
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	Xi	36/38	26
DMTr-Chlorid	-	-	22-24/25
Dowex50WX8	Xi	36/37/38	26-36
Essigsäure	C	10-35	26-36/37/39-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	Xi, F	11-36-66-67	16-26-33
Formaldehyd 37%	T	23/24/25-34-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Hexan	Xn, F, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Hydrazin	T, N	45-10-23/24/25-34-43-50/53	53-45-60-61
Imidazol	C	22-34	26-36/37/39-45
iso-Butyrylchlorid	F,C	11-35	16-23-26-36-45
Kaliumcarbonat	Xn, Xi	22-36/37/38	26-36
Kieselgel	Xn	40-37	26-37/39
Kohlenstoffdisulfid	F, T	11-36/38-48/23-62-63	16-33-36/37-45
Lithiumaluminiumhydrid	F	15	24/25-43.12-7/8
Mesitylensulfonylchlorid	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
Methyliodid	T	21-23/25-37/38-40	36/37-38-45
N,N-Dimethylanilin	T, N	23/24/25-40-51/53	(1/2-)28-36/37-45-61
Natrium	F, C	14/15-34	8-43.12-45

Substanz	Gefahren-symbol	R-Sätze	S-Sätze
Natriumazid	T+	28-32	28.1-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumhydrid	F, C	15-34	7/8-26-36/37/38-43.6-45
Natriumiodid	Xi	36/38	26
Natriummethylat	F, C	10-34	26-36/37/39-45
Natronlauge 1M	C	34	26-37/39-45
N-Brom-Succinimid	C	22-34	26-36/37/39-45
n-Butanol	Xn, Xi	10-22-37/38-41-67	12-36-37/39-46-7/9
N-Methylpyrrolidin	F, C	11-22-34	16-26-36/37/39-45
Octansäurechlorid	C	14-22-34-37	26-36/37/39-45
Oleum	C	35	26-30-45
para-Formaldehyd	C	20/22-34-40-43	26-36/37/39-45
para-Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26
Pd/C	-	-	14.1-22
Perhydrol	C	34	28.1-36/39-45
Petrolether 50/70	Xn, F+	12-65	9-16-29-33-62
Phenylboronsäure	Xn	22	22-24/25
Phosphor(V)oxid	C	35	22-26-45
Phosphortrichlorid	T+, C	14-26/28-29-35-48/20	26-36/37/39-45-7/8
Phosphorylchlorid	T+, C	14-22-26-29-35-48/23	7/8-26-36/37/39-45
Pivalinsäurechlorid	F, T	11-14-22-26-34	16-26-36/37/39-45
Propionsäure	C	34	26-36/37/39-45
Pyridin	Xn, F	11-20/21/22	26/28
Raney-Nickel	Xn, F	17-40-43	15-22-36
Salzsäure 2N	C	34-37	26-36/37/39-45
Silbernitrat	C, N	34-50/53	26-45-60-61
TBAF 1M in THF	F, C	11-19-34	16-26-36/37/39-45
TBAH 40%	C	34	26-36/37/39-45
TBDMS-Chlorid	F, C	11-35-37	16-26-36/37/39-45
tert-Butanol	Xn, F	11-20	9-16

Substanz	Gefahren-symbol	R-Sätze	S-Sätze
tert-Butylhydroperoxid	C, O	7-10-20/21/22-34-65	14.1-26-3/7-36/37/39-45-62
TFA	C	20-35-52/53	26-36/37/39-45
THF	Xi, F	11-19-36/37	16-29-33
TMS-Chlorid	F, C	11-14-20/21-35-37	16-26-36-36/37/39-45
Toluol	Xn, F	11-20	16-25-29-33
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trimethylphosphat	Xn	22-24	-
Trimethylphosphit	T	10-22-36/37/38-46	26-36-45-53
Wasserstoff	F+	12	9-16-33
Zinkpulver	F	15-17	7/8-43.3
Zirkon(IV)chlorid	C	14-22-34	8-26-36/37/39-45

12 Literaturverzeichnis

[1] A. L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox; Prinzipien der Biochemie; 2. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg **1994**, 1004.

