

Synthese und Untersuchungen zur
Struktur-Aktivitäts-Beziehung enzymatisch
aktivierbarer *cyclo*Sal-Pronucleotide

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Nicolas Gisch

vorgelegt dem Department Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg, im Oktober 2008



Universität Hamburg

Synthese und Untersuchungen zur
Struktur-Aktivitäts-Beziehung enzymatisch
aktivierbarer *cyclo*Sal-Pronucleotide

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Nicolas Gisch

vorgelegt dem Department Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg, im Oktober 2008



Universität Hamburg

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. Till Opatz

Datum der Disputation: 05.12.2008

**Meiner Frau Sonja
und meiner Tochter Emilia**

Herrn Prof. Dr. C. Meier danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises sei ein großer Dank für die angenehme und gute Zusammenarbeit ausgesprochen. Ein besonders großes Dankeschön gebührt meinem langjährigen Labor-OC-518-Kollegen Dr. Nicolas Böge für ein hervorragendes Arbeitsklima, die außerordentlich gute Zusammenarbeit sowie seine stete Bereitschaft zur Unterstützung. Außerdem danke ich Herrn Dr. Henning Jessen, Herrn Dr. Jens O. Thomann und Herrn Jun.-Prof. Dr. Christian Ducho für die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Ein großer Dank geht auch an die zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten, die im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten für mich durchgeführt haben. Besonders hervorzuheben ist dabei Herr Florian Pertenbreiter.

Herrn Dr. V. Sinnwell, Herrn Dr. E. T. K. Haupt und ihren Mitarbeitern danke ich für die Messung unzähliger NMR-Spektren. Frau C. Christ und Frau A. Meiners sei für die Messungen der Massenspektren gedankt. Herrn Prof. Dr. J. Kopf und seinem Team sowie insbesondere Dr. F. Hoffmann danke ich für die Durchführung der Einkristallstrukturuntersuchung.

Herrn Prof. Dr. J. Balzarini und seinem Team danke ich für die Durchführung der *in vitro*-Zelltests sowie für die Bereitstellung von Zellextrakten.

Herrn Dr. Nicolas Böge und Herrn Dipl.-Chem. in spe Florian Pertenbreiter sowie meiner Frau als fachfremde Korrektorin danke ich für die intensive und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein besonders großer Dank gebührt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Studiums und dieser Arbeit. Auch meinen Schwiegereltern gilt ein großer Dank für ihre Hilfe während dieser Zeit.

Ein riesiger Dank geht an meine Frau Sonja für ihre unermessliche Unterstützung und ihr enormes Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit. Ihr und unserer Tochter Emilia sei diese Arbeit gewidmet.

Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ABC	<i>carba</i> -2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro-6-cyclopropylaminoguanosin, Abacavir, Ziagen [®]
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
1-Acyl	1-Acetoxyvinyl
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AM	Acetoxymethyl
Äq.	Äquivalente
AZT	3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin, Zidovudin, Retrovir [®]
BChE	Butyrylcholinesterase
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BVDU	(<i>E</i>)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin, Brivudin, Zostex [®]
CD	circularer Dichroismus
CEM/0	humane Wildtyp T-Lymphozyten-Zelllinie
<i>cycloSal</i>	<i>cycloSaligenyl</i>
δ	chemische Verschiebung (NMR)
Δ	Energie
d	Dublett (NMR)
d4	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro (Nucleoside/Nucleotide)
d4A	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroadenosin
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin, Stavudin, Zerit [®]
dA	2'-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatografie
dd	Dublett eines Dubletts (NMR)
ddA	2',3'-Didesoxyadenosin
ddd	Dublett eines Dubletts eines Dubletts (NMR)
ddl	2',3'-Didesoxyinosin, Didanosin, Videx [®]
ddT	2',3'-Didesoxythymidin
<i>d.e.</i>	Diastereomerenüberschuss
dG	2'-Desoxyguanosin

DIPEA	Diisopropylethylamin (<i>Hünigs Base</i>)
dm ⁵ K	5-Methylpyrimidin-2-on-2'-desoxyribonucleosid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dT	2'-Desoxythymidin
E.C.	Enzyme Commission
EC	Effektive Konzentration
ESI ⁺	Elektronensprayionisation (positiv)
FAB	fast atom bombardement
FCS	Fötales Kälberserum
gef.	gefunden
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	high resolution
hept	Heptett (NMR)
iBOM	Isobutyroxymethyl
iPr	Isopropyl
IR	Infrarot
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
m	Multiplett (NMR)
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	mol/L
m ⁵ K	5-Methylpyrimidin-2-on-ribonucleosid
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRTI	nucleosidischer Reverse-Transkriptase-Hemmer
Nucl.	Nucleosid
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>

POC	Isopropoxyloxycarbonyloxymethyl
POM	Pivaloyloxymethyl
PPD	2-(Hydroxymethylphenyl)-phosphatnucleosiddiester
ppm	parts per million
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	reversed phase
rpm	revolutions per minute
R _t	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett (NMR)
SG	Schutzgruppe
SI	Selektivitätsindex
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR)
<i>t</i> _{1/2}	Halbwertszeit
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
THF	Tetrahydrofuran
TIPDS	Tetraisopropyldisiloxanyliden
TK	Thymidin-Kinase
TK ⁻	Thymidin-Kinase Defizienz
t _R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
vs.	versus

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Kenntnisstand	3
2.1.	Nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren zur HIV-Behandlung	3
2.1.1.	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, 2)	4
2.2.	Prodrug-Konzepte	5
2.3.	Das <i>cycloSal</i>-Konzept	7
2.3.1.	Mechanismus der chemischen Hydrolyse eines <i>cycloSal</i> -Nucleosidmonophosphats	8
2.3.2.	<i>CycloSal</i> -Pronucleotide der ersten Generation	9
2.3.3.	„Lock-in“-modifizierte <i>cycloSal</i> -Pronucleotide – <i>cycloSal</i> -Pronucleotide der zweiten Generation	13
2.3.4.	Enzymatisch aktivierbare <i>cycloSal</i> -Pronucleotide – <i>cycloSal</i> -Pronucleotide der dritten Generation	17
2.3.5.	Bis-(<i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate)	19
2.3.6.	Diastereoselektive Synthese von <i>cycloSal</i> -Pronucleotiden	19
2.3.7.	Synthetische Nutzung des <i>cycloSal</i> -Konzepts	21
3.	Aufgabenstellung	22
4.	Enzymatisch aktivierbare <i>cycloSal</i>-Pronucleotide	23
4.1.	Diacyloxymethyl-<i>cycloSal</i>-d4T-monophosphate	23
4.1.1.	Synthese von 5-Diacetoxymethyl- und 5-Formyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphaten	23
4.1.2.	Allgemeines zur Charakterisierung von <i>cycloSal</i> -Pronucleotiden	34
4.1.3.	Charakterisierung der 5-Diacetoxymethyl- und 5-Formyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	35
4.1.4.	Antivirale <i>in vitro</i> -Tests der 5-Diacetoxymethyl- und 5-Formyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	40
4.1.5.	Synthese von 3-Diacetoxymethyl- und 3-Formyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphaten	45

4.1.6.	Charakterisierung der 3-Diacetoxymethyl- und 3-Formyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	56
4.1.7.	Antivirale <i>in vitro</i> -Tests der 3-Diacetoxymethyl- und 3-Formyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	58
4.1.8.	Synthese, Charakterisierung und antivirale <i>in vitro</i> -Tests von Diacyloxymethyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphaten mit sterisch anspruchsvollen Acylalfunktionen	60
4.2.	1-Acetoxyvinyl-<i>cycloSal</i>-d4T-monophosphate	67
4.2.1.	Synthese von 1-Acetoxyvinyl- und Acetyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphaten	67
4.2.2.	Charakterisierung der 5-(1-Acetoxyvinyl)- und 5-Acetyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	94
4.2.3.	Antivirale <i>in vitro</i> -Tests der 5-(1-Acetoxyvinyl)- und 5-Acetyl- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	102
4.3.	Zusammenhang zwischen der absoluten Konfiguration von <i>cycloSal</i>-d4T-monophosphaten und ihrer Aktivität in Thymidin-Kinase-defizienten Zellen	105
4.3.1.	Biologische Bedeutung von Cholinesterasen	108
4.3.2.	Inhibition von Cholinesterasen durch <i>cycloSal</i> -Nucleosidmonophosphate	109
4.3.3.	Methodik des verwendeten Cholinesterase-Assays	113
4.3.4.	Butyrylcholinesterase-Inhibition diastereomerenreiner <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphate	115
5.	Synthese und Charakterisierung von Bis-(<i>cycloSal</i>-d4T-monophosphaten)	126
5.1.	Kenntnisstand	126
5.2.	Synthese von 5,5'-Bis-(<i>cycloSal</i>-d4T-monophosphaten)	129
5.2.1.	Synthese des 5-(Saligen-5'-yl)- <i>cycloSal</i> -d4T-monophosphats 206	134
5.3.	Charakterisierung der 5,5'-Bis-(<i>cycloSal</i>-d4T-monophosphate) und der Referenzverbindung 206	138
5.3.1.	Untersuchungen zum Hydrolyseweg des 5,5'-Bis-(<i>cycloSal</i> -d4T-monophosphats 194	142
5.4.	Antivirale <i>in vitro</i>-Tests der 5,5'-Bis-(<i>cycloSal</i>-d4T-monophosphate)	149

6.	Zusammenfassung	152
7.	Summary	156
8.	Ausblick	158
9.	Experimentalteil	161
9.1.	Allgemeines	161
9.1.1.	Edukte und Reagenzien	161
9.1.2.	Lösungsmittel	161
9.1.3.	Absolute Lösungsmittel	162
9.1.4.	Chromatografie	162
9.1.5.	Spektroskopie	165
9.1.6.	Weitere verwendete Geräte	166
9.2.	Synthesen	167
9.2.1.	Synthese bereits bekannter Verbindungen	167
9.2.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	167
9.2.3.	Synthese der 4-Formylsalicylalkohole	174
9.2.4.	Synthese der 5-Formylsaligenylchlorphosphite	178
9.2.5.	Synthese der 5-Formyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	180
9.2.6.	Synthese der 5-Diacetyloxymethyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	183
9.2.6.1.	Vorbereitende Synthesen	183
9.2.6.2.	Synthese der 5-Diacetyloxymethyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	186
9.2.6.3.	Synthese der 5-Diisobutyroxymethyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	191
9.2.7.	Synthese der 6-Formylsalicylalkohole	195
9.2.8.	Synthese der 3-Formylsaligenylchlorphosphite	202
9.2.9.	Synthese der 3-Formyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	204
9.2.10.	Synthese der 3-Diacetyloxymethyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	206
9.2.11.	Synthese der 4-Acetylsalicylalkohole	210
9.2.12.	Synthese der 5-Acetylsaligenylchlorphosphite	218
9.2.13.	Synthese der 5-Acetyl- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	219
9.2.14.	Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole	225
9.2.14.1.	Vorbereitende Versuche	225

9.2.14.2.	Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole unter Verwendung acyclischer Silylether als Vorstufen	226
9.2.14.3.	Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole unter Verwendung cyclischer Silylether als Vorstufen	234
9.2.15.	Synthese der 5-(1-Acetoxyvinyl)-saligenylchlorphosphite	245
9.2.16.	Synthese der 5-(1-Acetoxyvinyl)- <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	246
9.2.17.	Versuch der Synthese von 6-(1-Acetoxyvinyl)4-methyl-salicylalkohol 161	250
9.2.18.	Synthese der 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diole	253
9.2.19.	Synthese der 5,5'-Bis-(saligenylchlorphosphite)	257
9.2.20.	Synthese der 5,5'-Bis-(<i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate)	259
9.2.21.	Synthese der Referenzverbindung 206	266
9.3.	Hydrolyseexperimente	273
9.4.	Aufnahme der CD-Spektren	276
9.5.	Butyrylcholinesterase-Inhibitions-Assay	276
9.5.1.	Eingesetzte Reagenzien	276
9.5.2.	Durchführung und Auswertung	277

10. Literaturverzeichnis 280

Anhang

Anhang I	Einkristallstrukturdaten der Verbindung (<i>R_p</i>)- 63	I
Anhang II	CD-Spektren diastereomerenreiner <i>cyclo</i> Sal-d4T-monophosphate	IV
Anhang III	Ergänzende HPL-Chromatogramme zur Aufklärung des Hydrolysewegs von 194	VIII
Gefahrstoffliste		IX

Verbindungsliste

1. Einleitung

Viele Krankheiten, sowohl beim Menschen als auch im Tierreich, werden von *Retroviren* verursacht. Diese sind benannt nach dem Enzym *Reverse Transkriptase* (RT), das für die Umschreibung der viralen doppelsträngigen RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) verantwortlich ist. Nach der heutigen taxonomischen Einteilung werden Retroviren in sieben Gruppen eingeteilt, von denen fünf beim Menschen vorkommen. Eine dieser Gruppen bilden die Lentiviren, zu der die für die Immunschwächekrankheit AIDS verantwortlichen *Humanen Immundefizienzviren* mit den beiden Typen HIV-1 (hauptsächliches Vorkommen: Nordamerika, Europa, Nordafrika) und HIV-2 (hauptsächliches Vorkommen: Asien) gezählt werden.¹ HIV-1 wurde im Jahre 1983 erstmalig von *Montagnier et al.*² sowie *Gallo et al.*³ identifiziert und isoliert, drei Jahre später gelang *Clavel et al.*⁴ dies für HIV-2.

Das HI-Virus befällt vor allem CD4-positive Zellen, also jene, die auf ihrer Oberfläche den CD4-Rezeptor tragen. Diese sind in der Regel Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise die T-Helferzellen. Ihre Zerstörung durch das Virus führt zu einer grundlegenden Schwächung des Immunsystems, sodass selbst normalerweise harmlos verlaufende Krankheiten zum Tode führen können.

Die Grundlage therapeutischer Ansätze gegen das HI-Virus bildet die Kenntnis seines Aufbaus sowie seines Replikationszyklusses (Abb. 1, S. 2). Dieser legt sechs Ansatzpunkte zur HIV-Therapie nahe (blau bzw. rot gefärbt). Obwohl inzwischen für alle Ansatzpunkte zugelassene Medikamente zur Verfügung stehen, ist bis heute noch keine Therapieform bekannt, die zu einer vollständigen Heilung führt. Die Hauptursache hierfür sind fehlende Methoden, um das in das Genom der Wirtszelle integrierte HIV-Genom wieder herauszuschneiden. Einen vielversprechenden Ansatz hierzu stellt die „Tre-Rekombinase“ dar, die in der Lage ist, eine Sequenz, wie sie im HIV-Genom vorkommt, zu erkennen und wieder aus dem Wirtsgenom zu entfernen.⁵ Weitere Problematiken sind zum einen die hohe Mutationsrate des HIV-Genoms (durchschnittlich mindestens ein fehlerhaft eingebautes Nucleotid pro neu produziertem Virus) und somit eine starke Resistenzbildung, zum anderen die Ausbildung von Virus-Reservoirs (vor allem im zentralen Nervensystem⁶). Eine große Belastung für HIV-Patienten stellen auch die bisweilen extremen Nebenwirkungen der Therapien dar, die unter anderem aus den hohen Dosen der verabreichten Medikamente resultieren.⁷ Somit ist im Hinblick auf die weltweit ungefähr 33.2 Millionen HIV-Infizierten und die große Anzahl der jährlichen Neuinfektionen

(ca. 2.5 Millionen), vor allem im afrikanischen Raum (ca. 1.7 Millionen)⁸, die Entwicklung neuer Wirkstoffe aber auch die Verbesserung bereits bestehender Therapieformen von sehr großer Bedeutung.

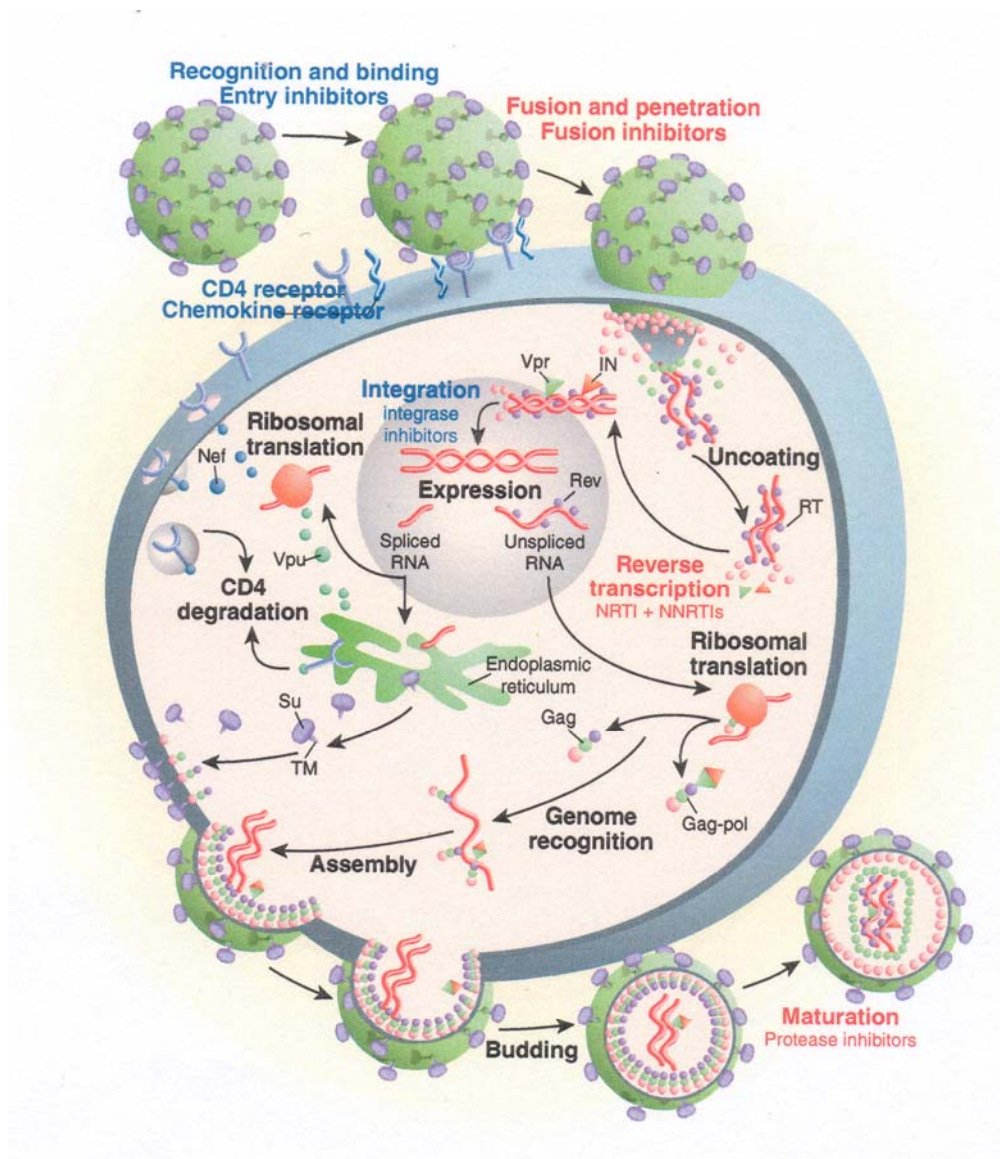


Abb. 1 Replikationszyklus des HIV-1⁹

Im Rahmen dieser Arbeit soll ausschließlich auf den Ansatz der Hemmung der viralen Reversen Transkriptase (in Abb. 1 „Reverse transcription“) eingegangen und dabei nur die Klasse der nucleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) betrachtet werden.

2. Kenntnisstand

2.1. Nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren zur HIV-Behandlung

Mit derzeit sieben zugelassenen Einzel- und vier Kombinationspräparaten bilden die NRTIs zurzeit die Wirkstoffklasse mit den meisten für die HIV-Therapie zugelassenen Medikamenten.¹⁰ Sie bilden auch die Grundlage der 1996 eingeführten, effektiven Kombinationstherapie HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) aus meist drei verschiedenen antiretroviralen Medikamenten, von denen in der Regel zwei NRTIs sind. Welche Medikamente im Einzelnen verwendet werden, hängt vom Stadium der HIV-Erkrankung sowie von möglichen Begleiterkrankungen und Unverträglichkeiten ab.¹¹ In Abb. 2 sind einige dieser NRTIs gezeigt.

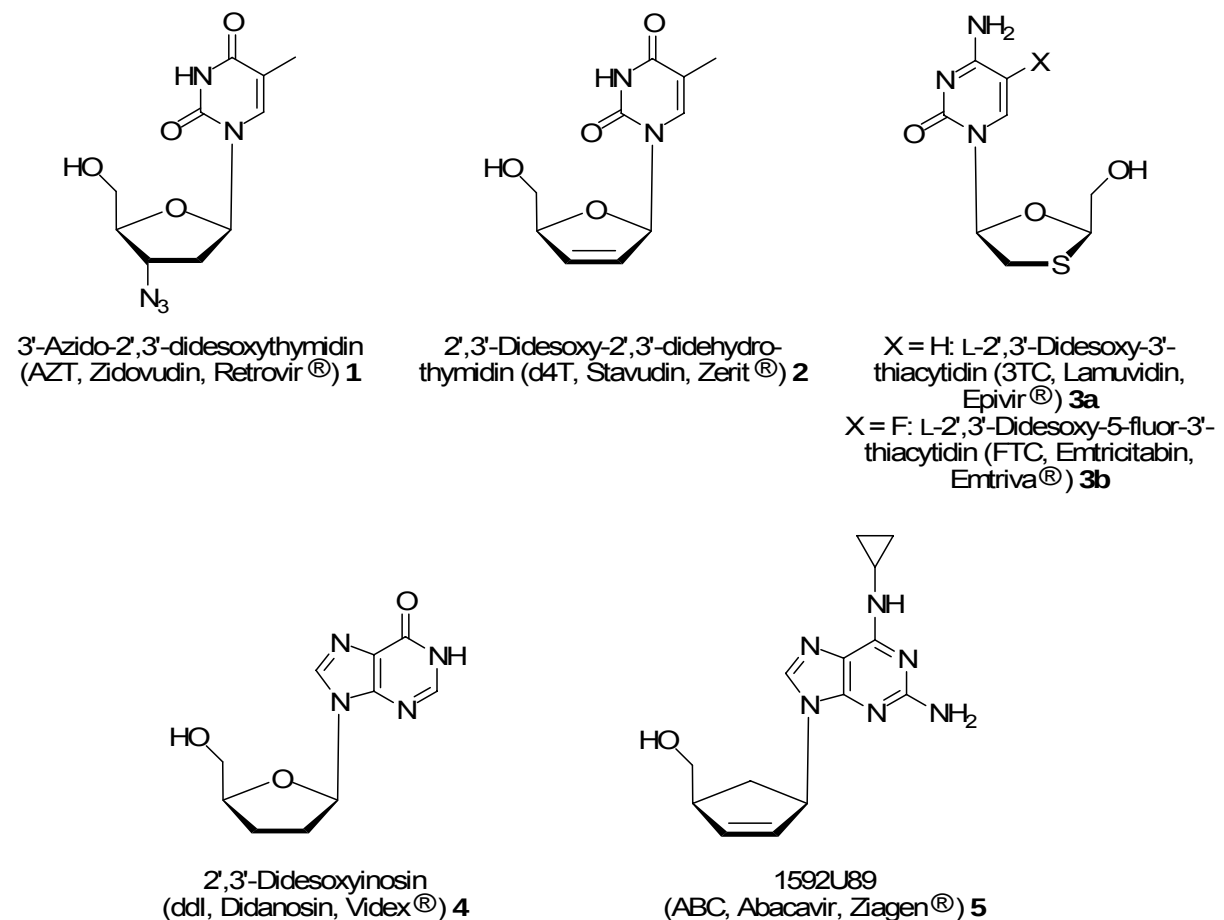


Abb. 2 Ausgewählte, in der HIV-Therapie eingesetzte NRTIs

Die antiviral wirksamen Nucleosidanaloga müssen, wie die natürlichen Nucleoside auch, zunächst in ihre Triphosphate überführt werden, bevor sie in die DNA eingebaut werden können. Die Phosphorylierung zu den Triphosphaten erfolgt durch mehr oder weniger spezifische, zelleigene Enzyme. Die Wirkung der NRTIs **1-5** ist in

dem Fehlen der 3'-Hydroxyfunktion begründet, da nach ihrem Einbau in die DNA an dieser Stelle keine weitere Kettenverlängerung erfolgen kann – sie sorgen also für den Abbruch der reversen Transkription an dieser Stelle.¹² Im Gegensatz zu humanen DNA-Polymerasen fehlt der Reversen Transkriptase des HI-Virus eine *proof-reading* Funktion, sodass sie die eingebauten Nucleosidanaloga nicht erkennen und wieder aus der DNA herausschneiden kann.¹³ Auf Grund der Korrekturfähigkeit der humanen DNA-Polymerasen sollte der Replikationszyklus der Wirtszelle durch die RT-Inhibitoren also nicht gestört werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit fast ausschließlich d4T **2** (Abb. 2, S. 3) eingesetzt wurde, soll im Folgenden nur auf dieses im Detail eingegangen werden.

2.1.1. 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, **2**)

Die Synthese des Nucleosidanalogs d4T **2** wurde 1964 erstmals von *Horwitz et al.*¹⁴ beschrieben. Seine antivirale Aktivität gegen HIV-1 wurde 1987 nahezu zeitgleich von *Lin et al.*¹⁵, *Baba et al.*¹⁶ und *Hamamoto et al.*¹⁷ entdeckt. Seit dem Jahre 1994 ist es unter dem Handelsnamen Zerit® (vertrieben durch Bristol-Myers Squibb) für die HIV-Therapie durch die U. S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen.¹⁸

Die eigentlich biologisch wirksame Form stellt das d4T-Triphosphat (d4TTP) dar, das über eine Phosphorylierungskaskade über die Zwischenstufen des Mono- (d4TMP) und des Diphosphats (d4TDP) aus **2** entsteht. Dabei wird die Bildung des Monophosphats von der relativ substratspezifischen Thymidin-Kinase (TK), die des Diphosphats von der weniger spezifischen Thymidylat-Kinase und die des Triphosphats von der unspezifischen Nucleosiddiphosphat-Kinase katalysiert (Abb. 3).¹⁹



Abb. 3 Phosphorylierung von d4T **2** zum d4T-Triphosphat

Auf Grund der Substratspezifität der Thymidin-Kinase ist die Phosphorylierung von d4T **2** zum d4TMP gehemmt. Dies hat eine stark verlangsamte Bildung von d4TTP zur Folge.¹² Die beiden folgenden Schritte laufen hingegen mit deutlich geringerer Limitierung ab. Somit könnte also die Umgehung des limitierenden ersten Schritts

(so genannter *TK-Bypass*) von großem therapeutischem Vorteil sein. Die direkte Applikation von d4TMP ist nicht möglich, da das Monophosphat bei physiologischem pH-Wert als Dianion vorliegt und somit in seiner Membrangängigkeit stark eingeschränkt ist. Des Weiteren kann es im Blut durch unspezifische Phosphatasen zu Dephosphorylierungsreaktionen kommen. Aus diesen Gründen hat sich die Anwendung von Prodrug-Systemen, die intrazellulär d4TMP freisetzen, als vorteilhaft erwiesen. Auf diese soll im anschließenden Kapitel 2.2. genauer eingegangen werden.

Die hauptsächlichen Nebenwirkungen von d4T **2** sind Polyneuropathie (Nervenerkrankung; bildet sich allerdings nach Absetzen des Medikaments im Laufe einiger Wochen wieder zurück) sowie Lipatrophie (Schädigung der Mitochondrien des Fettgewebes). Diese mitochondriale Toxizität hat inzwischen dazu geführt, dass d4T **2** in Industrieländern so gut wie nicht mehr verordnet wird. In den meisten Entwicklungsländern allerdings ist es nach wie vor eines der am häufigsten verwendeten Medikamente.

2.2. Prodrug-Konzepte

Als „Prodrugs“ werden im Allgemeinen pharmakologisch inaktive oder wenig aktive Wirkstoffe bezeichnet, die erst durch Metabolisierung im Organismus in aktive Wirkstoffe überführt werden. Im Fall von d4T **2** sind dieses auf Grund der gehemmten ersten Phosphorylierung (vgl. S. 4) also Wirkstoffvorläufer, die intrazellulär d4TMP freisetzen und so zu einer ungehinderten Bildung von d4TTP führen können. Um die bereits erwähnten Probleme der geringen Membrangängigkeit sowie der möglichen Dephosphorylierungsreaktionen im Blut zu umgehen, muss das Prodrug Voraussetzungen wie eine erhöhte Lipophilie zum Passieren von Zellmembranen sowie der Blut-Hirn-Schranke, die Verwendung nicht toxischer Masken und eine ausreichende extrazelluläre Stabilität aufweisen. Des Weiteren sollte die Maske erst am Zielort des Wirkstoffs abgespalten werden, was auf hydrolytischem oder enzymatischem Wege erfolgen kann. Bei Nucleosidmonophosphaten (NMPs) allgemein und somit auch beim d4TMP müssen also die zwei negativ geladenen Sauerstoffatome „maskiert“ werden, wobei die Maske sowohl cyclischer als auch acyclischer Natur sein kann. Die allgemeine Form eines Prodrugs zur Einschleusung von d4TMP in Zellen, das auch als Pronucleotid bezeichnet wird, ist in Abb. 4 (S. 6) gezeigt.

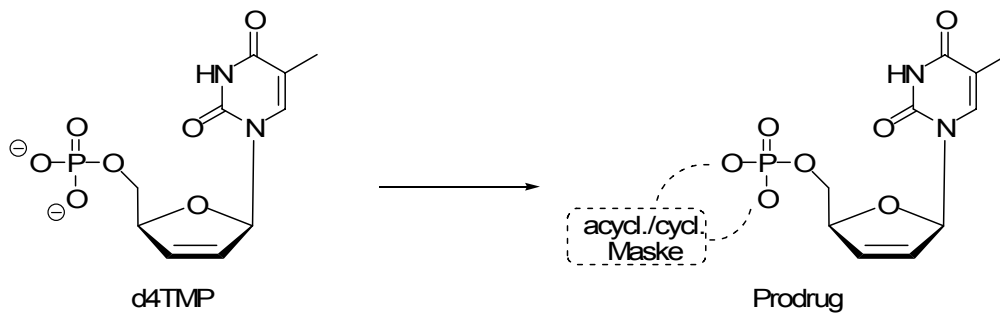


Abb. 4 Vom d4T-Monophosphat zum Prodrug

In ersten Versuchen zur intrazellulären Freisetzung von NMPs aus Prodrugs wurden Dialkylphosphatester verwendet, die allerdings erfolglos blieben, da nach der ersten hydrolytischen Abspaltung die entstandene negative Ladung die Spaltung des zweiten Esters behinderte. Somit konnte keine Freisetzung des Wirkstoffs erreicht werden. Nichtsdestoweniger belegten diese Versuche die Möglichkeit der Abspaltung von Masken durch eine nucleophile Reaktion am Phosphoratom.²⁰

In der Folge wurden neue, so genannte dreiteilige Prodrug-Systeme entwickelt, die auf der Freisetzung des Wirkstoffs durch zwei aufeinander folgende, voneinander abhängigen Hydrolyseschritten basieren. Hierbei erfolgt die erste Hydrolyse durch eine chemische oder enzymatische Reaktion, die dann eine zweite, spontan verlaufende Reaktion aktiviert.²¹ Einige Beispiele für enzymatisch gesteuerte Prodrug-Systeme sind:

- Bis-(POM)-Nucleotide [Bis-(**P**ivaloyloxymethyl)-],^{22,23}
- Bis-(POC)-Nucleotide [Bis-(isopropyl**oxycarbonyloxymethyl**)-],^{24,25}
- Bis-(SDTE)-Nucleotide [Bis-(**S**-(2-Hydroxyethyl)sulfidyl)-2-thioethyl)-],²⁶
- Bis-(SATE)-Nucleotide [Bis-(**S**-Acetyl-2-thioethyl)-],²⁷
- Bis-(AB)-Nucleotide [Bis-(4-Acetoxy**benzyl**)-],^{28,29}
- Phosphoramidat-Nucleoside,^{30,31}
- HepDirect[®]-Pronucleotidsysteme.³²

Die Pronucleotide des HepDirect[®]-Konzepts stellen hierbei eine Besonderheit dar, da ihre Aktivierung zellspezifisch verläuft. Sie werden selektiv in der Leber durch das dort bevorzugt exprimierte Cytochrom P₄₅₀ gespalten. Die allgemeinen Strukturen einiger Prodrug-Systeme sind in Abb. 5 (S. 7) gezeigt.

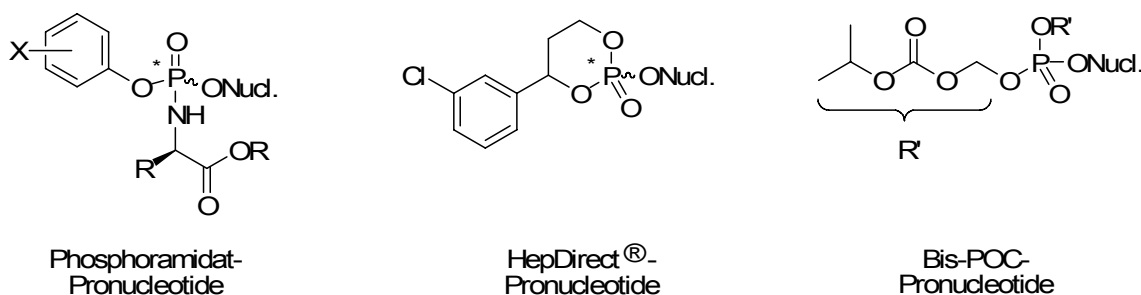


Abb. 5 Allgemeine Strukturen ausgewählter Prodrug-Konzepte

Die generelle Problematik in der Verwendung enzymatisch gesteuerter Prodrug-Systeme liegt in der Abhängigkeit vom spaltenden Enzym. Innerhalb von Zellen, in denen dieses Enzym nicht oder nur in geringer Konzentration vorliegt, wird kein Wirkstoff freigesetzt. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde 1996 von *Meier et al.*³³ das *cycloSal*-Konzept entwickelt. Dieses Konzept besteht aus einer vom Salicylalkohol abgeleiteten, cyclischen, bidenten Maske und einem Nucleosidmonophosphat, das durch ausschließlich chemische Hydrolyse freigesetzt werden kann. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt somit Enzym-unabhängig.

2.3. Das *cycloSal*-Konzept

Die allgemeine Struktur eines *cycloSal*igenyl-Nucleosidmonophosphats (*cycloSal*-NMPs) mit der Nummerierung der Kohlenstoffatome der Salicylalkohol-Einheit sowie die allgemeine Struktur und die Kohlenstoff-Nummerierung eines freien Salicylalkohols sind in Abb. 6 gezeigt.

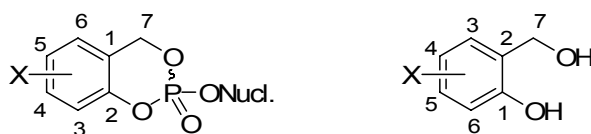


Abb. 6 Allgemeine Struktur und Nummerierung von *cycloSal*-NMPs und Salicylalkoholen

Die Nummerierung der Salicylalkohole ist dabei im Vergleich zu der ursprünglichen³⁴ geändert, um sich einer Nummerierung nach den IUPAC-Regeln anzunähern. So wird nicht mehr wie bisher das Kohlenstoffatom mit der Hydroxymethylfunktion als C1 betrachtet, sondern das phenolische Kohlenstoffatom, das nach den IUPAC-Regeln die höchste Priorität besitzt. Diese Zählweise wird der Übersichtlichkeit halber dann allerdings für alle Salicylalkohole angewendet, auch wenn Substituenten am aromatischen Ring (z. B. eine Aldehydfunktion) eine eigentlich höhere Priorität

haben. Die Nummerierung der *cycloSal*-NMPs hingegen erfolgt wie bisher, also unabhängig von der IUPAC-Nomenklatur.

2.3.1. Mechanismus der chemischen Hydrolyse eines *cycloSal*-Nucleosidmonophosphats

Die selektive Abspaltung der cyclischen Maske aus einem *cycloSal*-NMP durch chemische Hydrolyse basiert auf einer unterschiedlichen Stabilität der Benzyl-, Phenyl- und Alkylphosphatesterbindungen. Der allgemeine Hydrolyseweg eines *cycloSal*-Nucleosid-Phosphattriesters ist in Abb. 7 dargestellt.

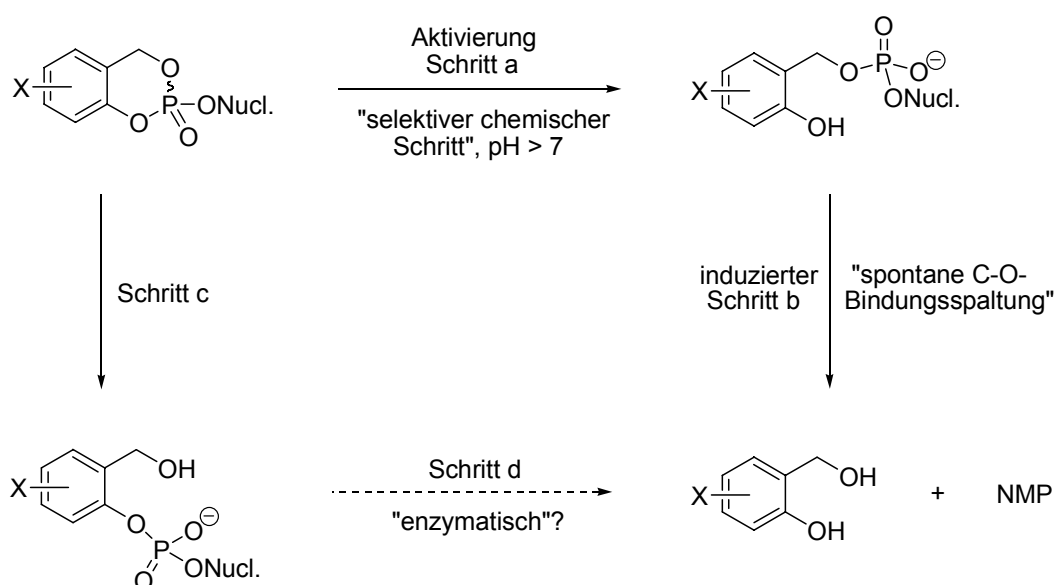


Abb. 7 Chemische Hydrolyse eines *cycloSal*-NMPs

Die Nucleotid-Freisetzung aus dem *cycloSal*-Triester wird durch die Spaltung der phenylischen Phosphatesterbindung eingeleitet (Abb. 7, Schritt a). Diese Bindung ist unter physiologischen Bedingungen, also bei leicht alkalischem pH-Wert, die labilste, da die bei der Spaltung entstehende negative Ladung im resultierenden 2-(Hydroxybenzyl)-phosphatnucleosiddiester am besten mesomeriestabilisiert ist. Der alternative Bindungsbruch der Benzylesterbindung würde zu einem (2-(Hydroxymethyl)-phenyl)-phosphatnucleosiddiester führen (Abb. 7, Schritt c). Dieser Bindungsbruch ist allerdings stark verlangsamt, da der Phosphatester als schwacher Elektronendonator in *ortho*-Position diese Bindung nicht labilisiert. Ein einmal so entstandener Phenylphosphatdiester wird auf Grund der negativen Ladung am Phosphat nicht erneut von einem Hydroxid-Anion angegriffen, sodass es aus dieser Verbindung nicht zur Freisetzung des NMPs kommt.

Durch die Spaltung der phenylischen Phosphatesterbindung wird in C-2-Position der *cycloSal*-Maske aus der Phosphatestergruppe mit einem schwachen Donoreffekt ein starker Elektronendonator (phenolische Hydroxyfunktion), wodurch es zu einem spontanen Bruch der C_{Benzyl}-O-Bindung kommt (Abb. 7, Schritt b). Hierdurch werden der Wirkstoff (das NMP) sowie der Salicylalkohol freigesetzt.^{21,35}

2.3.2. *CycloSal*-Pronucleotide der ersten Generation

In der ersten Generation der *cycloSal*-Pronucleotide konnte für *cycloSal*-d4TMPs die Abhängigkeit des in Kapitel 2.3.1. beschriebenen Hydrolysemechanismus vom Substituentenmuster des aromatischen Rings gezeigt werden. Hierzu wurde eine Vielzahl von Substituenten vor allem in 3- und/oder 5-Position, aber auch in der 6- oder 7-Position sowohl einzeln als auch in Kombinationen eingeführt und das Hydrolyseverhalten (für eine Übersicht der Standard-Hydrolysestudien für *cycloSal*-NMPs siehe Kapitel 4.1.2.) sowie die *in vitro*-Aktivität gegen HIV untersucht. Eine Auswahl an *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation zeigt Abb. 8.

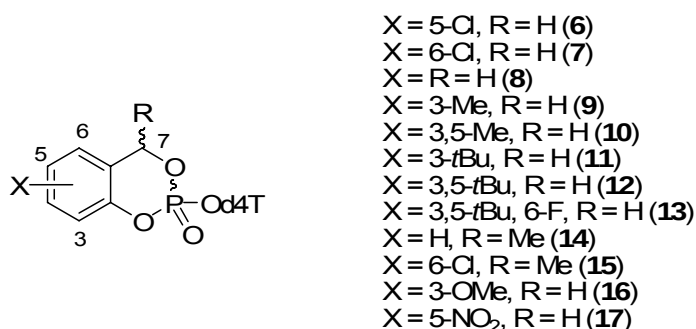


Abb. 8 Ausgewählte *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation

Die Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen der Verbindungen **6-15** sind in Tab. 1 (S. 10) zusammengefasst. Dabei wurde einerseits die Selektivität der Hydrolyse zum d4TMP untersucht. Mittels Integration des ³¹P-NMR-Spektrums der beendeten Hydrolyse des jeweiligen Triesters wurde dazu das Verhältnis von entstandenem d4TMP zu entstandenem (2-(Hydroxymethyl)-phenyl)-phosphatnucleosiddiester (PPD; vgl. Abb. 7, S. 8) bestimmt. Andererseits wurde die Hydrolysestabilität der *cycloSal*-d4TMPs bei physiologischem pH-Wert (7.3) in Phosphatpuffer untersucht.³⁶

Aus den ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien wird deutlich, dass der Hydrolyseweg durch die Wahl der Substituenten an der *cycloSal*-Maske gezielt beeinflusst werden kann. So führen Akzeptorsubstituenten zu einer selektiven Freisetzung des d4TMPs (Verbindung **6**, **7**), wie sie auch nahezu für das unsubstituierte *cycloSal*-d4TMP **8** gefunden wurde (nur 1% PPD).

<i>cycloSal</i> -d4TMP	X	R	d4TMP : PPD ^[a]	$t_{1/2}$ [h] (pH = 7.3) ^[b]
6	5-Cl	H	100 : 0	1.1
7	6-Cl	H	100 : 0	0.9
8	H	H	99 : 1	4.4
9	3-Me	H	94 : 6	17.5
10	3,5-Me	H	92 : 8	29
11	3- <i>t</i> Bu	H	92 : 8	73 ³⁷
12	3,5- <i>t</i> Bu	H	66 : 34	74 ³⁷
13	3,5- <i>t</i> Bu,6-F	H	100 : 0	6.2
14	H	Me	17 : 83	0.25
15	6-Cl	Me	100 : 0	2.2

^[a]Verhältnis aus gebildetem d4TMP und (2-(Hydroxymethyl)-phenyl)-phosphat-d4T-diester.

^[b]Hydrolyse-Halbwertszeit in Phosphatpuffer (pH = 7.3) bei 37 °C.

Tab. 1 Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen einiger *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation

Donorsubstituenten wie Alkylgruppen führen hingegen zu einer verstärkten Bildung des Phenyldiesters, wobei dessen Anteil mit zunehmender Stärke des induktiven Effekts der Alkylgruppe(n) ansteigt (Verbindungen **9-12**). Eine Methylgruppe am Benzyl-Kohlenstoff führt sogar zu 83% zum PPD (Verbindung **14**). Weitere Untersuchungen zu Funktionalisierungen in der Benzyl-Position wurden durchgeführt, sollen hier aber keine weitere Betrachtung finden.^{38,39,40} Die Verbindungen **13** und **15** zeigen allerdings, dass solche Einflüsse durch die Einführung elektronenziehender Substituenten ausgeglichen werden können. Die Verwendung von Alkylgruppen erweist sich allerdings ebenfalls als sinnvoll, da sie stabilisierend wirken und so die Hydrolyse-Halbwertszeiten erhöhen. Eine gewisse Stabilität ist notwendig, um eine extrazelluläre Hydrolyse der *cycloSal*-Pronucleotide zu vermeiden (vgl. auch Tab. 2, S. 11). Bei der Optimierung der Hydrolyseeigenschaften erschien also die Kombination elektronenziehender und -schiebender Substituenten als vorteilhaft. Den ersten Versuch einer so optimierten Maske stellt die Verbindung **13** dar.⁴¹

Besonders wichtig für die Beurteilung der „Qualität“ einer Maske ist die antivirale Aktivität des zugehörigen *cycloSal*-d4TMPs in Thymidin-Kinase defizienten Zellen (TK⁻-Zellen). Bleibt die antivirale Aktivität im Vergleich zu der in Wildtyp-Zellen (CEM/0-Zellen) vollständig oder zumindest in großen Teilen erhalten, so verläuft der TK-Bypass (vgl. Kapitel 2.1.1.) erfolgreich. In Tab. 2 sind die antiviralen Aktivitäten einiger *cycloSal*-d4TMPs zusammengefasst. Es wird deutlich, dass sehr labile Triester in TK⁻-Zellen ihre antivirale Aktivität vollständig verlieren (Verbindung **17**). Da die Aktivität mit der von d4T **2** vergleichbar und eine schlechte d4TMP-Freisetzung (auf Grund der niedrigen Hydrolysestabilität) auszuschließen ist, muss von einer vollständigen extrazellulären Hydrolyse des Prodrugs ausgegangen werden. Das freigesetzte d4TMP wird durch Kinasen dephosphoryliert, dadurch entstehendes d4T **2** passiv in die Zelle transportiert und dort über den in Abb. 3 (S. 4) gezeigten Weg zum d4TTP metabolisiert. Somit wird hier nur die antivirale Wirkung von d4T **2** gemessen.⁴²

<i>cycloSal</i> -d4TMP	X und/ oder R	<i>t</i> _{1/2} [h] ^b	EC ₅₀ [μM] ^a		
			CEM/0		CEM/TK ⁻
			HIV-1	HIV-2	HIV-2
17 ⁴²	5-NO ₂	0.15	0.29	0.40	40
6	5-Cl	1.1	0.42	1.40	2.67
16 ⁴²	3-OMe	1.4	0.17	0.42	0.17
8	H	4.4	0.20	0.22	0.15
9	3-Me	17.5	0.057	0.07	0.048
11	3- <i>t</i> Bu	73	0.18	0.65	0.33
13	3,5- <i>t</i> Bu,6-F	6.2	0.12	0.33	0.6
15	6-Cl, 7-Me	2.2	0.19	0.25	7
d4T	-	-	0.18	0.55	28

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. ^bHydrolyse-Halbwertszeit in Phosphatpuffer (pH = 7.3) bei 37 °C.