[2] G. Pialoux, S. Fournier, A. Moulignier, J. D. Poveda, F. Clavel, B. Dupont; Central nervous system as a sanctuary for HIV-1 infection despite treatment with zidovudine, lamivudine and indinavir ; *AIDS* **1997**, *11,* 1302-1303.

[3] D. D. Richman, M. A. Fischl, M. H. Grieco, M.S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. Groopman, D. Mildvan, M. S. Hirsch, G. G. Jackson, D.T. Durack, D. Phil, S. Nusinoff-Lehrman; The toxicity of AZT in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex; *New Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 192-197.

[4] 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 Immuodeficiency Virus Compounds; *J.Biol.Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.

[5] J. Balzarini; Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives; *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113-126.

[6] X. Tan, C. K. Chu, F.D. Boudinot; Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics; *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *39*, 117-151.

[7] R. J. Sawchuk, Z. Yang; Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system; *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *39*, 5-31.

[8] H. T. Ho, M. J. M. Hitchcock; Cellular pharmacology of d4T, a nucleoside analog active against human immunodeficiency; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *33*, 844-849.

[9] C. R. Wagner, V. V. Iyer, E. J. McIntee; Pronucleotides: Towards the In Vivo Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides; *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.

[10] G. Gosselin, J. L. Girardet, C. Periguad, S. Benzaria, I. Lefebvre, N. Schlienger, A. Pompon, J. L. Imbach; New insights regarding the potential of the pronucleotide approach in antiviral chemotherapie; *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 195-208.

[11] K. Ono, H. Nakane, P. Herdewijn, J. Balzarini, E. De Clercq; Differential inhibitory effects of several pyrimidine 2´, 3´-dideoxynucleoside 5´-triphosphates on the activities of reverse transcriptase and various cellular DNA polymerases; *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 578-583.

[12] P. Huang, D. Farquhar, W. Plunkett; Selective action of 2´, 3´-didehydro-2´,3´-dideoxythymidine triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and human DNA polymerases; *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2817-2822.

[13] E. M. August, E. M. Birks, W. H. Prusoff; 3´-Deoxythymidine-2´-ene permeation of human lymphocyte cells by non-facilitated diffusion; *Mol. Pharmacol.* **1991**, *39*, 246-249.

[14] C. H. Chen, M. Vazquez-Padua, Y. C. Cheng; Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity, *Mol. Pharmacol.* **1991**, *39*, 625-628.

[15] K. Z. Rana, M. N. Dudley; Clinical pharmacokinetics of stavudine; *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *33*, 276-248.

[16] M. J. Browne, K. H. Mayer, S. B. D. Chafee, M. N. Dudley, M. R. Posner, S. M. Steinberg, K. K. Graham, S. M. Geletko, S. H. Zinner, S. L. Denman, L. M. Dunckle, S. Kaul, C. McLaren, G. Skowron, N. M. Kouttab. T. A. Kennedy, A. B. Weitberg, G. A. Curt; d4T in patients with AIDS or AIDS-related complex: a phase I trial; *J. Infect. Dis.* **1993**, *167*, 21-29.

[17] C. Vonrhein, G. J. Schlauderer, G. E. Schulz; Movie of the Structural Changes During a Catalytic Cycle of Nucleoside Monophosphate Kinases; *Structure* **1995**, *3*, 483 – 490.

[18] A. Lavie, N. Ostermann, R. Brundiers, R. S. Goody, J. Reinstein, M. Konrad, I. Schlichting; Structural Basis for Efficient Phosphorylation of 3'-Azidothymidine Monophosphate by *Escherichia coli* Thymidylate Kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14045 – 14050.

[19] D. E. Koshland Jr.; Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98 - 105.

[20] T. Veit; Kinetischer Mechanismus der menschlichen Thymidylatkinase – der induced fit als Grund für die unzureichende Aktivierung des *Anti*-HIV-Medikaments 3'-Azido-2',3'-didesoxythymidinmonophosphat (AZTMP); *Dissertation*, Dortmund, **2000**.

[21] A. Lavie, I. Schlichting, I. R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, R. S. Goody; The bottleneck in AZT activation; *Nature Med.* **1997**, *3*, 922 – 924.

[22] A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting; Structure of thymidylate kinase revelas the cause behind the limiting step in AZT activation; *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 601 – 604.

[23] A. Lavie, M. Konrad, R. Brundiers, R. S. Goody, I. Schlichting, J. Reinstein; Crystal Structure of Yeast Thymidylate Kinase Complexed with the Bisubstrate Inhibitor P1-(5'-Adenosyl) P5-(5'-Thymidyl) Pentaphosphate (TP5A) at 2.0 Å Resolution: Implications for Catalysis and AZT Activation; *Biochemistry* **1998**, *37*, 3677 – 3686.

[24] J. P. Sommadossi, R. Carlisle, Z. Zhou; Cellular pharmacology of 3´-azido-3´-deoxythymidine (AZT) with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells; *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 9-14.

[25] J. A. Harrington, J. E. Reardon, T. Spector; 3´-azido-3´-deoxythymidine (AZT) monophosphate: An inhibitor of exonucleolytic repair AZT-terminated DNA; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 918-920.

[26] E. T. Hall, J. P. Yan, P. Melanco, R. D. Kuchta; 3´-Azido-3´-deoxythymidine potently inhibits protein glycosylation; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14355-14358.

[27] J. P. Yan, D. D. Ilsley, C. Frohlick, R. Street, E. T. Hall, R. D. Kuchta, P. Melanco; 3´-Azidothymidine (zidovudinie) inhibits glycosylation and dramatically alters glycosphingolipid synthesis in whole cells clinically relevant concentrations; *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22836-22841.

[28] J. M. Collins, R. W. Klecker Jr., J. A. Kelly, J. S. Roth, C. L. McCully, F. M. Balis, D. G. Poplack; Pyrimidine dideoxyribonucleosides: selective penetration into cerebrospinal fluid; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *245*, 466-470.

[29] M. R. Blum, S. H. T. Lao, S. S. Good, P. deMiranda; Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans; *Am. J. Med.* **1988**, *85*, 189-194.

[30] M. P. Stagg, E. M. Cretton, L. Kidd, R. B. Diasio, J. P. Sommadossi; Clinical pharmacokinetics of 3´-azido-3´-deoxythymidine (zidovudine) and catabolites with formation of a toxic catabolite 3´-amino-3´-deoxythymidine; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1992**, *51*, 668-676.

[31] 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.

[32] 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.

[33] M. R. Rashidi, J. A. Smith, S. E. Clarke, C. Beedham; In vitro oxidation of famciclovir and 6-deoxypenciclovir by aldehyde oxidase from human, guinea pig, rabbit and rat liver; *Drug Metabolism and Disposition* **1997**, *25*, 805-813.

[34] L. Naesens, E. de Clercq ; Recent developments in herpesvirus therapy; *HERPES* **2001**, *8*, 12-16.

[35] F. A. Alrabiah, S. L. Sacks; New anti-herpesvirus agents. Their targets and therapeutic potential; *Drugs* **1996**, *52*, 17-32.

[36] P. A. Chatis, C. S. Crumpacker ; Resistance of herpesvirus to antiviral drugs; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 1589-1595.

[37] A. Meerbach, R. Klöcking, C. Friedrichs, P. Wutzler, C. Meier; Antivirale Wirkung von *cyclo*Sal-Pronucleotiden gegen Herpes-Simplex-Virus und gegen Epstein-Barr-Virus; *Chemother. J.* **2003**, *12*, 79-84.

[38] S. Freeman, K. C. Ross; Prodrug design for phosphates and phosphonates; *Progress Med. Chem.* **1997**, *34*, 111-147.

[39] 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.

[40] 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.

[41] 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.

[42] 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.

[43] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J.Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of the Bis(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) Esters of the 5'-Monophosphate of AZT, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1993**, *1*, 1239-1245.

[44] 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.