Tab. 2 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten einiger *cycloSal*-d4TMPs

Aber schon für einen recht labilen Triester wie **6** kann eine signifikante antivirale Aktivität in TK⁻-Zellen gemessen werden, auch wenn diese im Vergleich zu dem Wildtyp-Zelltest noch vermindert ist. Beim 3-OMe-*cycloSal*-d4TMP **16**, das eine zu **6** vergleichbare Halbwertszeit besitzt, bleibt die antivirale Aktivität in den TK⁻-Zellen voll erhalten. Dies wurde auch für das unsubstituierte *cycloSal*-d4TMP **8** gefunden,

ebenso in der Regel für stabilisierte *cycloSal*-d4TMPs (wie die Verbindungen **9**, **11** und **13**). Im Hinblick auf die EC_{50} -Werte gegen HIV-2 in CEM/TK⁻-Zellen zeigte 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **9** das größte Potenzial. Da dies weder die hydrolyse-stabilste Verbindung noch eine Verbindung mit selektiver d4TMP-Freisetzung ist, wird deutlich, dass die Effektivität solcher Prodrugs von der gemeinsamen Wirkung vieler Faktoren abhängt, die durch die Wahl bestimmter Substituenten am aromatischen Ring gezielt beeinflusst werden kann.

Da die Spaltung der *cycloSal*-Phosphatester auf einer rein chemischen Hydrolyse basiert, ist davon auszugehen, dass die Hydrolysegeschwindigkeiten im extra- und intrazellulären Raum gleich sind. Die Abhängigkeit der *cycloSal*-Pronucleotide vom passiven Transport in die Zelle lässt vermuten, dass das Prodrug die Zelle auf passivem Wege auch wieder verlassen kann und sich an der Zellmembran ein Diffusionsgleichgewicht einstellt. Ein derartiges Gleichgewicht würde teilweise die Hydrolyse der *cycloSal*-Pronucleotide außerhalb der Zelle bedingen, was wiederum zu einem unerwünschten Verlust an antiviraler Aktivität führen würde. Um dies zu umgehen und somit die – für eine gute antivirale Aktivität unabdingbare – Akkumulation des Wirkstoffs in der Zelle zu erreichen, wurde die zweite Generation der *cycloSal*-Pronucleotide entwickelt, die „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Pronucleotide. Auf diese soll im folgenden Kapitel 2.3.3. näher eingegangen werden.

Durch die Synthesestrategie bedingt, fallen die *cycloSal*-d4TMPs als Diastereomerengemische an. Sie können am Phosphoratom entweder R_P - oder S_P -konfiguriert sein. Für einige *cycloSal*-d4TMPs konnte eine Trennung der Diastereomere mittels präparativer RP-HPLC erzielt werden. Hierbei zeigte sich, dass in allen Fällen ein Diastereomer eine signifikant bessere antivirale Aktivität aufweist. Da im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Reihe von Diastereomeren getrennt werden konnte, wird eine weitere Diskussion erst in dem entsprechenden Kapitel (4.3.) erfolgen.

Neben der Anwendung für d4T **2** konnte das *cycloSal*-Konzept bereits erfolgreich auf eine Vielzahl weiterer Nucleosidanaloga (z. B. BVdU^{43,44}, ddA und seine Derivate^{45,46}, ABC **5** und Carbovir⁴⁷, acyclische Nucleosidanaloga⁴⁸) angewendet werden.

2.3.3. „Lock-in“-modifizierte *cycloSal*-Pronucleotide – *cycloSal*-Pronucleotide der zweiten Generation

Die „lock-in“-Modifikationen an *cycloSal*-Pronucleotiden haben zum Ziel, das potenzielle Diffusionsgleichgewicht an Zellmembranen zu Gunsten einer Akkumulation der Prodrugs im Zellinneren zu unterbinden. Dies sollte durch Anbringen von Resten gelingen, die intrazellulär deutlich schneller durch Enzyme gespalten werden als extrazellulär. Diese Enzyme sollten möglichst ubiquitär sein, um nicht den Vorteil der chemischen Steuerung der Wirkstofffreisetzung im Vergleich zu einer enzymatischen Steuerung (vgl. Kapitel 2.2., S. 7) wieder aufzuheben. Eine solche in allen Wirbeltieren zu findende Enzym-Familie sind die Carboxyesterasen. Für diese ist bekannt, dass sie intrazellulär vermehrt vorkommen.⁴⁹ Viele der unter Kapitel 2.2. (vgl. S. 6) aufgeführten Prodrug-Konzepte basieren ebenfalls auf einer Spaltung der Esterfunktionen durch Carboxyesterasen.

Die ersten synthetisierten „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs waren zwei verschiedene Estertypen (Alkohol- bzw. Carbonsäureester), die – zur Vermeidung eines hydrolysedestabilisierenden Einflusses – über einen Ethylenspacer in der 3- oder der 5-Position an den aromatischen Ring gebunden wurden.^{50,51} Aus den Alkoholestern sollte durch enzymatische Spaltung der freie Alkohol, aus den Carbonsäureestern die freie Säure entstehen, die unter physiologischen Bedingungen das Carboxylat bildet. Eine Übersicht der in 5-Position modifizierten Verbindungen ist in Abb. 9 gezeigt.

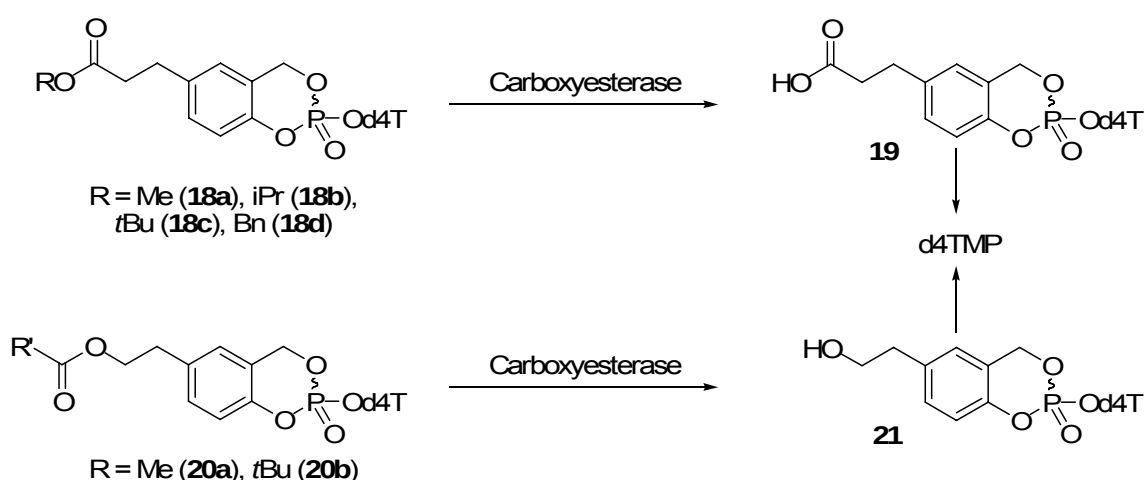


Abb. 9 Erste in 5-Position „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-d4TMPs

Untersuchungen in humanem CEM/0-Zellextrakt zeigten für die Carbonsäureester **18a-d**, dass die gewünschte Spaltung zur Carbonsäure **19** überraschenderweise nicht erfolgt. Aus den Alkoholestern **20a,b** hingegen wurde unter den gleichen Bedingungen der Alkohol **21** freigesetzt. Die Daten der antiviralen Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 in CEM/0- sowie CEM/TK⁻-Zellen offenbarten allerdings, dass die Verbindung **21** nicht für den gewünschten Zelleinschluss geeignet ist. Sie zeigte antivirale Aktivität in TK⁻-Zellen, was die Fähigkeit zur Passierung der Zellmembran bedeutet. Diese wurde für die Carbonsäure **19** nicht gefunden, sodass infolgedessen versucht wurde, Verbindungen zu synthetisieren, die erfolgreich Carbonsäuren intrazellulär freisetzen.

Zunächst wurde dazu der Spacer zur Separierung der Esterfunktion vom aromatischen Ring auf drei bzw. vier Kohlenstoffe verlängert (Abb. 10).⁵²

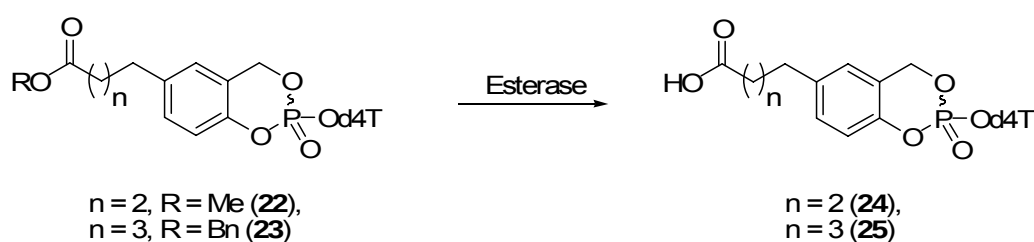


Abb. 10 „Lock-in“-modifizierte cycloSal-d4TMPs mit C₃- bzw. C₄-Spacer

Weder für **22** noch für **23** konnte in CEM/0-Zellextrakten eine Spaltung zur entsprechenden Säure **24** bzw. **25** nachgewiesen werden. Zwar konnte für Verbindung **23** eine Spaltung in Mausleberextrakt ($t_{1/2} = 0.1$ h) zu **25** gezeigt werden, allerdings war sie nicht anti-HIV-2-aktiv in CEM/TK⁻-Zellen. Da die Carbonsäureester somit nicht den gewünschten Erfolg brachten, wurden komplexere Ester untersucht. Dazu wurden Acylale als enzymatisch spaltbare Masken der Carbonsäuren verwendet. Diese Art von Estern wurde bereits in den in Kapitel 2.2. erwähnten Konzepten der Bis-(POM)- und Bis-(POC)-Nucleotide erfolgreich zur intrazellulären Freisetzung von Säuren genutzt.

Die bisher untersuchten Acylale sowie ihre postulierten Hydrolysewege sind in Abb. 11 (S. 15) gezeigt. Zunächst wurden das 5-Acetoxymethyl-propionyl-cycloSal-d4TMP **26** (5-AM-prop-cycloSal-d4TMP), das 5-POC-prop-cycloSal-d4TMP **27** sowie das 5-POM-prop-cycloSal-d4TMP **28** synthetisiert⁵³, die freizusetzende Säure **19** war bereits bekannt (Abb. 9, S. 13). In neueren Arbeiten konnte inzwischen auch das in 3-Position Methyl-substituierte 5-POM-Acylal **29** sowie durch Spaltung mit

Schweineleberesterase die entsprechende Säure **30** als analytische Referenz hergestellt werden.⁵⁴

Das AM-Acylal **26** sowie die POM-Acylale **28** und **29** werden durch Carboxyesterasen in ein instabiles Intermediat **31a** bzw. **31b** gespalten, aus dem POC-Acylal **27** entsteht **31a**, über die Zwischenstufe eines Kohlensäurehalbesters **32** und nachfolgender CO₂-Freisetzung, ebenfalls. Durch spontane Formaldehyd-Abspaltung werden die Säuren **19** bzw. **30** gebildet. Aus diesen wird dTMP dann durch die bekannte chemische Hydrolyse freigesetzt.

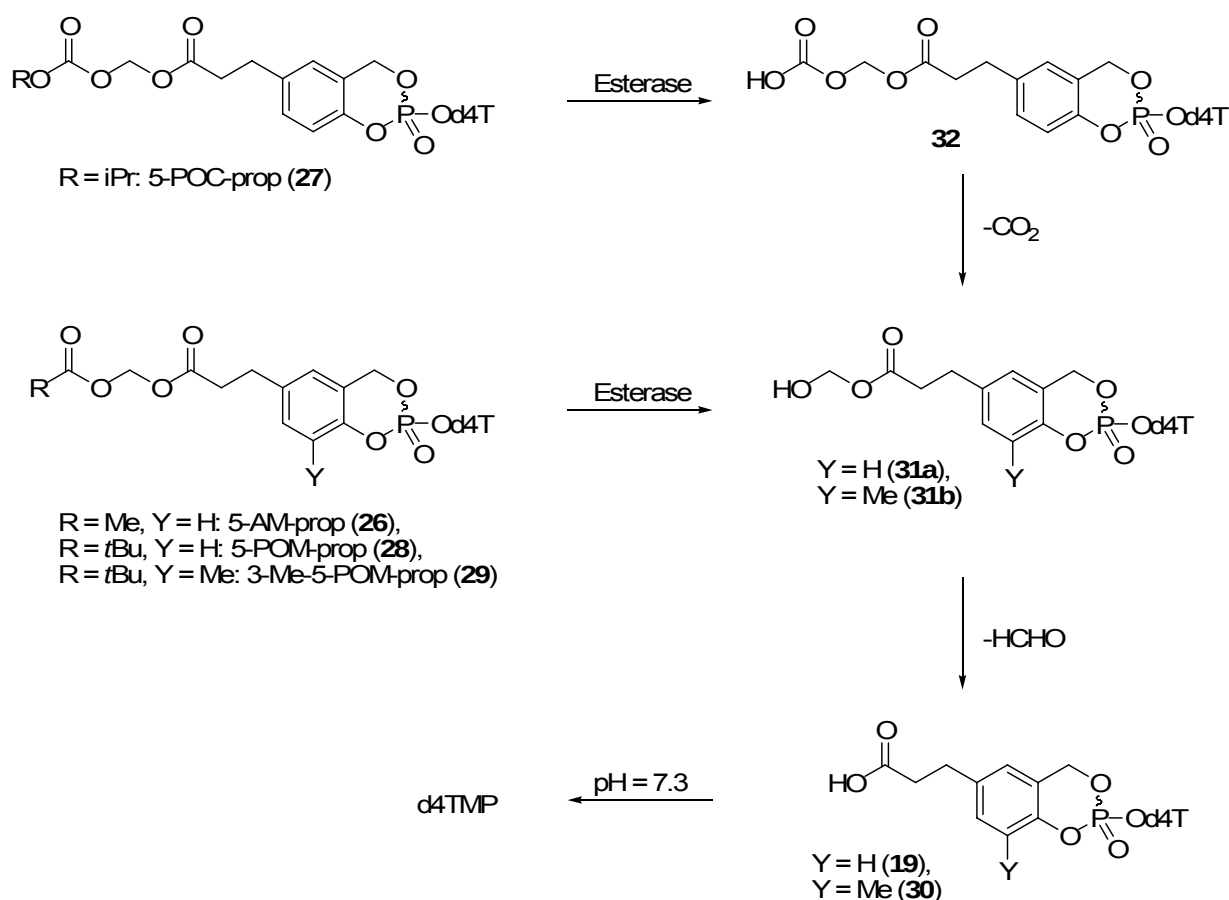


Abb. 11 Vorgeschlagene Hydrolysewege der Acylal-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **26-29**

Für die in 3-Position unsubstituierten Acylale **26-28** wurde in CEM/0-Zellextrakten eine erfolgreiche Spaltung in die Säure **19** nachgewiesen. Hierbei erwiesen sich das AM- sowie das POM-Acylal ($t_{1/2}$ = 0.25 h (**26**), 0.38 h (**28**)) als deutlich schneller spaltbar als das POC-Acylal ($t_{1/2}$ = 0.90 h (**27**)). Die chemische Hydrolyse-Halbwertszeit bei physiologischem pH-Wert lag zwischen 3.9 h und 5.6 h, sodass für alle Verbindungen die für einen erfolgreichen „lock-in“ notwendige signifikante Differenz zwischen chemischer und enzymatischer Stabilität gegeben war. Auch

konnte eine ausreichende Stabilität im extrazellulären Raum, simuliert durch Hydrolysestudien in humanem Blutserum (5%, pH = 6.8), nachgewiesen werden. Die antiviralen Daten für die Verbindungen **26-28** ergaben, dass einzig das POM-Acylal **27** den TK-Bypass effektiv durchführt. Für das AM-Derivat konnte dieses anschließend auf die Instabilität der AM-Funktion im Inkubationsmedium der antiviralen Tests (RPMI-1640 mit 10% hitzedesaktiviertem fötalem Kälberserum; RPMI/FCS(10%)) zurückgeführt werden. So wurde für **26** eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeit unter teilweiser Spaltung in die Säure **19** festgestellt.⁵³ Die freie Säure **19** selbst weist mit 12.5 h eine stark erhöhte Hydrolyse-Halbwertszeit im Vergleich zu den Acylalen auf, was eine verzögerte d4TMP-Freisetzung zur Folge hat. Dieser Trend war auch für die oben erwähnten (vgl. Abb. 10, S. 14) und für hier nicht gezeigte, in 3-Position mit analogen Carbonsäureresten substituierten *cycloSal*-d4TMPs gefunden worden.

Da das POM-Acylal **28** einen erfolgreichen „lock-in“ zeigte, wurde versucht, durch die Einführung eines Methylsubstituenten in 3-Position (Verbindung **29**, Abb. 11, S. 15) die Differenz zwischen chemischer und enzymatischer Stabilität weiter zu erhöhen, um so eine noch bessere antivirale Aktivität zu erzielen. Für **29** konnte im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **28** eine erhöhte Hydrolysestabilität ($t_{1/2} = 7.0$ h) bei einem pH-Wert von 7.3 bei gleichbleibend schneller enzymatischer Spaltung zur Säure (**30**, $t_{1/2} = 0.5$ h) sowie eine ausreichende extrazelluläre Stabilität gezeigt werden. Allerdings wurde für **29** ein fast vollständiger Verlust der antiviralen Aktivität in TK⁻-Zellen festgestellt. Mögliche Gründe hierfür sind eine schlechte Membrangängigkeit, eine stark erhöhte Hydrolysestabilität der freigesetzten Säure **30** und eine damit verbundene stark verzögerte d4TMP-Freisetzung sowie eine schlechtere Wasserlöslichkeit im Vergleich zur Verbindung **28**.

Ein weiteres, allgemeines Problem der POM-modifizierten *cycloSal*-Prodrugs ist die während der Hydrolyse entstehende Pivalinsäure, die im Körper nicht metabolisiert wird und dadurch in Zellen akkumuliert. Dieses trägt zur Toxizität dieser Verbindungen bei. Aus diesem Grund wurde inzwischen mit Aminosäureestern eine neue, erfolgreiche Klasse „lock-in“-modifizierter *cycloSal*-Pronucleotide entwickelt⁵⁴, die hier aber nicht weiter betrachtet werden soll.

Aus der verzögerten d4TMP-Freisetzung durch die Säuren leitete sich die Idee für die dritte Generation von *cycloSal*-Pronucleotiden ab – die enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-Pronucleotide.

2.3.4. Enzymatisch aktivierbare *cycloSal*-Pronucleotide – *cycloSal*-Pronucleotide der dritten Generation

In diesem Kapitel sollen das generelle Konzept der enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-Pronucleotide sowie erste Ergebnisse dazu aus eigenen Vorarbeiten⁵⁵ erläutert werden. Diese bilden die Grundlage für die hier vorliegende Arbeit.

Das Konzept der enzymatischen Aktivierung ist schematisch am allgemeinen Beispiel eines *cycloSal*-d4TMPs in Abb. 12 gezeigt.

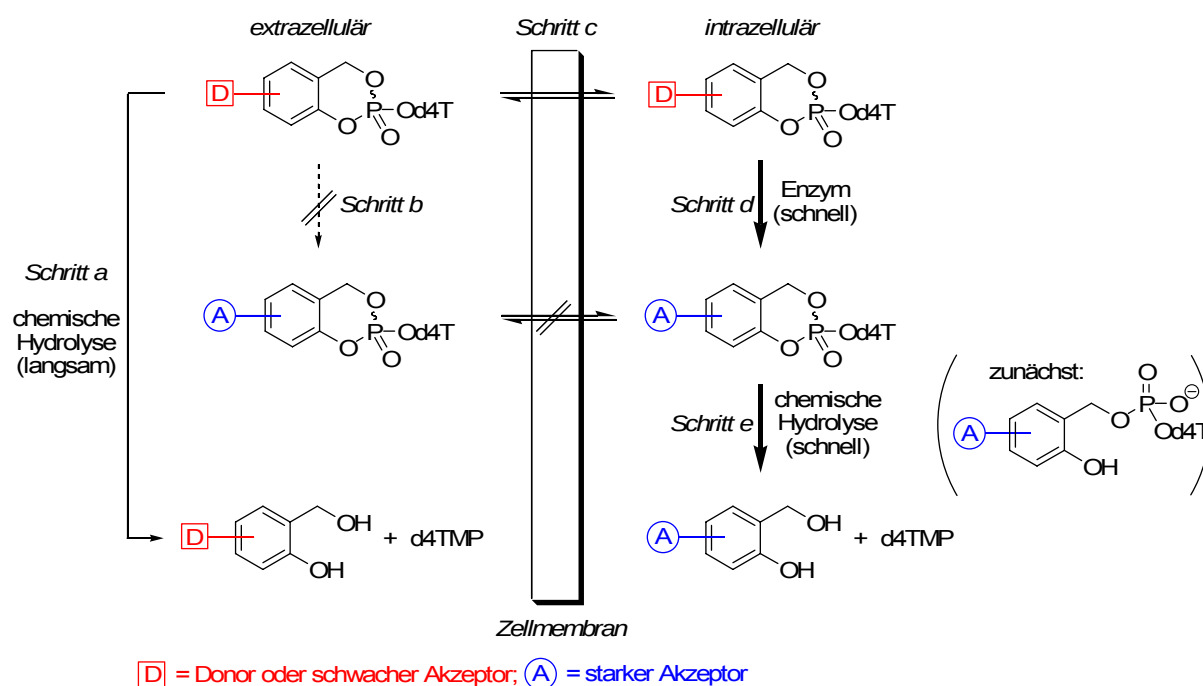


Abb. 12 Konzept der enzymatischen Aktivierung

Die Ausgangslage bildet ein *cycloSal*-d4TMP mit einem direkt an der *cycloSal*-Maske gebundenen, enzymatisch spaltbaren Substituenten, der zunächst Elektronendonator- oder nur schwache Elektronenakzeptor-Eigenschaften zeigt (in Abb. 12 mit „D“ gekennzeichnet). Dieses Prodrug sollte im extrazellulären Raum eine hohe Hydrolysestabilität aufweisen (sodass *Schritt a* in Abb. 12 nur möglichst langsam stattfindet) und gegenüber enzymatischer Spaltung inert sein (Abb. 12, *Schritt b*). Außerdem muss es lipophil genug sein, um durch die Zellmembran zu diffundieren (Abb. 12, *Schritt c*). Intrazellulär sollte der Donorsubstituent dann durch eine schnelle enzymatische Spaltung in einen starken Akzeptorsubstituenten (in Abb. 12 mit „A“ gekennzeichnet) umgewandelt werden (Abb. 12, *Schritt d*). Wie bereits in Kapitel 2.3.2. beschrieben, führen solche Substituenten zu einer sehr schnellen, selektiven d4TMP-Freisetzung (Abb. 12, *Schritt e*). Durch eine direkt nach dem Zelleintritt

erfolgende enzymatische Umwandlung und einer dadurch umgehend induzierten chemischen Hydrolyse sollte ein Zellaustritt des Prodrugs also umgangen werden können. Dabei reicht schon eine schnelle Bildung des 2-(Hydroxybenzyl)-phosphat-d4T-diester aus, um auf Grund der entstehenden negativen Ladung den Zelleinschluss zu gewährleisten.

Da sich Acylale bereits als geeignete Substrate der Carboxyesterase erwiesen hatten (vgl. Kapitel 2.3.3., S. 15), wurden für erste Versuche die ebenfalls zur Gruppe der Acylale gehörenden geminalen Dicarboxylate verwendet. Diese sind in der organischen Synthese als Schutzgruppe für Aldehydfunktionen bekannt.⁵⁶ Eine freigesetzte Aldehydfunktion am aromatischen Ring sollte dann als starker Elektronen-Akzeptor die gewünschte schnelle chemische Hydrolyse einleiten. Als erste Verbindung dieser neuartigen Klasse von *cycloSal*-d4TMPs wurde 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMP **33** (5-di-AM-*cycloSal*-d4TMP) synthetisiert. Die durch enzymatische Spaltung vermutlich entstehende Verbindung 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMP **34** wurde im Zuge der Synthese ebenfalls erhalten und lag somit als Referenz für Untersuchungen vor. Die Ergebnisse dieser sowie der postulierte Abbaumechanismus von **33** durch die Carboxyesterase und anschließende chemische Hydrolyse zeigt Abb. 13.

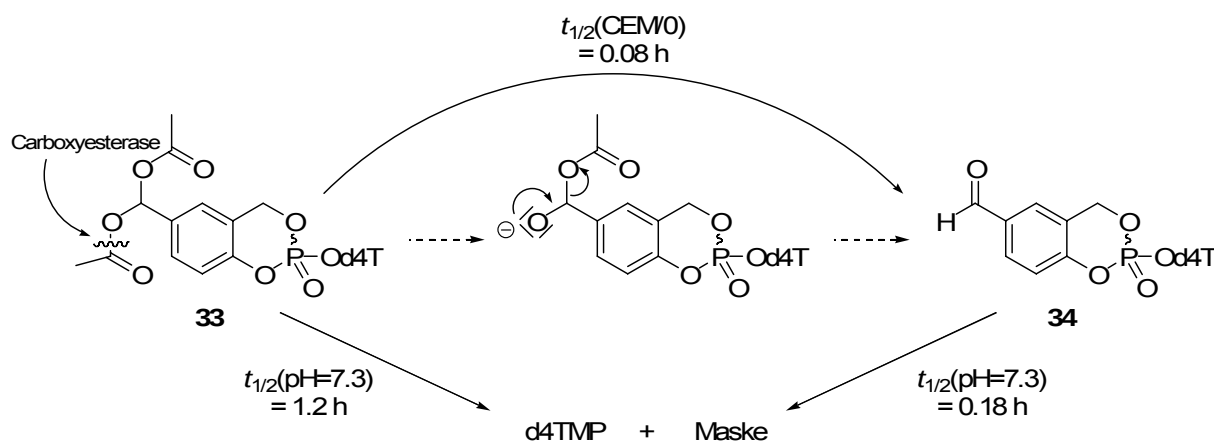


Abb. 13 Erste Ergebnisse zu enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-d4TMPs

Mittels HPLC-Studien in CEM/0-Zellextrakten konnte eine sehr schnelle enzymatische Spaltung ($t_{1/2} = 0,08 \text{ h}$) von **33** zu **34** gezeigt werden. Außerdem wurde eine sechsfache Differenz in der Hydrolysestabilität zwischen Acylal **33** ($t_{1/2} = 1,2 \text{ h}$) und der Formyl-Verbindung **34** ($t_{1/2} = 0,18 \text{ h}$) gefunden. Die Selektivität der Freisetzung von d4TMP aus **34** konnte durch ³¹P-NMR-Hydrolysestudien bewiesen werden.

Diese vielversprechenden ersten Ergebnisse bilden die Grundlage der in dieser Arbeit vorgenommenen, ausführlichen Untersuchungen von Verbindungen dieser Substanzklasse.

2.3.5. Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphate)

CycloSal-Pronucleotide besitzen im Vergleich zu vielen anderen Prodrug-Systemen (ausgenommen das erst 2004 vorgestellte HepDirect[®]-Konzept) ein sehr gutes Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1:1 (vgl. Kapitel 2.2.). Zur weiteren Verbesserung wurden die Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36** (Abb. 14) mit einem für Pronucleotide bisher einmaligem Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1:2 entwickelt.⁵⁷

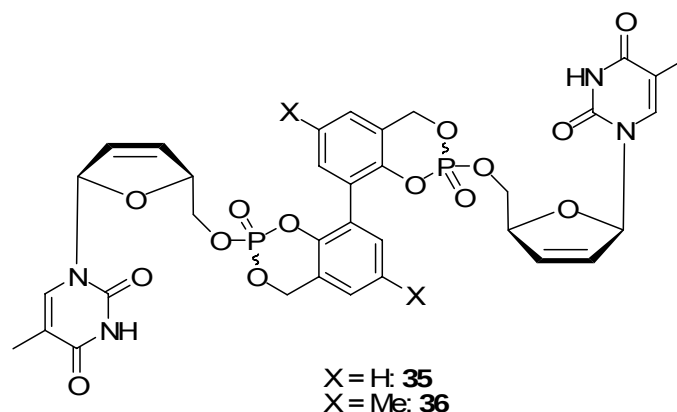


Abb. 14 Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36**

In der hier vorliegenden Arbeit wurden neuartige Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) entwickelt, sodass die bereits bekannten Verbindungen **35** und **36** erst an entsprechender Stelle detailliert besprochen werden (Kapitel 5.1.).

2.3.6. Diastereoselektive Synthese von *cycloSal*-Pronucleotiden

Auf Grund der bereits erwähnten Unterschiede in der antiviralen Aktivität und der inzwischen stark verschärften Vorschriften zur Zulassung nicht isomerenreiner Medikamente^{58,59} wurde versucht, gezielt nur ein Diastereomer der *cycloSal*-Pronucleotide zu synthetisieren. Renze⁶⁰ und Glöckler⁴⁰ konnten zeigen, dass mittels Benzyl-substituierter Salicylalkohole zumindest eine Diastereomeren-Anreicherung möglich ist. Allerdings war neben der sich als schwierig herausstellenden enantiomerenreinen Synthese dieser chiralen Salicylalkohole die Hauptproblematik, dass über diese Syntheseroute keine der in der Benzyl-Position unsubstituierten *cycloSal*-Prodrugs hergestellt werden konnten. Diese aber hatten sich hinsichtlich der

selektiven Freisetzung des d4TMPs sowie der antiviralen Aktivität in TK⁻-Zellen als überlegen erwiesen.

Inzwischen ist es gelungen, über eine neuartige asymmetrische Syntheseroute zu ersten diastereomerenreinen bzw. diastereomerenangereicherten *cycloSal*-Prodrugs zu kommen.⁶¹ Diese Synthesestrategie beruht auf der Umsetzung eines Salicylalkohols mit einem chiralen Auxiliar. Das dabei entstehende Hauptdiastereomer (im Fall von (*R_P*,*S_C*)-**37** 88% *d.e.*) wird dabei vom Minderdiastereomer getrennt, sodass ein isomerenreines Aktivimid (> 95% *d.e.* laut ¹H- und ³¹P-NMR) mit einem Nucleosid umgesetzt werden kann. Die Kupplung von (*R_P*,*S_C*)-**37** mit 3'-O-Acetyldesoxythymidin **38** führte beispielsweise mit einem *d.e.* > 95% zum Triester (*S_P*)-**39** (Abb. 15).

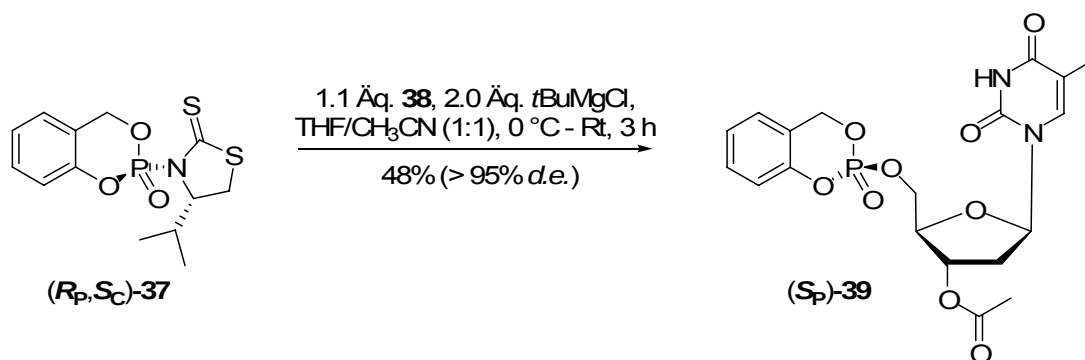


Abb. 15 Diastereomerenreine Darstellung von (*S_P*)-**39**

Gegenwärtig werden solche diastereoselektiven Reaktionen hinsichtlich ihrer breiten Anwendbarkeit auf weitere Nucleosidanaloga untersucht. Außerdem wird die Verwendung optimierter chiraler Auxiliare als Austrittsgruppen zur Ausbeuteverbesserung und zur Unterdrückung von Nebenreaktionen, die durch eine hohe Reaktivität der eingesetzten Aktivimide wie z. B. (*R_P*,*S_C*)-**37** bedingt sind, geprüft. Des Weiteren wird die Verwendung von *cycloSal*-Masken mit unterschiedlichen Substitutionsmustern weiter erforscht, da vor allem mit in 3-Position substituierten Salicylalkoholen noch keine erfolgreichen Synthesen durchgeführt werden konnten.

2.3.7. Synthetische Nutzung des *cycloSal*-Konzepts

Neben der Anwendung als Prodrugs konnte inzwischen der Nutzen einiger *cycloSal*-Pronucleotide als aktivierte Phosphatdonatoren gezeigt werden. So lassen sich durch Hydrolyse oder Umsetzung mit Phosphat bzw. Pyrophosphat gezielt Nucleosidmonophosphate bzw. die Di- und Triphosphate synthetisieren. Diese Verbindungen sind oftmals als Referenzverbindungen für biologische Tests von sehr hohem Interesse. Des Weiteren können durch Umsetzung mit Pyranose-1-Phosphaten biologisch ebenfalls interessante Nucleosiddiphosphat-Pyranosen mit festgelegter Stereochemie am anomeren Kohlenstoff in exzellenten Ausbeuten hergestellt werden.⁶² Eine Zusammenfassung der synthetischen Anwendung des *cycloSal*-Konzepts ist in Abb. 16 gezeigt.

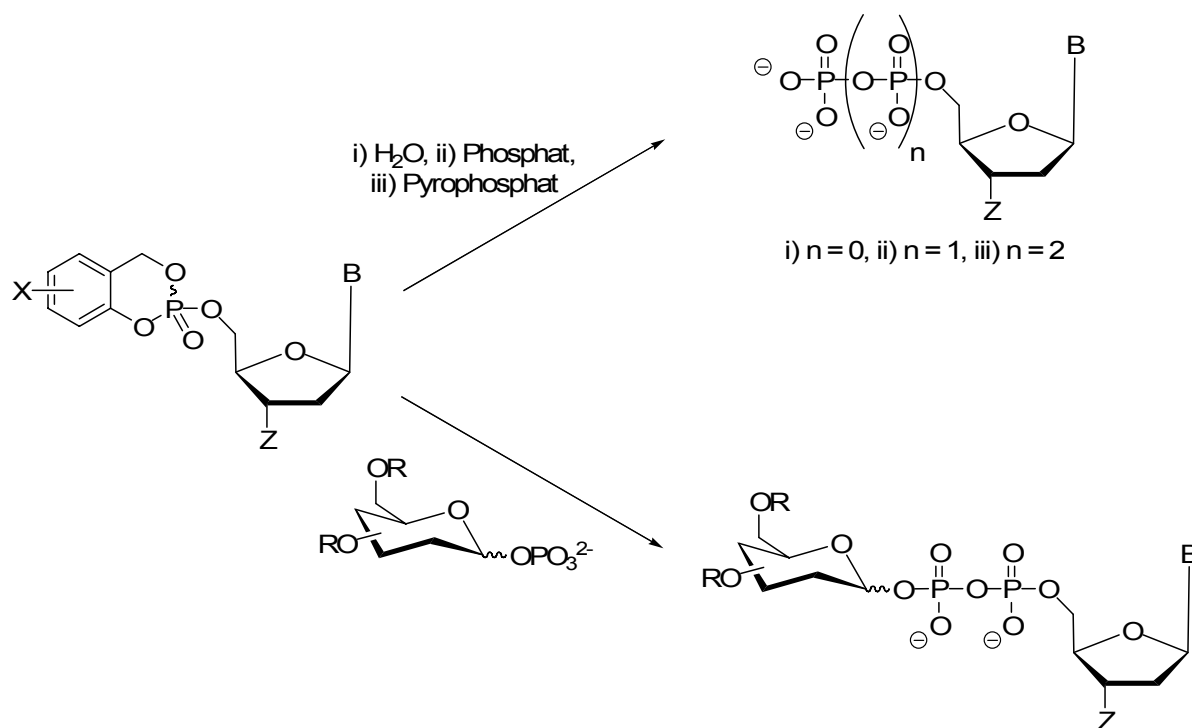


Abb. 16 Synthetische Anwendung des *cycloSal*-Konzepts

3. Aufgabenstellung

Ausgehend von den in eigenen Vorarbeiten erzielten ersten Ergebnissen zu enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-Pronucleotiden (Kapitel 2.3.4.) sollte im Rahmen dieser Arbeit diese neue Klasse von Prodrugs intensiv untersucht werden. Zunächst sollte dabei durch gezielte strukturelle Veränderung des ersten hergestellten Prototyps **33** (Abb. 13, S. 18) die Gruppe der Diacyloxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs hinsichtlich ihrer Hydrolyseeigenschaften und anti-HIV-Aktivität betrachtet werden. Zudem sollte überprüft werden, ob 1-Acetoxyvinyl-*cycloSal*-d4TMPs ebenfalls als enzymatisch aktivierbare Prodrugs dienen können, indem sie durch enzymatische Spaltung Acetyl-Verbindungen freisetzen. Abbildung 17 zeigt die allgemeine Struktur der 5-(1-Acetoxyvinyl)- und der entsprechenden 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs.



Abb. 17 Potenziell enzymatisch aktivierbare 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Untersuchung neuartiger Bis-(*cycloSal*-d4TMPs). Dabei sollten die aromatischen Ringe über die 5-Position miteinander verknüpft werden (Abb. 18) und diese Verbindungen dann in ihren Eigenschaften mit den bereits bekannten, über die 3-Position verknüpften Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36** (Abb. 14, S. 19) verglichen werden.

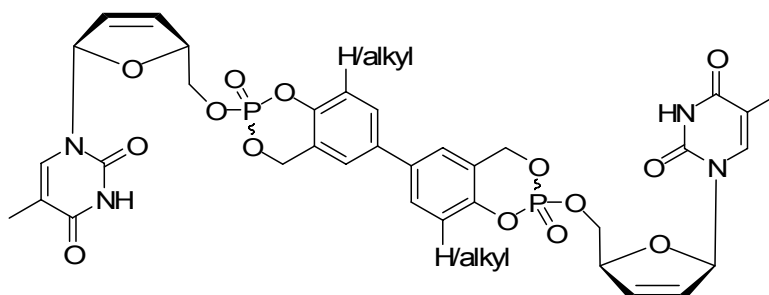


Abb. 18 Neuartige Bis-(*cycloSal*-d4TMPs)

4. Enzymatisch aktivierbare *cycloSal*-Pronucleotide

4.1. Diacyloxymethyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

4.1.1. Synthese von 5-Diacetoxymethyl- und 5-Formyl-*cycloSal*-d4T-monophosphaten

Aus eigenen Vorarbeiten waren bereits die Synthese und erste Ergebnisse aus Hydrolysestudien des 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs **33** (vgl. Kapitel 2.3.4.) bekannt.⁵⁵ Das Prodrug **33** besitzt unter physiologischen Bedingungen mit 1.2 h nur eine recht niedrige Hydrolyse-Halbwertszeit, sodass zunächst versucht wurde, durch Einführung von Alkylsubstituenten in der 3-Position der *cycloSal*-Maske eine höhere Stabilität gegenüber der chemischen Hydrolyse zu erzeugen. Aus den Untersuchungen der *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation war bekannt, dass eine Methyl- bzw. eine *tert*-Butylgruppe in 3-Position zu einer jeweils signifikanten Erhöhung der Hydrolysestabilität führt (vgl. Tab. 1, S. 10, Verbindung **9** und **11** im Vergleich zur Verbindung **8**), weshalb zunächst das 5-Diacetoxymethyl-3-methyl-*cycloSal*-d4TMP **40** (5-di-AM-3-Me-*cycloSal*-d4TMP) sowie das 5-Diacetoxymethyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **41** (5-di-AM-3-*t*Bu-*cycloSal*-d4TMP; Abb. 29, S. 32) synthetisiert wurden. Dazu wurde die für die Herstellung von **33** entwickelte Syntheseroute genutzt, welche in Abb. 19 zusammengefasst ist.

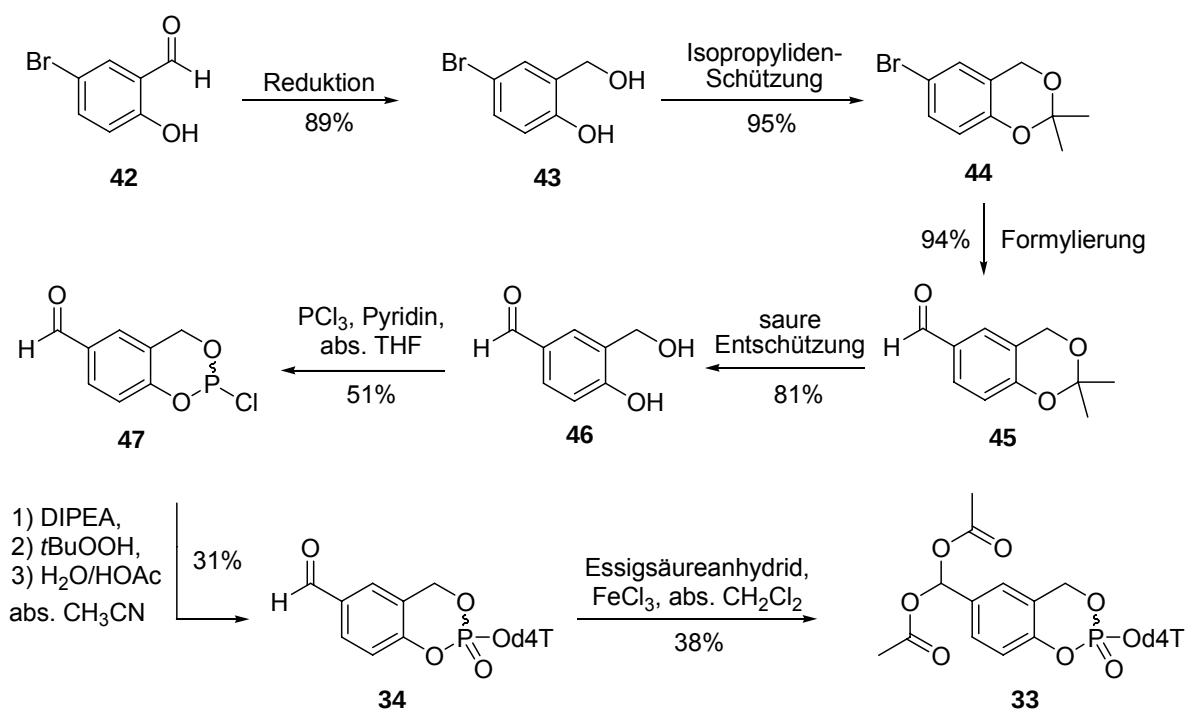


Abb. 19 Zusammenfassung der Synthese von **33**

Ausgehend vom 5-Bromsalicylaldehyd **42** wurde durch Reduktion der 4-Bromsalicylalkohol **43** erhalten. Nach Schützung als Isopropylidenacetal **44** konnte durch Formylierung die Aldehydfunktion eingeführt und so das 4-Formylsalicylalkohol-isopropylidenacetal **45** synthetisiert werden. Saure Entschützung lieferte den 4-Formylsalicylalkohol **46**, der über das Chlorphosphit **47** zum 5-Formyl-*cyclo*Sal-d4TMP **34** umgesetzt wurde. Durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid und FeCl₃ konnte dann die Diacetoxymethyl-Verbindung **33** hergestellt werden.

Es mussten also zunächst die in 3-Position alkylierten 4-Bromsalicylalkohole **48** und **49** (Abb. 20) hergestellt werden, die dann analog zur unsubstituierten Verbindung **43** über den oben beschriebenen Syntheseweg weiter zu den Zielverbindungen **40** und **41** umgesetzt werden sollten.