[45] C. McGuigan, D. Cahard, H. M. Sheeka, E. De Clercq; Aryl Phosphoramidate Derivatives of d4T Have Improved anti-HIV Efficiency in Tissue Culture and May Act by the Generation of a Novel Intracellular Metabolite; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1748-1753.

[46] 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 P_{450} 3A-Activated Prodrugs (HepDirect Prodrugs) Useful for Targeting Phosph(on)ate-Based Drugs to the Liver; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.

[47] E. Palomino, D. Kessel, J. P. Horwitz ; A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2´,3´-dideoxynucleosides to brain; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 622-625.

[48] 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.

[49] R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y.-F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland; Metabolism and *in vitro* Antiretroviral Activities of Bis(Pivaloyl-

oxymethyl)-Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2247-2250.

[50] 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.

[51] A. Routledge, I. Walker, S. Freeman, A. Hay, N. Mahmood, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of 4-Acyloxybenzyl Bis(Nucleosid-5-yl) Phosphates; *Nucl. Nucl.*, **1995**, *14(7*), 1545-1558.

[52] A. Glazier et al., Poster at the 9th International Conference on Antiviral Research, May 19-24, *Fukushima, Japan*, **1995**.

[53] U. Muus; *Dissertation* **2003**, Universität Hamburg.

[54] C. Meier, U. Muus, J. Renze, L. Naesens, E. De Clercq, J. Balzarini; Comparative study of bis(benzyl)phosphate triesters of 2´,3´-dideoxy-2´,3´-didehydrothymidine (d4T) and *cyclo*Sal-d4TMP- hydrolysis, mechanistic insights and anti-HIV activity; *Antiviral Chem. Chemother.* **2002**, *13*, 101-114.

[55] 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.

[56] C. Meier; Pro-Nucleotides - Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates; *Synlett* **1998**, 233-242.

[57] C. Meier; *cyclo*Sal-Pronucleotides - Design of Chemical Trojan Horses; *Mini. Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 219-234.

[58] C. Meier; *cyclo*Sal Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery - Chemistry Meets Biology; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.

[59] 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-monophosphate; *Liebigs Ann.* **1995**, 2203-2208.

[60] T. Imamichi, M. A. Murphy, J. W. Adelsberger, J. Yang, C. M. Watkins, S. C. Berg, M. W. Baseler, R. A. Lempicki, J. Guo, J. G. Levin, H. C. Lane; Actinomycin D Induces High-Level Resistance to Thymidine Analogs in

Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Interfering with Host Cell Thymidine Kinase Expression; *Journal of Virology* **2003**, *77*, 1011-1020.

[61] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; *Cyclo*Sal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cyclo*Sal-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.

[62] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; *cyclo*Sal-Pro-Nucleotides (*cyclo*Sal-NMP) of 2',3'-dideoxyadenosine (ddA) and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydroadenosine (d4A): Synthesis and antiviral evaluation of a highly efficient nucleotide delivery system; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1604-1614.

[63] 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 *cyclo*Sal-Nucleotides of acyclic Nucleoside Analogues; *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 389-402.

[64] J. Balzarini, F. Haller-Meier, E. De Clercq, C. Meier; Antiviral activity of *cyclo*saligenyl prodrugs of acyclovir, carbovir and abacavir; *Antiviral Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 301-306.

[65] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler; *Cyclo*Sal-BVDUMP pronucleotides: how to convert an antiviral-inactive nucleoside analogue into a bioactive compound against EBV; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5157-5172.

[66] C. Meier, C. Ducho, H. J. Jessen, D. Vukadinovic-Tenter, J. Balzarini; Second Generation cycloSal-d4TMP Pronucleotides bearing Esterase-cleavable sites - The trapping-Concept*; Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *1*, 197-206.

[67] C. Meier, C. Ducho, H. J. Jessen, J. Balzarini; Esterase-cleavable cycloSal-Pronucleotides - the Trapping Concept; *Coll. Cech. Chem. Commun. (Symp. Series)* **2005**, 105-114.

[68] H. J. Jessen, V. Tonn, C. Meier; Intracellular Trapping of cycloSal-Pronucleotides by Enzymatic Cleavage; *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids* **2007**, *26*, 827.

[69] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier; Enzymatically Activated *cyclo*Sal-d4T-monophosphates: The Third Generation of *cyclo*Sal-Pronucleotides; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658-1667.

[70] C. Ducho, U. Görbig, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier; Bis-*cyclo*Sal-d4T-monophosphates: Drugs That Deliver Two Molecules of Bioactive Nucleotides; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1335-1346.

[71] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier; Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1-4.

[72] C. Wojczewski, K. Stolze, J.W. Engels; Fluorescent Oligonucleotides – Versatile Tools as Probes and Primers for DNA and RNA Analysis; *Synlett* **1999**, *10*, 1667-1678.

[73] L. C. Sowers, B. R. Shaw, M. L. Veigl, W. D. Sedwick, *Mutation Research* **1987**, *177*, 201.

[74] M. Ruppel; *Dissertation* **2003**, Universität Hamburg.

[75] H. J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier; Synthesis and Properties of fluorescent cycloSal-Nucleotides based on the Pyrimidine Nucleoside m5K; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 924-931.

[76] C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinovic, J. Balzarini; Second Generation of *cyclo*Sal-Pro-Nucleotides with Esterase-Cleavable Sites: The „Lock-In"-Concept; *Nucleosides Nucleotides* **2004**, *23*, 89-115.

[77] C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinovic, J. Balzarini; „Lock-in"-*cyclo*Sal-pronucleotides - a new generation of chemical Trojan horses?; *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 383-394.

[78] D. Vukadinovic-Tenter, J. Balzarini, C. Meier; New Developments of the "Lock-in" Modified *cyclo*Sal-d4TMPs; *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1325-1328.

[79] C. Ducho; *Dissertation* **2005**, Universität Hamburg.

[80] Slough, Deutsches Patent Nr. 1931255.

[81] A. Lomp; *Dissertation* **2002**, Universität Hamburg.

[82] N. Gisch, C. Meier; *unveröffentlichte Ergebnisse*.

[83] R. J. Crooks; Valaciclovir – a review of its potential in the management of genital herpes; *Antiviral Chem. Chemother.* **1995**, *6*, 39-44.

[84] A. Guo, P. Hu, P. V. Balimane, F. H. Leibach, P. J. Sinko; Interactions of a nonpeptidic drug, valacyclovir, with the human intestinal peptide transporter (hPEPT1) expressed in a mammalian cell line; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 448-454.

[85] C. Meier, C. Ducho, U. Görbig, R. Esnouf, J. Balzarini; Interaction of *cyclo*Sal-Pronucleotides with Cholinesterases from Different Origins. A Structure-Activity Relationship; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2839-2852.

[86] D. Voet, J. G. Voet; Biochemistry; 2nd Edition, *John Wiley & Sons*, New York **1995**, 390-391, 1296-1300.

[87] 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.

[88] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum, New York, **1999**.

[89] A. Sharma, R. G. Shulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York, **1999**.

[90] http://merian.pch.univie.ac.at/pch/lv/instr/instr.pdf **2008**, letzter Zugriff 20.1.2008.

[91] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228.

[92] A. Broo; A Theoretical Investigation of the Physical Reason for the Very Different Luminescence Properties of the Two Isomers Adenine and 2-Aminopurine; *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 526-531.

[93] P. Rai, T. D. Cole, E. Thompson, D. P. Millar, S. Linn; Steady-state and time-resolved fluorescence studies indicate an unusual conformation of 2-aminopurine within ATAT and TATA duplex DNA sequences, *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 2323-2332.

[94] J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; *Cyclo*saligenyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate: Efficient Intracellular Delivery of d4TMP; *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 928-935.

[95] H. J. Jessen; *Diplomarbeit* **2005**, Universität Hamburg.

[96] G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, K. K. Ogilvie; *Can. J. Chem*. **1982**, *60*, 1106-1113.

[97] V. Nair, D. A. Young, R. DeSilvia Jr.; 2-Halogenated Purine Nucleosides: Synthesis and Reactivity; *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1344-1347.