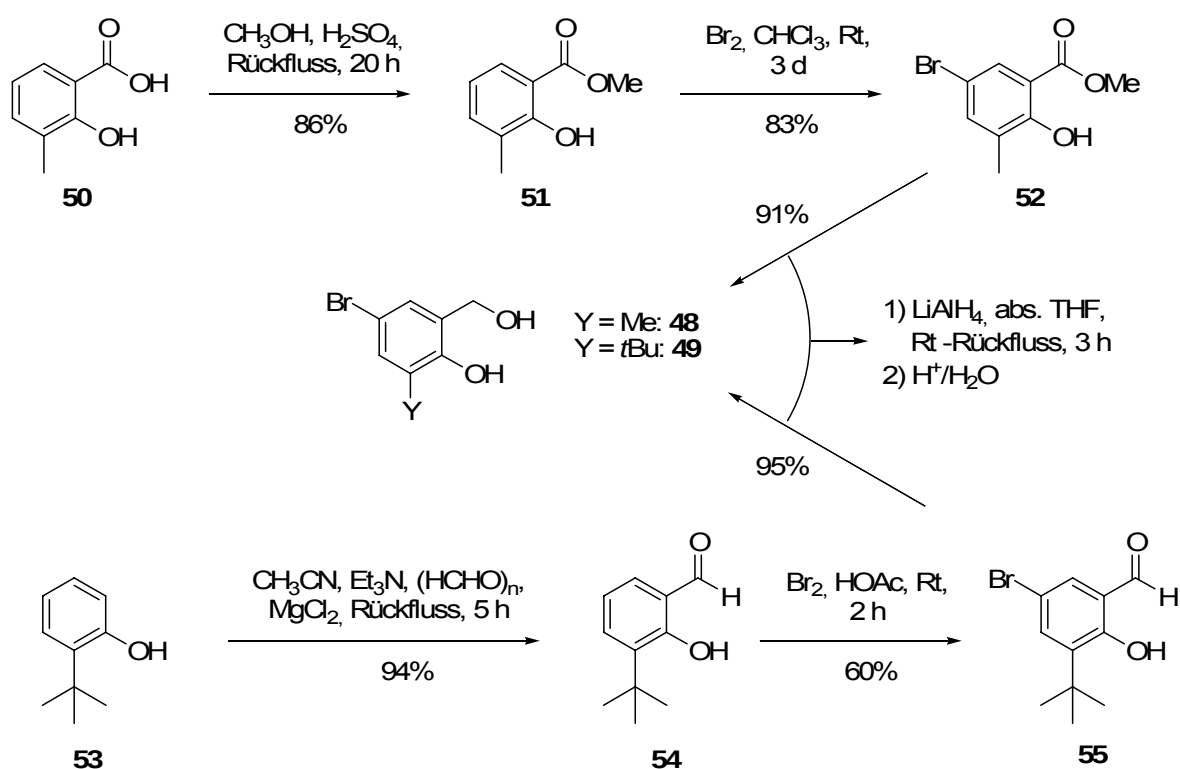


Abb. 20 Synthese der 4-Brom-6-alkylsalicylalkohole **48** und **49**

Die Darstellung des 4-Brom-6-methylsalicylalkohols **48** ausgehend von kommerziell erhältlicher 3-Methylsalicylsäure **50** über den Methylester **51**, einer Bromierung zu **52** und anschließender Reduktion mit LiAlH₄ war dabei bereits bekannt.³⁷ Zur Synthese des 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohols **49** wurde vom im Handel verfügbaren 2-*tert*-Butylphenol **53** ausgegangen und dies wie von *Hofsløkken* und *Skattebøl* beschrieben mit 94% Ausbeute in *ortho*-Position zum Salicylaldehyd **54** formyliert.⁶³

Die anschließende Bromierung zu **55** erfolgte unter den von *Cavazzini et al.* beschriebenen Bedingungen mit einer Ausbeute von 60%, was exakt der Literatúrausbeute entspricht.⁶⁴ Durch die für Salicylaldehyde und Salicylsäuremethylester bewährte Reduktion mit LiAlH_4 wurde dann der Salicylalkohol **49** in 95% Ausbeute erhalten. Die weitere Umsetzung von **48** und **49** erfolgte wie in Abb. 21 gezeigt.

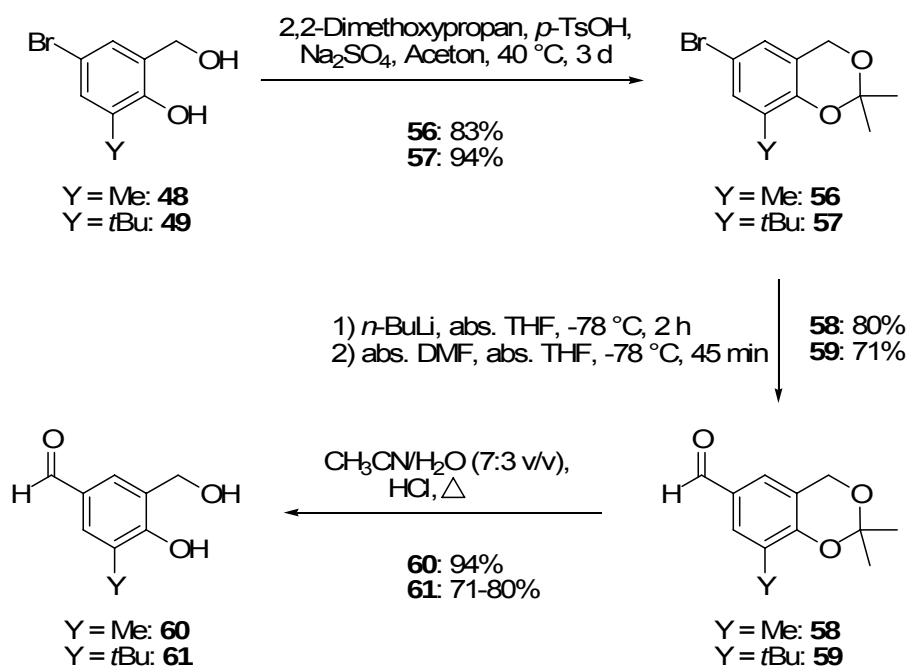


Abb. 21 Synthese der 4-Formyl-6-alkylsalicylalkohole **60** und **61**

Die 4-Brom-6-alkylsalicylalkohole **48** und **49** wurden zunächst in einer standardisierten Methode mit guten Ausbeuten in die entsprechenden Isopropylidenacetale überführt (**56**: 83%, **57**: 94%).⁶⁵ Der Austausch des Bromsubstituenten gegen die Aldehydfunktion erfolgte unter von *Saccomano et al.* beschriebenen Reaktionsbedingungen⁶⁶, die in eigenen Vorarbeiten⁵⁵ bereits modifiziert worden waren. Die Ausbeuten der Umsetzung lagen dabei nicht mehr im sehr guten Bereich, wie es noch für die unsubstituierte Verbindung **44** der Fall war (95% Ausbeute, Abb. 19, S. 23). Dennoch konnten mit 80% (**58**) bzw. 71% (**59**) zufrieden stellende Ausbeuten erreicht werden. Durch saure Entschützung wurden dann die 4-Formyl-6-alkylsalicylalkohole **60** (94% Ausbeute) und **61** (71-80% Ausbeute) erhalten. Dabei mussten zur Entschützung des 3-*tert*-Butyl-substituierten Derivats **59** deutlich größere Mengen an rauchender Salzsäure verwendet werden.

Die Umsetzung zu den 5-Formyl-3-alkyl-cycloSal-d4TMPs **62** und **63** über die entsprechenden Saligenylchlorphosphite **64** bzw. **65** (Abb. 22, S. 27 bzw. Abb. 23, S. 28) geschah dann unter in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig verwendeten Bedingungen.⁴² Diese sehen für die Synthese von Chlorphosphiten zunächst die Reaktion von einem Äquivalent Salicylalkohol in abs. Diethylether mit 1.2 Äquivalenten destilliertem Phosphor(III)-chlorid für zehn Minuten bei -20 °C vor. Anschließend werden bei -20 °C über einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden 2.3 Äquivalente abs. Pyridin (in der fünffachen Menge abs. Diethylether) zugetropft, um die entstehende Salzsäure unter Bildung von Pyridinhydrochlorid abzufangen. Danach wird zur Vervollständigung der Reaktion eine bis zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionslösung anschließend über Nacht bei -27 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Dadurch soll ein möglichst vollständiges Ausfallen des Pyridinhydrochlorid gewährleistet werden, dass durch Filtration unter Schlenk-Bedingungen abgetrennt wird. Durch Einengen werden dann die rohen Saligenylchlorphosphite in meist guter Ausbeute und hoher Reinheit erhalten, die ohne Reinigung zur weiteren Synthese eingesetzt werden. Die Reinheit der Chlorphosphite wird durch Integration aus dem ¹H-NMR-Spektrum bestimmt, wobei ein Proton des aromatischen Rings gegen das einzelne Proton des Pyridinhydrochlorids integriert wird. Die somit für Chlorphosphite angegeben Ausbeuten sind also nicht ganz exakt, da sie andere mögliche Verunreinigungen vernachlässigen. Somit kann sich die tatsächliche Menge an eingesetztem Chlorphosphit etwas reduzieren.

Für die Synthese des 5-Formylsaligenylchlorphosphits **47** musste von Diethylether auf THF als Lösungsmittel ausgewichen werden, da der 4-Formylsalicylalkohol **46** in Diethylether nicht löslich war. Auf Grund der höheren Löslichkeit des Pyridinhydrochlorids in THF führte dies zu einem weniger reinen Chlorphosphit (Reinheit: 55%; Ausbeute 51%), wobei die Auswirkungen dessen auf die Folgereaktion noch nicht geklärt waren.

Die Synthese des 5-Formyl-3-methylsaligenylchlorphosphits **64** musste ebenfalls in abs. THF durchgeführt werden. Allerdings erwies sich **64** als gut löslich in Diethylether, sodass nach vollendeter Reaktion zunächst das THF abkondensiert und durch die entsprechende Menge abs. Diethylether ersetzt wurde. So konnte nach Lagerung in der Kälte über Nacht ein reines (Reinheit > 95%) Chlorphosphit **64** in 60% Ausbeute erhalten werden.

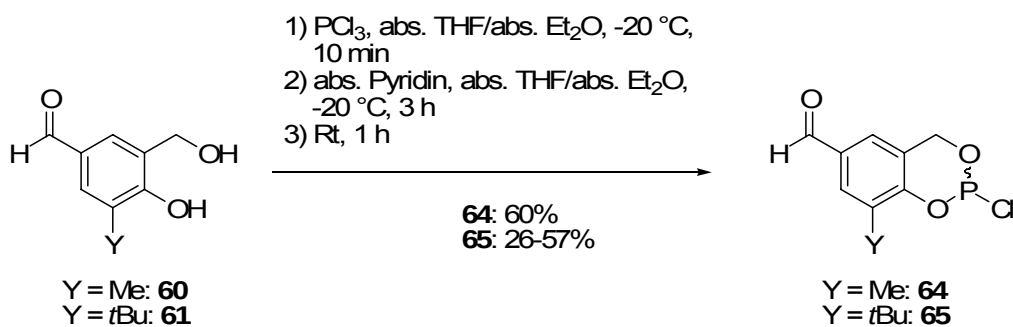


Abb. 22 Synthese der Saligenylchlorphosphite **64** und **65**

4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **61** erwies sich in Diethylether als gut löslich, sodass hier die Reaktion nach dem Standardprotokoll erfolgen konnte und ein reines Chlorphosphit **65** erhalten wurde (57% Ausbeute). Um zu testen, ob durch eine Reaktion in THF die Ausbeute verbessert werden kann, wurde sowohl ein Ansatz nach der für das Methyl-Derivat **64** erfolgreichen Strategie des Lösungsmittelwechsels als auch ein Ansatz mit ausschließlicher Verwendung von THF durchgeführt. Die Wechselstrategie führte in einer schlechten Ausbeute von 26% zu einem Chlorphosphit mit einer Reinheit von 70%. Das Chlorphosphit des reinen THF-Ansatzes wies nur eine Reinheit von 50% auf, konnte aber immerhin in 44% Ausbeute erhalten werden. Die Verwendung von THF führte also nicht zu einer Ausbeuteverbesserung. Auch scheint der Anwendungserfolg der Wechselstrategie stark vom jeweiligen Chlorphosphit abzuhängen.

Die Synthese von *cyclo*Sal-d4TMPs aus Saligenylchlorphosphiten stellt ebenfalls ein etabliertes Verfahren in unserer Arbeitsgruppe dar. In diesem wird ein Äquivalent d4T **2** mit zwei Äquivalenten Chlorphosphit in Anwesenheit von 1.6 Äquivalenten Diisopropylethylamin (DIPEA) in abs. Acetonitril umgesetzt. Nach erfolgter Reaktion wird die entstandene Phosphor(III)-Verbindung in einer „Eintopf-Reaktion“ mit drei Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid (*t*BuOOH) zur entsprechenden Phosphor(V)-Verbindung oxidiert. Die Verwendung von zwei Äquivalenten Chlorphosphit zielt dabei auf einen vollständigen Umsatz von d4T **2** ab und geht von einer hypothetischen Reinheit der rohen Chlorphosphite aus. Diese war für das in THF synthetisierte 5-Formylsaligenylchlorphosphit **47** nicht gegeben, sodass dort zur Synthese des Triesters **34** (Abb. 19, S. 23) – in Erwartung einer schlechteren Ausbeute durch die Verunreinigungen – nur tatsächliche 1.2 Äquivalente des Chlorphosphits eingesetzt wurden, um die Quantität des entstehenden *cyclo*Sal-d4TMPs zu erhöhen. So wurde eine Ausbeute von 31% erzielt.

Die Umsetzung des reinen 5-Formyl-3-methylsaligenylchlorphosphits **64** wurde wie im Standardprotokoll beschrieben mit zwei Äquivalenten **64** durchgeführt und lieferte 5-Formyl-3-methyl-*cycloSal*-d4TMP **62** in einer Ausbeute von 51%. Das reine Chlorphosphit **65** wurde unter gleichen Bedingungen umgesetzt und lieferte 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **63** in 36% Ausbeute. Erstaunlicherweise gelang es bei der Reaktion mit dem nur zu 70% reinen Chlorphosphit **65** den Triester **63** mit einer Ausbeute von 49% zu isolieren, wobei sogar nur 1.5 Äquivalente **65** eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 23 grafisch zusammengefasst.

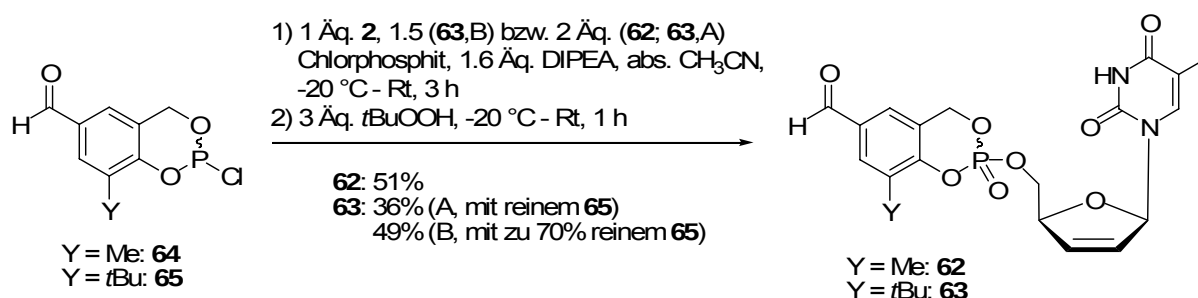


Abb. 23 Synthese der *cycloSal*-d4TMPs **62** und **63**

Somit wurde mit dem unreineren Chlorphosphit **65** die deutlich bessere Ausbeute erzielt, wobei außerdem weniger Äquivalente verwendet wurden. Dies ist also ein Indiz dafür, dass ein unreines Chlorphosphit nicht zwingend zu erniedrigten Ausbeuten führen muss. Allerdings sollte bemerkt werden, dass der Ansatz mit dem reinen Chlorphosphit **65** in einem 6.5-fachen Maßstab durchgeführt wurde, sodass die Gründe für die geringere Ausbeute möglicherweise im „Up-scalen“ liegen. Die Ausbeute von 31% für die Synthese des 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs **34** kann somit aber nicht zwingend auf das unreine Chlorphosphit **47** zurückgeführt werden. Wie bereits in den Vorarbeiten postuliert, könnte auch die vergleichsweise hohe Hydrolyselabilität des Produkts **34** ein Grund für Ausbeuteverluste während der wässrigen Aufarbeitung und der chromatografischen Reinigung sein. Da der Fokus auf der Synthese der Zielverbindungen **40** und **41** und der Analyse ihrer Eigenschaften lag, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Optimierung der Syntheseschritte verzichtet.

Wie in Abb. 19 (S. 23) gezeigt, konnte **34** bereits erfolgreich zum 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMP **33** umgesetzt werden (Ausbeute: 38%). Dazu wurde **34** in abs. Dichlormethan unter Katalyse der Lewis-Säure FeCl₃ mit Essigsäureanhydrid zur Reaktion gebracht. Diese von *Kochar et al.* publizierte Methode zur Acylalbildung aus

Aldehyden beschreibt allerdings nur die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid zu geminalen Diacetaten. Einzig die Umsetzung von Benzaldehyd **66** mit dem gemischten Anhydrid aus Essig- und Propionsäure zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus wird dort beschrieben.⁶⁷ Im Hinblick auf die Darstellung von Acylalen mit sterisch anspruchsvolleren Resten (vgl. Kapitel 4.1.8.) wurde bereits an dieser Stelle getestet, ob FeCl_3 auch für die Umsetzung mit Isobuttersäureanhydrid **67** geeignet ist. Dazu wurde versucht, den bereits früher synthetisierten,⁵⁵ zweifach TBDPS-geschützten 4-Formylsalicylalkohol **68** zum Bis-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-diisobutyroxymethylsalicylalkohol **69** umzusetzen. Allerdings war bei der Reaktion von **68** mit **67** nach einem Tag kein Umsatz festzustellen. Sowohl die Erhöhung der Äquivalente von **67** und FeCl_3 als auch eine Reaktionsdauer von insgesamt sechs Tagen führte zu keiner Reaktion (Abb. 24). Die analoge Umsetzung mit Essigsäureanhydrid hatte in 85% Ausbeute zum entsprechenden geminalen Diacetat geführt.⁵⁵

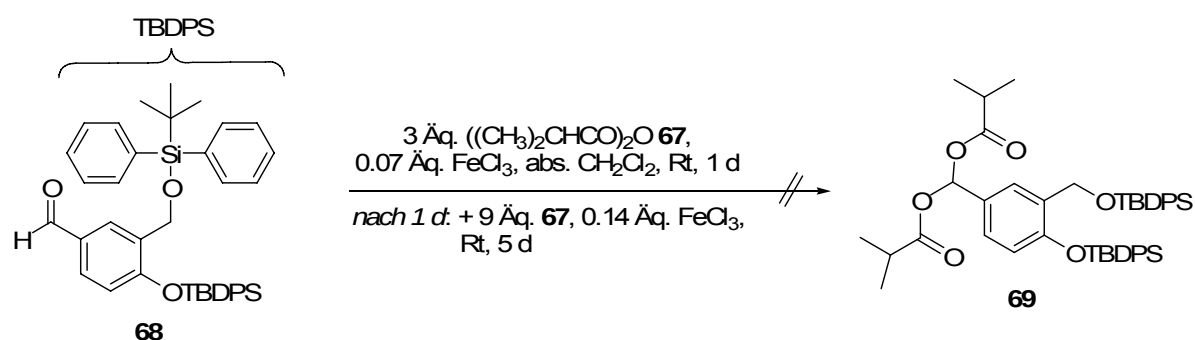


Abb. 24 Versuch der Synthese von **69** aus **68** mittels FeCl_3 -Katalyse

Somit wurde nach einer Lewis-Säure gesucht, die auch für die Bildung von Diisobutyroxymethyl-Verbindungen aus Aldehyden geeignet ist. *Smitha* und *Reddy*⁶⁸ beschreiben die Umwandlung einer Reihe von Aldehyden in die jeweiligen geminalen Diacetate bzw. Dipivalate unter Verwendung von 0.05 Äquivalenten Zirkonium(IV)-chlorid (ZrCl_4). Da folglich auch die Umsetzung mit **67** möglich sein sollte, wurde die Verwendung von ZrCl_4 als Katalysator am Beispiel der Umwandlung von Benzaldehyd **66** in Diisobutyroxymethylbenzol **70** getestet. Dazu wurde ein Äquivalent **66** mit drei Äquivalenten **67** sowie 0.05 Äquivalenten ZrCl_4 für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung sowie chromatografischer Reinigung konnte das Produkt **70** erhalten werden, wobei die Abtrennung von überschüssigem Isobuttersäureanhydrid **67** nicht vollständig gelang,

sodass **67** im ^1H -NMR-Spektrum noch zu 29% enthalten war. Die rechnerische Ausbeute von **70** nach Abzug des Gehaltes an **67** ergab 85% (Abb. 25).

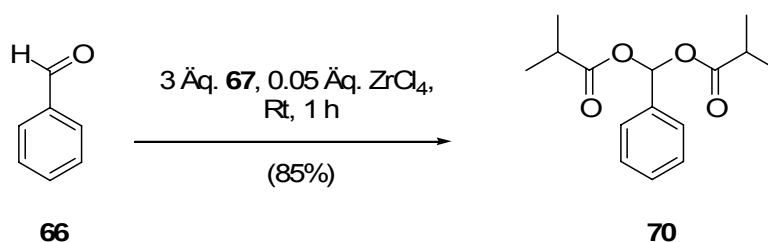


Abb. 25 Synthese von Diisobutyroxymethylbenzol **70** aus Benzaldehyd **66**

Da sich schon in den Vorarbeiten aus Handhabungsgründen die Verwendung eines Lösungsmittels als nützlich erwiesen hatte, wurde die zusätzliche Verwendung von Dichlormethan bzw. Acetonitril getestet. Dazu wurden die Reaktionen ansonsten analog zu dem in Abb. 25 gezeigten Versuch durchgeführt, allerdings auf Grund der schlechten Abtrennung von **67** auf die chromatografische Reinigung verzichtet. Die Auswertung der ^1H -NMR-Spektren der Rohprodukte zeigte keine Umsetzung in Dichlormethan, dafür aber eine deutlich zum Produkt verlaufende Reaktion in Acetonitril. Somit wurde in einem abschließenden Vorversuch die in Abb. 24 (S. 29) gezeigte Reaktion noch einmal unter Verwendung von ZrCl_4 in abs. Acetonitril anstelle von FeCl_3 in abs. Dichlormethan durchgeführt (Abb. 26). Diese lieferte mit 94% eine exzellente Ausbeute, sodass die Reaktionsbedingungen für zukünftige Acylal-Bildungsreaktionen als geeignet erschienen.

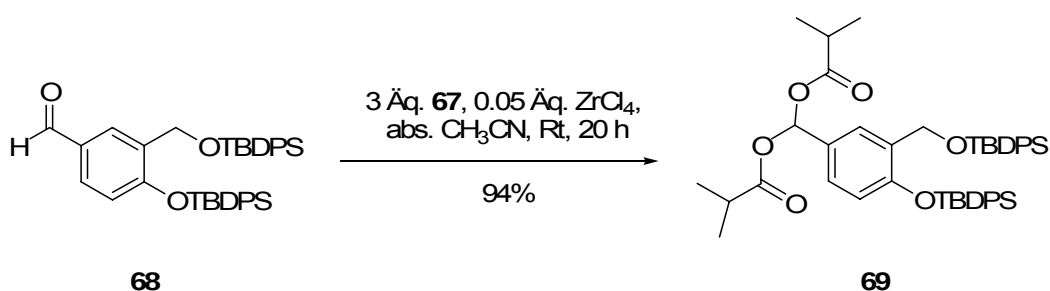


Abb. 26 Synthese von **69** aus **68** mittels ZrCl_4 -Katalyse

Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und dünnschichtchromatografisch verfolgt. Nach drei Stunden war noch Edukt **68** zu detektieren, sodass zur Vervollständigung über Nacht weiter gerührt wurde. Die dünnschichtchromatografische Kontrolle zeigte hiernach allerdings keine Veränderung.

Die erste Anwendung der so gefundenen Reaktionsbedingungen erfolgte zur Synthese des 5-di-AM-3-Me-*cycloSal*-d4TMPs **40**. Dazu wurde ein Äquivalent des Formyl-Triesters **62** in abs. Acetonitril gelöst und mit vier Äquivalenten Essigsäureanhydrid und 0.1 Äquivalenten ZrCl_4 umgesetzt. Da nach drei Stunden bei Raumtemperatur keine Reaktion mittels Dünnschichtchromatografie nachzuweisen war, wurde die Menge an Essigsäureanhydrid auf insgesamt 22 Äquivalente erhöht. Dies brachte ebenfalls keinen Erfolg, sodass nach einer Stunde weitere 0.11 Äquivalente ZrCl_4 hinzugegeben wurden. Nach 20 Minuten konnte per DC eine vollständige Umsetzung von **62** detektiert werden. Nach Aufarbeitung und Chromatografie wurde die Zielverbindung **40** mit einer Ausbeute von 32% isoliert (Abb. 27).

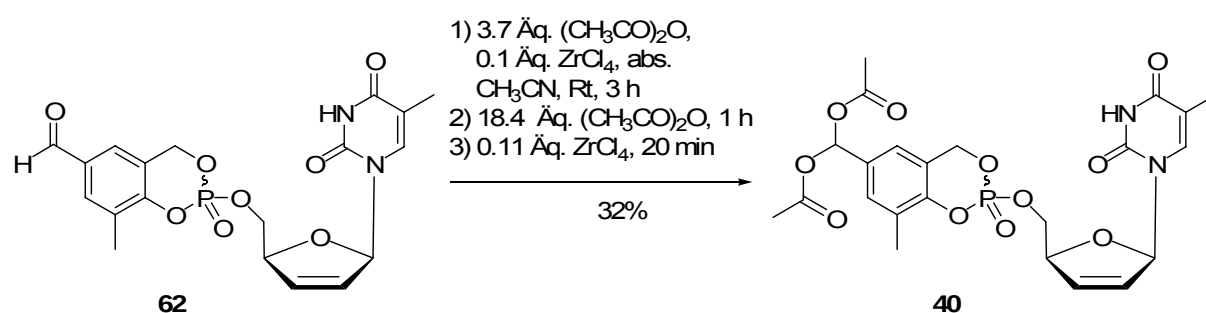


Abb. 27 Erste Synthese der Zielverbindung **40**

Hier mussten also deutlich größere Mengen an Säureanhydrid und Lewis-Säure im Vergleich zur Modellreaktion (Abb. 26, S. 30) verwendet werden, um zu einem vollständigen Umsatz zu gelangen. Um die Methylgruppe in 3-Position des aromatischen Rings als dafür ausschlaggebenden Faktor auszuschließen, wurde die Synthese des in 3-Position unsubstituierten 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs **33** unter Verwendung der gleichen Reaktionsbedingungen wiederholt. Aber auch hier zeigte sich anfänglich keine Reaktion. Die Mengen der Reaktionspartner wurden sukzessive erhöht. Hier erfolgte die vollständige Reaktion erst nach je zwei erneuten Zugaben. Am Ende enthielt die Reaktionsmischung 0.55 Äquivalente ZrCl_4 und 26 Äquivalente Essigsäureanhydrid. Das Produkt **33** konnte schließlich in 44% Ausbeute isoliert werden (Abb. 28, S. 32), was eine leichte Verbesserung im Vergleich zu der FeCl_3 -katalysierten Reaktion mit 38% (vgl. Abb. 19, S. 23) darstellt.

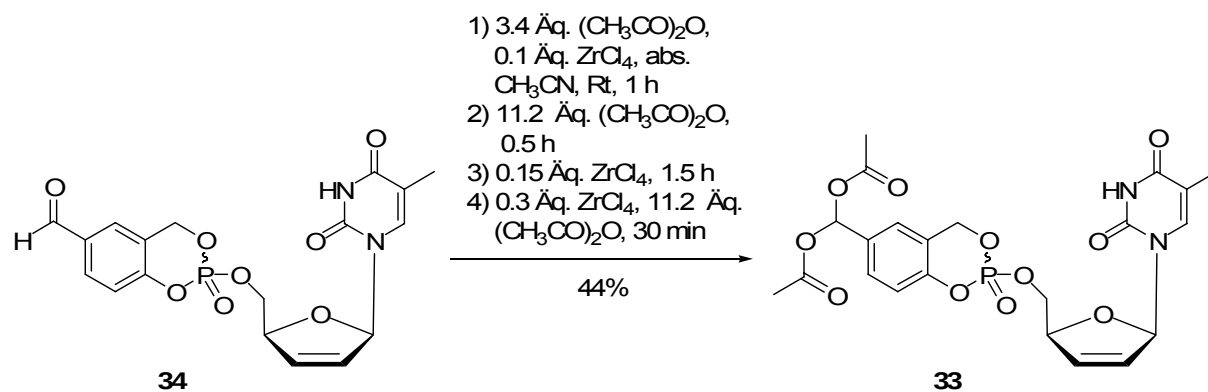


Abb. 28 Synthese von **33** aus **34** unter Verwendung von ZrCl_4 als Lewis-Säure

Auf Grundlage dieser Reaktionen wurden die weiteren Umwandlungen der Formyl-Triester in die entsprechenden Acylale unter Verwendung von 0.5 Äquivalenten ZrCl_4 und ca. 25 Äquivalenten Säureanhydrid durchgeführt. Die Wiederholung der Synthese von **40** aus **62** (vgl. Abb. 27, S. 31) sowie die Darstellung von 5-di-AM-3-*t*Bu-cycoSal-d4TMP **41** aus **63** sind nachfolgend in Abb. 29 gezeigt.

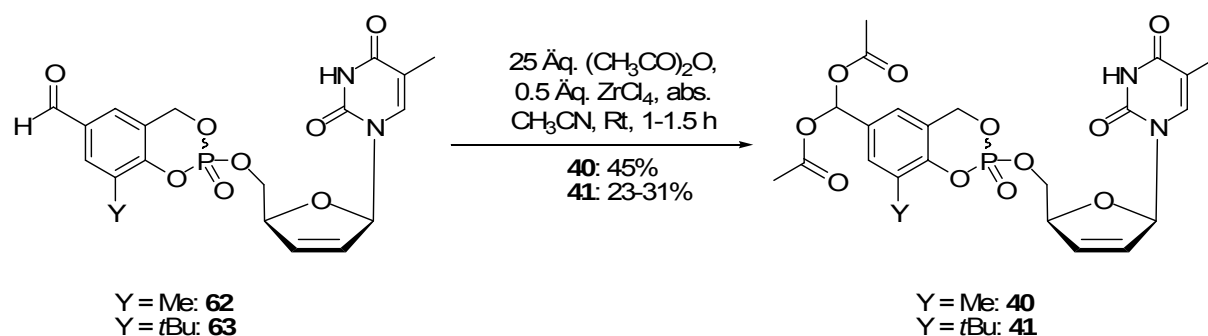


Abb. 29 Darstellung der 5-Di-AM-3-alkyl-cycoSal-d4TMPs **40** und **41**

Die Synthese von **40** verlief dabei mit 45% in nahezu identischer Ausbeute wie die der unsubstituierten Verbindung **33**. Die 3-*tert*-Butyl-substituierte Verbindung **41** hingegen wurde in einem ersten Versuch nur in 23% Ausbeute rein erhalten. Allerdings wurden noch einige Mischfraktionen aus **41** und dem Edukt **63** isoliert, sodass die niedrigere Ausbeute auch auf eine schlechtere Umsetzung zurückgeführt werden konnte. In einem weiteren Ansatz wurde die Reaktionszeit auf 1.5 Stunden verlängert und zur Trennung von Edukt und Produkt auch auf eine präparative RP-HPL-Chromatografie zurückgegriffen. Dadurch konnte die Ausbeute auf 31% gesteigert und zeitgleich eine Trennung der Diastereomere erreicht werden. Diese werden im Hinblick auf ihr Elutionsverhalten bei der RP-HPLC mit **41-fast** bzw. **41-slow** bezeichnet. Die Trennung der Diastereomere der *tert*-Butyl-substituierten Formyl-Verbindung **63** gelang ebenfalls mittels der präparativen RP-HPLC

(Abb. 30), sodass neben den Diastereomerengemischen **34-mix**, **33-mix**, **62-mix**, **40-mix**, **63-mix** und **41-mix** die Zielverbindungen **63** und **41** auch als reine Diastereomere (**63-fast**, **63-slow**, **41-fast**, **41-slow**) für die anschließenden biologischen Tests sowie die Untersuchungen der Hydrolyseeigenschaften zur Verfügung standen.

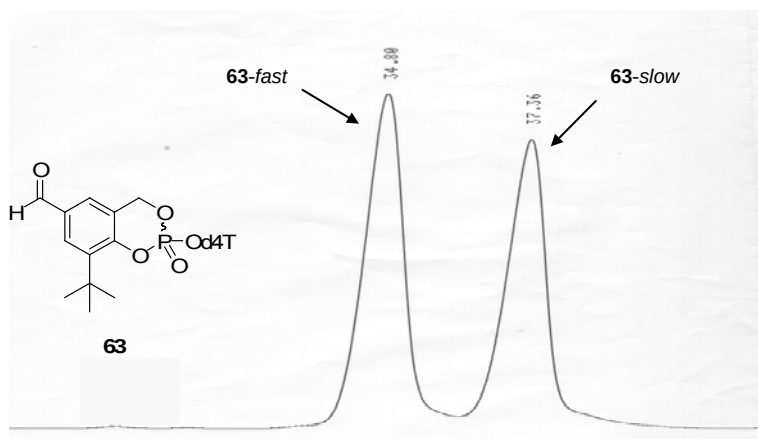


Abb. 30 Trennung der Diastereomere von **63** mittels präparativer RP-HPLC ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 0.5\% \text{HOAc}$)

Besonders erfreulich war die Tatsache, dass von dem Diastereomer **63-slow** mittels der Diffusionsmethode Einkristalle erhalten werden konnten, die für eine Röntgenkristallstrukturanalyse geeignet waren. Dies ist das erste und bisher einzige Mal, dass von einem diastereomerenreinen *cycloSal*-Pronucleotid eine Kristallstruktur vorliegt. Somit kann hier erstmalig eine definitive Aussage über die absolute Stereokonfiguration am Phosphoratom gemacht werden. Die Konfiguration wurde auf Basis der CIP-Regeln⁶⁹ als R_P bestimmt. Dabei besitzt die P-O-Doppelbindung die niedrigste Priorität, da „Beiträge von *d*-Orbitalen an die Bindungen quadriliganter Atome (...) vernachlässigt [werden]“. Der P-O2-Bindung wurde die höchste, der P-O5-Bindung die zweite und der P-O3-Bindung die dritte Priorität zugeordnet. Somit kann **63-fast** also als (S_P)-**63** und **63-slow** als (R_P)-**63** bezeichnet werden. Der ORTEP-Plot von (R_P)-**63** ist in Abb. 31 (S. 34) gezeigt.

Da für die Diskussion an dieser Stelle zunächst nur die Konfiguration am Phosphoratom von Bedeutung ist, erfolgt eine detaillierte Diskussion der Struktur in einem späteren Kapitel (Kapitel 4.3.4.). Bevor auf die analytischen Untersuchungen der 5-Diacetoxymethyl- und der 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs eingegangen wird, erfolgt im nächsten Kapitel zunächst eine kurze Beschreibung der Ziele der durchgeführten Studien.

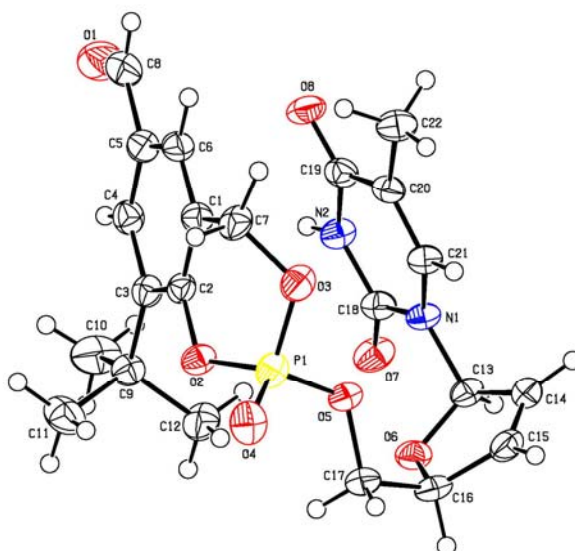


Abb. 31 Einkristallstruktur von (*R_p*)-63

4.1.2. Allgemeines zur Charakterisierung von *cycloSal*-Pronucleotiden

Zur Untersuchung der Eigenschaften von *cycloSal*-Pronucleotiden steht eine Reihe von Hydrolysestudien zur Verfügung, die allesamt bei 37 °C durchgeführt und mittels analytischer RP-HPLC vermessen werden. Die Ziele dieser Studien sollen hier kurz erläutert werden, ohne im Einzelnen auf die jeweilige experimentelle Durchführung einzugehen. Diese sind in Kapitel 9.3. ausführlich beschrieben.

Die *chemische Hydrolyse* unter physiologischen Bedingungen wird durch eine Hydrolyse in einem Phosphatpuffer, pH-Wert 7.3 simuliert. Die hierbei gemessenen Halbwertszeiten beziehen sich ausschließlich auf die Abnahme des zu untersuchenden *cycloSal*-Triesters. Die *enzymatische Spaltung* „lock-in“-modifizierter und enzymatisch aktivierbarer *cycloSal*-Verbindungen in Zellen wird durch Studien in CEM/0-Zellextrakten untersucht. Die angegebenen Halbwertszeiten beziehen sich dabei auf die Freisetzung des jeweiligen Spaltprodukts (z. B. Spaltung des Acylals **41** zur Formyl-Verbindung **63**). Diese Halbwertszeiten sind zwar leicht durch die parallel verlaufende chemische Hydrolyse beeinflusst, welche allerdings nicht sehr stark ins Gewicht fallen sollte, da die enzymatische Spaltung deutlich schneller verläuft als die chemische Hydrolyse. Diese ist durch den leicht sauren pH-Wert der Zellextrakte (pH-Wert: 6.8) ohnehin noch verlangsamt.

Um die *Stabilität* der Verbindungen in dem für die antiviralen Tests verwendeten Inkubationsmedium (RPMI-1640 mit 10% hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum; RPMI/FCS(10%)) einschätzen zu können, wird eine Hydrolyse in diesem Medium

durchgeführt, die hinsichtlich der Durchführung den Tests in CEM/0-Zellen analog ist. Die so bestimmten Halbwertszeiten beziehen sich dabei hingegen auf die Abnahme der untersuchten Substanz. Im RPMI/FCS(10%) ist der pH-Wert mit 7.6 leicht basischer als unter physiologischen Bedingungen, was eine schnellere chemische Hydrolyse der *cycloSal*-Pronucleotide zur Folge hat. Um eine potenzielle Spaltung der Esterfunktionen in diesem Medium zu untersuchen, wird zum Vergleich auch eine chemische Hydrolyse im Phosphatpuffer mit pH = 7.6 durchgeführt. Die *Stabilität im extrazellulären Raum* kann durch Hydrolysestudien in humanem Blutserum (5%, pH = 6.8) simuliert werden, die in ihrer Art den Studien in RPMI/FCS(10%) äquivalent sind.

4.1.3. Charakterisierung der 5-Diacetoxymethyl- und 5-Formyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

Das wesentliche Ziel der Einführung von Alkylgruppen in der 3-Position der *cycloSal*-Maske war die Erhöhung der Stabilität der 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs gegenüber der chemischen Hydrolyse, ohne dabei die schnelle enzymatische Spaltung des Acylals zu beeinflussen. Die Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse bei den pH-Werten 7.3 und 7.6, der enzymatischen Spaltung sowie der Hydrolyse in RPMI/FCS(10%) der Verbindungen **33**, **40** und **41** sind vergleichend in Diagramm 1 (S. 36) dargestellt. Die Halbwertszeiten der 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) sind dort ebenfalls aufgeführt, wobei für alle Triester zunächst nur die Diastereomerenmischungen betrachtet werden. Bereits bekannte Werte für die Verbindungen **33** und **34** wurden verifiziert.

Wie erwartet, hydrolysieren die 3-Methyl- bzw. die 3-*tert*-Butyl-substituierten Verbindungen langsamer als die vergleichbare unsubstituierte Verbindung. Durch die Methylgruppe ist die Hydrolysestabilität um den Faktor 2, durch die *tert*-Butylgruppe sogar um den Faktor 5 (**63** vs. **34**) bzw. 6.5 (**41** vs. **33**) erhöht. Wie konzeptionell erwünscht (vgl. Kapitel 2.3.4.), besitzen die Acylal-Verbindungen eine deutlich höhere Hydrolysestabilität als die entsprechenden Formyl-Verbindungen (sechs- (3-H, 3-Me) bis achtfach (3-*t*Bu)). Die Methylgruppe hat keinen Einfluss auf die enzymatische Spaltung, wohingegen die *tert*-Butylgruppe die Stabilität des Acylals **41** im Zellextrakt im Vergleich zu der von **33** verdoppelt. Mit einer Halbwertszeit von 0.15 h verläuft die Spaltung von **41** zu **63** allerdings immer noch

sehr schnell. Ein wichtiger Aspekt des Konzepts der enzymatischen Aktivierung (wie auch des „lock-in“-Konzepts) ist die Differenzierung zwischen chemischer und enzymatischer Stabilität. Die chemische Hydrolyse des unsubstituierten Acylals **33** verläuft 15-fach langsamer als die enzymatische Spaltung zu **34**. Diese Differenz konnte durch die Substitution in 3-Position auf das 29-fache für die Methyl-Verbindung **40** bzw. das 53-fache für die *tert*-Butyl-Verbindung **41** gesteigert werden.

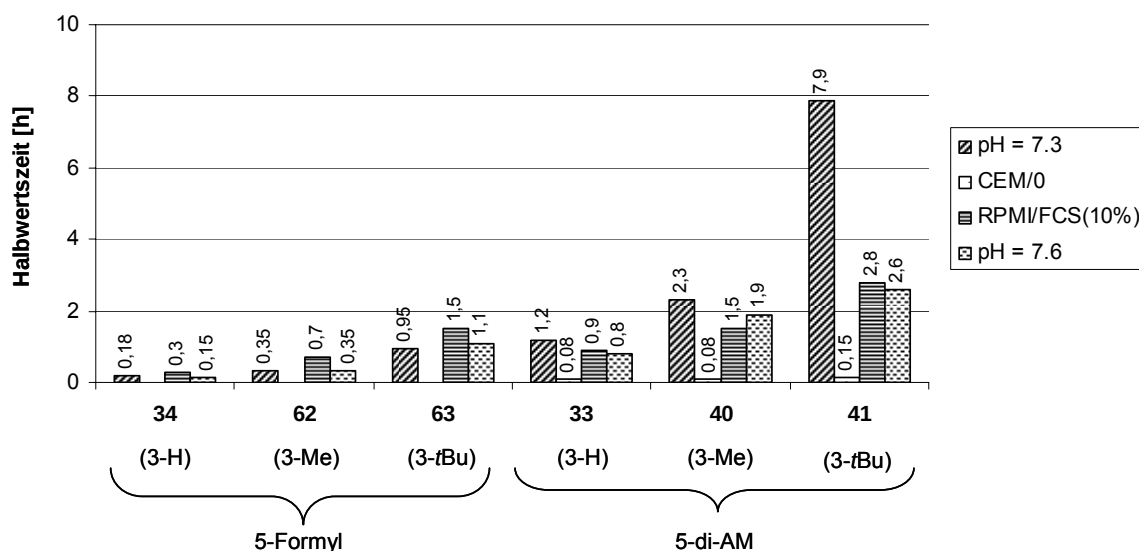


Diagramm 1 Halbwertszeiten der 5-di-AM- (**33**, **40**, **41**) und 5-Formyl-cycloSal-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) in verschiedenen Medien (Diastereomergemische)

Im Hinblick auf die Interpretation der antiviralen Daten der Prodrugs ist allerdings die Differenz zwischen der Hydrolyse im Inkubationsmedium RPMI/FCS(10%) und der enzymatischen Spaltung in CEM/0-Zellen ausschlaggebend, da jene Werte die dort gegebenen Bedingungen widerspiegeln. Im RPMI/FCS(10%) wurde für alle 5-di-AM-Verbindungen eine deutliche Verringerung der Hydrolysestabilität festgestellt. So beträgt die Halbwertszeit von **41** nur noch 2.8 h, was einer Verringerung der Stabilität um zwei Drittel entspricht. Für **33** beträgt die Abnahme 25%, für **40** sind es 33%. Somit ist im Inkubationsmedium die Hydrolyse von **41** nur noch 19-fach langsamer als die enzymatische Spaltung; die gleiche Differenz liegt beim Methyl-Derivat **40** vor. Für die unsubstituierte Verbindung **33** reduziert sich die Differenz auf das 11-fache. Insofern weist das 5-di-AM-3-*t*Bu-cycloSal-d4TMP **41** im Vergleich zum 3-Methyl-Derivat **40** in RPMI/FCS(10%) nur noch eine höhere absolute Hydrolysestabilität auf, die deutlich bessere Differenzierung zwischen chemischer Hydrolyse bei physiologischem pH-Wert (7.3) und enzymatischer Spaltung ging verloren.

Die beim gleichen pH-Wert (7.6) in Phosphatpuffer durchgeführten Hydrolysen weisen zunächst darauf hin, dass vor allem der basischere pH-Wert für diesen Stabilitätsverlust verantwortlich ist. Allerdings wurde für alle 5-di-AM-Verbindungen im RPMI/FCS(10%) auch eine anteilige Spaltung zur entsprechenden Formyl-Verbindung detektiert. Auf Grund der höheren Stabilität des entstehenden Formyl-Triesters **63** war dies besonders deutlich für Verbindung **41** nachzuweisen. Da in den Hydrolysestudien im Phosphatpuffer keine Spaltung auftrat, kann der basischere pH-Wert als Ursache für die Spaltung ausgeschlossen werden. Somit kann die Spaltung entweder durch eine Restaktivität des hitzedeaktivierten fötalen Kälberserums (FCS) oder durch Bestandteile des RPMI-Mediums bedingt sein. Dieses enthält u. a. eine Vielzahl an Aminosäuren und Vitaminen, deren Auswirkungen auf die Acylalfunktion nicht bekannt sind. Die Instabilität von Acetoxymethyl-Verbindungen in RPMI/FCS(10%) war bereits bei den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs (**26**; vgl. Kapitel 2.3.3.) beobachtet worden.