[98] F. Seela, G. Becher; Synthesis, Base Pairing and Fluorescence Properties of Oligonucleotides Containing 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-6-amine (8-Aza-7-

deazapurin-2-amine) as an Analogue of Purin-2-amine; *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 928-939.

[99] Y.-Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann; Simple Synthesis of 4-Thiothymidine, 4-Thiouridine and 6-Thiodeoxyguanosine; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2817-2820.

[100] M. J. Robins, B. Uzanski; *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2601.

[101] C. K. Chu, V. S. Bhadti, B. Doboszewski, Z. P. Gu, Y. Kosugi, K. Pullaiah, P. Van Roey; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2217.

[102] E. J. Corey, R. A. E. Winter; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2677.

[103] O. R. Ludek, J. Balzarini, C. Meier; Synthesis and Antiviral Evaluation of Carbocyclic 3'-Azidothymidine (AZT) Analogues and their cycloSal-Phosphate Triesters; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 932-940.

[104] R. Vince, J. Brownell, S. A. Beers; 6-Deoxycarbovir: A Xanthine Oxidase activated Prodrug of Carbovir; *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14*, 39-44.

[105] J. Balzarini, C. McGuigan; Bicyclic pyrimidine nucleoside analogues (BCNAs) as highly selective and potent inhibitors of varicella-zoster virus replication; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2002**, *50*, 5-9.

[106] J. A. Doudna, J. W. Szostak, A. Rich, N. Usman; Chemical Synthesis of Oligoribonucleotides Containing 2-Aminopurine: Substrates for the Investigation of Ribozyme Function; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5547-5549.

[107] T. Sowa, S. Ouchi; *Bull. Chem. Soc. Jpn*. **1975**, *48*, 2084.

[108] J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel; Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2´-deoxy-β-D-lyxofuranosyl)thymine; *J. Org. Chem* **1964**, *29*, 2076.

[109] G. M. Tener; 2-Cyanoethyl Phosphate and its Use in the Synthesis of Phosphate Esters; *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 159-168.

[110] M. E. Kuipers, P. J. Swart, M. M. W. B. Hendriks, D. K. F. Meijer; Optimization of the Reaction Conditions for the Synthesis of Neoglycoprotein-AZT-Monophosphates Conjugates; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 883-889.

[111] O. Ludek; *Dissertation* **2005**, Universität Hamburg.

[112] J. L. York; Effect of the Structure of the Glycon on the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Adenine Nucleosides; *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2171-2173.

[113] T. Mukaiyama, F.-C. Pai, M. Onaka, K. Narasaka; A Useful Method For Selective Acylation of Alcohols Using 2,3'-Bipyridyl-6-yl Carboxylate and Cesium Fluoride; *Chem. Lett.* **1980**, 563-566.

[114] M. P. Paradisi, G. P. Zecchini, I. Torrini; Selective Acylations of Aminophenols and Hydroxyalkylphenols with 1-Acetyl-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridin; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27(41)*, 5029-5032.

[115] A. Saito, B. Shimizu; Synthesis of Mesoionic Triazolopyridine. III Applications of *N*Acyl Mesoionic Triazolopyridines as Acylating Reagents; *Bull. Chem. Soc. Jpn*. **1983**, *56*, 2974-2980.

[116] S. Freeman, W. J. Irwin, A. G. Mitchell, D. Nicholls, W. Thomson; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 875.

[117] S. Warnecke; *Diplomarbeit* **2005**, Universität Hamburg.

[118] K. He, A. Hasan, B. Krzyzanowska, B. R. Shaw; Synthesis and Separation of Ribonucleoside 5´-(α-P-Borano)triphosphates; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5769-5773.

[119] J. Tomasz, B. R. Shaw, K. Porter, B. F. Spielvogel, A. Sood; 5´-P-Borane-Substituted Thymidine Monophosphate and Triphosphate; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1373-1375.

[120] M. Dobrikov, K. M. Grady, B. R. Shaw; Introduction of the alpha-*P*-Borano-Group into Deoxynucleoside Triphosphates Increases their Selectivity to HIV-1 Reverse Transcriptase Relative to DNA Polymerases; *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22(3)*, 275-82.