Das Hydrolyseverhalten der 5-Formyl-Triester (**34**, **62**, **63**) im RPMI/FCS(10%) ist genau entgegengesetzt. So erhöht sich hier die Stabilität dieser Verbindungen um ungefähr den Faktor 2. Die Hydrolysen im Phosphatpuffer bei pH = 7.6 lieferten hingegen identische Werte zu den bei pH = 7.3 durchgeführten Untersuchungen. Somit ist es möglich, dass die Akzeptor-Eigenschaften der Formylgruppe durch Inhaltsstoffe des RPMI-Mediums abgeschwächt werden und so die Hydrolyse verlangsamt wird.

Des Weiteren wurden die 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs **33**, **40** und **41** hinsichtlich ihrer Stabilität in humanem Blutserum (5%) getestet. Für alle drei Verbindungen wurden im Vergleich zur chemischen Hydrolyse bei pH = 7.3 erhöhte Stabilitäten festgestellt ($t_{1/2}$ (Serum) = 1.5 h (**33**), 3.6 h (**40**), 8.7 h (**41**)). Diese können durch den vorherrschenden saureren pH-Wert (6.8) erklärt werden. Allerdings konnte für **41** eine anteilige Spaltung zur Formyl-Verbindung **63** festgestellt werden. Für die Acylale **33** und **40** ist somit anzunehmen, dass die Spaltung dort ebenso stattfindet, die jeweils entstehende Formyl-Verbindung auf Grund einer sehr geringen Stabilität aber schnell weiter hydrolysiert wird und somit schlecht in der analytischen HPLC zu detektieren ist.

Die selektive Freisetzung von d4TMP war bereits in Vorarbeiten für das 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMP **33** mittels ^{31}P -NMR-Hydrolyse gezeigt worden⁵⁵ und konnte durch die gleiche Methode auch für das 5-Formyl-3-methyl- (**62**) und das 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **63** bestätigt werden. Da der Verlauf dieser beiden Hydrolysen identisch war, ist nur die des Diastomerengemischs von **63** exemplarisch in Abb. 32 gezeigt.

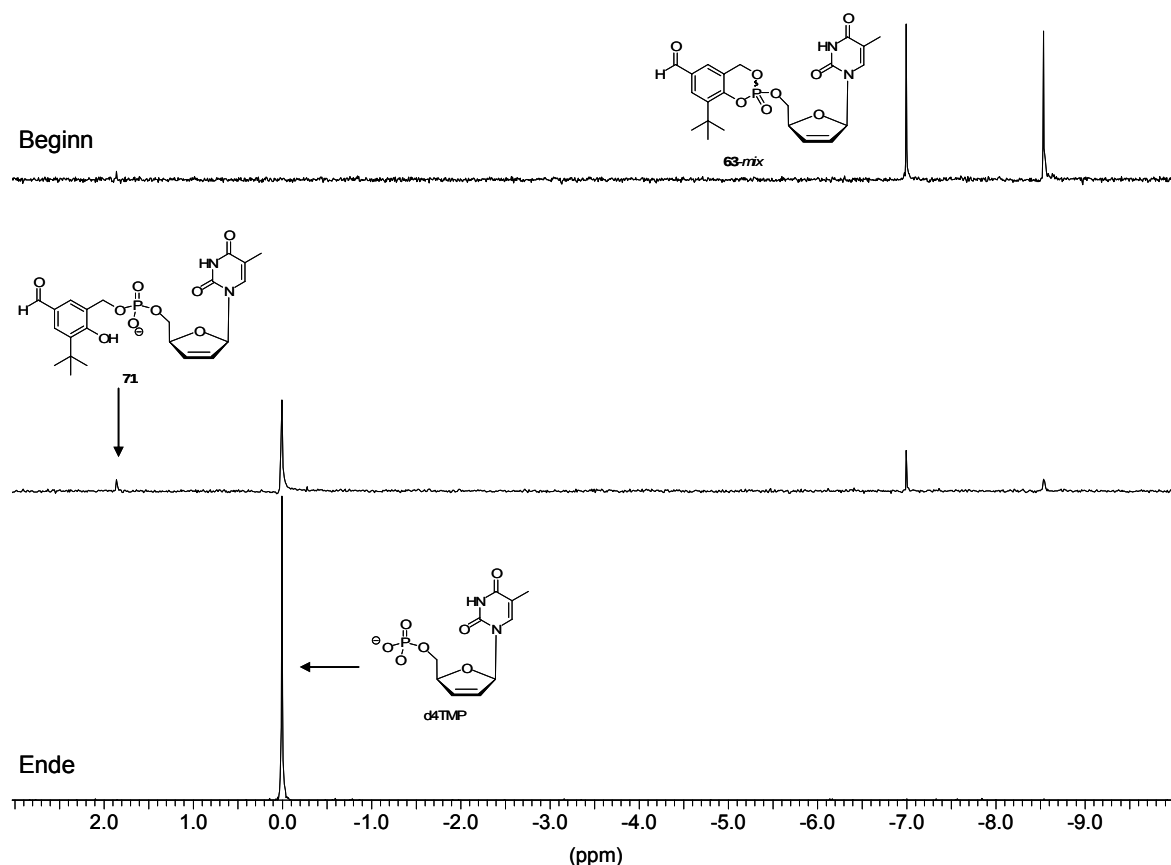


Abb. 32 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von **63-mix** im Imidazol/HCl-Puffer (pH = 7.3) bei 37 °C

Ein signifikanter Unterschied im Verlauf der Hydrolysen der 5-Formyl-Verbindungen war, dass die unsubstituierte Verbindung zunächst vollständig zum intermediären 2-(Hydroxybenzyl)-phosphat-d4T-diester hydrolysiert und aus diesem dann langsam d4TMP freigesetzt wurde. Die Hydrolysen der alkyltierten Verbindungen **62** und **63** hingegen lieferten den entsprechenden Diester (in Abb. 32 Verbindung **71**) nur zu einem geringen Anteil, da dieser sofort weiter zu d4TMP hydrolysiert wurde.

Die getrennten Diastereomere der 3-*tert*-Butyl-substituierten Verbindungen **41** und **63** wurden in den gleichen Medien wie die Gemische untersucht. Dabei konnte über die

CEM/0-Zellextraktstudien von **41-fast** und **41-slow** nachgewiesen werden, dass aus **41-fast** durch enzymatische Spaltung **63-fast** und aus **41-slow** dementsprechend die Formyl-Verbindung **63-slow** freisetzt wird (Abb. 33). Somit entspricht **41-fast** also (**S_P**)-**41** und **41-slow** kann mit (**R_P**)-**41** gleichgesetzt werden.

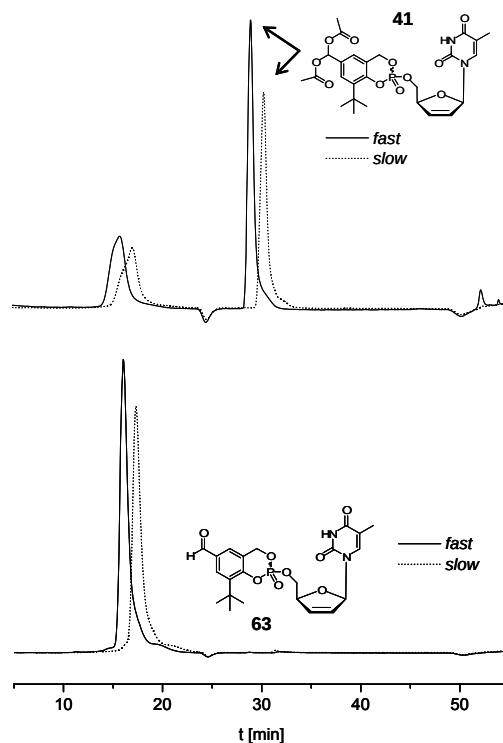


Abb. 33 oben: HPL-Chromatogramme der Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten nach 5 min von **41-fast** und **41-slow**; unten: HPL-Chromatogramme der Referenzverbindungen **63-fast** und **63-slow** (Methode III)

Die Ergebnisse der Hydrolysestudien in den verschiedenen Medien sind in Diagramm 2 (S. 40) zusammengefasst, in das auch die Werte der Diastereomerengemische (**63-mix** und **41-mix**) zum Vergleich noch einmal aufgenommen sind. Die Hydrolyseuntersuchungen der getrennten Diastereomere zeigen die schon für die Diastereomerengemische beschriebenen Trends und werden deshalb nicht noch einmal detailliert diskutiert.

Im Vergleich der Diastereomere untereinander sind kaum Unterschiede im Hydrolyseverhalten zu erkennen. Lediglich die stark erniedrigte Halbwertszeit (0.2 h) von (**R_P**)-**63** in Phosphatpuffer (pH = 7.6) ist im Vergleich zur Hydrolyse in RPMI/FCS(10%) ($t_{1/2}$ = 1.6 h) und den Hydrolysen von (**S_P**)-**63** und **63-mix** sehr verwunderlich. Beachtenswert ist allerdings, dass die enzymatische Spaltung von (**S_P**)-**41** ($t_{1/2}$ = 0.3 h) deutlich langsamer als die von (**R_P**)-**41** ($t_{1/2}$ = 0.15 h) verläuft.

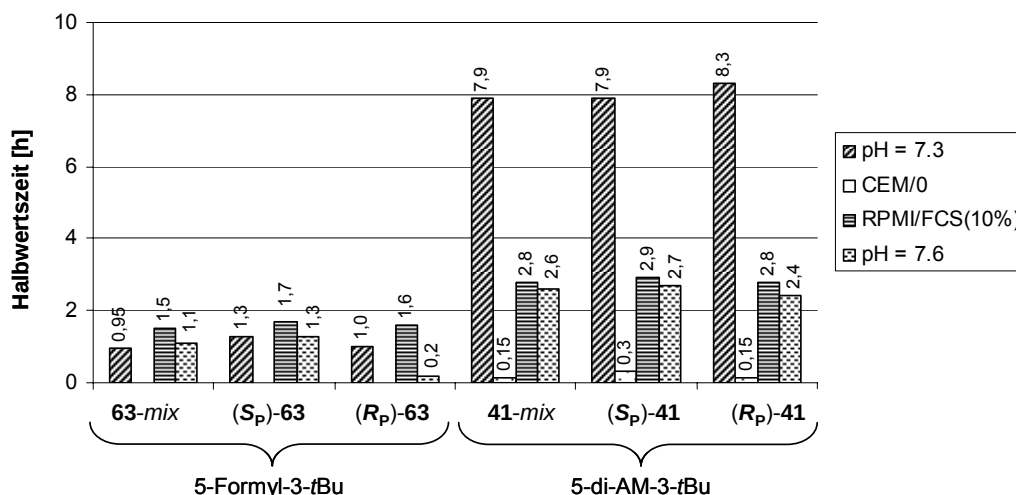


Diagramm 2 Halbwertszeiten der getrennten Diastereomere von **63** und **41** in verschiedenen Medien vergleichend zu den Diastereomerengemischen

In Anbetracht der immensen Abweichungen der Hydrolysestabilitäten in dem Inkubationsmedium RPMI/FCS(10%) ist anzuzweifeln, dass die antiviralen *in vitro*-Untersuchungen die potenzielle *in vivo*-Aktivität dieser enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-d4TMPs auch nur annähernd korrekt wiedergeben. Nichtsdestoweniger sind diese Tests unabdingbar, um das antivirale Potenzial der Prodrugs untereinander und im Vergleich zu den *cycloSal*-d4TMPs der ersten und zweiten Generation einschätzen zu können. Die Ergebnisse der antiviralen Tests der 5-di-AM- und 5-Formyl-Verbindungen sind im folgenden Kapitel 4.1.4. beschrieben.

4.1.4. Antivirale *in vitro*-Tests der 5-Diacetoxymethyl- und 5-Formyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

Sowohl die bereits bekannten als auch die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *cycloSal*-d4TMPs wurden in Kooperation mit Prof. Dr. J. Balzarini von der Universität in Leuven (Belgien) in antiviralen *in vitro*-Tests hinsichtlich ihrer Aktivität gegen HIV-1 (in Wildtyp-CEM-Zellen (CEM/0)) und HIV-2 (in CEM/0-Zellen und Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen (CEM/TK⁻)) analysiert. Als Referenz wurde dabei d4T **2** verwendet. In Tab. 3 (S. 41) sind die antiviralen Daten der Diastereomerengemische der 5-Formyl- und 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs zusammengefasst.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
5-Formyl 34	0.41 ± 0.29	0.15 ± 0.08	5.0 ± 4.6	113 ± 20.6
5-Formyl-3-Me 62	0.45 ± 0.32	1.27 ± 0.64	4.5 ± 0.7	82.1 ± 19.9
5-Formyl-3-tBu 63	0.45 ± 0.07	0.6 ± 0.0	17.5 ± 6.5	58.6 ± 22.4
5-di-AM 33	0.42 ± 0.28	0.4 ± 0.0	10.5 ± 8.3	98.7 ± 26.0
5-di-AM-3-Me 40	0.50 ± 0.17	0.70 ± 0.14	6.3 ± 2.9	43.9 ± 26.4
5-di-AM-3-tBu 41	0.32 ± 0.14	0.75 ± 0.07	3.0 ± 0.0	16.9 ± 4.3
d4T 2	0.48 ± 0.45	0.63 ± 0.21	47.5 ± 26.3	234

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

Tab. 3 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der Diastereomerengemische der 5-di-AM- (**33**, **40**, **41**) und 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) sowie der Referenzverbindung **2**

Alle in der Tab. 3 aufgeführten *cycloSal*-d4TMPs zeigen in den Wildtyp-Zellen anti-HIV-Aktivitäten, die mit denen von d4T **2** vergleichbar sind. Die Daten der Tests in CEM/TK⁻-Zellen sind ob der hohen Standardabweichungen nicht immer eindeutig zu interpretieren. D4T **2** verliert, wie erwartet, dort deutlich an Aktivität. Alle Triester zeigen eine bessere antivirale Wirksamkeit als **2**, wobei mit Ausnahme von **41** die Aktivitätsverluste der Triester dennoch so deutlich sind, dass davon auszugehen ist, dass diese Prodrugs den TK-Bypass gar nicht oder nur sehr schlecht vollziehen. Für **41** kann anhand dieser Werte zumindest ein teilweise effizienter und im Vergleich zu dem in 3-Position unsubstituierten bzw. Methyl-substituierten 5-di-AM-Triester besserer TK-Bypass vermutet werden. Im Zuge der Bestimmung der antiviralen Aktivitäten der getrennten Diastereomere von **41** und **63** wurde für **41-mix** sogar ein voller Erhalt der Aktivität in TK⁻-Zellen gemessen (vgl. Tab. 5, S. 44). Ein Merkmal für die größere Effektivität von **41** ist auch die höhere Cytotoxizität. Der Trend, dass eine bessere antivirale Aktivität auch meistens mit einem niedrigeren CC₅₀-Wert verbunden ist, war bereits früher für andere *cycloSal*-d4TMPs festgestellt worden.⁷⁰ Es wird vermutet, dass die steigende Cytotoxizität bei steigender Aktivität mit dem stärker werdenden Eingriff in den natürlichen Stoffwechsel der Zelle zusammenhängt. Dass die Cytotoxizität auch anderen Einflüssen unterliegt, zeigen die CC₅₀-Werte der 5-Formyl-Triester. So ist der antiviral am wenigsten aktive *tert*-Butyl-Triester **63** am toxischsten.

Als Maß für das Verhältnis von Cytotoxizität und antiviraler Wirkung dient der Selektivitäts-Index (SI), der sich aus dem Quotienten des CC_{50} - und des EC_{50} -Wertes (CEM/TK) ergibt. Hierdurch können Prodrugs mit einem vergleichbar guten EC_{50} -Wert leicht untereinander verglichen werden, um abzuschätzen, welche dieser Verbindungen für eine potenzielle Anwendung insgesamt geeigneter ist. So ist nicht zwangsläufig die beste antivirale Aktivität von Nutzen, wenn daraus eine zu hohe Giftigkeit resultiert. Prodrugs, deren effektive Konzentration nahe an der toxischen Konzentration liegt, sind dabei natürlich für eine therapeutische Verwendung völlig ungeeignet. Die SI und die zu ihrer Berechnung notwendigen Angaben der 5-Formyl- und 5-di-AM-cycloSal-d4TMPs sowie einiger Referenzverbindungen³⁶ sind in der nachfolgenden Tab. 4 aufgeführt.

Verbindung	EC_{50} ^a [μ M] (CEM/TK)	CC_{50} ^b [μ M]	SI ^c
5-Formyl 34	5.0	113	23
5-Formyl-3-Me 62	4.5	82.1	18
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu 63	17.5	58.6	3
5-di-AM 33	10.5	98.7	9
5-di-AM-3-Me 40	6.3	43.9	7
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu 41	3.0	16.9	6
3-H 8	0.15	50	333
3-Me 9	0.048	32	667
3- <i>t</i> Bu 11	0.33	35	106

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. ^b50% cytotoxische Konzentration. ^cSelektivitäts-Index CC_{50}/EC_{50} .

Tab. 4 Selektivitäts-Indices der Zielverbindungen **33**, **34**, **40**, **41**, **62**, **63** und der Referenzverbindungen **8**, **9**, **11** (Diastereomerenmischungen)

Aus diesen Werten ist zu erkennen, dass in der Reihe der 5-Formyl-Triester die *tert*-Butylgruppe in 3-Position zu einem deutlich schlechteren SI führt. Dies ist in der oben bereits erwähnten Absenkung der antiviralen Aktivität bei erhöhter Cytotoxizität begründet. In der Reihe der 5-di-AM-cycloSal-d4TMPs hat eine Alkylierung dieser Position nicht so einen drastischen Einfluss. Hier steigt mit zunehmender Wirkung auch die Cytotoxizität an, sodass der SI nahezu unverändert bleibt. Dass der Einfluss auf die Cytotoxizität möglicherweise auch auf sterische Gründe zurückzuführen ist, zeigen die SI der in 5-Position unsubstituierten Referenzverbindungen **8**, **9** und **11**. So ist der SI des 3-*t*Bu-cycloSal-d4TMPs **11** im Vergleich zu **8** und **9** ebenfalls deutlich niedriger, was ebenso durch eine (deutlich) schlechtere antivirale Wirkung

bei erhöhter bzw. gleicher Cytotoxizität bedingt ist. 3-Me-cycloSal-d4TMP **9** sticht insgesamt mit einem EC_{50} von 0.048 μ M bei einem SI von 667 klar hervor.

Allgemein ist zu bemerken, dass die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen im Verhältnis zu ihrer antiviralen Aktivität deutlich cytotoxischer sind als die Referenzverbindungen. In der Testreihe der Referenzverbindungen wurde für d4T **2** ein CC_{50} -Wert von 35 μ M bestimmt, die Triester **8**, **9** und **11** besitzen also eine gleiche bzw. niedrigere Cytotoxizität (CC_{50} = 32-50 μ M) bei deutlich besserer antiviraler Wirkung. Die 5-Formyl- und die 5-di-AM-Verbindungen hingegen besitzen alle eine höhere Cytotoxizität als d4T **2** (vgl. Tab. 3, S. 41).

Die antiviralen Daten der getrennten Diastereomere (Tab. 5, S. 44) zeigen das von den cycloSal-d4TMPs der ersten Generation bekannte Bild: Das eine Diastereomer, hier in beiden Fällen das schneller eluierende S_P -Diastereomer, besitzt eine deutlich bessere Aktivität als das andere (R_P). Während das R_P -Diastereomer der 5-Formyl-Verbindung **63** den TK-Bypass nur schlecht vollzieht, deutet der Wert für das S_P -Diastereomer einen teilweise erfolgenden Bypass an. Im Fall der Acylal-Verbindung **41** ist es noch deutlicher: Das R_P -Diastereomer weist einen eingeschränkten Bypass auf, wohingegen die antivirale Aktivität des S_P -Diastereomers in TK⁻-Zellen nicht nur erhalten, sondern sogar noch gesteigert ist. Die unterschiedlichen Aktivitäten können dabei nicht auf Unterschiede im Hydrolyseverhalten zurückgeführt werden, da dies für die jeweiligen Diastereomere nahezu identisch ist (Diagramm 2, S.41). Folglich scheint die Konfiguration am Phosphoratom die entscheidende Rolle hinsichtlich einer guten antiviralen Aktivität zu spielen. Eine ausführliche Untersuchung hierzu, unter Betrachtung weiterer diastereomerenreiner cycloSal-d4TMPs, erfolgt in Kapitel 4.3. Die Werte für die Referenz d4T **2** in Tab. 5 (S. 44) weichen von den vorher angegebenen ab. Dies liegt daran, dass die Referenz mit jeder Testreihe neu vermessen wird und es Unterschiede zwischen den einzelnen Testreihen geben kann.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu 63-mix	0.39 ± 0.40	1.0 ± 0.22	15 ± 6.4	33 ± 7.8
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 63	0.16 ± 0.071	0.69 ± 0.41	2.6 ± 1.9	27 ± 11
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 63	0.81 ± 0.042	1.4 ± 0.81	10 ± 0.0	41 ± 1.4
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu 41-mix	0.65 ± 0.35	0.80 ± 0.13	0.78 ± 0.0	19 ± 0.0
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 41	0.54 ± 0.51	0.75 ± 0.49	0.29 ± 0.16	17 ± 2.1
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 41	1.1 ± 1.3	0.84 ± 0.085	3.9 ± 2.7	51 ± 21
d4T 2	0.86 ± 0.057	1.9 ± 1.8	62 ± 0.48	182 ± 16

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

Tab. 5 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der getrennten Diastereomere und der Diastereomerengemische von **41** und **63** sowie der Referenzverbindung **2**

Die 5-Diacetoxymethyl-*cyclo*Sal-d4TMPs sind also generell als enzymatisch aktivierbare *cyclo*Sal-Pronucleotide verwendbar, da die aus der enzymatischen Spaltung resultierenden 5-Formyl-*cyclo*Sal-d4TMPs durch schnelle Hydrolyse zu einem intrazellulären Einschluss führen. Auch wenn mit (**S_P**)-**63** genau diejenige Formyl-Verbindung einen teilweisen TK-Bypass aufweist, die aus der potentesten 5-di-AM-Verbindung (**S_P**)-**41** freigesetzt wird, ist hier dennoch ein 10-facher Unterschied in der antiviralen Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen zu finden, sodass die enzymatische Aktivierung als erfolgreich angesehen werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung einer Alkylgruppe in der 3-Position der *cyclo*Sal-Maske die Hydrolysestabilität der Prodrugs erhöht werden kann, ohne einen zu großen Einfluss auf die schnelle enzymatische Umwandlung der Acylalfunktion in die Formylfunktion auszuüben. Negativ zu bemerken ist vor allem der drastische Stabilitätsverlust der 5-di-AM-*cyclo*Sal-d4TMPs im Inkubationsmedium der antiviralen Tests und die anteilige Spaltung der Acylalfunktion in diesem Medium.

Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt versucht, die Formyl- und di-AM-*cyclo*Sal-d4TMPs mit „vertauschten Substituenten“, also die 3-Formyl- und 3-di-AM-5-alkyl-*cyclo*Sald4TMPs zu synthetisieren, um die Stabilität der Diacetoxy-methylfunktion in dieser Position zu untersuchen. Die Synthese und Analyse dieser Verbindungen ist in den folgenden Kapiteln 4.1.5. bis 4.1.7. beschrieben.

4.1.5. Synthese von 3-Diacetoxymethyl- und 3-Formyl-*cycloSal*-d4T-monophosphaten

Die angestrebten Zielverbindungen waren das 3-Diacetoxymethyl- (**72**), 3-Diacetoxymethyl-5-methyl- (**73**) und 3-Diacetoxymethyl-5-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **74**, die aus den jeweiligen 3-Formyl-Verbindungen (**75-77**) hergestellt werden sollten (Abb. 34).

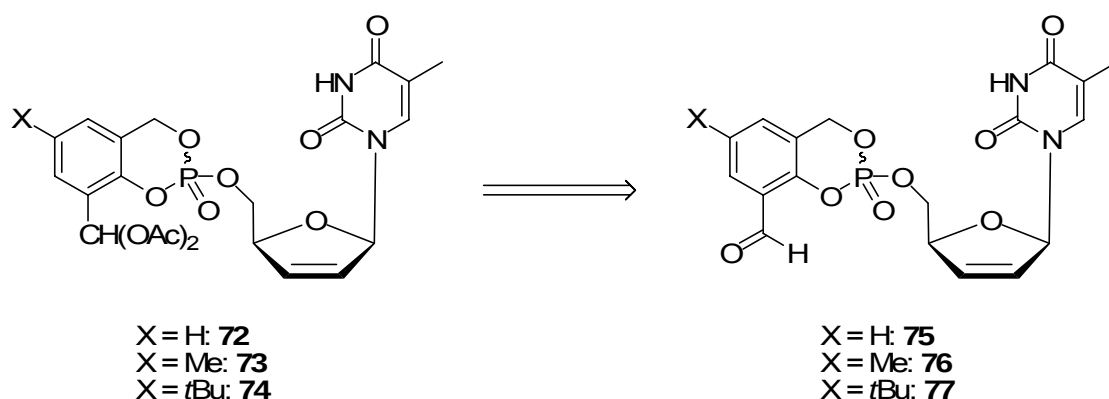


Abb. 34 Zielverbindungen **72-77**

Da davon ausgegangen wurde, dass die für die Synthese der 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) angewendeten Reaktionsschritte (vgl. Kapitel 4.1.1.) auch für die Darstellung der 3-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs **75-77** geeignet sind, mussten in Analogie dazu zunächst die 6-Brom-4-alkylsalicylalkohole **78-80** hergestellt werden. Über die drei Schritte Isopropylidenschützung, Formylierung und Entschützung sollten aus diesen dann die entsprechenden 6-Formyl-4-alkylsalicylalkohole **81-83** erhalten werden. Durch Synthese der Chlorphosphite **84-86** und anschließender Umsetzung mit d4T **2** sollten dann die 3-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs **75-77** zugänglich sein (Abb. 35).

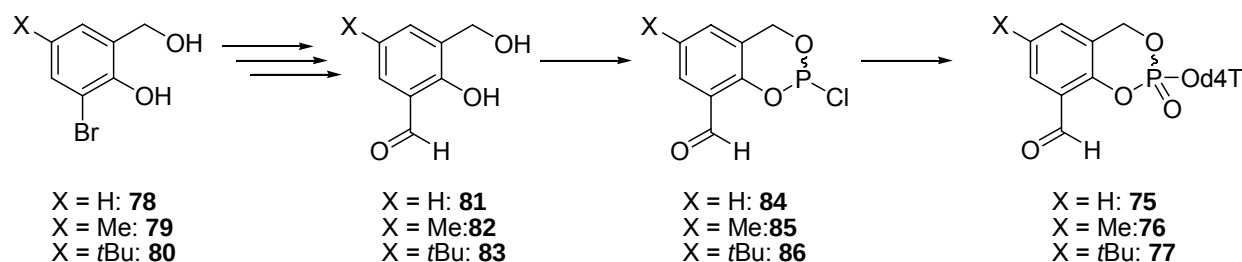


Abb. 35 Geplanter Syntheseweg zur Darstellung der 3-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs **75-77**

Die Synthese des 6-Bromsalicylalkohols **78**, ausgehend vom kommerziell erhältlichen *ortho*-Bromphenol **87** über die Zwischenstufe des Dioxaborins **88**, wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich durchgeführt (Abb. 36).⁵³ Für die in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen stand **78** daher noch in ausreichender Menge zur Verfügung.

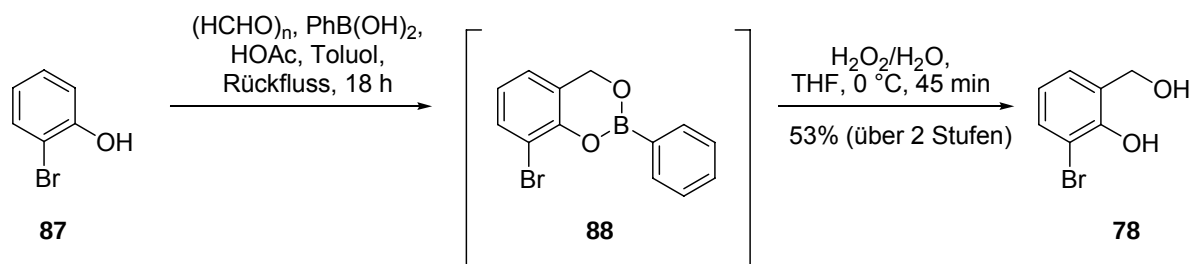


Abb. 36 Synthese des 6-Bromsalicylalkohols **78**

Die zur Darstellung der 6-Brom-4-alkylsalicylalkohole **79** und **80** durchgeführten Reaktionen sind in Abb. 37 zusammengefasst.

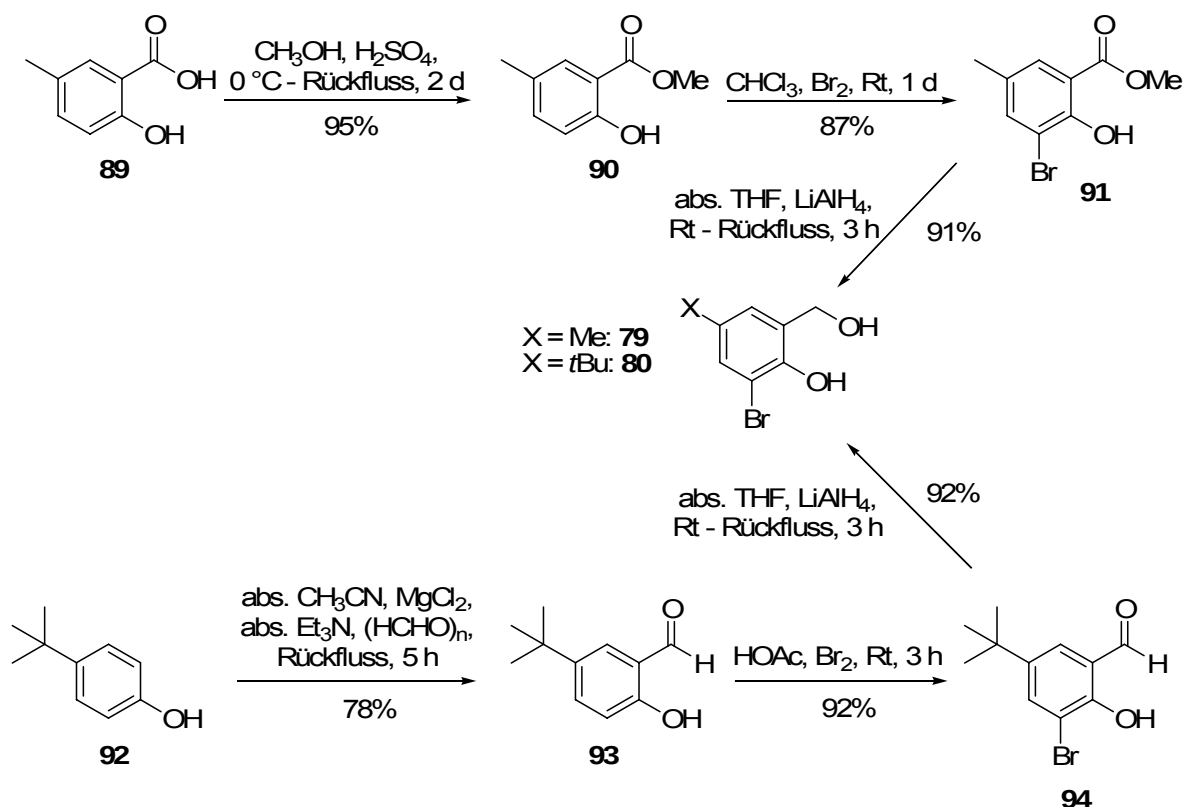


Abb. 37 Synthese der 6-Brom-4-alkylsalicylalkohole **79** und **80**

Für die Synthese des 6-Brom-4-methylsalicylalkohols **79** wurde dabei von der kommerziell verfügbaren 5-Methylsalicylsäure **89** ausgegangen. Diese konnte mit

einer Ausbeute von 95% in den 5-Methylsalicylsäuremethylester **90** umgewandelt werden. Durch Umsetzung von **90** mit Brom in Chloroform bei Raumtemperatur wurde dann der 3-Brom-5-methylsalicylsäuremethylester **91** hergestellt (87% Ausbeute). Die Reduktion mit LiAlH_4 lieferte den Salicylalkohol **79** in einer Ausbeute von 91%.

6-Brom-4-*tert*-butylsalicylalkohol **80** wurde ausgehend von dem im Handel erhältlichen 4-*tert*-Butylphenol **92** – unter zu der dreistufigen Synthese des 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohols **49** aus 2-*tert*-Butylphenol **53** (vgl. Abb. 20, S. 24) analogen Reaktionsbedingungen – synthetisiert. Durch die im ersten Schritt durchgeführte *ortho*-Formylierung konnte der 5-*tert*-Butylsalicylaldehyd **93** in 78% Ausbeute hergestellt werden. Die anschließende Bromierung führte in der sehr guten Ausbeute von 92% zum 3-Brom-5-*tert*-butylsalicylaldehyd **94**. Durch die etablierte Reduktion mit LiAlH_4 wurde dann der 6-Brom-4-*tert*-butylsalicylalkohol **80** mit einer Ausbeute 92% dargestellt. Die weitere Umsetzung der 6-Bromsalicylalkohole **78-80** zu den 6-Formylsalicylalkoholen **81-83** ist in Abb. 38 zusammengefasst.

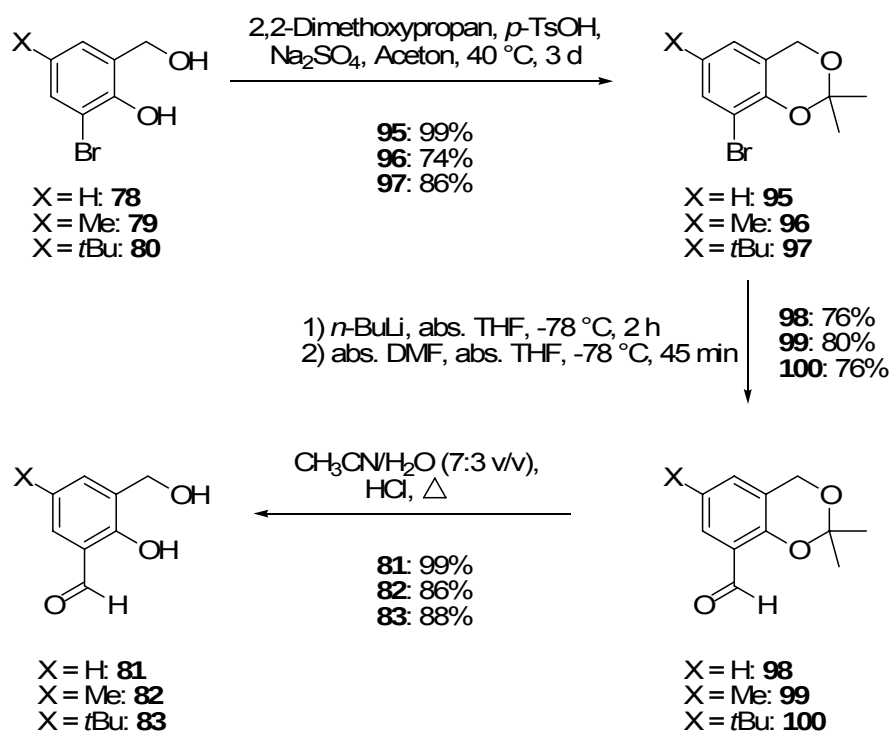


Abb. 38 Synthese der 6-Formylsalicylalkohole **81-83**

Die Synthese der Isopropylidenacetale **95-97** verlief in den gewohnt guten bis sehr guten Ausbeuten (74-99%). Die nahezu quantitative Umsetzung von **78** zu **95** war dabei bereits literaturbekannt (98%)⁵³ und konnte hier bestätigt werden. Auch die

anschließenden Formylierungen wurden mit konstant guten Ausbeuten (76-80%) durchgeführt. Die saure Entschützung von **98** zu **81** gelang fast quantitativ und auch **99** und **100** konnten in sehr guten Ausbeuten (86% bzw. 88%) entschützt werden. Auch hier musste für die Entschützung des *tert*-Butyl-Derivats **100** deutlich mehr rauchende Salzsäure eingesetzt werden als für die Entschützung von **98** und **99** (vgl. Entschützung von **59**, Abb. 21, S. 25). Somit standen also alle benötigten 6-Formylsalicylalkohole zur Verfügung, die nun in die entsprechenden 3-Formylsaligenylchlorphosphite **84-86** überführt werden sollten.

Zunächst wurde versucht, den 6-Formylsalicylalkohol **81** unter den bereits ausführlich beschriebenen Standardbedingungen (S. 26) zum Chlorphosphit **84** umzusetzen (Abb. 39). Dazu musste auf Grund der Unlöslichkeit von **81** in abs. Diethylether wieder auf abs. THF als Lösungsmittel zurückgegriffen werden. Allerdings konnte in keinem der durchgeführten Versuche **84** isoliert werden. Die erhaltenen Rohprodukte enthielten nur in einem einzigen Fall im ^{31}P -NMR-Spektrum ein Signal, das im für Chlorphosphite typischen Bereich um die 140 ppm lag. Laut ^1H -NMR-Spektrum bestand dieses Rohprodukt allerdings fast ausschließlich aus Pyridinhydrochlorid. Somit stand kein 3-Formylsaligenylchlorphosphit **84** zur Verfügung, sodass auch die nachfolgenden Zielverbindungen **75** und **72** nicht synthetisiert werden konnten.

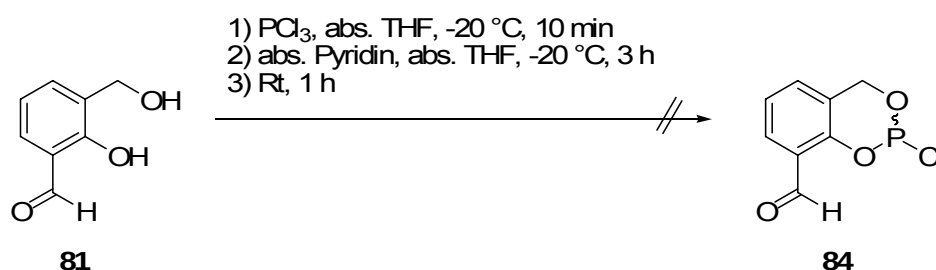


Abb. 39 Versuch der Synthese des 3-Formylsaligenylchlorphosphits **84**

Die Synthese des 3-Formyl-5-methylsaligenylchlorphosphits **85** wurde aus Gründen der Löslichkeit ebenfalls in abs. THF durchgeführt. Der erste Versuch erfolgte dabei unter den Standardbedingungen (Abb. 40, S. 49). Das so isolierte Rohprodukt fiel allerdings nur in einem geringen Maße an (22% bei hypothetischer Reinheit von **85**).

Eine genaue Ausbeute kann hier nicht angegeben werden, da erstaunlicherweise neben **85** zwei weitere Verbindungen (Signale im für Chlorphosphite typischen Bereich bei 140.68 und 140.66 ppm; in Abb. 40 zusammenfassend mit **X** bezeichnet) entstanden. Diese weiteren Verbindungen lagen zusammen laut ^{31}P -NMR (^1H -entkoppelt) im Verhältnis 1:1 mit **85** vor (Abb. 41). Dabei war aus den vorhandenen Spektren nicht zu ermitteln, um was für weitere Verbindungen es sich handeln könnte.

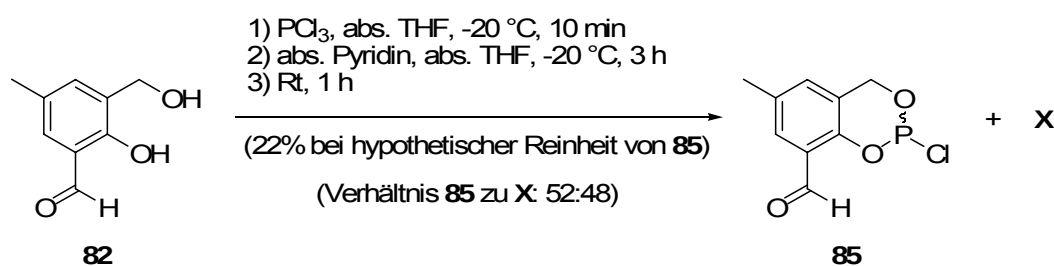


Abb. 40 Synthese des 3-Formyl-5-methylsaligenylchlorphosphits **85** unter Standardbedingungen

Neben den Verbindungen **85** und **X** war im Rohprodukt noch Pyridinhydrochlorid enthalten, allerdings in einem – für in THF synthetisierte Chlorphosphite – geringen Maße.

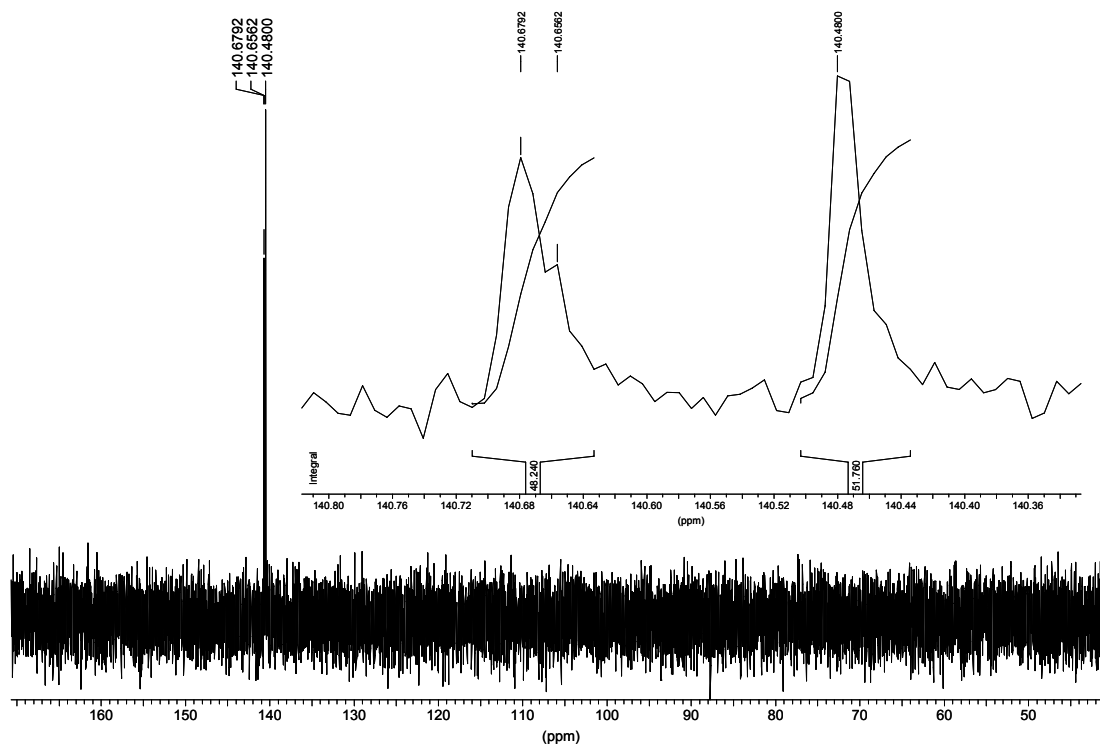


Abb. 41 Ausschnitt des ^{31}P -NMR-Spektrums (^1H -entkoppelt) des Rohprodukts der Synthese von **85** unter Standardbedingungen

Um den Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Bildung der weiteren Produkte **X** zu untersuchen, wurde die Chlorphosphitsynthese wiederholt, wobei die Zugaben von PCl_3 und Pyridin bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$ erfolgten. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde danach wieder eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 42). Dieser Versuch lieferte erstaunlicherweise ein reines Chlorphosphit ohne signifikante Verunreinigung durch Pyridinhydrochlorid.

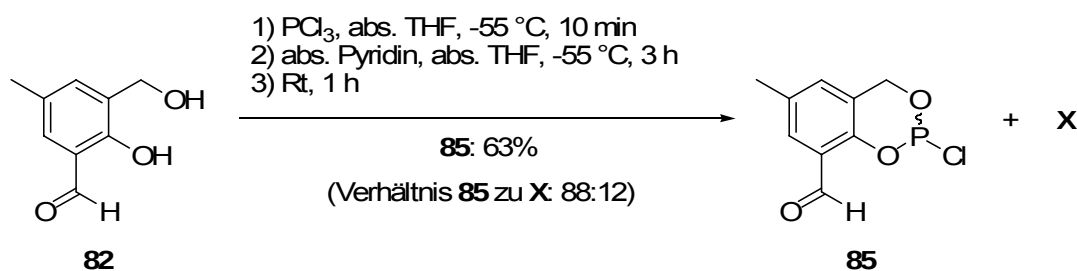


Abb. 42 Synthese von **85** bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$ mit anschließendem Rühren bei Raumtemperatur für 1 h

Laut ^{31}P -NMR-Spektrum des Rohprodukts (Abb. 43) waren auch die Verbindungen **X** nur noch zu insgesamt 12% enthalten. Die berechnete Ausbeute an **85** betrug in diesem Versuch 63%.

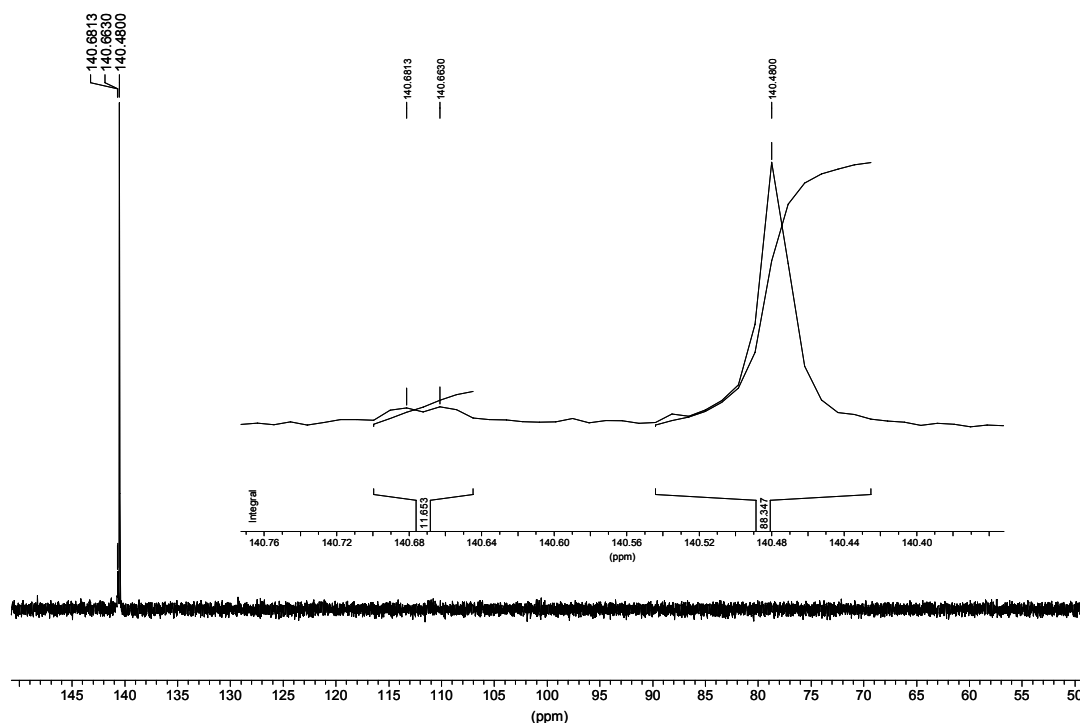


Abb. 43 Ausschnitt des ^{31}P -NMR-Spektrums (^1H -entkoppelt) des Rohprodukts der Synthese von **85** bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$ mit anschließendem Rühren bei Raumtemperatur für 1 h

Da der Wechsel zu einer niedrigeren Reaktionstemperatur also zu einem deutlichen Rückgang der Nebenproduktbildung führte, wurde in einem weiteren Versuch auch das einstündige Rühren bei Raumtemperatur durch ein einstündiges Rühren bei $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ersetzt. Somit lag die Temperatur während der gesamten Reaktion nicht über den aus der nächtlichen Lagerung im Gefrierschrank resultierenden $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Reaktion führte mit 60% Ausbeute zu einem reinen Chlorphosphit (Reinheit $> 95\%$ laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum), das die Verbindungen **X** nicht mehr enthielt (Abb. 44). Somit konnte die Nebenproduktbildung durch konsequentes Einhalten tiefer Temperaturen vollständig unterbunden werden.

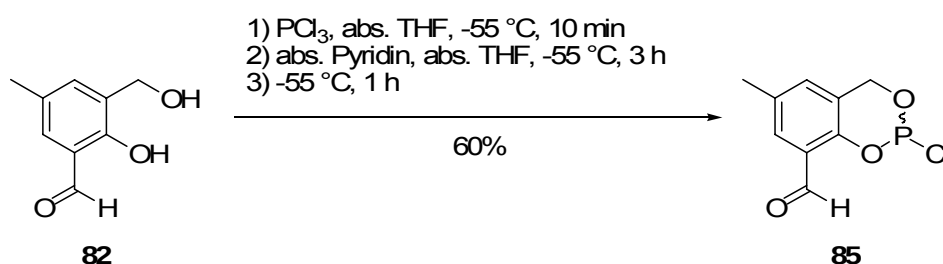


Abb. 44 Synthese von **85** bei $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit anschließendem Rühren bei $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h

Dieses pure Chlorphosphit **85** wurde dann für die Synthese des 3-Formyl-5-methyl-*cycloSal*-d4TMPs **76** verwendet, die unter den bereits beschriebenen Standardbedingungen (S. 27) durchgeführt wurde. Der Triester **76** konnte dadurch in 44% Ausbeute hergestellt werden (Abb. 45).

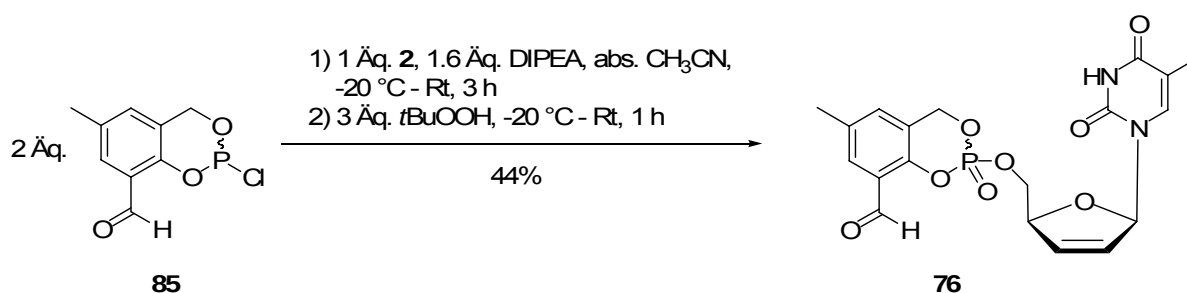


Abb. 45 Synthese des 3-Formyl-5-methyl-*cycloSal*-d4TMPs **76** aus reinem **85**

Daneben wurde auch das 8:1-Gemisch aus **85** und den weiteren Verbindungen **X** mit d4T **2** umgesetzt, um aus den möglicherweise zusätzlich entstehenden Produkten Rückschlüsse auf die Verbindungen **X** ziehen zu können. Dazu wurde dieses Gemisch ebenfalls unter den Standardbedingungen zur Reaktion gebracht, wobei das Gemisch als zwei Äquivalente hypothetisch reiner Verbindung **85** eingesetzt wurde.

Tatsächlich lieferte die Reaktion neben dem bereits bekannten Triester **76** weitere Verbindungen. *CycloSal*-d4TMP **76** konnte nach chromatografischer Reinigung in 23% Ausbeute rein erhalten werden. Außerdem war **76** noch in Mischfraktionen mit einer zweiten nucleosidischen Verbindung sowie einem weiteren, nicht nucleosidischen Produkt enthalten. Leider konnte der zweite potenzielle Triester auch durch die Verwendung der präparativen RP-HPLC nicht in charakterisierbarer Menge isoliert werden. Somit lagen nur die NMR-Spektren der Mischfraktionen zur Identifikation vor. Mittels dieser konnte der unbekannte Triester allerdings nicht eindeutig identifiziert werden, sodass auch keine Rückschlüsse auf wenigstens eine der während der Chlorphosphitsynthese entstandenen Verbindungen **X** möglich waren.

Da die Nebenproduktbildung aber, wie beschrieben, erfolgreich unterdrückt werden konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Versuche zur Strukturaufklärung der Verbindungen **X** unternommen.

Die optimierten Bedingungen für die Synthese des 3-Formyl-5-methylsaligenylchlorphosphits **85** (Abb. 44, S. 51) wurden dann für die Darstellung von 3-Formyl-5-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **86** aus dem Salicylalkohol **83** verwendet. Dadurch konnte **86** in einer Ausbeute von 54% hergestellt werden, wobei die Reinheit des Chlorphosphits nur bei 55% lag (Abb. 46).

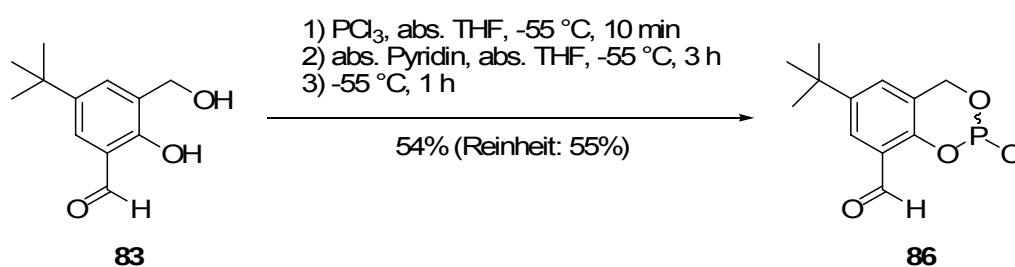


Abb. 46 Synthese des 3-Formyl-5-*tert*-butylsaligenylchlorphosphits **86**

Aus diesem Chlorphosphit wurde dann 3-Formyl-5-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **77** synthetisiert, wobei wiederum nur 1.2 Äquivalente **86** eingesetzt wurden. Die Zielverbindung **77** konnte so in einer annehmbaren Ausbeute von 36% dargestellt werden (Abb. 47, S. 53). Die Verbindungen **76** und **77** sollten sehr hydrolyselabil sein, da sie einen starken Elektronenakzeptor in *ortho*-Position zum Phenylphosphatester beinhalten.

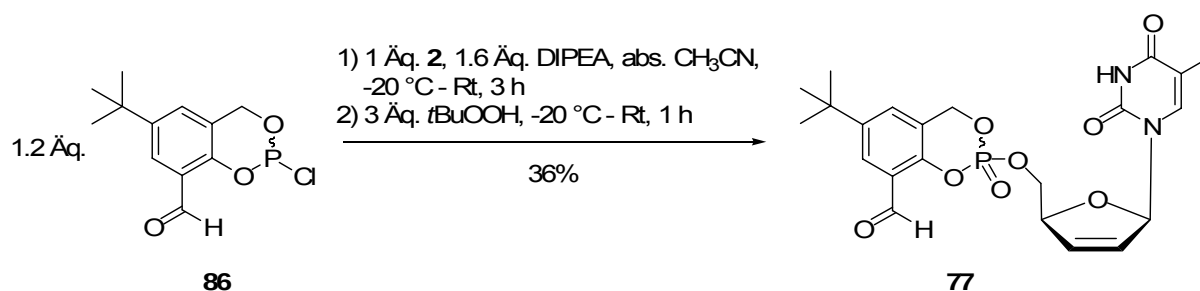


Abb. 47 Synthese des 3-Formyl-5-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **77**

Die Umsetzung der 3-Formyl-5-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs **76** und **77** in die entsprechenden Diacetoxymethyl-Verbindungen **73** und **74** stellte sich im Vergleich zu den Synthesen der 5-Diacetoxymethyl-Verbindungen als schwieriger heraus.

Die Reaktion von **76** führte, unter den für die Synthese der di-AM-Acylale optimierten Bedingungen (vgl. Abb. 29, S. 32), in 19% zum 3-di-AM-5-Me-*cycloSal*-d4TMP **73** (Abb. 48). Allerdings wurden auch 23% des Edukts **76** wieder reisoliert, obwohl mittels der dünnschichtchromatografischen Verfolgung nach der Reaktionszeit von 45 Minuten **76** nur noch in geringem Maße detektiert werden konnte. Somit ist entweder der Grad der Umsetzung mittels Dünnschichtchromatografie schlecht abzuschätzen oder ein Teil des entstandenen Acylals wird während der Aufarbeitung wieder zur Formyl-Verbindung gespalten. Auch wenn in den Synthesen der 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs nichts Vergleichbares beobachtet wurde, ist eine höhere Labilität der Acylalfunktion in der 3-Position nicht auszuschließen.

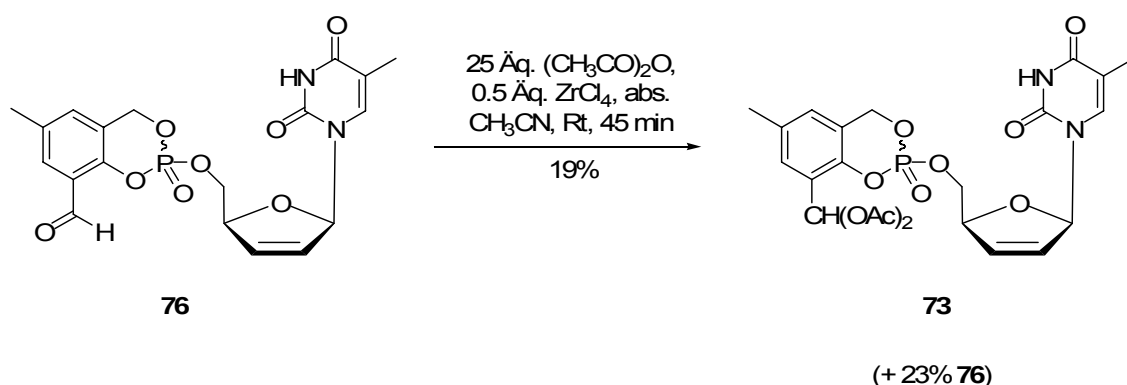


Abb. 48 Synthese von 3-Diacetoxymethyl-5-methyl-*cycloSal*-d4TMP **73**

Die Separation von **73** und **76** erwies sich dabei mittels der normalen Chromatografie am Chromatotron als nicht möglich, da diese beiden Verbindungen fast identische R_f -Werte aufweisen. Somit musste zur Trennung auf die präparative RP-HPLC zurückgegriffen werden. Das Chromatogramm dieser Trennung in Acetonitril/ Wasser 2:3 v/v zeigt Abb. 49 (S. 54).

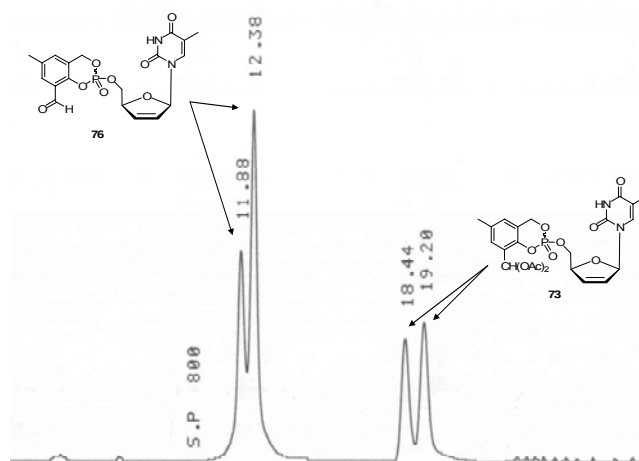


Abb. 49 Trennung von **73** und **76** mittels präparativer RP-HPLC (CH₃CN/H₂O 2:3 v/v)

Ein erster Versuch der Umwandlung des 3-Formyl-5-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **77** in das 3-Diacetoxymethyl-5-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **74** unter diesen Bedingungen führte prinzipiell zum Produkt, wenngleich der Umsatz laut dünnschichtchromatografischer Kontrolle nicht vollständig war. Ähnliches war, wenn auch in geringerem Maße, schon bei der Darstellung von **73** beobachtet worden. Das ³¹P-NMR-Spektrum der produkthaltigen Fraktionen nach der Reinigung am Chromatotron enthielt neben **74** noch einen weiteren Triester. Das Chromatogramm der Trennung mittels RP-HPLC zeigte dann auch das Edukt **77** und noch ein zusätzliches Produkt. Allerdings konnten nach der präparativen RP-HPLC von allen Verbindungen keine nennenswerten Mengen isoliert werden. Dieses konnte nachträglich auf eine zu geringe Löslichkeit der Verbindungen im verwendeten Laufmittel (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v) zurückgeführt werden, sodass der Großteil an Substanz wahrscheinlich bei der vorangegangenen Filtration verloren wurde. Dieser Versuch wies aber sowohl auf eine Nebenreaktion während der Synthese als auch auf eine partielle Zersetzung von **74** sowie des Nebenprodukts während der HPLC-Trennung hin.

In den weiteren durchgeführten Versuchen zur Darstellung von **74** wurde zur Umsatzsteigerung das ZrCl₄ in mindestens äquimolarer Menge eingesetzt und die Reaktionszeit verlängert. Da für die präparative HPLC-Trennung die Zugabe stabilisierender Essigsäure aufgrund der säurelabilen Acylalfunktion nicht erfolgen konnte, wurde die Lösung des Substanzgemischs vorab gekühlt. Außerdem wurde die Trennung zur Umgehung der Löslichkeitsprobleme in einem Fall mit Acetonitril/Wasser 1:1 v/v durchgeführt, im anderen Fall wurde das Substanzgemisch in diesem

Gemisch gelöst und mit Acetonitril/Wasser 2:3 v/v getrennt. Der Triester **74** konnte so mit einer Ausbeute von 10% bzw. 17% isoliert werden. Das Chromatogramm der Trennung in Acetonitril/Wasser 1:1 v/v ist beispielhaft in Abb. 50 gezeigt. Auch hier sind neben **74** noch das Edukt **77** sowie die zwei weiteren Produkte ($t_R = 16.66$ und $22.28/22.84$ min) enthalten. Die isolierten Mengen dieser reichten allerdings für eine Strukturaufklärung nicht aus.

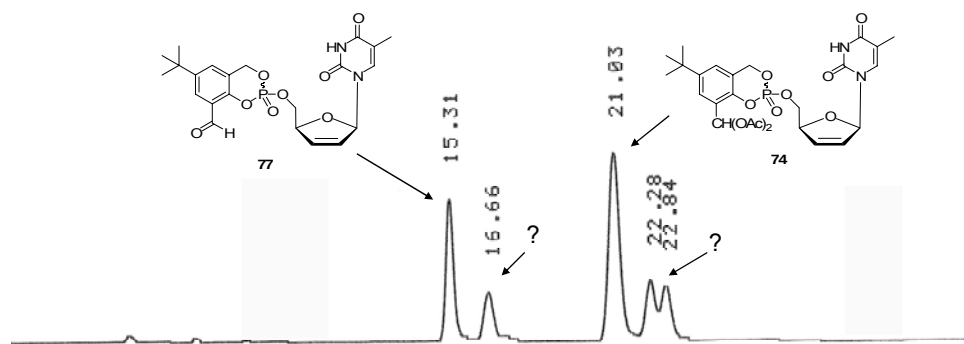


Abb. 50 Chromatogramm der Isolierung von **74** mittels präparativer RP-HPLC ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v)

Die zur Isolierung des 3-di-AM-5-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMPs **74** führenden Synthesen sind in Abb. 51 noch einmal grafisch zusammengefasst.

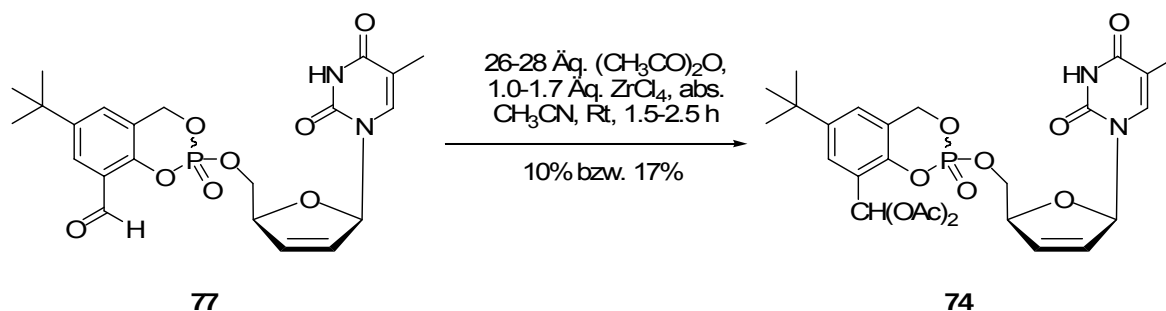


Abb. 51 Synthese des 3-Diacetoxymethyl-5-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMPs **74**

Die Zielverbindungen **73** und **74** sowie **76** und **77** standen somit für Hydrolyseuntersuchungen (Kapitel 4.1.6.) und antivirale Tests (Kapitel 4.1.7.) zur Verfügung. Die in den hier vorgestellten Versuchen nur mäßigen Umsätze und schlechten Ausbeuten sind neben der Labilität der Verbindungen höchstwahrscheinlich größtenteils in der sterischen Hinderung durch die benachbarte Monophosphatgruppe begründet. Die Umwandlung zu den Acylal en in der 5-Position sollte solchen Hinderungen nicht unterliegen und verläuft dementsprechend, wie experimentell bestätigt, in besseren Ausbeuten.

Gewiss sind durch die hier durchgeführten Arbeiten nicht alle Möglichkeiten zur Optimierung der Synthese zu 3-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs ausgeschöpft worden. So könnte beispielsweise noch der Einfluss von unterschiedlichen Reaktionstemperaturen untersucht werden. Auch ist die Ausbeute der Synthese des 3-di-AM-5-methyl-*cycloSal*-d4TMPs **73** (vgl. Abb. 48, S. 53) wahrscheinlich durch die Verwendung von 1.0 oder 1.5 Äquivalenten ZrCl_4 noch zu steigern. Außerdem wäre eine Trennung der Diastereomere von **73** und **76** prinzipiell möglich (vgl. Abb. 49, S. 54). Auf Grund der durchgeführten Hydrolyseuntersuchungen und antiviralen Tests (vgl. die beiden nachfolgenden Kapitel) wurde allerdings der Nutzen einer optimierten Synthese bezweifelt, sodass im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Versuche hierzu unternommen wurden.

4.1.6. Charakterisierung der 3-Diacetoxymethyl- und 3-Formyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

Die 3-di-AM- (**73**, **74**) und 3-Formyl-5-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs (**76**, **77**) wurden mittels der gleichen Studien untersucht, die schon für die in 5-Position Formyl- (**34**, **62**, **63**) bzw. di-AM-substituierten Verbindungen (**33**, **40**, **41**; vgl. Kapitel 4.1.3.) beschrieben wurden. Die ermittelten Halbwertszeiten sind in Diagramm 3 zusammengefasst.

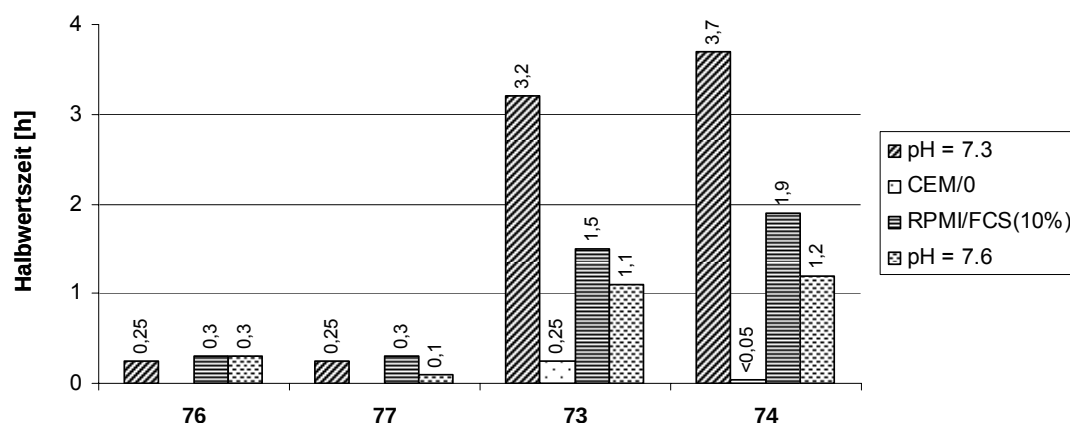


Diagramm 3 Halbwertszeiten der 3-di-AM- (**73**, **74**) und 3-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**76**, **77**) in verschiedenen Medien

Die 3-Formyl-Triester **76** und **77** weisen bei physiologischem pH-Wert die erwartete kurze Halbwertszeit auf ($t_{1/2} = 0.25$ h). Im Vergleich zu den 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) ist die Halbwertszeit dabei allerdings unabhängig vom Alkylsubstituenten in 5-Position. Auch die Halbwertszeiten der beiden 3-di-AM-Verbindungen **73** und **74** unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander. Solch

ein vergleichbarer Effekt von Methyl- und *tert*-Butylgruppe in 5-Position war erwartet worden, da auch die Halbwertszeiten der bereits bekannten, ausschließlich in 5-Position alkylierten *cycloSal*-d4TMPs in einem vergleichbaren Bereich lagen (5-Methyl-*cycloSal*-d4TMP (**101**): $t_{1/2} = 6.2 \text{ h}^{57}$; 5-*tert*-Butyl-*cycloSal*-d4TMP (**102**): $t_{1/2} = 7.2 \text{ h}^{37}$). Die vorrangige Intention der unterschiedlichen Alkylsubstituenten in der 5-Position war auch nicht eine Erhöhung der Halbwertszeit, sondern die Untersuchung der Auswirkung einer veränderten Lipophilie auf die antivirale Aktivität. In RPMI/FCS(10%) verlieren die 3-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs **73** und **74**, wie es bereits für die 5-di-AM-Triester (**33**, **40**, **41**) beobachtet wurde, deutlich an Hydrolysestabilität. So reduziert sich in diesem Medium die Halbwertszeit in beiden Fällen auf ungefähr die Hälfte. Auch für **73** und **74** konnte mittels analytischer HPLC nachgewiesen werden, dass ein Teil der Acylal-Verbindung zur entsprechenden Formyl-Verbindung gespalten wird. Im Phosphatpuffer mit pH-Wert 7.6 wurde diese Spaltung wiederum nicht beobachtet. Die Halbwertszeiten dieser Hydrolysen zeigen allerdings auch, dass der basischere pH-Wert hier ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz zu den 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) hat der erhöhte pH-Wert keinen Einfluss auf die Hydrolysestabilität der 3-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**76**, **77**). Die Halbwertszeiten dieser Verbindungen in RPMI/FCS(10%) und PBS (pH = 7.6) sind mit denen in PBS (pH = 7.3) nahezu identisch.

Allerdings scheint der Alkylsubstituent in 5-Position einen Einfluss auf die enzymatische Spaltung des Acylals in 3-Position zu haben. So konnte für die 5-Methyl-substituierte Verbindung **73** in CEM/0-Zellextrakten eine Halbwertszeit von 0.25 h bestimmt werden. Die Spaltung des 5-*tert*-Butyl-substituierten Acylals **74** zur Verbindung **77** verlief hingegen so schnell, dass keine genaue Halbwertszeit ermittelt werden konnte. Bereits nach fünf Minuten konnte kaum noch intaktes Acylal **74** nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit ist hier deshalb mit $< 0.05 \text{ h}$, also schneller als drei Minuten, angegeben. Die Untersuchungen der 5-di-AM-Triester (**33**, **40**, **41**) hatten genau das Gegenteil gezeigt. Hier führte die *tert*-Butylgruppe in 3-Position zu einer Verdopplung der Halbwertszeit der enzymatischen Spaltung. Somit scheint der sterisch anspruchsvolle *tert*-Butylsubstituent einen merklichen Einfluss auf die Bindung des Moleküls in der „active site“ der Carboxyesterase und somit auf die Geschwindigkeit der Acylalspaltung zu haben – in der 5-Position sorgt er für eine bevorzugte Wechselwirkung mit dem Enzym, in der 3-Position führt er zu einer Verminderung dieser.

4.1.7. Antivirale *in vitro*-Tests der 3-Diacetoxymethyl- und 3-Formyl-cycloSal-d4T-monophosphate

Die 3-Diacetoxymethyl- (**73**, **74**) und die 3-Formyl-5-alkyl-cycloSal-d4TMPs (**76**, **77**) wurden ebenfalls in Kooperation mit Prof. Dr. J. Balzarini hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität untersucht. Die Daten der *in vitro*-Tests gegen HIV-1 und HIV-2 sind in Tab. 6 angegeben.

Für alle vier Verbindungen wurde in CEM/0-Widtyp-Zellen eine zu d4T **2** vergleichbare anti-HIV-Aktivität gefunden. Wie auf Grund des sehr ähnlichen Hydrolyseverhaltens zu erwarten war, besitzen die beiden 3-di-AM-Verbindungen **73** und **74** eine nahezu identische Aktivität gegen HIV-2 in CEM/TK⁻-Zellen. Beide Verbindungen büßen hier allerdings deutlich an Wirksamkeit im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ein, sodass nur von einem schlechten TK-Bypass ausgegangen werden kann. Das 3-Formyl-5-methyl-cycloSal-d4TMP **76** verliert in den Thymidin-Kinase defizienten Zellen seine Wirkung nahezu vollständig. Dieses war wegen der sehr geringen Hydrolyse-Halbwertszeit auch zu erwarten. Beachtlich hingegen ist, dass das 3-Formyl-5-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMP **77** trotz der gleichen Hydrolysestabilität wie **76** eine signifikant bessere Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen zeigt, die sogar mit der Aktivität der 3-di-AM-Verbindungen **73** und **74** vergleichbar ist.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]		CC ₅₀ ^b [μM]	
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
3-Formyl-5-Me 76	3.6 ± 2.2	1.4 ± 0.78	29 ± 18	29 ± 4.9
3-Formyl-5- <i>t</i> Bu 77	0.99 ± 0.30	1.0 ± 0.54	5.1 ± 1.9	8.8 ± 1.3
3-di-AM-5-Me 73	0.52 ± 0.41	1.0 ± 0.37	6.5 ± 3.1	19 ± 3.5
3-di-AM-5- <i>t</i> Bu 74	0.72 ± 0.0071	1.0 ± 0.57	7.3 ± 4.6	7.9 ± 1.9
d4T 2	0.86 ± 0.057	1.9 ± 1.8	62 ± 0.48	182 ± 16

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

Tab. 6 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der 3-di-AM- (**73**, **74**) und der 3-Formyl-5-alkyl-cycloSal-d4TMPs (**76**, **77**) sowie der Referenzverbindung **2**

Die bessere Aktivität von **77** im Vergleich zu **76** in CEM/TK⁻-Zellen könnte ein Indiz dafür sein, dass eine erhöhte Lipophilie zu einer deutlich besseren Wirksamkeit bei vergleichbarer Hydrolysestabilität führen kann. Die Werte für **73** und **74** zeigen allerdings, dass eine höhere Lipophilie nicht zwingend zu einer besseren Aktivität

führt. Auch für die 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **40**, **41**) war bereits beobachtet worden, dass die Erhöhung der Lipophilie durch den *tert*-Butylsubstituenten in 3-Position, trotz einer dadurch bedingten höheren Hydrolysestabilität, zu einer Verschlechterung der antiviralen Aktivität führt (vgl. Tab. 3, S. 41). Zu erwarten wäre, dass eine höhere Lipophilie – zumindest in einem gewissen Rahmen – bedingt durch eine bessere Membranpenetration zu einer besseren Aktivität führt.

Allgemein ist der teilweise Erhalt der Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen für die sehr labilen Verbindungen **34** und **77** ($t_{1/2}$ (RPMI/FCS(10%)) = 0.3 h) sehr erstaunlich. Für 5-Nitro-*cycloSal*-d4TMP **17** mit einer vergleichbaren Halbwertszeit in RPMI/FCS(10%) von 0.12 h war ein vollständiger Verlust der anti-HIV-Wirksamkeit beobachtet worden (EC_{50} = 40 μ M). Möglicherweise begünstigt die Formylgruppe durch ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen den passiven Transport durch die Zellmembran, sodass die Zellaufnahme deutlich beschleunigt ist. Diese Eigenschaft scheint durch die induktiven Effekte von Alkylgruppen positionsbedingt beeinflusst zu werden. Bei den 3-Formyl-Triestern **76** und **77** führt der stärkere induktive Effekt der *tert*-Butylgruppe im Vergleich zur Methylgruppe zu einer deutlich besseren Aktivität. Betrachtet man die 5-Formyl-Triester (**34**, **40**, **41**), so ist der Effekt genau gegenläufig. Möglicherweise resultiert die schlechtere Wirksamkeit von **41** im Vergleich zu **34** und **40** also aus einer elektronischen Beeinflussung der Formylfunktion durch den +I-Effekt der *tert*-Butylgruppe, sodass die Zellaufnahme verschlechtert ist.

Im Sinne des Konzepts der enzymatischen Aktivierung ist nur das 3-di-AM-5-methyl-*cycloSal*-d4TMP **73** geeignet, da nur hier die freigesetzte 3-Formyl-Verbindung (**76**) einen intrazellulären Einschluss gewährleistet. Auf Grund der sehr hohen Toxizitäten und der damit verbundenen sehr schlechten Selektivitätsindices wäre eine *in vivo*-Anwendung der 3-di-AM-Verbindungen **73** (SI = 3) und **74** (SI = 1) allerdings ohnehin ausgeschlossen.

Da sich die Diacetoxymethylgruppe sowohl in 3- als auch in 5-Position der *cycloSal*-Maske als instabil in RPMI/FCS(10%) erwies, wurde im Folgenden versucht, die Acylalfunktion durch Verwendung verzweigter Alkylreste gegenüber der Spaltung in diesem Medium zu stabilisieren. Solch eine Verzweigung war bereits bei den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs (**26-28**; vgl. Kapitel 2.3.3.) erfolgreich durchgeführt

worden.⁵³ Die unternommenen Versuche sind im nächsten Kapitel (4.1.8.) beschrieben.

4.1.8. Synthese, Charakterisierung und antivirale *in vitro*-Tests von Diacyloxymethyl-*cycloSal*-d4T-monophosphaten mit sterisch anspruchsvollen Acylalfunktionen

Auf Grund der deutlich besseren Ausbeuten der Acylal-Bildungsreaktionen in der 5-Position im Vergleich zur 3-Position sollten zunächst 5-Acyloxymethyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs mit sterisch anspruchsvolleren Acylalfunktionen als die Diacetoxymethylfunktion synthetisiert werden. Deshalb wurden die 5-Formyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs **40** und **41** mit Isobuttersäureanhydrid **67** in Acetonitril in Anwesenheit von ZrCl_4 umgesetzt, um so das 5-Diisobutyroxy-3-methyl- (**103**) bzw. das 5-Diisobutyroxy-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP (**104**) darzustellen. Die prinzipielle Verwendung von ZrCl_4 in Verbindung mit **67** zur Darstellung von Diisobutyroxymethyl-Verbindungen war im Zuge von Testsynthesen bereits geprüft worden (vgl. S. 29-30). Es stellte sich heraus, dass wie bei der Synthese von **74** die äquimolare Verwendung von ZrCl_4 für einen guten Umsatz notwendig war. Eine vollständige Umsetzung des Edukts konnte allerdings in beiden Fällen nicht erreicht werden. Die Zielverbindungen wurden mit einer Ausbeute von 30% (**103**) bzw. 25% (**104**) synthetisiert (Abb. 52).

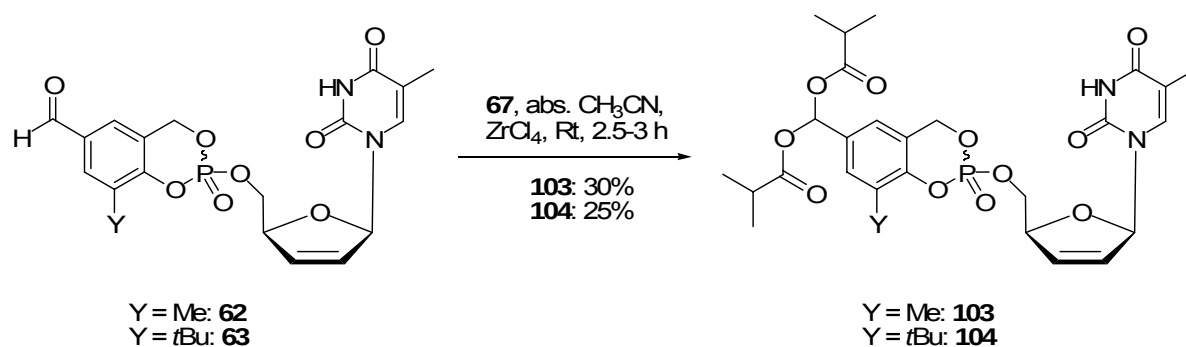


Abb. 52 Synthese der 5-Diisobutyroxymethyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs **103** und **104**

Die Abtrennung der Produkte vom jeweiligen Edukt konnte dabei in beiden Fällen erst mittels präparativer RP-HPLC erreicht werden. Für Verbindung **104** konnten im Zuge dieser Reinigung auch die Diastereomere getrennt werden. Wie bereits für die getrennten Diastereomere von **41** (vgl. Abb. 33, S. 39), wurde über die Untersuchungen in CEM/0-Zell-extrakten dem schneller eluierenden Diastereomer

104-fast die (S_P)-Konfiguration zugeordnet; **104-slow** entspricht folglich (R_P)-**104**. Die Halbwertszeiten der mit **103**, **104-mix**, (S_P)-**104** und (R_P)-**104** durchgeführten Hydrolysestudien sind in Diagramm 4 zusammengefasst. Darin sind zum Vergleich die Werte der Diastereomergemische der 5-di-AM-Triester **40** und **41** mit aufgenommen.

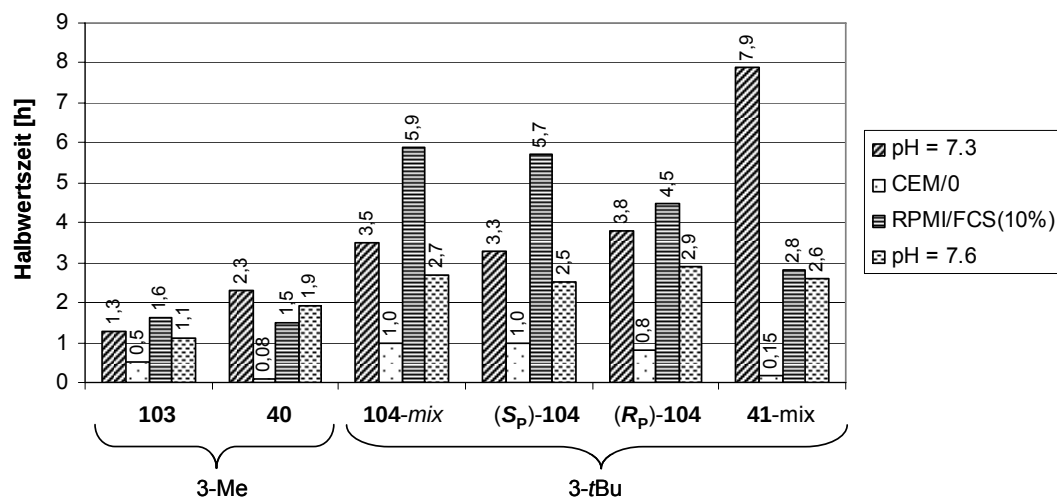


Diagramm 4 Halbwertszeiten der 5-di-iBOM-cycloSal-d4TMPs (**103**, **104**) in verschiedenen Medien im Vergleich zu den 5-di-AM-Verbindungen (**40**, **41**)

Die Hydrolysestudien von **103** und **104** im Phosphatpuffer (pH = 7.3) lieferten überraschende Ergebnisse. Hier wurde eine Halbierung der Halbwertszeit im Vergleich zu der jeweiligen 5-di-AM-Verbindung **40** bzw. **41** festgestellt. Folglich wäre die di-iBOM-Funktion eine deutlich stärkere Akzeptorgruppe als die di-AM-Funktion. Dies lässt sich anhand der elektronischen Eigenschaften aber nicht erklären. Der im Vergleich zu den Methylgruppen des di-AM-Acylals stärkere positive induktive Effekt der Isopropylgruppen des di-iBOM-Acylals sollte die positiven Partialladungen an den Carbonyl-Kohlenstoffatomen besser stabilisieren und so zu einem geringeren Gesamtelektronenzug führen. Dies hätte dann eine Halbwertszeiterhöhung zur Folge haben müssen. Erstaunlich ist auch, dass die Hydrolyse-Halbwertszeiten für die 3-*tert*-Butyl-substituierten Acylale **104** und **41** im Phosphatpuffer (pH = 7.6) dann nahezu identisch sind. Diese Werte würden bedeuten, dass die unterschiedlichen Acylalfunktionen in Abhängigkeit vom pH-Wert eine gleiche (pH = 7.6) bzw. eine sehr unterschiedliche (pH = 7.3) Akzeptorstärke besitzen. Diese Beobachtungen konnten für die 3-Methyl-substituierten Acylale **103** und **40** nicht bestätigt werden. Hier wurde auch bei pH = 7.6 eine annähernd doppelt so hohe Hydrolysestabilität des di-AM-Triesters **40** im Vergleich zum di-iBOM-Triester **103** gemessen.

Ein denkbarer Grund für die Unterschiede in den Hydrolysestabilitäten der 5-di-AM- und 5-di-iBOM-cycloSal-d4TMPs ist auch ein Einfluss der deutlich sperrigeren Diisobutyroxymethylgruppe auf die gesamte Molekülkonformation. So ist möglicherweise in den di-iBOM-Verbindungen **103** und **104** der Angriff der Hydroxid-Ionen auf das Phosphoratom konformativ bevorzugt, sodass die Hydrolyse schneller verläuft. Aber auch diese Bevorzugung wäre im Hinblick auf die ermittelten Halbwertszeiten pH-Wert abhängig, da sie im Fall der 3-*tert*-Butyl-Verbindungen **104** und **41** bei pH = 7.6 aufgehoben wird, im Fall der 3-Methyl-Verbindungen **103** und **40** aber nicht. Auf Grund dieser nicht eindeutigen Werte kann also keine definitive Aussage über die Gründe der unerwarteten Reduktion der Hydrolysestabilität der di-iBOM-cycloSal-d4TMPs **103** und **104** gemacht werden. Eine konformative Bevorzugung könnte nur anhand von Röntgenkristallstrukturen eindeutig belegt werden. Versuche, die getrennten Diastereomere von **41** und **104** zu kristallisieren, führten allerdings nicht zum Erfolg.

Für beide di-iBOM-cycloSal-d4TMPs (**103**, **104**) konnte in CEM/0-Zellextrakten eine Spaltung in die jeweilige Formyl-Verbindung (**62**, **63**) nachgewiesen werden. Wie erwartet, verliefen diese Spaltungen deutlich langsamer als die der 5-di-AM-Verbindungen **40** ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 0.08 h) und **41** ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 0.15 h; vgl. Diagramm 1, S. 37). So hat **103** im Zellextrakt eine Halbwertszeit von 0.5 h, **104** sogar von 1.0 h. Auch hier führt also die *tert*-Butylgruppe in 3-Position zu einer Verdoppelung der Stabilität gegenüber der enzymatischen Spaltung, wodurch die bereits oben (vgl. S. 57) postulierte, vom Maße der sterischen Hinderung abhängige Beeinflussung der Wechselwirkungen der Diacyloxymethyl-Triester mit der Carboxy-esterase noch mal verdeutlicht wird. Im Hinblick auf das Konzept der enzymatischen Aktivierung ist diese erhöhte Stabilität gegenüber der enzymatischen Spaltung bei gleichzeitig deutlichem Verlust an Stabilität gegenüber der chemischen Hydrolyse allerdings sehr nachteilig. So ist sowohl für **103** als auch für **104** die enzymatische Spaltung nur noch um den Faktor 3 schneller als die chemische Hydrolyse.

Eine weitere Problematik wird bei dem Blick auf die in RPMI/FCS(10%) bestimmten Hydrolyse-Halbwertszeiten deutlich. Diese weisen nicht die im Phosphatpuffer (pH = 7.6) gefundene Halbwertszeit-Erniedrigung auf, die Halbwertszeiten sind vielmehr gegenüber denen bei pH = 7.3 deutlich erhöht. Dies ist eindeutig auf eine

ungenügende Wasserlöslichkeit der sehr lipophilen di-iBOM-Verbindungen **103** und **104** zurückzuführen. So musste für die Hydrolyse im Phosphatpuffer bereits ein Großteil des verwendeten Wassers durch DMSO ersetzt werden, um diese vollständig zu lösen. Im RPMI/FCS(10%) hingegen wurde kein zusätzliches DMSO verwendet, um die Vergleichbarkeit mit den antiviralen *in vitro*-Tests zu gewährleisten. Somit liegt hier zunächst nur ein Teil des untersuchten Triesters in Lösung vor und nur dieser wird hydrolysiert. Im Verlauf der Hydrolyse löst sich dann der Rest der Probe nach, wodurch die Gesamthydrolyse insgesamt verzögert ist. Die Untersuchungen von **103** und **104** lieferten auf Grund dieser Löslichkeitsprobleme auch ungenauere Werte als die Untersuchungen der di-AM-Verbindungen. Dies ist dadurch bedingt, dass beim Entnehmen der Proben nicht immer ein vergleichbarer Anteil des noch ungelösten Triesters mit aufgenommen wird. Durch den Abbruch der Reaktion mit Methanol geht dieser aber in Lösung und wird somit auch mit detektiert. So ist auch zu erklären, dass die Untersuchung von **104-mix** einen höheren Wert ($t_{1/2} = 5.9$ h) liefert als die Untersuchungen der beiden reinen Diastereomere (**S_P**)-**104** ($t_{1/2} = 5.7$ h) und (**R_P**)-**104** ($t_{1/2} = 4.5$ h). Gewöhnlich hydrolysiert das eine Diastereomer schneller, das andere langsamer als das Diastereomergemisch. Noch zu bemerken ist, dass auch für die 5-di-iBOM-Triester **103** und **104** eine anteilige Spaltung in die jeweilige Formyl-Verbindung (**62** bzw. **63**) beobachtet wurde, wobei dieser Anteil allerdings deutlich geringer als noch bei den 5-di-AM-Verbindungen **40** und **41** war.