Lebenslauf

Dipl. Chem. Henning Jacob Jessen
geboren am 22. Dezember 1978 in Hamburg
ledig, keine Kinder

Schulausbildung

1985-1989:	Grund- und Realschule Weusthoffstraße in Hamburg/Harburg
1989-1998:	Friedrich-Ebert-Gymnasium in Hamburg/Harburg
06/1998:	Abitur (Note: 1.6)

Ersatzdienst

08/1998-08/1999:	EDV-Abteilung des Krankenhauses Mariahilf, Hamburg

Studium

10/1999-12/2001:	Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg
12/2001:	Vordiplom in Chemie (Note: 1.0)
12/2001-01/2005:	Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg
06/2004-01/2005:	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg. Titel: „Synthese und Charakterisierung fluoreszierender *cyclo*Sal-Nucleotid-Analoga“
01/2005:	Diplom in Chemie (Note: 1.0)
seit 02/2005:	Doktorand in Organischer Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier an der Universität Hamburg. Titel der Dissertation: „Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten“

Lehrerfahrung

2001-2004:	Verschiedene Lehrtätigkeiten am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg: Tutorium für Studierende der Chemie und Lebensmittelchemie sowie Assistent im Chemischen Praktikum für Studierende der Medizin (Anorganische und Organische Chemie)
seit 2005:	Assistent im Fortgeschrittenenpraktikum in Organischer Chemie sowie im Integrierten Synthesepraktikum in Anorganischer und Organischer Chemie (für Studierende im Hauptstudium)

Auslandsaufenthalt

10/2007: Gastaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Arwyn T. Jones an der Welsh School of Pharmacy, Cardiff, Wales. Durchführung fluoreszenzmikroskopischer Analysen in HeLa-Zellkulturen.

Auszeichnungen

05/2006: Second Prize - Graduate Student. Poster at the 19th International Conference on Antiviral Research, San Juan, Puerto Rico (ICAR-ISAR). Title: “Synthesis and properties of intrinsically fluorescent *cyclo*Sal-pronucleotides”

05/2007: First Prize - Graduate Student. Poster at the 20th International Conference on Antiviral Research, Palm Springs, California (ICAR-ISAR). Title: “Properties of amino acid esters linked to *cyclo*Sal-pronucleotides”

Publikationsliste

- C. Meier, C. Ducho, H.J. Jessen, J. Balzarini; *Esterase-cleavable cycloSal-Pronucleotides - the Trapping Concept;* Coll. Cech. Chem. Commun. (Symp. Series) **2005**, 105-114.

- H.J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier; *Synthesis and Properties of fluorescent cycloSal-Nucleotides based on the Pyrimidine Nucleoside m5K;* European Journal of Organic Chemistry **2006**, 924-931.

- C. Meier, C. Ducho, H.J. Jessen, D. Vukadinovic-Tenter, J. Balzarini; *Second Generation cycloSal-d4TMP Pronucleotides bearing Esterase-cleavable sites - The trapping-Concept;* European Journal of Organic Chemistry **2006**, 197-206.

- H. J. Jessen, V. Tonn, C. Meier; *Intracellular Trapping of cycloSal-Pronucleotides by Enzymatic Cleavage;* Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids **2007**, *26*, 827.

Poster

- H.J. Jessen, W. Fendrich, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier; *Synthesis and Properties of intrinsically fluorescent cycloSal-Pronucleotides;* 19th International Conference on Antiviral Research, San Juan, Puerto Rico, 7-11 May 2006.

- H.J. Jessen, V. Tonn, J. Balzarini, C. Meier; *Intracellular Trapping of cycloSal-Pronucleotides by Enzymatic Cleavage;* 17th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland, 3-7 September 2006.

- H.J. Jessen, J. Balzarini, C. Meier; *Properties of amino acid esters linked to cycloSal pronucleotides;* 20th International Conference on Antiviral Research, Palm Springs, California, 29 April - 3 May 2007.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation “Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten” 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 mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Henning Jessen Hamburg, den 9.2.2008