Die Analyse der getrennten Diastereomere (**S_P**)-**104** und (**R_P**)-**104** ergab keine signifikanten Unterschiede in den Hydrolysestabilitäten. Einzig zu bemerken ist, dass – wie es schon für die reinen 5-di-AM-3-*t*Bu-cycloSald4TMPs (**S_P**)-**63** ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 0.15 h) und (**R_P**)-**63** ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 0.30 h) beobachtet wurde – das (**S_P**)-konfigurierte Diastereomer etwas schneller gespalten wird als das (**R_P**)-konfigurierte. Die Werte für (**S_P**)-**104** ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 0.8 h) und (**R_P**)-**104** ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 1.0 h) zeigen, dass es sich hierbei anscheinend nicht um einen sich potenzierenden Faktor handelt. Darüber, ob der Unterschied von in beiden Fällen ca. 0.2 h dabei Zufall ist oder das (**S_P**)-Diastereomer tatsächlich stets um diesen Unterschied schneller gespalten wird, kann an dieser Stelle mangels weiterer Vergleichsverbindungen keine Aussage getroffen werden.

Die in Kooperation mit Prof. Dr. J. Balzarini ermittelten antiviralen Daten der 5-Diisobutyroxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs **103**, **104-mix**, (**S_P**)-**104** und (**R_P**)-**104** sind in Tab. 7 vergleichend zu den Daten der 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs **40**, **41-mix**, (**S_P**)-**41** und (**R_P**)-**41** aufgeführt.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]		CC ₅₀ ^b [μM]	
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
5-di-iBOM-3-Me 103	1.60 ± 0.57	0.95 ± 0.49	≥10	19.6 ± 0.78
5-di-AM-3-Me 40	0.50 ± 0.17	0.70 ± 0.14	6.3 ± 2.9	43.9 ± 26.4
5-di-iBOM-3- <i>t</i> Bu 104-mix	0.53 ± 0.45	2.0 ± 2.3	2.4 ± 2.3	20 ± 3.5
5-di-iBOM-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 104	0.72 ± 0.68	0.85 ± 0.64	1.4 ± 0.91	14 ± 1.4
5-di-iBOM-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 104	0.89 ± 0.16	1.9 ± 2.1	3.6 ± 0.42	40 ± 1.4
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu 41-mix	0.65 ± 0.35	0.80 ± 0.13	0.78 ± 0.0	19 ± 0.0
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 41	0.54 ± 0.51	0.75 ± 0.49	0.29 ± 0.16	17 ± 2.1
5-di-AM-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 41	1.1 ± 1.3	0.84 ± 0.085	3.9 ± 2.7	51 ± 21
d4T 2	0.86 ± 0.057	1.9 ± 1.8	62 ± 0.48	182 ± 16

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

Tab. 7 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der 5-di-iBOM-*cycloSal*-d4TMPs **103** und **104** (*mix*, (**S_P**), (**R_P**)) im Vergleich zu den 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMPs **40** und **41** (*mix*, (**S_P**), (**R_P**)) sowie d4T **2**

Das 5-di-iBOM-3-Me-*cycloSal*-d4TMP **103** verliert dabei seine antivirale Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen, wie es bereits ansatzweise für den 5-di-AM-3-Me-Triester **40** gefunden wurde. Die 5-di-iBOM-3-*t*Bu-Verbindung **104** hingegen behält ihre Aktivität gegen HIV-2 in diesen Zellen in vollem Umfang. Trotz der teilweise hohen Standardabweichungen lässt sich der Trend erkennen, dass die 5-di-iBOM-Triester **103** und **104** im absoluten Vergleich mit den 5-di-AM-Triestern **40** und **41** in CEM/TK⁻-Zellen schlechter gegen HIV-2 wirksam sind. Die Gründe hierfür können einerseits die geringere Hydrolysestabilität sowie eine zu langsame intrazelluläre enzymatische Spaltung – und damit verbunden, Verluste durch wieder aus der Zelle transportierte Moleküle – sein. Andererseits wird auf Grund der begrenzten Löslichkeit von **103** und **104** in RPMI/FCS(10%) nur ein Teil der verwendeten Substanz für die erzielte Wirkung verantwortlich sein. Die in den Tests ermittelte effektive Konzentration wird also aller Wahrscheinlichkeit nach von der tatsächlichen effektiven Konzentration abweichen. Nichtsdestoweniger ist auch für die Verbindung **104** zu erkennen, dass

das schneller eluierende (**S_P**)-**104** eine bessere Aktivität als das (**R_P**)-**104** aufweist (weiterführende Diskussion in Kapitel 4.3.).

Im Hinblick auf die noch immer nicht vollständig unterbundene Spaltung des Acylals im RPMI/FCS(10%) wäre der nächste logische Schritt die Verwendung eines noch weiter verzweigten Acylals. In Analogie zu den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **26-28** (vgl. Abb. 11, S. 15) wäre dies die 5-Dipivaloxymethylfunktion (in Abb. 57 beispielhaft an der möglichen Verbindung 5-Dipivaloxymethyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **105** gezeigt). In den Untersuchungen dieser Verbindungen hatte sich gezeigt, dass das POM-Acylal langsamer als das AM-Acylal, aber deutlich schneller als das POC-Acylal, gespalten wird ($t_{1/2}$ (CEM/0) = 0.25 h (5-AM-prop, **26**), 0.38 h (5-POM-prop, **28**), 0.89 h (5-POC-prop, **27**)), was an dieser Stelle von Vorteil wäre.

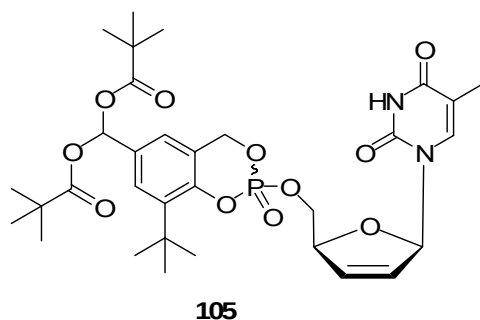


Abb. 53 Struktur des möglichen 5-Dipivaloxymethyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **105**

Allerdings würde die Verbindung **105** aller Voraussicht nach eine noch geringere Halbwertszeit in der chemischen Hydrolyse aufweisen als **104** und noch schlechter wasserlöslich sein.

Abschließend bleibt noch einmal zu bemerken, dass die Sinnhaftigkeit der Untersuchung weiterer Acylalfunktionen im Hinblick auf die antivirale Aktivität bezweifelt werden kann, solange von den bestehenden Systemen das *in vivo*-Verhalten gänzlich unbekannt ist. Eine Optimierung auf das bestehende *in vitro*-Testsystem würde in keiner Weise ein vergleichbares Ergebnis unter realen Bedingungen vorhersagen lassen. Jedoch wäre die Synthese weiterer vergleichbarer Verbindungen für die Untersuchung der elektronischen Eigenschaften geminaler Dicarboxylate von Interesse. So könnten hierüber möglicherweise weitere Kenntnisse über die Gründe der Abnahme in der Hydrolysestabilität der 5-Diisobutyroxymethyl-

cycloSal-d4TMPs **103** und **104** im Vergleich zu den 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs **40** und **41** gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu allerdings keine weiteren Versuche unternommen. Vielmehr wurde eine zweite Art potenziell enzymatisch aktivierbarer *cycloSal*-Verbindungen – die 1-Acetoxyvinyl-*cycloSal*-d4TMPs – synthetisiert und untersucht. Die Ergebnisse hierzu werden im folgenden Abschnitt 4.2. ausführlich beschrieben.

4.2. 1-Acetoxyvinyl-*cyclo*Sal-d4T-monophosphate

4.2.1. Synthese von 1-Acetoxyvinyl- und Acetyl-*cyclo*Sal-d4T-monophosphaten

Neben den in Abschnitt 4.1. vorgestellten geminalen Dicarboxylaten sollten Enolester auf ihre Eignung als enzymatisch aktivierbare *cyclo*Sal-Produgs getestet werden. Die Enolesterfunktion sollte im Vergleich zur Acylalfunktion (bei gleichen Carboxylresten) weniger lipophil sein. Dies stellt potenziell einen Vorteil dar, da so auch die gleichzeitige Verwendung eines stark verzweigten Alkylsubstituenten in der 3-Position des Aromaten und in der Enolesterfunktion möglich sein sollte, ohne dass es zu Löslichkeitsproblemen in wässrigen Medien kommt, wie es für die 5-di-iBOM-*cyclo*Sal-d4TMPs **103** und **104** beobachtet wurde (vgl. S. 61-63). Für grundlegende Studien wurde hier als Enolesterfunktionalität die 1-Acetoxyvinylgruppe gewählt. Um die Eigenschaften dieser Gruppe auf die Hydrolyse der *cyclo*Sal-NMPs im Vergleich zu den Acylal-Verbindungen aus Kapitel 4.1. einordnen zu können, sollten zunächst *cyclo*Sal-d4TMPs mit der 1-Acetoxyvinylfunktion in 5-Position und denjenigen Substituenten in 3-Position (H, Me, *t*Bu) synthetisiert werden, die auch für die Acylale verwendet worden waren. Von diesen 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Sal-d4TMPs **106-108** wurde erwartet, dass sie durch enzymatische Spaltung in die entsprechenden 5-Acetyl-*cyclo*Sal-d4TMPs **109-111** umgewandelt werden. Diese sollten dann, wie schon die 5-Formyl-*cyclo*Sal-d4TMPs **34**, **62** und **63** (vgl. Diagramm 1, S. 36), relativ schnell chemisch zu d4TMP und den entsprechenden 4-Acetylsalicylalkoholen **112-114** hydrolysiert werden. Diese Salicylalkohole sowie die Strukturen der Zielverbindungen **106-111** sind in der postulierten Hydrolysekaskade in Abb. 54 gezeigt.

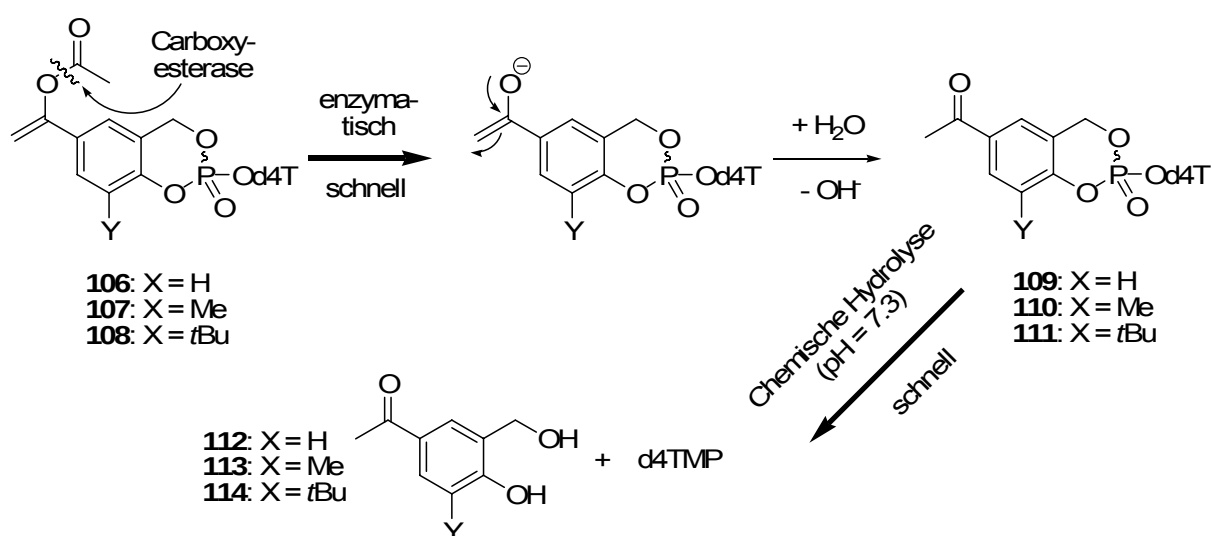


Abb. 54 Postulierter Hydrolysemechanismus der 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Sal-d4TMPs **106-108**

Die Darstellung der Zielverbindungen **106-108** war über zwei potenzielle Synthesestrategien denkbar. In der Synthesestrategie I (Abb. 55) werden dabei zunächst die 4-Acetylsalicylalkohole **112-114** benötigt, die dann über die entsprechenden Saligenylchlorphosphite **115-117** in die 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** umgewandelt werden. Auf dieser Stufe erfolgt dann die Umwandlung der Acetylfunktion in den Enolester, sodass die 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** entstehen.

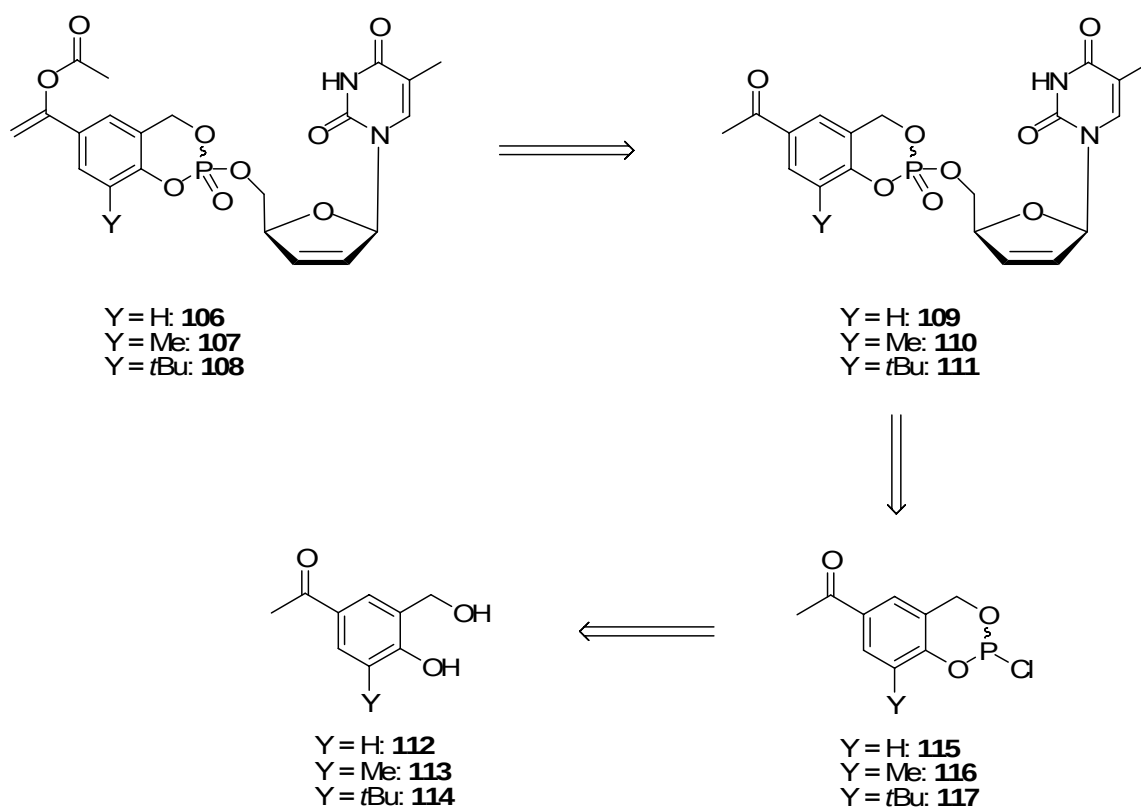


Abb. 55 Retrosyntheseschema zur Darstellung von **106-108** über die Synthesestrategie I

Die Synthesestrategie II (Abb. 56, S. 69) geht von geschützten 4-Acetylsalicylalkoholen aus, die aus den Verbindungen **112-114** darstellbar sein sollten. Auf Grund der Vielfalt an potenziell verwendbaren Schutzgruppen (SG) für die Alkoholfunktionen sollen jene an dieser Stelle noch nicht näher spezifiziert werden. Zunächst erfolgt dann die Einführung der Enolesterfunktion und durch anschließende Entschützung werden die 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **118-120** dargestellt. Aus diesen werden dann über die Chlorphosphite **121-123** die 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** direkt synthetisiert.

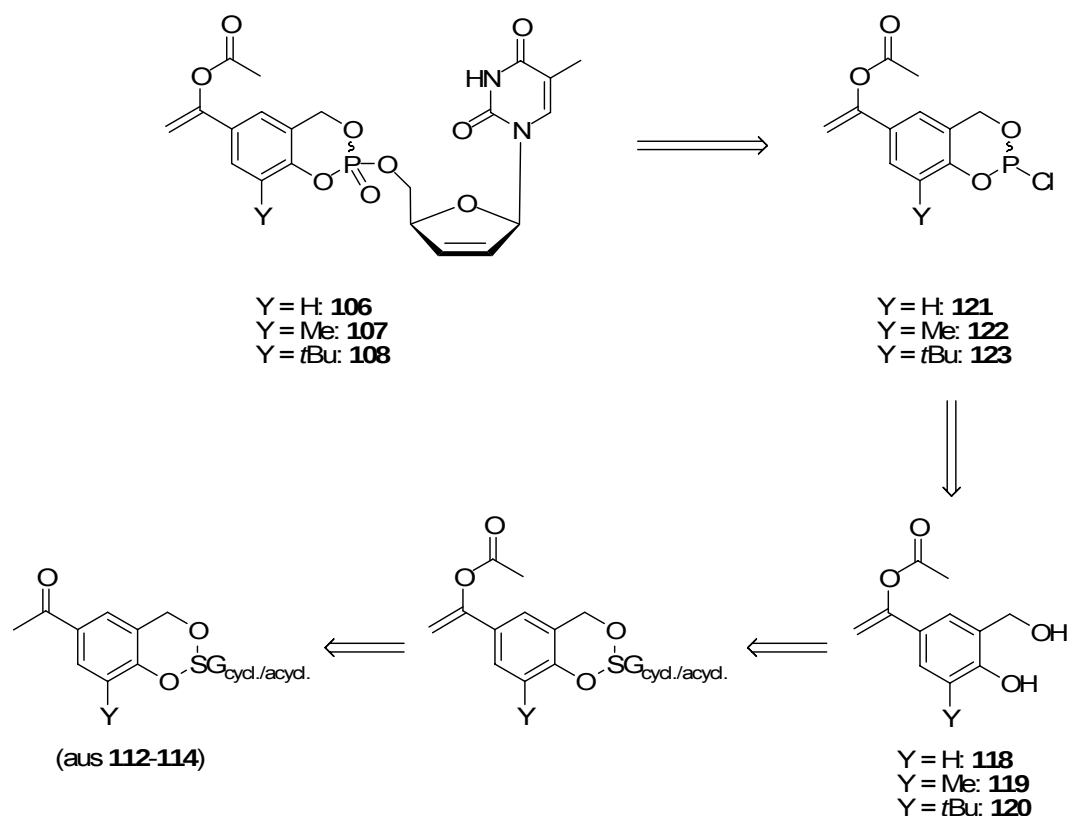


Abb. 56 Retrosyntheseschema zur Darstellung von **111-113** über die Synthesestrategie II

Der eindeutige Vorteil der Synthesestrategie I ist, dass sowohl die Zielverbindungen **106-108** als auch die benötigten Referenzverbindungen **109-111** während der Syntheseroute erhalten werden. Diese Strategie würde also ausgehend von **112-114** in einer deutlich geringeren Anzahl an Reaktionen zu den gewünschten Produkten **106-111** führen (je drei Reaktionen (Synthesestrategie I) vs. je sieben Reaktionen (Synthesestrategie II)). Die Synthesestrategie I ist mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Darstellung der Diacyloxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs vergleichbar (vgl. Kapitel 4.1.1.), sodass von der Möglichkeit einer analogen Synthese der 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** ausgegangen wurde. Die Hauptschwierigkeit dieser Route stellt also das Finden geeigneter Reaktionsbedingungen für die Einführung der Enolesterfunktion auf der Triester-Stufe dar. Im Hinblick auf die Verwendung weiterer Nucleoside oder Nucleosid-Analoga (außer d4T **2**) müssten auch Bedingungen gefunden werden, die deren funktionelle Gruppen unberührt lassen.

Dieses wiederum ist der Vorteil der Synthesestrategie II, da die Synthese einer Vielzahl von *cycloSal*-NMPs mit verschiedenen Nucleosidanaloga über die entsprechenden Chlorphosphite bereits bekannt ist (vgl. S. 12). So sollte eine breite Anwendung auch für die Enolester möglich sein, vorausgesetzt, die Darstellung der

4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **118-120** gelingt. Die hiermit vergleichbare Synthese des 4-Diacetoxymethylsalicylalkohols **124** war in eigenen Vorarbeiten⁵⁵ nicht gelungen, da sich das Acylal bei der Entschützung als instabil erwies. Dies konnte auf eine Umesterung zurückgeführt werden, die zu dem an der phenolischen Hydroxygruppe acetylierten 4-Formylsalicylalkohol **125** führte. In Abb. 57 ist beispielhaft der Versuch der Entschützung des zweifach TBDPS-geschützten 4-Diacetoxymethylsalicylalkohols **126** gezeigt.

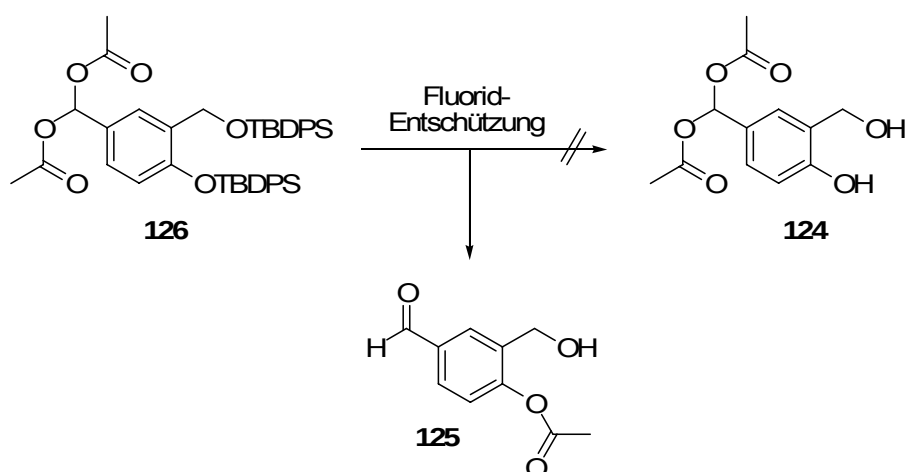


Abb. 57 Problem der Umesterung bei der Synthese des 4-Diacetoxymethylsalicylalkohols **124**

Somit stellte sich die Frage, ob die Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **118-120** einer ähnlichen Problematik unterliegt. Allerdings war zumindest die Existenz eines 1-Acetoxyvinylphenols aus der Literatur bekannt (Verbindung **127** in Abb. 58).⁷¹

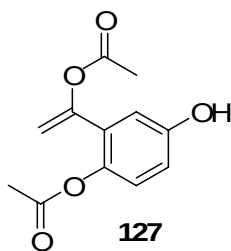


Abb. 58 Literaturbekanntes 1-Acetoxyvinylphenol **127**

Die in der Literatur vorherrschende Methode zur Synthese von 1-Acetoxyvinyl-Verbindungen aus den entsprechenden Ketonen ist die durch *para*-Toluolsulfonsäure katalysierte Umsetzung mit Isopropenylacetat. So ist beispielsweise die Umsetzung von Acetophenon **128** mit 32 Äquivalenten Isopropenylacetat sowie 0.1 Äqui-

valenten *para*-Toluolsulfonsäure bei 110 °C für 12 Stunden beschrieben, die in einer Ausbeute von 78% zum 1-Phenylvinylacetat **129** führt (Abb. 59).⁷²

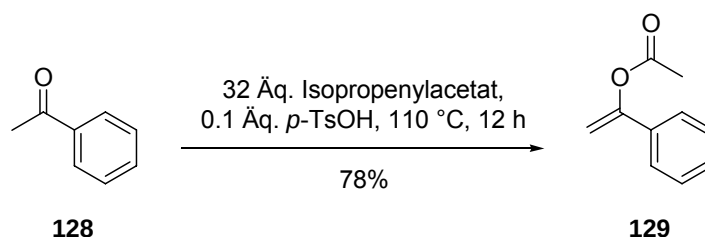


Abb. 59 Literaturbekannte Synthese von 1-Phenylvinylacetat **129** aus Acetophenon **128**

Es wurde zunächst versucht diese Synthese zu reproduzieren. Der eigene Versuch unter den in Abb. 59 gezeigten Bedingungen (abweichend: 15 h Reaktionszeit) führte allerdings nur mit 8% Ausbeute zu **129**. Auch die Erhöhung der Äquivalente an *para*-Toluolsulfonsäure auf 0.2 erhöhte die Ausbeute nur auf 12%. Erst eine Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Tage führte mit einer der Literatur entsprechenden Ausbeute (86%) zum Produkt **129**. Ein Versuch, diese Reaktion auch bei mildereren Temperaturen durchzuführen (1 Tag Raumtemperatur, 4 Tage 40 °C), ergab keine Umsetzung des Edukts **128**. Die durchgeführten Vorversuche sind in Tab. 8 zusammengefasst, wobei nur die Parameter aufgeführt sind, die im Laufe der Synthesen verändert wurden.

<i>p</i> -TsOH	Reaktionstemperatur	Reaktionsdauer	Ausbeute an 129
0.1	110 °C	15 h	8%
0.2	110 °C	15 h	12%
0.2	110 °C	3 d	86%
0.1	Rt, dann 40 °C	5 d	-

Tab. 8 Durchgeführte Vorversuche zur Darstellung von **129**

Somit stand also eine nachvollziehbare Methode für die Enolester-Synthese zur Verfügung, sodass sich der Darstellung der für beide der oben gezeigten Synthesestrategien (vgl. Abb. 55 (S. 68) und Abb. 56 (S. 69)) zunächst benötigten 4-Acetylsalicylalkohole **112-114** zugewandt wurde.

Für die Synthese des 4-Acetylsalicylalkohols **112** beschreiben *Goswami et al.* eine direkte Synthese ausgehend von 4-Hydroxyacetophenon **130**. Diese führt durch Umsetzung von **130** mit *para*-Formaldehyd in Wasser und konz. Salzsäure mit 37%

Ausbeute zu **112**. Zusätzlich entstehen allerdings noch weitere Produkte, hauptsächlich das 4-Acetylsalicylalkoholmethylenacetal **131** (zu 46%). Dieses kann aber laut Literatur mit einer Ausbeute von 80% zu **112** entschützt werden, sodass **112** letztendlich in einer Gesamtausbeute von 66% hergestellt wird (Abb. 60).⁷³

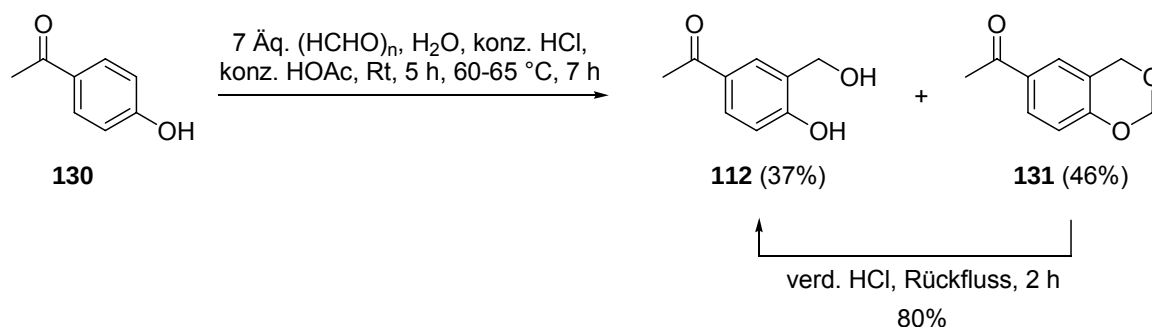


Abb. 60 Literaturbekannte Synthese von **112** aus **130**

Diese Synthese wurde versucht zu reproduzieren, wobei die Reaktion allerdings für 15 Stunden bei 60-65 °C gerührt wurde. Die Reaktion lieferte aber ein deutlich anderes Ergebnis, als in der Literatur (Abb. 60) beschrieben. So konnten zwar die Produkte **112** und **131** isoliert werden, allerdings nur in 3% bzw. 11% Ausbeute. Als ein weiteres Produkt der Reaktion wurde der 7-O-Acetyl-4-acetylsalicylalkohol **132** mit einer Ausbeute von 10% isoliert (Abb. 61). Diese Verbindung ist in der Literatur nicht als Nebenprodukt erwähnt.

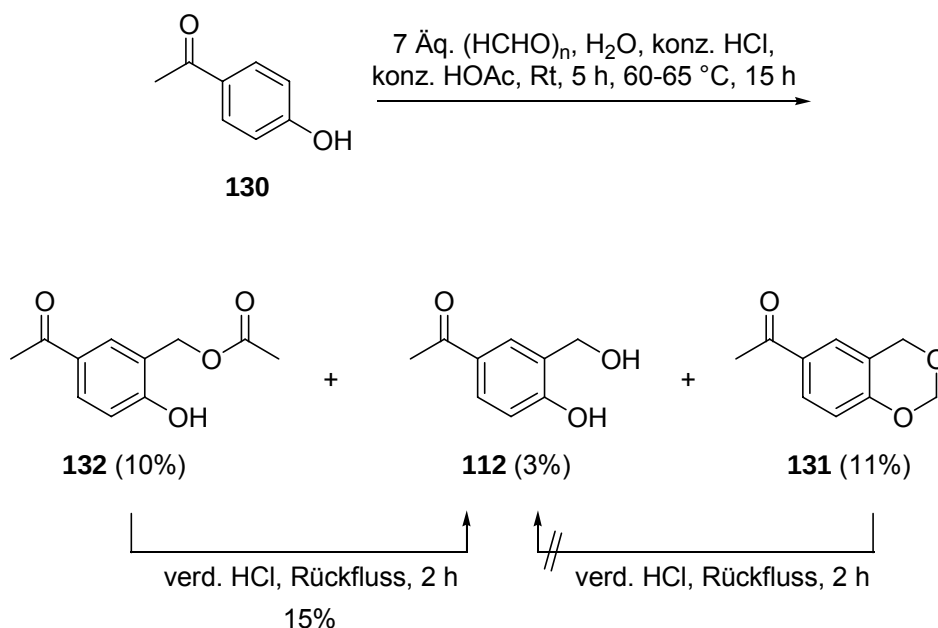


Abb. 61 Nach den Bedingungen von Goswami et al.⁷³ durchgeführte Synthese von **112** aus **130**

Nicht nur **112** sondern auch die potenziell in **112** umwandelbaren Nebenprodukte **131** und **132** entstanden also nur in geringen Ausbeuten. Da die Entschützungen dieser Verbindungen zu **112** gar nicht (**131**) oder nur mit einer Ausbeute von 15% (**132**) gelangen (Abb. 61, S. 72), wurde sich einer anderen Synthesemethodik für den 4-Acetylsalicylalkohol **112** zugewandt (Abb. 62).

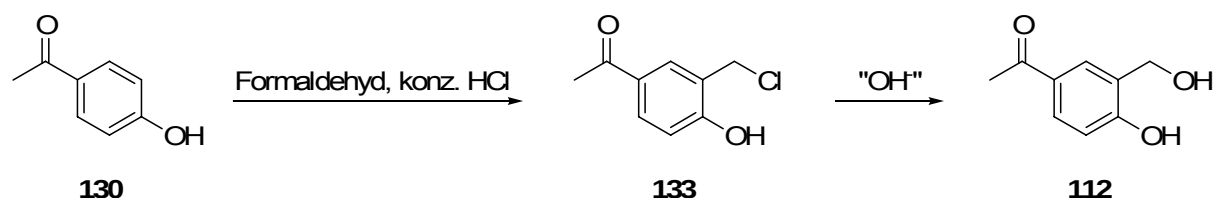


Abb. 62 Zweistufiges Synthesekonzept für die Darstellung von **112** aus **130**

Dixon et al. berichten über eine Chlormethylierung von **130** zum 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133** und einer anschließenden Substitutionsreaktion zu **112** in einer Ausbeute von 49% über die beiden Stufen. Dabei wird **130** in konz. Salzsäure mit einer Formaldehyd-Lösung (37%) für 3.5 Stunden bei 65 °C umgesetzt. Die Substitution erfolgt mit Calciumcarbonat (CaCO₃) in wässrigem THF bei Raumtemperatur über 13 Stunden.⁷⁴ Die Chlormethylierung wurde in vergleichbarer Art und Weise (4 h, 50 °C) auch von *Yanagi et al.* beschrieben.⁷⁵ Dabei fiel **133** als roter Feststoff aus, der zwar noch verunreinigt war, aber in Folgereaktionen ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte. *Yanagi et al.* verwendeten das ungereinigte **133** zur Darstellung der 4-Acetylsalicylsäure, wobei zunächst das Chlorid-Ion durch eine Cyanidgruppe ausgetauscht wurde. Somit wurde davon ausgegangen, dass auch eine Substitution mit Hydroxid-Ionen als Nucleophile prinzipiell ohne vorherige Reinigung möglich sein sollte.

Die Chlormethylierung von **130** zu **133** wurde hier nach dem Protokoll von *Yanagi et al.* durchgeführt. Für die anschließende nucleophile Substitution wurden zum einen die von *Dixon et al.* beschriebenen Reagenzien erprobt, wobei 1.5 Äquivalente CaCO₃ verwendet wurden. Dies führte mit einer Ausbeute von 28% über die zwei Stufen zum Salicylalkohol **112**. Zum anderen beschreiben *Rastogi et al.*⁷⁶ die Umwandlung von **133** in **112** durch dreistündiges Refluxieren in Wasser. Dieses wurde ebenfalls getestet, führte aber auch nach einem Tag Reaktionszeit nur in 12% Ausbeute zu **112**. In Anbetracht dieser mäßigen Ausbeuten wurden weitere, teilweise literaturbekannte Verfahren zur Umwandlung eines Benzylchlorids in einen

Benzylalkohol ausprobiert. Diese brachten allerdings allesamt keinen Umsatz des 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **133**. Alle durchgeführten Versuche hierzu sind in der Tab. 9 zusammengefasst.

Reagenzien	Zeit	Temperatur	Ausbeute (über 2 Stufen)
H ₂ O	1 d	Rückfluss	12%
CaCO ₃ (1.5 Äq.), wäss. THF	13 h	Raumtemp.	28%
1 M NaOH (3 Äq.)	2 d	Rückfluss	–*
Na ₂ CO ₃ (1.5 Äq.), H ₂ O ⁷⁷	4 d	Rückfluss	–*
Na ₂ CO ₃ (10 Äq.), Dioxan, H ₂ O ⁷⁸	8 h	Rückfluss	–*
kein Umsatz von 133 zu detektieren			

Tab. 9 Durchgeführte Versuche zur Synthese von **112** aus **133** durch nucleophile Substitution

Da somit keine effizienteren Bedingungen als die Verwendung von CaCO₃ in wässrigem THF gefunden werden konnten, wurden diese für einen Ansatz im großen Maßstab (Umsetzung von 12.5 g ungereinigter Verbindung **133**) verwendet. Über diesen konnte **112** zwar nur in 16% Ausbeute synthetisiert werden, allerdings fielen während der Reinigung 5.6 g eines leicht rosafarbenen Feststoffs aus, der als das reine 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133** identifiziert werden konnte. Somit stand erstmalig die reine Verbindung **133** zur Verfügung, wodurch die Reaktionsverfolgung mittels Dünnschichtchromatografie stark vereinfacht wurde.

So zeigte sich in einem ersten Ansatz mit reinem **133**, dass nach einem Tag unter den gewählten Bedingungen nur ein Teil von **133** zu **112** umgesetzt wurde. Erfreulicherweise entstanden dabei keine weiteren Produkte. Der Reaktionslösung wurde deshalb eine frei gewählte Menge an zusätzlichem Wasser (ca. 80 Äquivalente) hinzugefügt, da vermutet wurde, dass nicht genügend Hydroxid-Ionen zum vollständigen Ablauf der Reaktion vorlagen. Tatsächlich konnte nach einem weiteren Tag dünnschichtchromatografisch kein Edukt mehr nachgewiesen werden. In einem weiteren Ansatz, dem von Beginn an Wasser hinzugegeben wurde, konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen die Reaktion nach einem Tag vollständig verläuft. Beide Ansätze wurden anschließend vereint und säulenchromatografisch gereinigt, sodass der 4-Acetylsalicylalkohol **112** letztlich mit einer Ausbeute von 88% isoliert werden konnte. Unter Verwendung dieser optimierten Bedingungen für die nucleophile Substitution wurde die zweistufige

Synthese von **112** aus **130** erneut durchgeführt. Diese führte ohne Reinigung des Zwischenprodukts **133** mit einer Ausbeute von 62% zum Salicylalkohol **112** (Abb. 63).

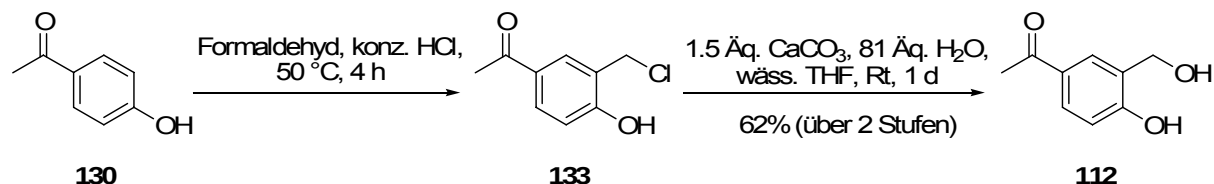


Abb. 63 Optimierte Synthese von **112** aus **130**

Dieser optimierte Syntheseweg sollte dann auch für die Darstellung der in der 3-Position alkylierten 4-Acetylsalicylalkohole **113** und **114** verwendet werden. 4-Hydroxy-3-methylacetophenon **134** war kommerziell zu erwerben, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyacetophenon **135** musste zunächst aus 2-*tert*-Butylphenol **53** hergestellt werden. Dies gelang durch Anwendung einer von *Shimomura et al.* im Rahmen eines Patenten veröffentlichten Friedel-Crafts-Acylierung in einer Ausbeute von 53% (Literatur: 76%).⁷⁹ Die Darstellung von **113** aus **134** über **136** verlief dabei analog zu der für **112** beschriebenen Synthese. Mit 59% über zwei Stufen konnte auch eine vergleichbare Ausbeute erzielt werden. In einer Reaktion mit deutlich größerem Maßstab (ausgehend von 9 g **134** vs. 1 g) konnte **113** mit einer Ausbeute von 45% isoliert werden (Abb. 64).

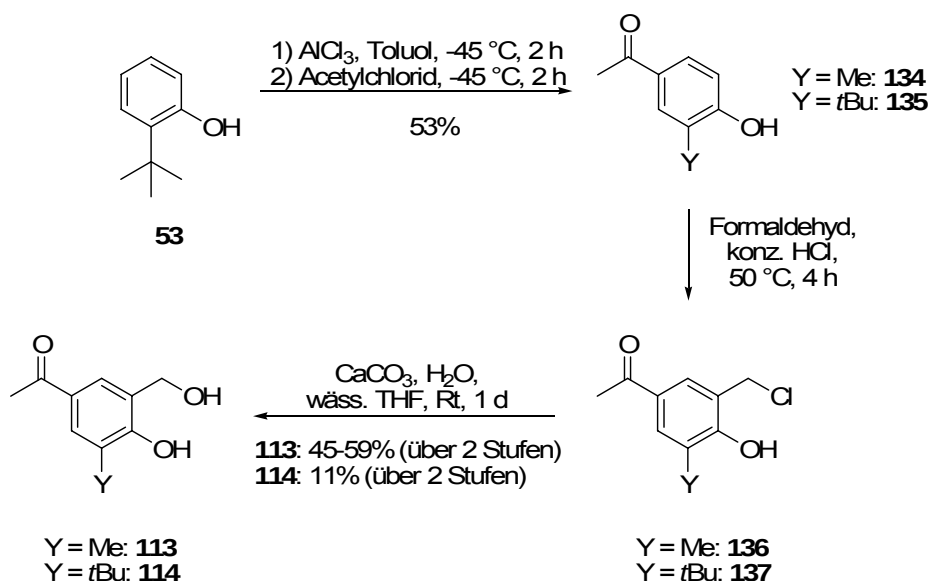


Abb. 64 Synthese der 4-Acetyl-6-alkylsalicylalkohole **113** und **114**

Der 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114** konnte hingegen unter diesen Bedingungen aus **135** über **137** nur mit einer Ausbeute von 11% hergestellt werden. Allerdings konnten 45% des anfänglich eingesetzten Edukts **135** isoliert werden, sodass ein schlechter Umsatz im ersten Schritt deutlich wurde (Abb. 64, S. 75). Dieser schlechte Umsatz konnte auf eine nur unzureichende Löslichkeit von **135** in der konz. Salzsäure zurückgeführt werden. Deshalb wurde sowohl die Menge an verwendeter Salzsäure verdoppelt als auch die Reaktionstemperatur auf 100 °C erhöht. Dadurch konnte nach 2.5 h dünnschichtchromatografisch ein vollständiger Umsatz des Edukts **135** nachgewiesen werden, wobei allerdings mehrere Produkte entstanden. Die anschließende Umsetzung des ungereinigten 5-*tert*-Butyl-3-chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **137** wurde in Vermutung einer auch hier verlangsamten Umsetzung ebenfalls bei einer leicht höheren Temperatur (50 °C) durchgeführt. So konnte die Reaktion nach sechs Stunden beendet werden und der Salicylalkohol **114** mit 29% Ausbeute über die zwei Stufen isoliert werden. Als hauptsächliches Nebenprodukt dieser Reaktionen wurde das als Methylenacetal geschützte Derivat **138** identifiziert. Dies konnte allerdings im Großteil nur in Mischfraktionen mit anderen Nebenprodukten isoliert werden, sodass eine exakte Ausbeute nicht angegeben werden kann.

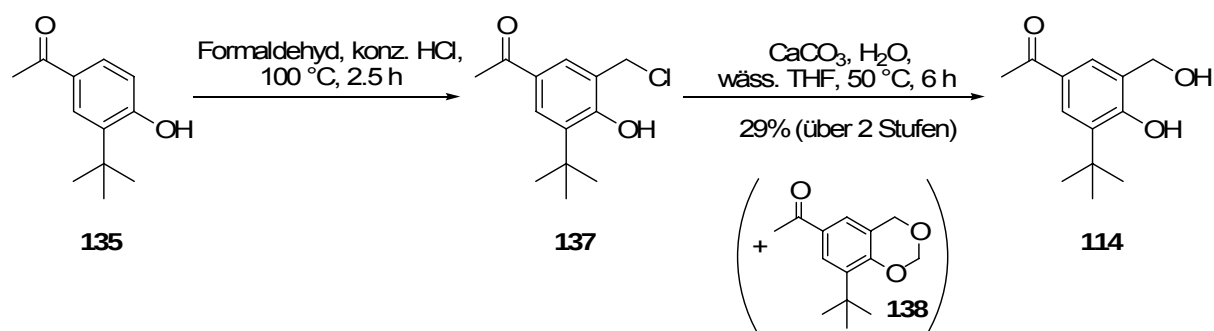


Abb. 65 Synthese von **114** aus **135** unter veränderten Reaktionsbedingungen

Das Nebenprodukt **138** entsteht schon im ersten Reaktionsschritt durch die Reaktion des Zwischenprodukts **137** mit einem weiteren Formaldehyd-Molekül. In der Dünnschichtchromatografie konnte keine weitere Reaktion des Produkts **138** während des zweiten Schrittes beobachtet werden. Die erhöhte Temperatur (100 °C) während der Chlormethylierung scheint also die Bildung von Methylenacetalen zu begünstigen, da die Bildung solcher Acetale in den Synthesen von **112** und **113** (bei 50 °C) nicht beobachtet wurde. Im Versuch der direkten Synthese des 4-Acetyl-

salicylalkohols **112** aus **130** (Abb. 61, S. 72) unter Verwendung ähnlicher Reagenzien hingegen (bei 60-65 °C) war der entsprechende als Methylenacetal geschützte Salicylalkohol **131** in größerer Menge isoliert worden.

Die drei 4-Acetylsalicylalkohole **112-114** konnten anschließend alle nach dem Standardverfahren zunächst in die Saligenylchlorphosphite **115-117** und dann in die 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** umgewandelt werden (Abb. 66).

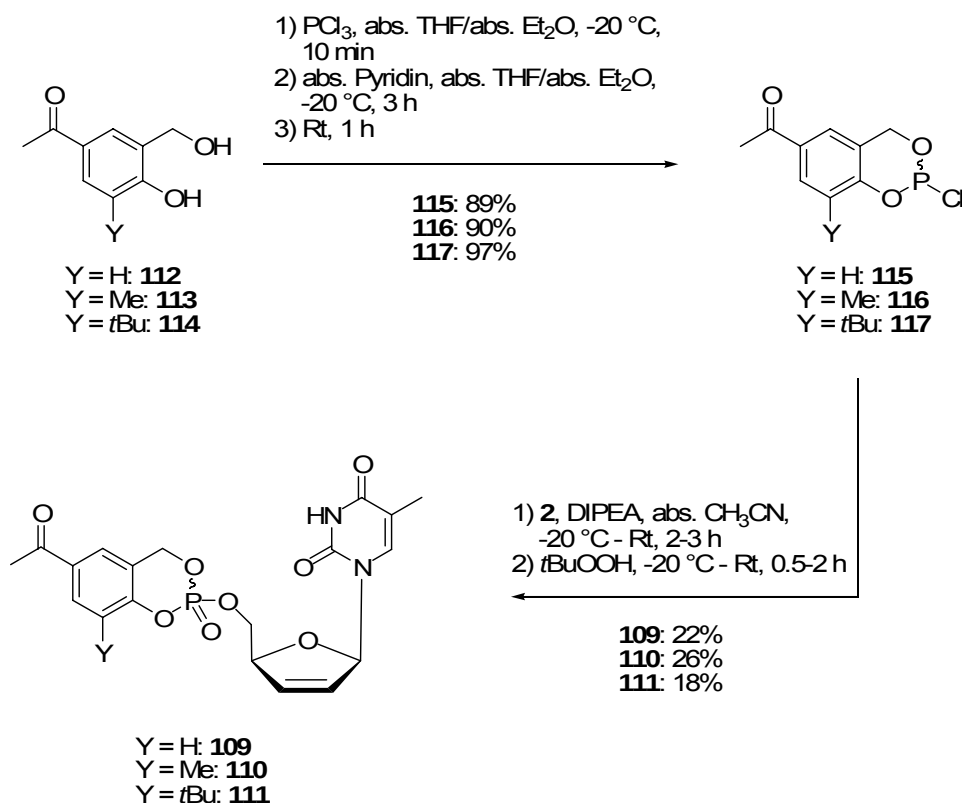


Abb. 66 Synthese der 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **114-116**

Für die Synthesen der Chlorphosphite **115** und **116** wurde dabei aus Gründen der Löslichkeit ein Lösungsmittelgemisch aus abs. Diethylether und abs. THF (3:1 v/v) verwendet, die Synthese von **117** konnte in reinem abs. Diethylether durchgeführt werden. Alle drei Saligenylchlorphosphite **115-117** wurden dabei in reiner Form (Reinheit laut ^1H -NMR $> 95\%$) erhalten. Durch Kupplung mit d4T **2** und anschließender Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid wurden dann die 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** synthetisiert. Hierbei gab es leichte Abweichungen in der Dauer der Kupplungsreaktion wie auch der Oxidation. Die erzielten Ausbeuten lagen mit 18-26% dabei alle in einem vergleichbaren Rahmen. Im Vergleich zur Darstellung der 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs **33**, **40** und **41** (31-51%; vgl. Abb. 19, S. 23 bzw. Abb. 23, S. 28) waren die hier durchgeführten Synthesen weniger effizient.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurden deshalb zwei weitere Oxidationsmittel im Vergleich zu *tert*-Butylhydroperoxid ausprobiert, die in unserer Arbeitsgruppe in einigen Fällen bereits zu deutlich besseren Ergebnissen geführt hatten.⁶² Zum einen wurde dafür Oxone[®] ($2 \text{ KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$)⁸⁰ verwendet, zum anderen ein Pyridin/Iod-Gemisch. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde zunächst das 4-Acetylsaligenylchlophosphit **115** synthetisiert und anschließend auf drei Reaktionen zum Triester **109** gleichmäßig verteilt. Alle drei Reaktionen wurden parallel durchgeführt, um Unterschiede in der Reagenzien- und Lösungsmittelqualität minimieren zu können. Für alle drei Reaktionen erfolgte die Oxidation nach 1.5 Stunden Reaktionszeit, da dünnschichtchromatografisch ein vollständiger Umsatz von d4T **2** nachgewiesen werden konnte. Die Oxidationen sowie die Aufarbeitung wurden dann nach individuellen Protokollen durchgeführt (vgl. S. 220-222). Durch Säulenfiltration und eine abschließende Reinigung am Chromatotron wurde in allen Fällen 5-Acetyl-*cyclo*Sal-d4TMP **109** isoliert.

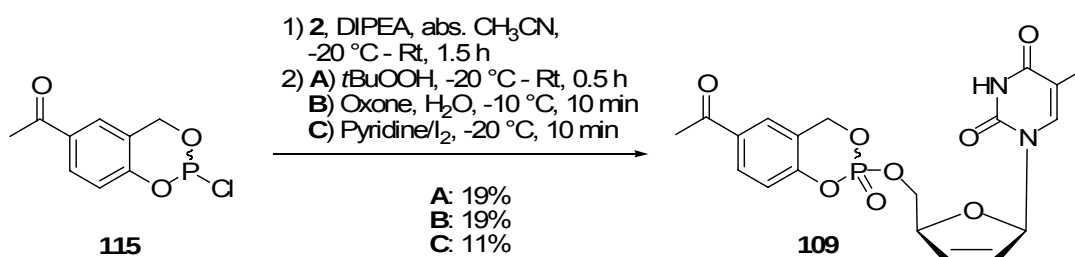


Abb. 67 Effizienzvergleich dreier Oxidationsmittel in der Synthese von **109** aus **115**

Der Ansatz unter Verwendung von *tert*-Butylhydroperoxid gelang mit 19% in einer zu der vorher erfolgten Darstellung (22%; vgl. Abb. 66, S. 77) vergleichbaren Ausbeute. Die Verwendung von Oxone[®] führte mit der identischen Ausbeute (19%) zu **109**. Durch den Einsatz des Pyridin/Iod-Gemischs wurde **109** nur mit 11% Ausbeute hergestellt, wobei die NMR-Spektren in diesem Fall auch noch leichte Verunreinigungen aufwiesen. Eine Verbesserung der Ausbeute konnte also auch durch die Verwendung anderer Oxidationsmittel nicht erreicht werden. Außerdem sollte noch erwähnt werden, dass die mit sehr guten Ausbeuten (teilweise > 90%) verlaufenden *cyclo*Sal-Triester-Synthesen (v. a. für Verbindung **17**⁶²), die unter Verwendung von Oxone[®] erreicht wurden, allesamt nicht chromatografisch gereinigt sind. Diese Ansätze werden ausschließlich durch Extraktion und anschließende Gefriertrocknung gereinigt. Auf diese Weise wurden dort ^1H - und ^{31}P -NMR-reine Produkte erhalten, die dann zur weiteren synthetischen Anwendung des *cyclo*Sal-

Konzepts (vgl. Kapitel 2.3.7.) genutzt werden. Von den Produkten der in Abb. 67 (S. 78) vorgestellten Synthesen wurden deshalb nach jedem Reinigungsschritt ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen. Hier zeigte sich deutlich, dass in diesem Fall erst durch Reinigung am Chromatotron **109** in NMR-reiner Form isoliert werden konnte. Für die in dieser Arbeit dargestellten *cycloSal*-d4TMPs ist eine chromatografische Reinigung ohnehin unabdingbar, um neben der Isolierung des reinen Produkts auch eine vollständige Abtrennung eventuell enthaltener Salze vor den *in vitro*-Tests zu gewährleisten.

Im Folgenden werden nun die Synthesen der 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** beschrieben, wobei sich der Fokus auf die Syntheseroute II (Abb. 56, S. 69) richtet. Diese geht von geschützten 4-Acetylsalicylalkoholen aus. Die Notwendigkeit einer solchen Schützung war durch die Umsetzung des 4-Acetylsalicylalkohols **112** unter den in Abb. 59 (S. 71) gezeigten, literaturbekannten⁷² Bedingungen der Enolester-Bildung überprüft worden. Diese Reaktion lieferte ein nicht trennbares Gemisch aus dem diacetylierten 4-Acetylsalicylalkohol **139** und dem diacetylierten 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol **140**, das zusammen einer Ausbeute von ca. 31% entspricht (Abb. 68).

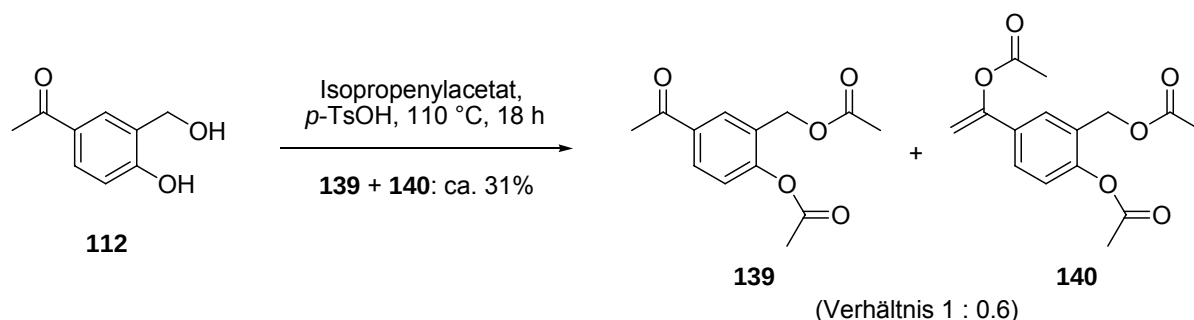


Abb. 68 Notwendigkeit der Schützung der Hydroxygruppen der Salicylalkohole vor der Enolester-Bildung

Da Enolester säurelabile Gruppen sind, wurde dementsprechend nach einer geeigneten basenlabilen Schutzgruppe zur Schützung der beiden Hydroxyfunktionen der 4-Acetylsalicylalkohole **112-114** gesucht. Eine solche Gruppe stellt die *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe (TBDPS-Schutzgruppe) dar. Ein Verfahren zur bis-Silyl-Schützung (sowohl TBDPS- als auch TBDMS-Schützung) von Salicylalkoholen in guten Ausbeuten war dabei bereits in eigenen Vorarbeiten entwickelt worden.⁵⁵ Dabei werden die entsprechenden Salicylalkohole mit vier Äquivalenten des

jeweiligen Silylchlorids und sieben Äquivalenten Imidazol bei Raumtemperatur in abs. Pyridin umgesetzt. Durch die so durchgeführten Schützungen konnte der bis-TBDPS-geschützte 4-Acetylsalicylalkohol **141** in einer Ausbeute von 90%, der bis-TBDPS-geschützte 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **142** nur noch mit 33% Ausbeute in reiner Form isoliert werden. Zusätzlich war noch ein Teil an **142** in Mischfraktionen mit dem hydrolysierten Schutzgruppenreagenz enthalten (Abb. 69).

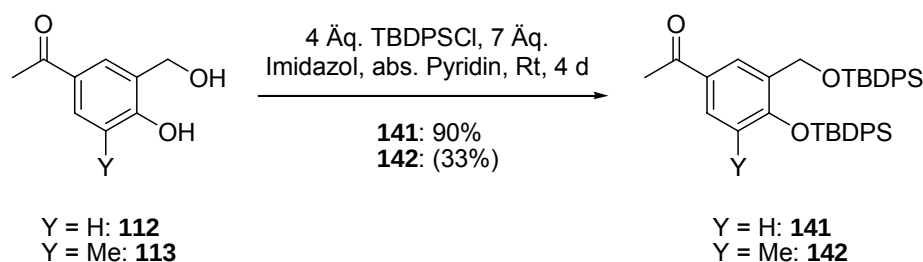


Abb. 69 Synthese der bis-TBDPS-geschützten 4-Acetylsalicylalkohole **141** und **142**

Die Umsetzung des 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohols **114** führte unter diesen Bedingungen nicht zum gewünschten bis-geschützten Produkt **143a** sondern nur zu dem an der benzylicischen Hydroxyfunktion mono-geschützten Produkt **144a** (Abb. 70). Somit wird die bis-Silyl-Schätzung also durch Alkylgruppen in 6-Position sterisch gehindert, was auch die schlechtere Ausbeute an **142** im Vergleich zu **141** erklärt.

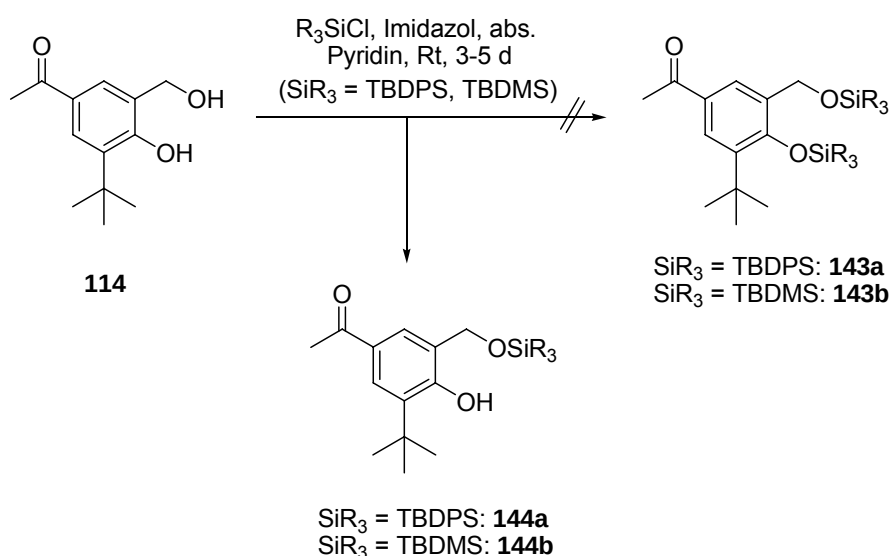


Abb. 70 Versuch der bis-Silyl-Schätzung des 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohols **114**

Der Versuch der bis-Silyl-Schätzung von **114** unter Verwendung der sterisch weniger anspruchsvollen TBDMS-Schutzgruppe führte ebenfalls nur zu dem analogen mono-

geschützten Produkt **144b**. Sowohl **144a** als auch **144b** konnten nur zu einem geringen Anteil in reiner Form isoliert werden. Der Großteil lag als Mischfraktionen mit dem hydrolysierten jeweiligen Schutzgruppenreagenz vor, sodass die Angabe einer genauen Ausbeute nicht möglich ist (Abb. 70, S. 80).

Um zu überprüfen, ob auch im Fall eines 6-*tert*-Butyl-substituierten Salicylalkohols die Schützung der phenolischen Hydroxyfunktion vor der Enolester-Bildung notwendig ist, wurde die mono-TBDPS-geschützte Verbindung **144a** unter den Bedingungen der Enolester-Bildung umgesetzt. Diese Reaktion führte nicht zum 7-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **145**, sondern lieferte mit den Verbindungen **146** und **147** die vergleichbaren Produkte zu der bereits durchgeführten Umsetzung des ungeschützten 4-Acetylsalicylalkohols **112** (vgl. Abb. 68, S. 79). Diese konnten zum Teil (leicht) verunreinigt, zum Teil in Mischfraktionen isoliert werden, sodass hier keine absolute Ausbeute angegeben wird (Abb. 71).

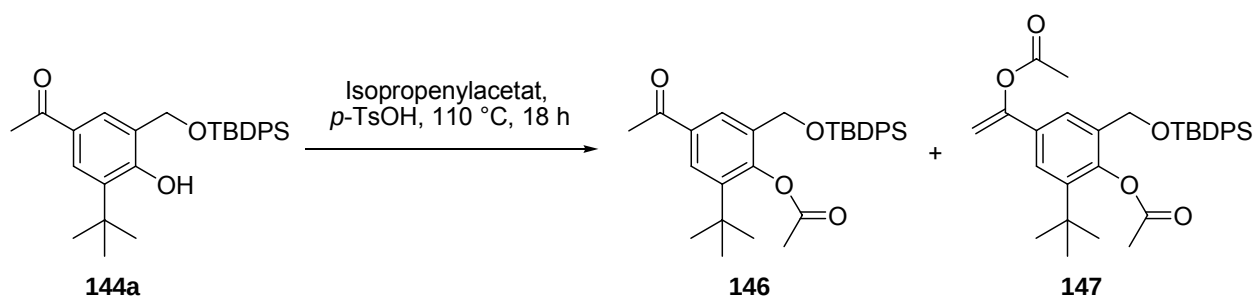


Abb. 71 Umsetzung von **144a** unter den Bedingungen der Enolester-Bildung

Da somit also die Notwendigkeit der Schützung beider Hydroxyfunktionen auch bei 6-*tert*-Butylsalicylalkoholen belegt war, wurde versucht, eine cyclische Silyl-Schutzgruppe zu verwenden. Es wurde vermutet, dass zum einen durch die räumliche Nähe und zum anderen durch die thermodynamische Triebkraft einer Ringbildung die Verwendung einer cyclischen Schutzgruppe von Vorteil sein könnte. Als potenziell verwendbare, ebenfalls basisch abspaltbare, cyclische Silyl-Schutzgruppen kamen die 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxanylidene-Schutzgruppe (TIPDS) sowie die di-*tert*-Butylsilyl-Schutzgruppe in Frage. Beide Schutzgruppen wurden zunächst an der Modellverbindung 6-*tert*-Butylsalicylalkohol **148**, die in unserem Arbeitskreis in ausreichender Menge zur Verfügung stand, auf ihre mögliche Verwendung hin getestet.

Wada *et al.*⁸¹ berichten von einer sehr effizienten TIPDS-Schätzung des 4-Hydroxymethylsalicylalkohols (94% Ausbeute) unter den von W. T. Markiewicz⁸² für die Synthese von 3',5'-geschützten Nucleosiden beschriebenen Bedingungen. Dazu wurde **148** in abs. THF (20 mL pro mmol **148**) gelöst und mit zwei Äquivalenten TIPDSCl₂ sowie acht Äquivalenten Triethylamin bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach einem Tag Reaktionszeit war dünnschichtchromatografisch kein Edukt, anstelle dessen aber drei Hauptprodukte, zu detektieren. Nach Hydrolyse in Eiswasser und Extraktion mit Ethylacetat wurde eine Reinigung am Chromatotron durchgeführt. Hierdurch konnte ein Produkt (**149**) in reiner Form isoliert werden, die anderen beiden (**150**, **151**) nur in Mischfraktionen. Nach einer Vielzahl von Chromatografie-Versuchen konnte letztendlich eine Trennung der beiden Substanzen unter Verwendung einer RP-18 Phase mit Acetonitril als Eluent erzielt werden. Bei **149** handelte es sich um das Produkt, bei dem nur die benzyliche Hydroxyfunktion reagiert hatte, der Ringschluss also noch nicht erfolgt war. Verbindung **150** stellte sich als das gewünschte Produkt heraus, **151** hingegen war ein „Dimer“ des Salicylalkohols **148**, in dem zwei Moleküle **148** über die benzylichen Hydroxygruppen durch die Schutzgruppe miteinander verbunden waren. Auf Grund der zahlreichen Versuche zur Trennung von **150** und **151** kann nicht von einer quantitativen Isolierung der einzelnen Produkte ausgegangen werden. Die in Abb. 72 für **150** und **151** angegebenen Ausbeuten sind deshalb aus dem Produktverhältnis laut des ¹H-NMR-Spektrums der Mischfraktionen berechnet.

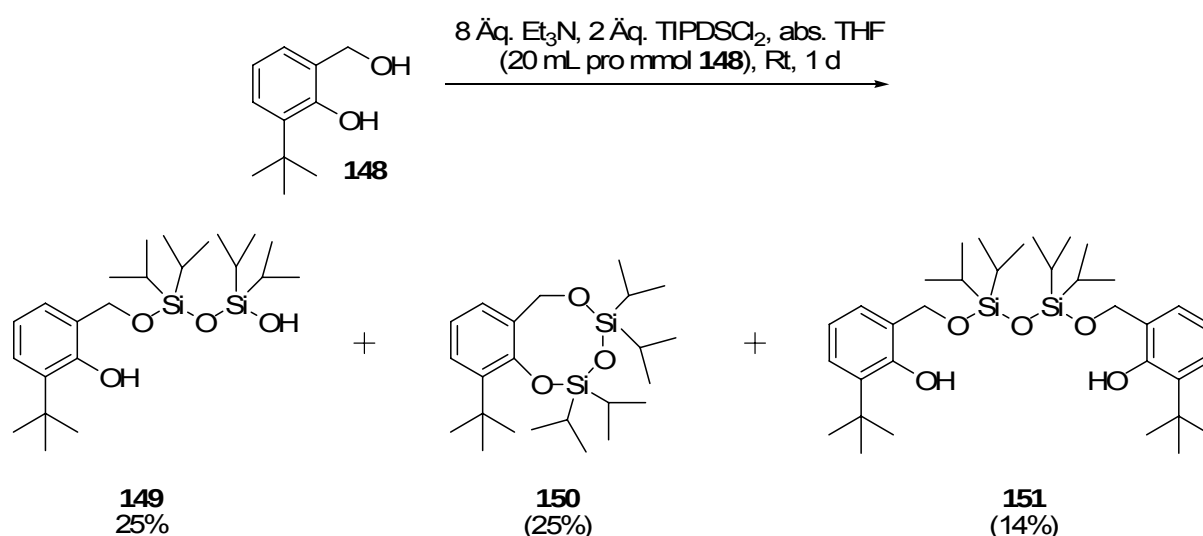


Abb. 72 Synthese des TIPDS-geschützten 6-*tert*-Butylsalicylalkohols **150**

Es zeigte sich somit, dass die TIPDS-Schützung von **148** prinzipiell möglich ist, der Ringschluss aber noch nicht vollständig verlaufen war. Zur zusätzlichen Aktivierung wurde deshalb im nächsten Ansatz eine Spatelspitze 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) hinzugegeben. Außerdem wurde vermutet, dass die „Dimer“-Bildung möglicherweise durch eine niedrigere Konzentration des Edukts in der Reaktionslösung vermindert bzw. gänzlich unterdrückt werden könnte. Somit wurde **148** erneut unter den in Abb. 72 (S. 82) gezeigten Bedingungen umgesetzt, allerdings wurden dabei 40 mL THF pro mmol **148** verwendet. Nach zwei Tagen Reaktion konnte dünnschichtchromatografisch weder das Edukt **148** noch das ausschließlich mit der benzyllischen Hydroxygruppe reagierte Produkt **149** detektiert werden. Nach Aufarbeitung und zweifacher säulenchromatografischer Reinigung wurde so **150** mit einer Ausbeute von 50% isoliert, das „Dimer“ **151** mit einer Ausbeute von 10%. Die Erhöhung der Äquivalente an Schutzgruppenreagenz auf drei führte zu keiner Änderung, es wurden die identischen Ausbeuten erzielt. Die Idee hinter dieser Erhöhung war eine möglichst schnell erfolgende Reaktion aller benzyllischer Hydroxyfunktionen von **148** mit einem Molekül des Schutzgruppenreagenzes, sodass der Anteil an noch nicht umgesetzten **148** reduziert wird, dass für die „Dimer“-Bildung zu **151** zur Verfügung steht. Die in den durchgeführten Versuchen geänderten Parameter sind in Tab. 10 noch einmal zusammengefasst.

mL THF pro mmol 148	Äq. TIPDSCl ₂	Reaktionszeit	Ausbeute an		
			149	150	151
20	2	1 d	25%	25%**	14%**
40*	2	2 d	-	50%	10%
40*	3	2 d	-	50%	10%

*katalytische Verwendung von DMAP; **berechnete Ausbeute

Tab. 10 Durchgeführte Versuche zur Optimierung der Synthese von **150**

Die di-*tert*-Butylsilyl-Schützung von **148** wurde unter Anwendung der von *Kita et al.* beschriebenen Bedingungen durchgeführt.⁸³ Dazu wurde **148** in abs. Dichlormethan mit 1.3 Äquivalenten di-*tert*-Butylsilylditriflat ((*t*Bu)₂Si(OTf)₂) und 4.4 Äquivalenten abs. Pyridin für zwei Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung und anschließender chromatografischer Reinigung konnte der di-*tert*-Butylsilyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **152** mit einer Ausbeute von 86% isoliert werden (Abb. 73, S. 84).

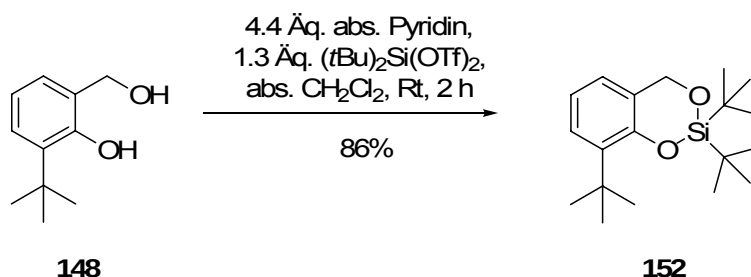


Abb. 73 Synthese des di-*tert*-Butylsilyl-6-*tert*-butylsalicylalkohols **152**

Die Verwendung der di-*tert*-Butylsilyl-Schutzgruppe im Vergleich zur TIPDS-Schutzgruppe führte also in wesentlich besserer Ausbeute bei deutlich geringerer Reaktionszeit sowie einfacherer chromatografischer Reinigung zum gewünschten cyclisch geschützten 6-*tert*-Butylsalicylalkohol. Dies ist vornehmlich darauf zurückzuführen, dass die Sechsring-Bildung energetisch deutlich gegenüber der Achtring-Bildung bevorzugt ist. Somit wurde für weitere Versuche ausschließlich die di-*tert*-Butylsilyl-Schutzgruppe verwendet.

Der di-*tert*-Butylsilyl-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **153** hätte nun direkt aus dem 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114** synthetisiert werden können. In Anbetracht der sehr geringen Gesamtausbeute der Herstellung von **114** (15% über drei Stufen aus **53**; vgl. Abb. 64, S. 75 und Abb. 65, S. 76) wurde allerdings eine andere Syntheseroute eingeschlagen. So wurde vom 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **49** ausgegangen, der bereits zuvor in einer Gesamtausbeute von 54% über drei Stufen aus **53** hergestellt worden war (vgl. Abb. 20, S. 24). Dieser konnte unter den oben beschriebenen Bedingungen mit einer Ausbeute von 90% in den di-*tert*-Butylsilyl-4-brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **154** überführt werden (Abb. 74).

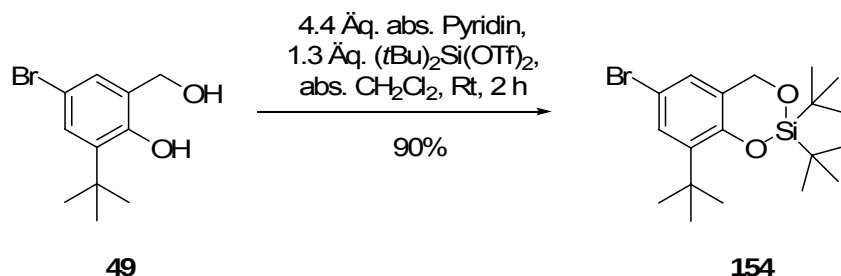


Abb. 74 Synthese des di-*tert*-Butylsilyl-4-brom-6-*tert*-butylsalicylalkohols **154**

An dieser Stelle sollte die Einführung der Acetylfunktion mittels einer der Formylierung der Isopropyliden-geschützten Bromsalicylalkohole (vgl. beispielsweise Abb. 21, S. 25) vergleichbaren Reaktion erfolgen. So wurde **154** nach einer von Long

et al.⁸⁴ beschriebenen Methode zunächst bei -78 °C für zwei Stunden mit 1.2 Äquivalenten einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung umgesetzt, um so einen Brom-Lithium-Austausch zu erreichen. Zu dem so gebildeten Lithio-Aromaten wurden dann 1.5 Äquivalente *N,N*-Dimethylacetamid gegeben, sodass die Temperatur der Reaktionslösung immer unter -50 °C blieb. Nach einer Reaktionszeit von 45 Minuten erfolgten die entsprechende Aufarbeitung und eine abschließende chromatografische Reinigung (Abb. 75).

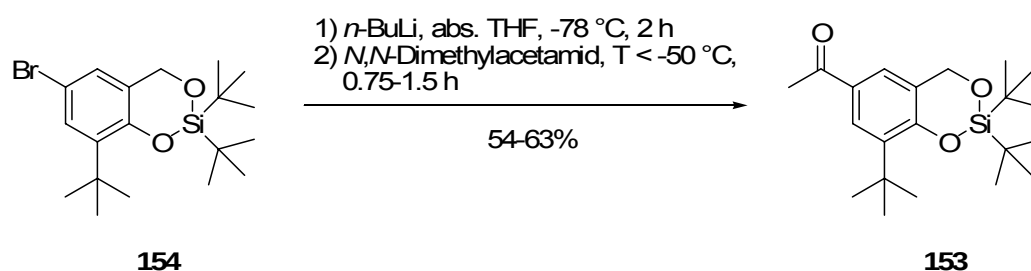


Abb. 75 Synthese des di-*tert*-Butylsilyl-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohols **153**

Diese konsequent nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll durchgeführte Reaktion ergab **153** mit einer Ausbeute von 54%. In Analogie zu den Formylierungsreaktionen wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, in denen zwei Äquivalente *n*-Butyllithium verwendet wurden. Die weitere Umsetzung erfolgte dann unter Verwendung von drei bzw. zehn Äquivalenten *N,N*-Dimethylacetamid. Der Ansatz mit drei Äquivalenten lieferte **153** mit 63% Ausbeute, die weitere Erhöhung brachte keine Verbesserung mehr (56% Ausbeute). Die durchgeführten Versuche sind in Tab. 11 noch einmal zusammengestellt.

Äq. <i>n</i> -BuLi	Äq. <i>N,N</i> -DMAA*	Reaktionszeit mit <i>N,N</i> -DMAA*	Ausbeute
1.2	1.5	45 min	54%
2	3	45 min	63%
2	10	1.5 h	56%

**N,N*-DMAA = *N,N*-Dimethylacetamid

Tab. 11 Zur Darstellung von **153** durchgeführte Reaktionen

Da das Produkt der bis-TBDPS-Schützung des 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohols **113** nur in mäßiger Ausbeute rein isoliert werden konnte, wurde als Alternativmethode die di-*tert*-Butylsilyl-Schützung von **113** durchgeführt. Unter den oben bereits erläuterten

Bedingungen (vgl. S. 83-84) konnte der di-*tert*-Butylsilyl-4-acetyl-6-methylsalicylalkohol **155** mit einer Ausbeute von 63% synthetisiert werden.

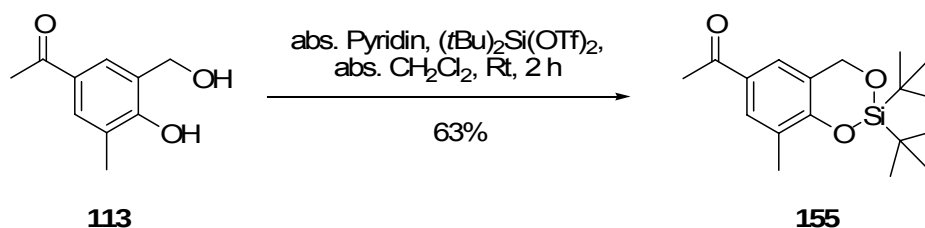


Abb. 76 Synthese des di-*tert*-Butylsilyl-4-acetyl-6-methylsalicylalkohols **155**

Somit standen die bis-TBDPS-geschützten 4-Acetylsalicylalkohole **141** und **142** sowie die di-*tert*-Butylsilyl-geschützten 4-Acetylsalicylalkohole **153** und **155** zur Verfügung, die anschließend in die entsprechenden 4-(1-Acetoxyvinyl)-Verbindungen umgesetzt wurden. Dazu wurden die effizientesten der in Tab. 8 (S. 71) vorgestellten Bedingungen noch einmal verändert, um die Reaktionszeit von drei Tagen zu verkürzen. Durch die Verwendung von 0.3 Äquivalenten *para*-Toluolsulfonsäure sowie 80 Äquivalenten Isopropenylacetat konnten die geschützten 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **156-159** nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden (im Fall von **159** von 90 Stunden) in Ausbeuten zwischen 59-69% isoliert werden (Abb. 77).

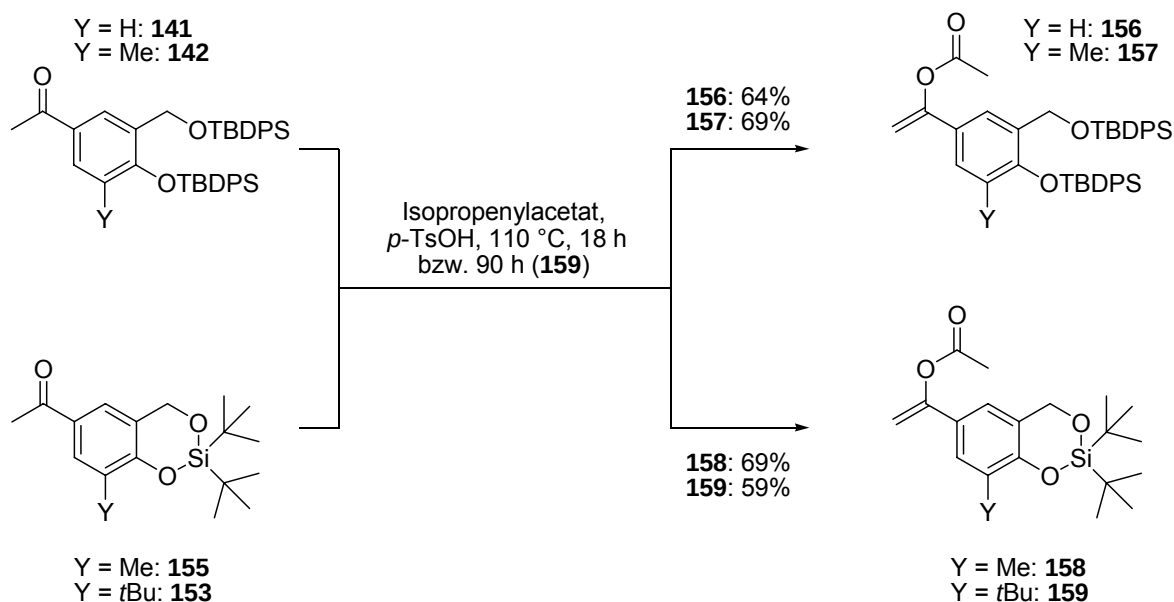
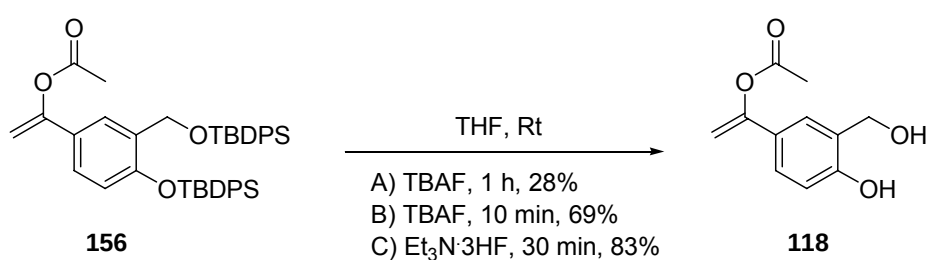


Abb. 77 Synthese der geschützten 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **156-159**

Die Fluorid-Entschützung der Salicylalkohole **156-159** zu dem jeweiligen 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol **118-120** erwies sich als sehr stark abhängig vom gewählten Entschützensreagenz sowie vom Aufarbeitungsprotokoll. Hierbei wurden vor allem große Unterschiede in der Stabilität der 4-(1-Acetoxyvinyl)-Gruppe in Abhängigkeit vom Substituenten in der 6-Position des Aromaten deutlich.

Die standardisierte Durchführung solcher Silyl-Entschützens sieht die Verwendung von drei Äquivalenten Entschützensreagenz (vorzugsweise Triethylamin-Trihydrofluorid ($\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$) oder Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF)) in THF bei Raumtemperatur vor. Nach vollständiger Entschützung wird die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene Rückstand chromatografisch gereinigt. Verbindung **156** wurde nach diesem Protokoll zunächst für eine Stunde mit TBAF umgesetzt. Diese Reaktion lieferte **118** in 28% Ausbeute, wobei in der dünnschichtchromatografischen Verfolgung eine Zersetzung des entstehenden Produkts beobachtet wurde. Eine Verkürzung der Reaktionszeit auf nur 10 Minuten erhöhte die Ausbeute an **118** auf 69%. Die Reaktion unter Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid ergab den 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol **118** in einer Ausbeute von 83%. Obwohl die Reaktionsdauer 30 Minuten betrug, konnte hier keine Produktzersetzung beobachtet werden. Somit scheint die 4-(1-Acetoxyvinyl)-Funktion unter den deutlich basischeren Bedingungen der TBAF-Entschützung nicht stabil genug zu sein. Die Ergebnisse sind in Abb. 78 grafisch zusammengefasst.

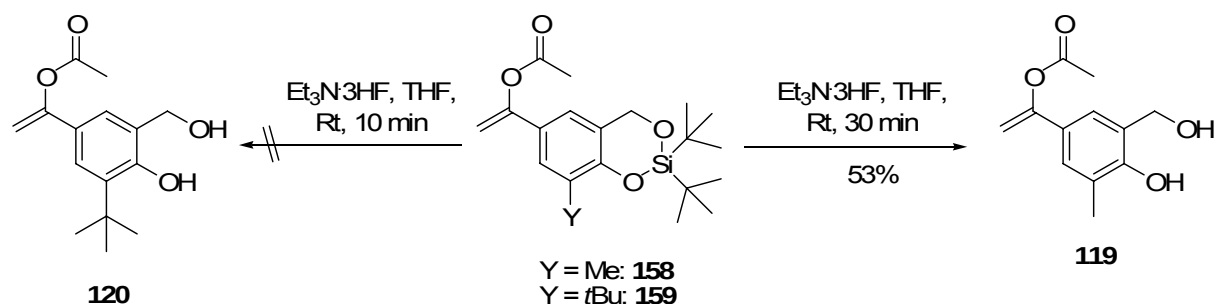


(Aufarbeitung: Einengen, Chromatografie)

Abb. 78 Synthese des 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohols **118**

Die Entschützens der di-*tert*-Butylsilyl-geschützten 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **158** und **159** wurden deshalb mit Triethylamin-Trihydrofluorid durchgeführt. Das Aufarbeitungsprotokoll aus Abb. 78 wurde beibehalten. Verbindung **119** konnte dadurch allerdings nur noch mit 53% Ausbeute isoliert werden, bei der Entschützung von **159** zu **120** konnte nach dem Entfernen des Lösungsmittels

dünnschichtchromatografisch kein Produkt mehr nachgewiesen werden. Vor dem Einengen war in der Dünnschichtchromatografie nur eine Substanz sichtbar, anstatt dieser waren hinterher zwei neue Substanzen zu detektieren (Abb. 79).



(Aufarbeitung: Einengen, Chromatografie)

Abb. 79 Versuche zur Entschützung von **158** und **159**

Somit musste bei den in 6-Position alkylierten 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkoholen das Aufarbeitungsprotokoll geändert werden, um eine Zersetzung der Enolesterfunktion zu unterbinden. Dabei wurde herausgefunden, dass auch das Extrahieren mit Ethylacetat gegen Wasser zur Isolierung von **120** nicht ausreichte. Auch in diesem Fall zersetzte sich das entstandene Produkt beim Einengen in die bereits zuvor beobachteten zwei neuen Verbindungen. Erst durch die Einführung eines Waschschriffs mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5%) konnte nach Entfernen des Lösungsmittels ausschließlich das entstandene Produkt **120** in der Dünnschichtchromatografie detektiert werden. Nach der abschließenden chromatografischen Reinigung konnte **120** dann mit einer Ausbeute von 98% isoliert werden. Dieses Aufarbeitungsprotokoll wurde dann auch für die erneute Entschützung von **158** sowie die Entschützung des bis-TBDPS-geschützten 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohols **157** verwendet. Diese lieferten den entsprechenden Salicylalkohol **119** mit einer Ausbeute von 85% (ausgehend von **158**) bzw. 82% (ausgehend von **157**; Abb. 80, S. 89).

Durch diese Optimierung der Aufarbeitung konnten also alle 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole **118-120** in sehr guten Ausbeuten isoliert werden. Die unterschiedliche Stabilität der Enolesterfunktion bei der Aufarbeitung zeigt deutlich, dass die Alkylsubstituenten in 6-Position diese in ihren elektronischen Eigenschaften stark beeinflussen müssen. Je stärker der positive induktive Effekt der Alkylgruppe in

6-Position ist, desto geringer scheint die Stabilität der Enolesterfunktion gegenüber einer Spaltung zu sein.

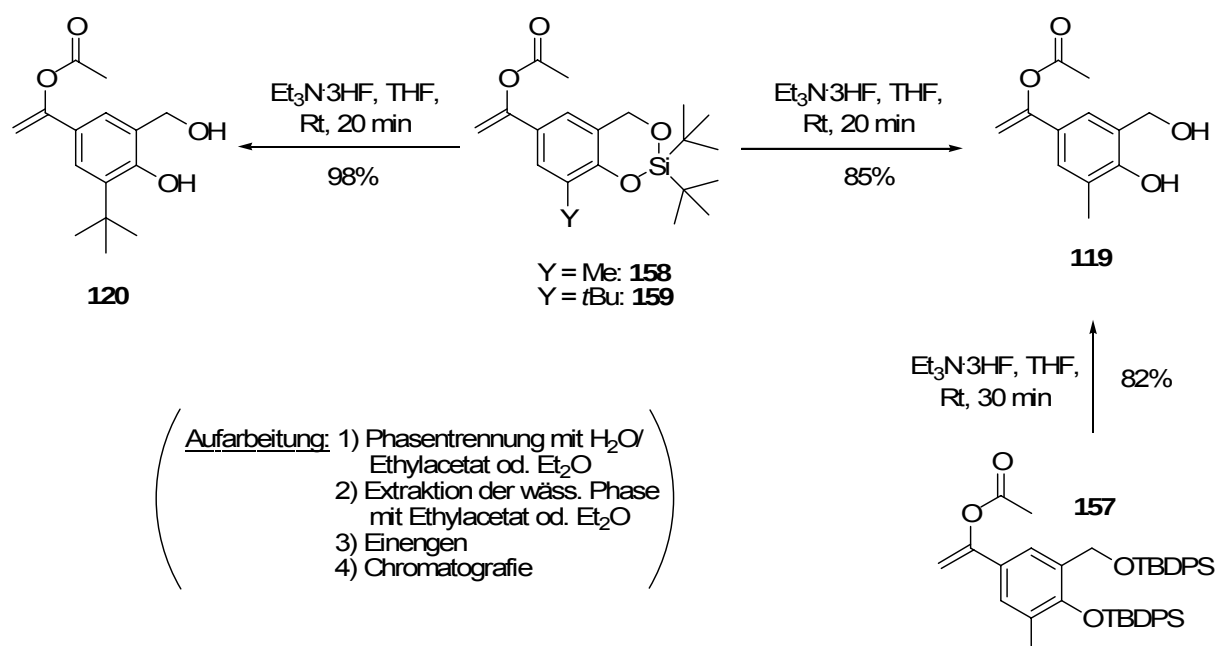


Abb. 80 Entschützungen von **157-159** zu **119** bzw. **120** mit optimierter Aufarbeitung

Des Weiteren konnte auch der di-*tert*-Butylsilyl-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **153** mit sehr guter Ausbeute (95%) zum 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114** entschützt werden. Auf Grund der Unempfindlichkeit der Acetylfunktion konnte hier TBAF verwendet und auf eine Extraktion vor dem Einengen verzichtet werden. Somit kann **114** ausgehend von 2-*tert*-Butylphenol **53** über den 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **49** mit einer Gesamtausbeute von 29% über sechs Stufen synthetisiert werden. Diese alternative Route zur Darstellung von **114** ist damit trotz doppelt so vieler Schritte effizienter als die dreistufige Synthese ausgehend von **53** über das 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyacetophenon **135** (15% Gesamtausbeute; Abb. 81).

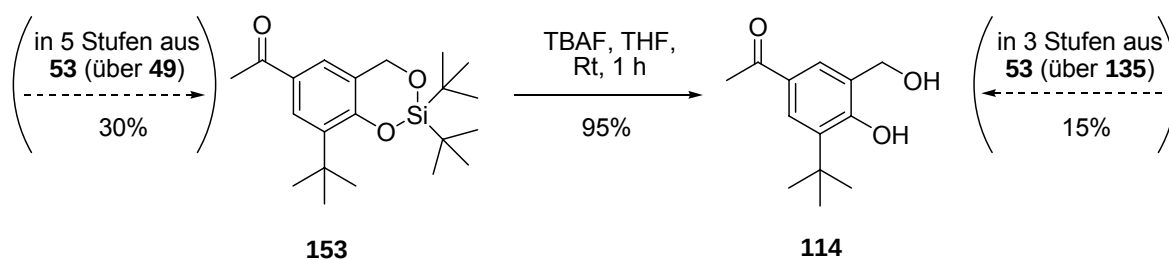


Abb. 81 Entschätzung von **153** zu **114**

Aus den 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkoholen **118-120** konnten anschließend alle entsprechenden Saligenylchlorphosphite **121-123** in guter bis sehr guter Reinheit synthetisiert werden. Die Ausbeuten dieser in abs. Diethylether durchgeführten Reaktionen lagen dabei zwischen 66-69%. Aus **121-123** konnten dann mit in zu den Synthesen der 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** (vgl. Abb. 66, S. 77) vergleichbaren Ausbeuten (19-23%) die entsprechenden 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** dargestellt werden (Abb. 82).

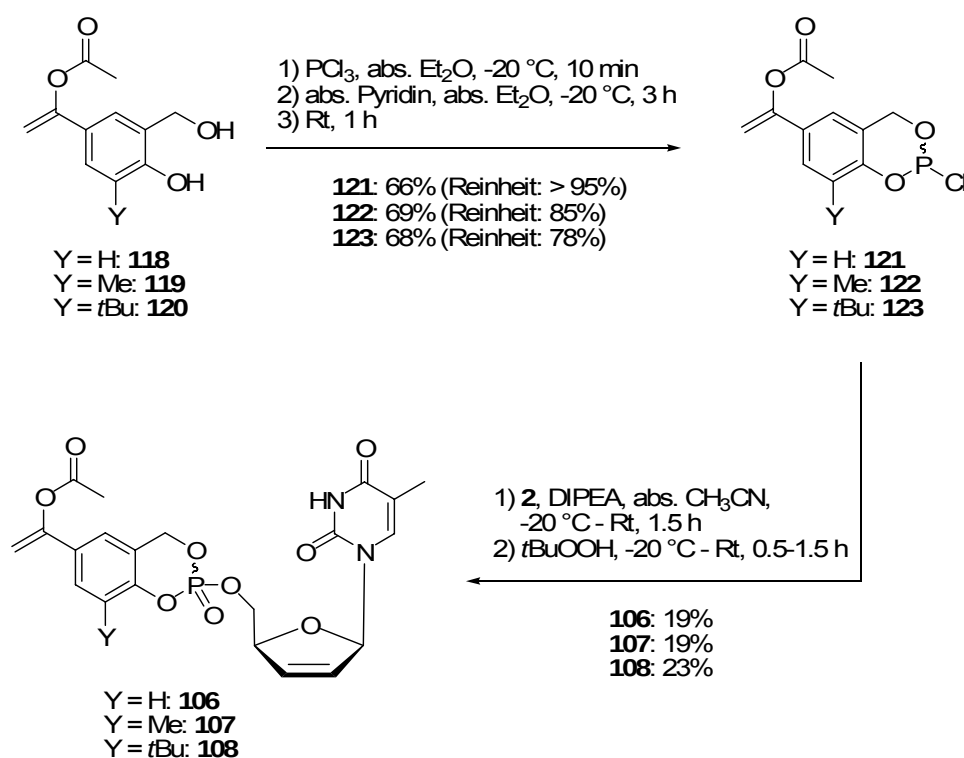


Abb. 82 Synthese der 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108**

Für die Triester **107** und **108** konnte eine endgültige Reinigung erst unter Verwendung der präparativen RP-HPLC erzielt werden. Im Fall von **108** konnten dabei auch die einzelnen Diastereomere getrennt isoliert werden. Diese Trennung gelang ebenfalls für die Diastereomere der entsprechenden Referenzverbindung 5-Acetyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **111**. Somit standen für die anschließenden biologischen Tests sowie die Untersuchungen der Hydrolyseeigenschaften sowohl die Diastereomerengemische der 5-Acetyl- (**109-111-mix**) und 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs (**106-108-mix**) als auch die reinen Diastereomere der Zielverbindungen **111** und **108** (**111-fast**, **111-slow**, **108-fast**, **108-slow**) zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den nachfolgenden Kapiteln 4.2.2. und 4.2.3. erläutert.

Die Synthese des 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106** wurde ebenfalls ausgehend vom 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMP **109** versucht, um so die Realisierung der Syntheseroute I (vgl. Abb. 55, S. 68) zu überprüfen. Dazu wurde **109** unter den etablierten Bedingungen der Enolester-Bildung umgesetzt (Abb. 83).

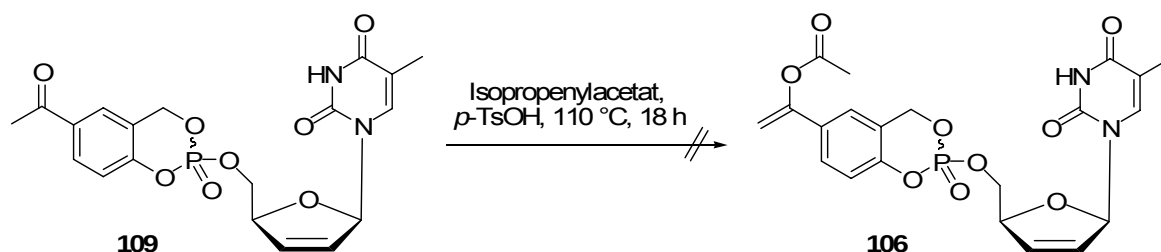


Abb. 83 Versuch der Synthese von **106** aus **109**

Bei dieser Reaktion entstand eine Vielzahl an Produkten. Das Produkt **109** konnte dabei während und nach Abbruch der Reaktion dünnschichtchromatografisch allerdings nicht nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass der *cycloSal*-Triester **109** unter der hohen Temperatur über die lange Reaktionszeit nicht stabil ist. Da in Vorversuchen bereits gezeigt worden war, dass für diese Reaktion eine recht hohe Temperatur benötigt wird (vgl. Tab. 8, S. 71), wurden keine weiteren Versuche zu dieser Reaktion unternommen. In Ermangelung an weiteren, potenziell milderer literaturbekannten Methoden zur Umwandlung von Acetylgruppen in 1-Acetoxyvinylfunktionen und in Anbetracht der erfolgreichen Synthese der Zielverbindungen **106-108** über die Syntheseroute II wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Anstrengungen unternommen, auch über die Syntheseroute I zu diesen zu gelangen.

Die Synthese von 3-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs wurde am Beispiel des Methyl-Derivats **160** versucht. Somit musste zunächst der 6-(1-Acetoxyvinyl)-4-methylsalicylalkohol **161** dargestellt werden. Unter Anwendung der Reaktionsschritte und Bedingungen, die zur erfolgreichen Synthese des 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohols **119** geführt hatten, wurde dazu vom kommerziell erhältlichen 2-Hydroxy-5-methylacetophenon **162** ausgegangen. Dieses wurde über die Chlormethylierung (Zwischenprodukt **163**) und die anschließende nucleophile Substitution in 75% zum 6-Acetyl-4-methylsalicylalkohol **164** umgesetzt. Dieser konnte mit 78% Ausbeute di-*tert*-Butylsilyl geschützt werden. Die resultierende Verbindung **165** konnte dann mit einer Ausbeute von 77% in den entsprechenden

Enolester **166** überführt werden. Die Entschützung von **166** mit Triethylamin-Trihydrofluorid lieferte bereits nach zehn Minuten selektiv nur ein Produkt, das nach Reinigung am Chromatotron problemlos isoliert werden konnte. Dies konnte allerdings als der an der benzylicsen Hydroxyfunktion acetylierte 6-Acetyl-4-methylsalicylalkohol **167** identifiziert werden (Abb. 84).

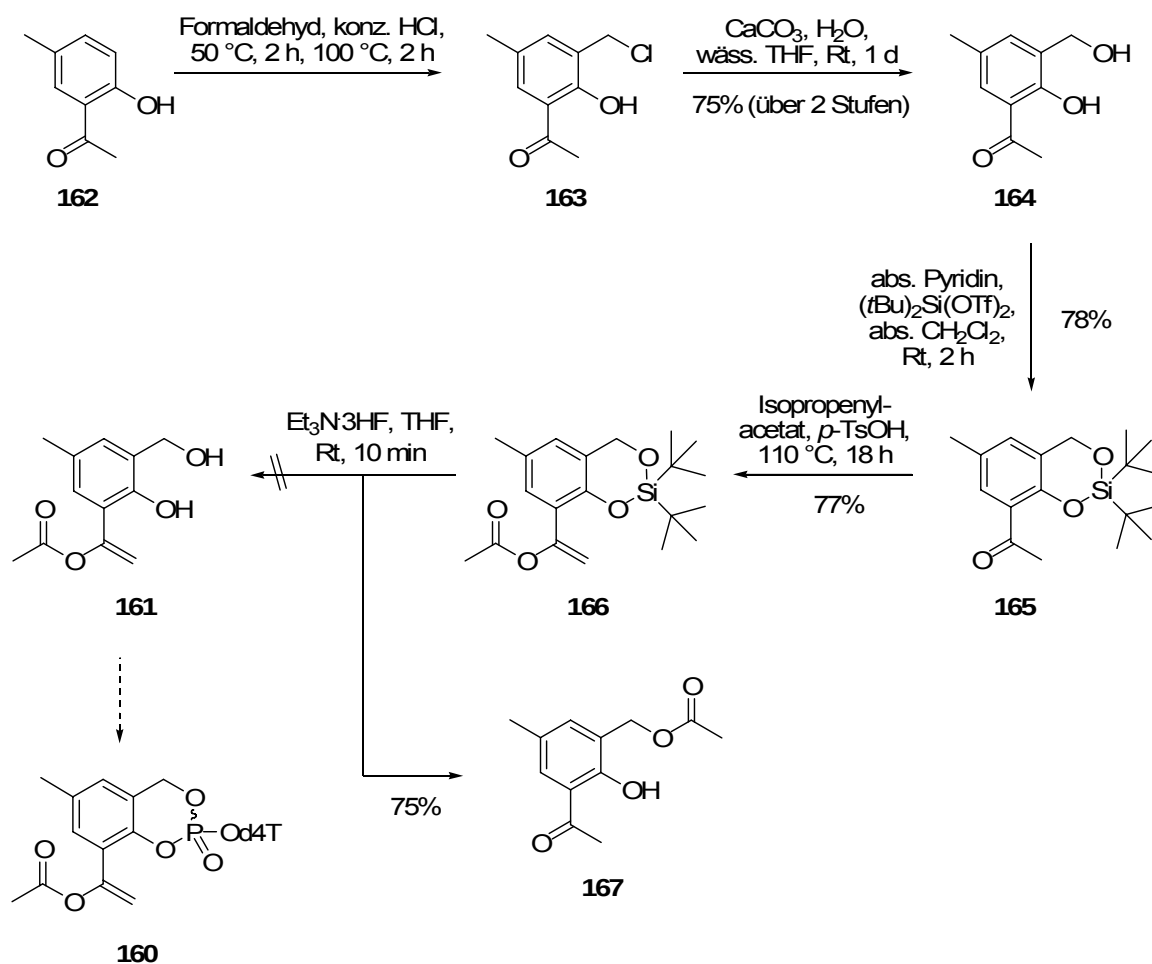


Abb. 84 Versuch der Synthese des 3-(1-Acetoxyvinyl)-5-methyl-cycloSal-d4TMPs **160**

Eine ähnliche Umesterung war bereits zuvor bei den Versuchen zur Synthese des 4-Diacetoxymethylsalicylalkohols **124** (vgl. Abb. 57, S. 70) beobachtet worden. Verbindung **167** kann über zwei denkbare Reaktionsmechanismen entstehen. So könnte ein intermolekularer Angriff eines entstandenen Moleküls **161** auf die Enolesterfunktion eines weiteren Moleküls **161** oder auf ein Molekül **166** erfolgen. Da die Reaktion aber schon nach zehn Minuten beendet war und dünnschichtchromatografisch keinerlei andere Produkte beobachtet wurden, ist dieser Reaktionsweg unwahrscheinlich. Außerdem wäre es sehr verwunderlich, dass im Falle einer intermolekularen Reaktivität die 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole

118-120 stabil bleiben, die 6-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole wie **161** hingegen miteinander reagieren. Deshalb ist eher von einer Acetyl-Wanderung auszugehen, in der zunächst die phenolische Hydroxygruppe unter Ausbildung eines intermediären Sechsrings an der Carbonylgruppe der Enolesterfunktion angreift. Danach erfolgt ein Angriff der benzylichen Hydroxyfunktion unter erneuter zwischenzeitlicher Sechsringbildung auf den Carbonyl-Kohlenstoff der gewanderten Acetylgruppe (Abb. 85).

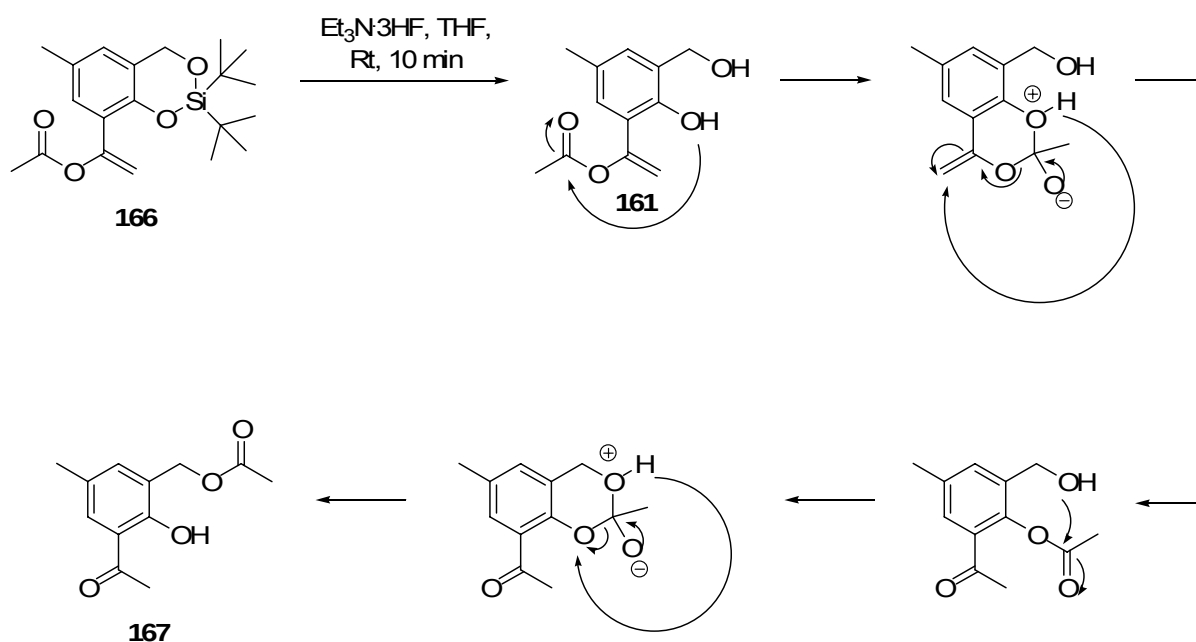


Abb. 85 Mögliche Entstehung von **167** aus **161** durch eine Acetyl-Wanderung

In den 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkoholen **118-120** ist die Enolesterfunktion weit genug von den Hydroxyfunktionen separiert, sodass es zu keiner solchen Wanderung kommt. Diese könnte theoretisch nur mit dem Angriff der benzylichen Hydroxyfunktion beginnen. Dies würde allerdings die intermediäre Bildung eines Achtrings erfordern. Die Instabilität der Acylalfunktion des 4-Diacetoxymethylsalicylalkohols **124** (vgl. Abb. 57, S. 70) kann somit eher mit einer intermolekularen Reaktion begründet werden. Komplette ausgeschlossen werden kann eine Acetyl-Wanderung anhand der vorliegenden Ergebnisse aber nicht.

Da bisher keine geeignete Methode zur Enolester-Bildung auf der Triester-Stufe zur Verfügung steht, war eine Synthese der 3-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Sal-d4TMPs im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

4.2.2. Charakterisierung der 5-(1-Acetoxyvinyl)- und 5-Acetyl-cycloSal-d4T-monophosphate

Die 5-(1-Acetoxyvinyl)- (**106-108**) und 5-Acetyl-cycloSal-d4TMPs (**109-111**) wurden den gleichen Hydrolysen unterzogen, die bereits zur Analyse der Formyl- und Diacyloxymethyl-cycloSal-d4TMPs durchgeführt worden waren. Die Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse bei den pH-Werten 7.3 und 7.6, der enzymatischen Spaltung sowie der Untersuchung in RPMI/FCS(10%) sind in Diagramm 5 zusammengefasst. Zunächst werden dabei nur die Diastereomerenengemische betrachtet.

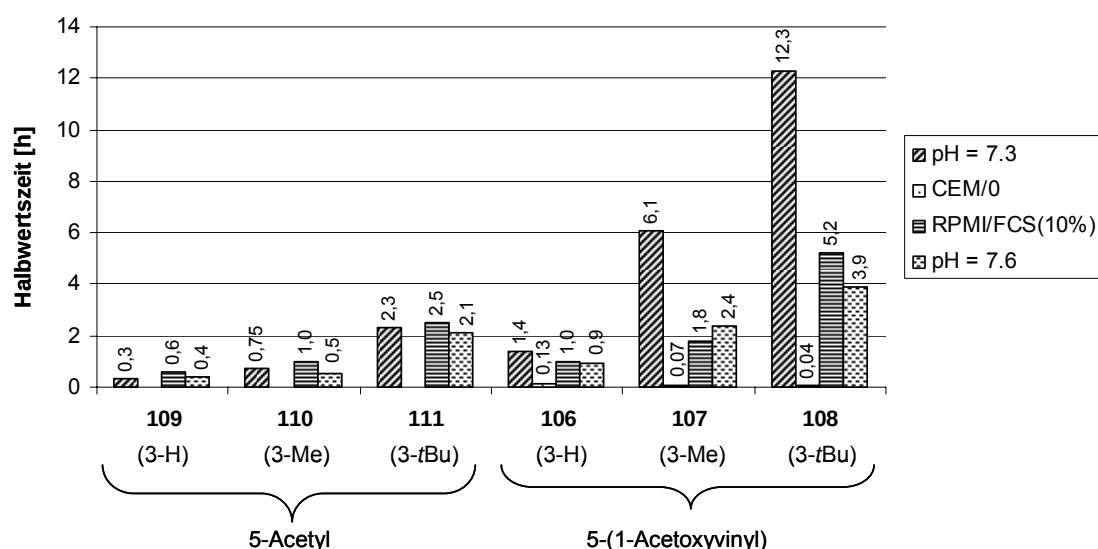


Diagramm 5 Halbwertszeiten der 5-(1-Acetoxyvinyl)- (**106-108**) und 5-Acetyl-cycloSal-d4TMPs (**109-111**) in verschiedenen Medien (Diastereomerenengemische)

Die Halbwertszeiten der Hydrolysen in Phosphatpuffer mit pH = 7.3 zeigen, dass die Alkylsubstituenten in 3-Position zu einer deutlichen Erhöhung der Stabilität gegenüber der chemischen Hydrolyse führen. Dieser Effekt war bereits für die 5-Formyl- (**34**, **62**, **63**) und 5-Diacetoxymethyl-cycloSal-d4TMPs (**33**, **40**, **41**) gefunden worden (vgl. Diagramm 1, S. 36). So erhöht die Methylgruppe die Hydrolysestabilität der 5-Acetyl-Verbindung um den Faktor 2.5, die *tert*-Butylgruppe um den Faktor 7.5. Im Vergleich der 5-(1-Acetoxyvinyl)-Verbindungen ist die faktorielle Veränderung noch größer. Hier führt die Methylgruppe zu einer 4.5-fach erhöhten Halbwertszeit, die *tert*-Butyl-Verbindung **108** weist sogar eine neunmal höhere Hydrolyse-Halbwertszeit auf als das in 3-Position unsubstituierte Derivat **106**. Im Allgemeinen sind die 5-Acetyl-Verbindungen **109-111** um ungefähr den Faktor 2 hydrolysestabiler als die vergleichbaren 5-Formyl-Triester (**34**, **62**, **63**). Diese höhere

Halbwertszeit war auf Grund der geringeren Akzeptorstärke der Acetylgruppe auch so erwartet worden. Der Vergleich der Akzeptorstärken von 5-Diacetoxymethyl- und 5-(1-Acetoxyvinyl)-Funktion hingegen ist nicht eindeutig. Die Halbwertszeiten der in 3-Position unsubstituierten Verbindungen sind annähernd gleich (**33**: $t_{1/2} = 1.2$ h, **106**: $t_{1/2} = 1.4$ h), was auch auf eine annähernd gleiche Akzeptorstärke schließen lässt. Die in 3-Position alkylierten Verbindungen weisen im Vergleich untereinander allerdings deutlich unterschiedliche Halbwertszeiten auf. So sind die Enolester-Verbindungen **107** ($t_{1/2} = 6.1$ h; 3-Me) und **108** ($t_{1/2} = 12.3$ h; 3-*t*Bu) deutlich stabiler als die entsprechenden 5-Diacetoxymethyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs **40** ($t_{1/2} = 2.3$ h; 3-Me) und **41** ($t_{1/2} = 7.9$ h; 3-*t*Bu). Diese Ergebnisse würden wiederum darauf schließen lassen, dass die 5-(1-Acetoxyvinyl)-Funktion deutlich weniger starke Akzeptoreigenschaften besitzt. Allerdings ist es möglich, dass die elektronischen Eigenschaften und damit die Akzeptorstärke der 5-(1-Acetoxyvinyl)-Funktion durch die Alkylsubstituenten in 3-Position deutlich stärker beeinflusst werden als es für die 5-Diacetoxymethylgruppe der Fall ist. Hieraus resultieren dann die vergleichsweise deutlich höheren Hydrolyse-Halbwertszeiten der Enolesterverbindungen. Die starke Beeinflussung der elektronischen Natur der (1-Acetoxyvinyl)-Funktion durch die Alkylgruppen am aromatischen Ring war bereits in den Entschützungsreaktionen zu den 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkoholen **118-120** (vgl. S. 87-89) aufgefallen.

Für alle 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs (**106-108**) konnte in CEM/0-Zellextrakten die sehr schnelle Spaltung in das jeweilige 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMP (**109-111**) nachgewiesen werden. Allerdings zeigt die 5-(1-Acetoxyvinyl)-Funktion auch hier ein uneinheitliches Verhalten. So sind Unterschiede in der Geschwindigkeit der enzymatischen Spaltung der Enolester abhängig vom Substituenten in 3-Position zu finden. Die unsubstituierte Verbindung **106** hat eine Halbwertszeit von 0.13 h, die 3-Methyl-Verbindung **107** eine von 0.07 h. Das 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **108** weist dann sogar nur noch eine Halbwertszeit von 0.04 h auf. Diese Reihung der Empfindlichkeit gegenüber der enzymatischen Spaltung ist der bei den Entschützungsreaktionen beobachteten Labilitätsreihenfolge identisch. In den Analysen der 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs (**33**, **40**, **41**) in CEM/0-Zellextrakten war genau das Gegenteil gefunden worden. Hier wurde die Acylalfunktion der *tert*-Butyl-Verbindung **41** nur halb so schnell zur Formylgruppe gespalten wie in den Verbindungen **33** und **40** (vgl. Diagramm 1, S. 36).

In RPMI/FCS(10%) wurde für die Enolester **106-108**, wie auch schon für alle 5-di-AM-Verbindungen (**33**, **40**, **41**), eine deutliche Verringerung der Hydrolysestabilität festgestellt. Wie an den in Phosphatpuffer (pH = 7.6) durchgeführten Vergleichsmessungen zu erkennen, hat auch hier der basischere pH-Wert einen merklichen Einfluss. Allerdings war auch für die Verbindungen **106-108** eine anteilige Spaltung dieser in die entsprechende 5-Acetyl-Verbindung **109-111** nachzuweisen, die während der Hydrolysen in Phosphatpuffer bei gleichem pH-Wert (7.6) nicht aufgetreten war.

Nichtsdestoweniger wird die konzeptionell erwünschte Differenzierung zwischen chemischer Hydrolyse und enzymatischer Spaltung durch Alkylgruppen in der 3-Position massiv verbessert. Dies ist mit der steigenden Hydrolysestabilität in Abhängigkeit der Stärke des positiven induktiven Effekts der Alkylgruppen bei gleichzeitig zunehmender Labilität gegenüber der enzymatischen Spaltung zu begründen. Betrachtet man die Halbwertszeiten in RPMI/FCS(10%), so ist die chemische Hydrolyse der Verbindung **106** nur achtmal langsamer als die chemische Spaltung, für **107** beträgt der Unterschied schon Faktor 26. Für die *tert*-Butyl-Verbindung **108** liegt die Differenz bei Faktor 130. Betrachtet man die Halbwertszeiten in Phosphatpuffer (pH = 7.3), so sind die Unterschiede noch deutlicher. Hier findet die chemische Hydrolyse 11- (**106**), 87- (**107**) bzw. 308-mal (**108**) langsamer statt als die enzymatische Spaltung.

Nachteilig auf das Konzept der enzymatischen Aktivierung wirkt sich allerdings die Tatsache aus, dass die 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** in RPMI/FCS(10%) im Vergleich zu den Hydrolysen bei pH = 7.3 eine nahezu gleichbleibende (**111**) bzw. sogar deutlich höhere (**109**, **110**) Halbwertszeit besitzen. Vor allem die Halbwertszeit des 5-Acetyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **111** ist schon so hoch (2.5 h), dass nicht mehr davon ausgegangen werden kann, dass diese Verbindung einen vollständigen Zelleinschluss gewährleisten kann.

Des Weiteren wurden die 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** hinsichtlich ihrer Stabilität in humanem Blutserum (5%) getestet. Für alle Verbindungen wurden im Vergleich zur chemischen Hydrolyse bei pH = 7.3 eine erniedrigte Hydrolyse-Halbwertszeit ermittelt ($t_{1/2}$ (Serum) = 1.1 h (**106**), 4.8 h (**107**), 11.7 h (**108**)). Gewöhnlicher Weise haben *cycloSal*-d4TMPs auf Grund des vorherrschenden

saureren pH-Wertes (6.8) im Serum eine höhere Halbwertszeit als im Phosphatpuffer (pH = 7.3). Die niedrigere Halbwertszeit ist für alle 5-(1-Acetoxyvinyl)-Verbindungen **106-108** mit einer anteiligen Spaltung zur jeweiligen Acetyl-Verbindung **109-111** zu begründen, die mittels der analytischen HPLC nachgewiesen werden konnte. Gleichwohl ist die Hydrolysestabilität von **106-108** im humanen Blutserum noch immer deutlich höher als die Stabilität im Zellextrakt (Faktor 8.5 (**106**), 69 (**107**) bzw. 293 (**108**)).

Die Selektivität der d4TMP-Freisetzung wurde anhand des Diastereomeren-gemischs des 5-Acetyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMPs **111** mittels ^{31}P -NMR-Hydrolyse in einem Imidazol/HCl-Puffer (pH = 7.3) überprüft. Wie schon beim 5-Formyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMP **63** (vgl. Abb. 32, S. 38) erfolgte diese auch hier ohne Bildung eines Phenylphosphatdiesters. Der Verlauf der Hydrolyse über den zwischenzeitlich entstehenden Benzylphosphatdiester **168** ist in Abb. 86 gezeigt.

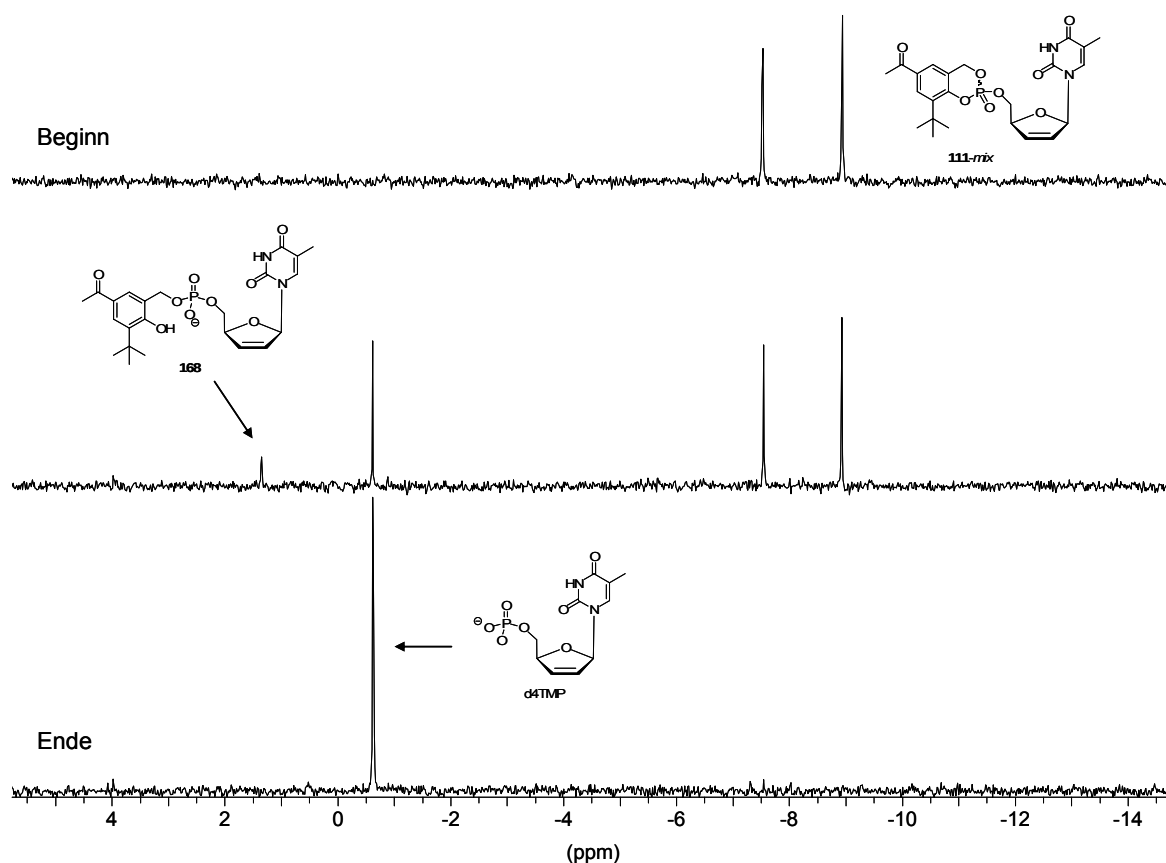


Abb. 86 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von **111-mix** im Imidazol/HCl-Puffer (pH = 7.3) bei 37 °C

Bevor auf die Ergebnisse der Hydrolysestudien der getrennten Diastereomere der Verbindungen **108** und **111** eingegangen wird, sollen zunächst die durchgeführten Versuche zur Zuordnung der absoluten Konfiguration am Phosphoratom erläutert werden. Auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit des 5-Acetyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **108** mit dem 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **63** wurde davon ausgegangen, dass sich die entsprechenden Diastereomere auch in ihrem Kristallisationsverhalten ähneln. Entsprechende Versuche mit der für die Kristallisation von **63**-*slow* erfolgreichen Diffusionsmethode führten auch für **111**-*slow* zu Kristallen. Diese waren allerdings keine Einkristalle und somit nicht für die Röntgenkristallstrukturanalyse geeignet. Verbindung **111**-*fast* bildete unter Verwendung der gleichen Methode genauso wie **63**-*fast* nur einen nicht-kristallinen Niederschlag aus. Durch dieses ähnliche Kristallisationsverhalten lag für **111** also die gleiche Zuordnung der Stereokonfiguration wie bei **63** nahe (*fast*: S_P , *slow*: R_P).

Als weiteren Beleg für die identischen absoluten Konfigurationen der *fast*- bzw. *slow*-Diastereomere von **63** und **111** lassen sich ferner die Ergebnisse der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) anführen. Diese Methode basiert auf der Verwendung von zirkular polarisiertem Licht. Ein optisch aktives Molekül absorbiert das rechts-polarisierte Licht im Vergleich zum links-polarisierten in unterschiedlichem Maße. Die Differenz der Absorption wird für jede Wellenlänge (hier $\lambda = 200\text{-}350\text{ nm}$) gemessen, woraus dann das Spektrum ermittelt wird. Zueinander enantiomere Verbindungen zeigen in der CD-Spektroskopie beispielsweise einen spiegelbildlichen Kurvenverlauf. Für Diastereomere, wie sie bei den *cycloSal*-d4TMPs vorliegen, können die Verläufe annähernd gleich, aber auch sehr unterschiedlich sein. Dies hängt von dem Einfluss der Konfiguration des jeweiligen Stereozentrums auf die Gesamtmolekülstruktur ab. Ändert sich diese nur geringfügig, so sind sehr ähnliche CD-Spektren zu erwarten. Da der strukturelle Unterschied zwischen Acetyl- und Formylfunktion nicht sehr groß ist, wurde davon ausgegangen, dass die CD-Spektren der gleich konfigurierten Diastereomere sehr ähnlich sein sollten. Im Vergleich der CD-Spektren der getrennten Diastereomere von **63** und **111** (Abb. 87, S. 99) ist dann auch klar zu erkennen, dass die *fast*- und die *slow*-Diastereomere, wie es auf Grund der Kristallisationseigenschaften schon vermutet wurde, jeweils die gleiche absolute Konfiguration aufweisen sollten. Somit entspricht **111**-*fast* also (S_P)-**111** und **111**-*slow* demnach (R_P)-**111**. Eine ausführliche und mit

CD-Spektren weiterer, diastereomerenreiner *cycloSal*-d4TMPs vergleichende Betrachtung zum Verlauf der Kurven erfolgt in Kapitel 4.3.4.

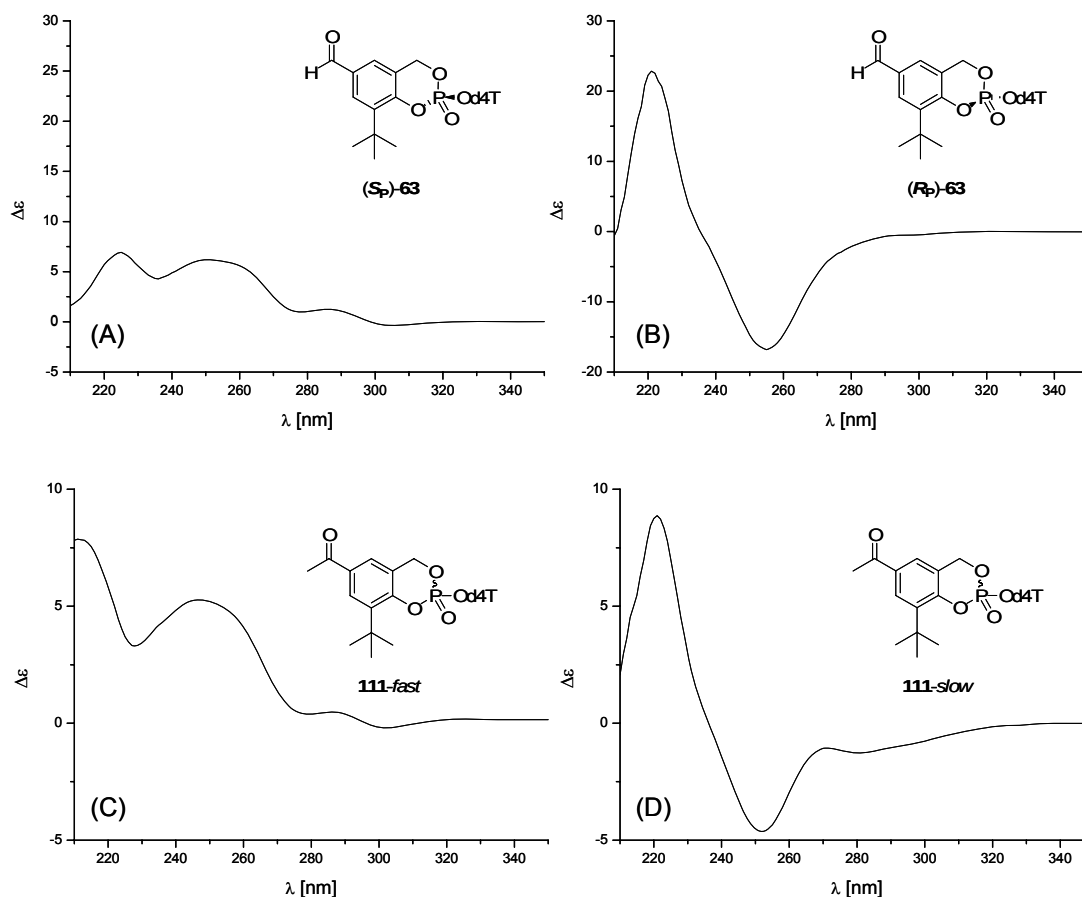


Abb. 87 CD-Spektren von **111-fast** (C) und **111-slow** (D) im Vergleich mit (S_P) -63 (A) und (R_P) -63 (B)

Über die Hydrolysen der getrennten Diastereomere in CEM/0-Zellextrakten konnte dann nachgewiesen werden, dass aus **108-fast** durch enzymatische Spaltung **111-fast** und aus **108-slow** die Acetyl-Verbindung **111-slow** freigesetzt wird (Abb. 88, S. 100). Daher entspricht **108-fast** also (S_P) -108 und **108-slow** kann mit (R_P) -108 gleichgesetzt werden.

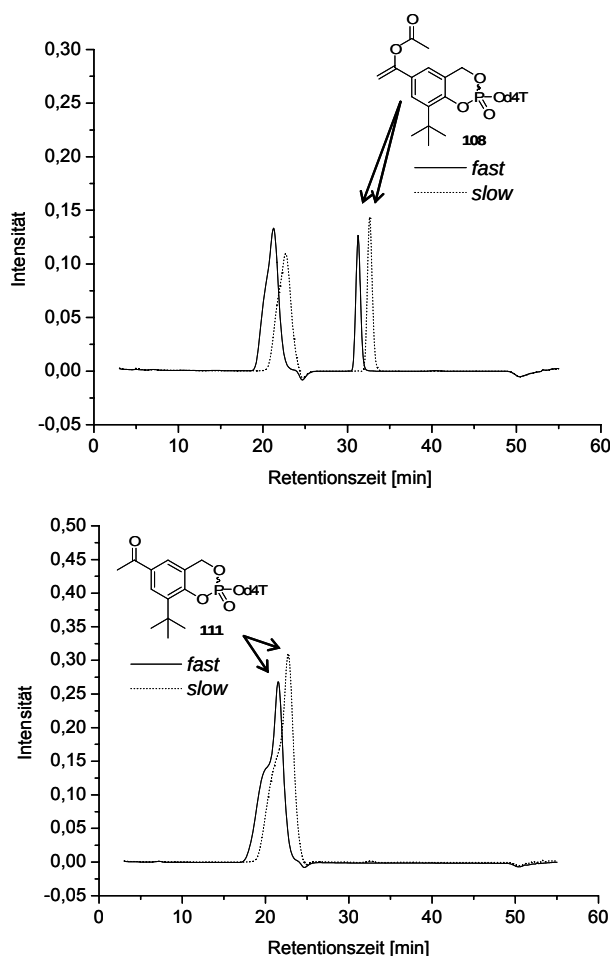


Abb. 88 oben: HPL-Chromatogramme der Hydrolysestudien in CEM/0-Zell-extrakten nach 5 min von **108-fast/108-slow**; **unten:** HPL-Chromatogramme der Referenzverbindungen **111-fast/111-slow** (Methode III)

Die für die getrennten Diastereomere von **108** und **111** in den im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig verwendeten Medien ermittelten Hydrolyse-Halbwertszeiten sind in Diagramm 6 (S. 101) zusammengefasst. Zum Vergleich sind die Werte der Diastereomerengemische (**108-mix**, **111-mix**) mit aufgeführt.

In der Hydrolysestabilität der getrennten Diastereomere des 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs (**S_P**)-**108** und (**R_P**)-**108** im Phosphatpuffer (pH = 7.3) ist ein deutlicher Unterschied erkennbar. So hydrolysiert (**S_P**)-**108** über zwei Stunden langsamer als (**R_P**)-**108**. In RPMI/FCS(10%) wird diese Differenz noch größer, hier hydrolysiert (**R_P**)-**108** vier Stunden schneller. Die Halbwertszeiten in diesem Medium sind, wie es bereits für **108-mix** bestimmt wurde, deutlich geringer als im Phosphatpuffer (pH = 7.3). Hier weist (**S_P**)-**108** ($t_{1/2}$ = 8.5 h) im Vergleich zu (**R_P**)-**108** ($t_{1/2}$ = 3.7 h) eine mehr als doppelt so hohe Hydrolysestabilität auf. Erstaunlicher-

weise sind diese Unterschiede in den Hydrolysen im Phosphatpuffer (pH = 7.6) nicht mehr zu finden. Hier werden beide Diastereomere annähernd gleich schnell hydrolysiert. Das R_P -konfigurierte Diastereomer hat dabei sogar die leicht höhere Halbwertszeit. Auffällig ist vor allem, dass sich die Hydrolysestabilität von (S_P)-**108** im Phosphatpuffer (pH = 7.6) im Vergleich zum Inkubationsmedium halbiert, (R_P)-**108** hingegen eine leicht erhöhte Stabilität zeigt. Für die reinen Diastereomere des 5-Diacetoxymethyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs (S_P)-**41** und (R_P)-**41** war kein vergleichbares Hydrolyseverhalten beobachtet worden (vgl. Diagramm 2, S. 40). Die enzymatische Spaltung der Enolesterfunktion ist von der Konfiguration des Phosphoratoms unabhängig und erfolgt für beide Diastereomere äußerst schnell ($t_{1/2} = 0.04$ h).

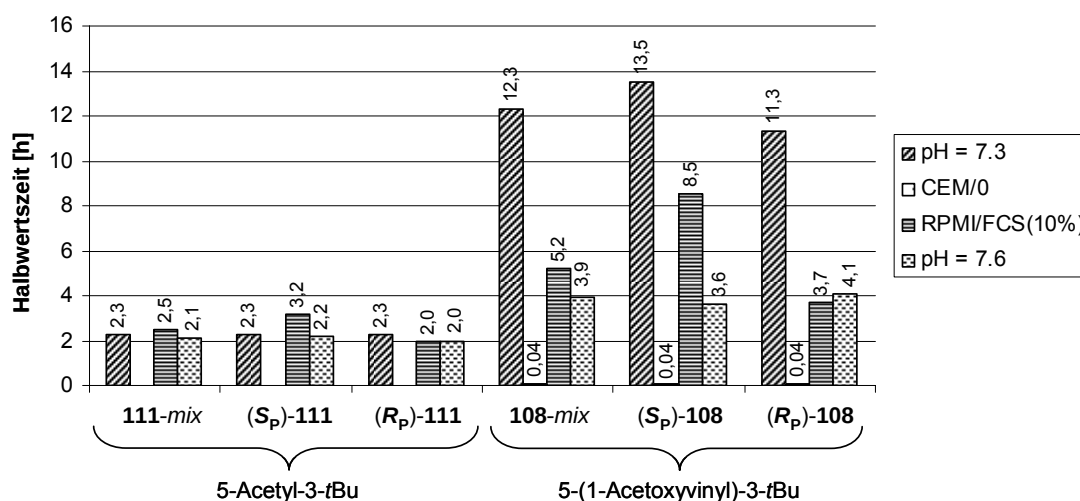


Diagramm 6 Halbwertszeiten der getrennten Diastereomere von **108** und **111** in verschiedenen Medien vergleichend zu den Diastereomerengemischen

Die getrennten Diastereomere des 5-Acetyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs (S_P)-**111** und (R_P)-**111** besitzen im Phosphatpuffer (pH = 7.3) eine identische Halbwertszeit von 2.3 Stunden. Diese wird auch durch den basischeren pH-Wert 7.6 nicht signifikant beeinflusst. Allerdings ist für die Diastereomere von **111** im Gegensatz zu den Hydrolysen im Phosphatpuffer im RPMI/FCS(10%) eine Differenzierung der Hydrolysegeschwindigkeiten zu finden. Das S_P -Diastereomer hydrolysiert deutlich langsamer als im Phosphatpuffer, während für (R_P)-**111** wiederum eine gleiche Halbwertszeit ermittelt wurde. Die Erhöhung der Halbwertszeiten im Inkubationsmedium wurde auch für die vergleichbaren 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs (S_P)-**63** und (R_P)-**63** gefunden (vgl. Diagramm 2, S. 40), dort allerdings gleichermaßen für beide Diastereomere.

Somit zeigt sowohl beim 5-Acetyl- (**111**) als auch beim 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP (**108**) jeweils das *S_P*-konfigurierte Diastereomer im RPMI/FCS(10%) ein auffälliges Hydrolyseverhalten. Da die Werte der einzelnen Diastereomere im Vergleich zu den Diastereomeregemischen plausibel erscheinen, könnte der Grund in einer konfigurationsspezifischen Beeinflussung der Hydrolyse der Triester durch Bestandteile des RPMI/FCS(10%) liegen. Wie diese im Einzelnen verlaufen könnte und warum diese nur im Fall von **108** und **111**, nicht aber bei **41** und **63** auftritt, kann anhand der durchgeführten Versuche nicht erklärt werden. Bereits in unserem Arbeitskreis durchgeführte Versuche zur Untersuchung von (unspezifischen) Proteinbindungen im Kulturmedium (und im humanen Blutserum) hatten keine eindeutigen Ergebnisse erbracht. Das Vorliegen einer solchen Bindung konnte aber auch dort nicht ausgeschlossen werden.³⁷

4.2.3. Antivirale *in vitro*-Tests der 5-(1-Acetoxyvinyl)- und 5-Acetyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

Die ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Universität Leuven ermittelten antiviralen Daten der 5-(1-Acetoxyvinyl)- (**106-108**) und 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs (**109-111**) sind in Tab. 12 (S. 103) aufgeführt.

Auch in dieser Auflistung sind einige Werte zunächst etwas irritierend. So könnte der Wert für die Aktivität von d4T **2** in CEM/TK⁻-Zellen ($EC_{50} = 69 \pm 70 \mu M$) rein rechnerisch sowohl als völlig inaktiv aber auch als extrem wirksam interpretiert werden. Da eine negative Aktivität nicht möglich ist und aus unzähligen Messungen bekannt ist, dass **2** nicht TK⁻-aktiv ist, muss zur Interpretation der Daten das Zustandekommen der Werte betrachtet werden. Die antiviralen Aktivitäten werden meist in drei voneinander unabhängigen Messungen ermittelt. Die so erhaltenen Werte werden dann gemittelt. Anschließend werden die Differenzen der zur Berechnung verwendeten Einzelwerte zum Mittelwert errechnet und die größte Abweichung (unabhängig davon ob positive oder negative Abweichung) als Standardabweichung angegeben. Ob der Unmöglichkeit eines negativen Wertes ist im Falle des oben genannten Wertes davon auszugehen, dass ein Einzelwert der Bestimmung $139 \mu M$ (also $69 \mu M + 70 \mu M$) gewesen ist. Somit müssten die beiden anderen Einzelmessungen addiert $68 \mu M$, also einen gemittelten EC_{50} von $34 \mu M$ ergeben. Dieses liegt im Bereich der standardmäßig für **2** bestimmten Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen. Wenn die Standardabweichung also größer ist als der eigentliche

Wert selbst, kann davon ausgegangen werden, dass eine der drei Einzelmessungen eine deutlich nach oben hin abweichende effektive Konzentration zur Unterdrückung von 50% der Virusreplikation ergeben hat.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
5-Acetyl 109	1.3 ± 0.071	3.0 ± 3.0	>50	148
5-Acetyl-3-Me 110	0.54 ± 0.19	2.2 ± 2.3	36 ± 0.0	96
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu 111-mix	0.45 ± 0.31	0.87 ± 0.12	1.7 ± 0.42	49
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 111	0.18 ± 0.007	0.51 ± 0.39	0.55 ± 0.36	56
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 111	0.75 ± 0.049	1.2 ± 1.1	2.8 ± 1.1	64
5-(1-Acyl ^c) 106	0.65 ± 0.35	0.80 ± 0.13	>50	111
5-(1-Acyl ^c)-3-Me 107	0.18 ± 0.071	0.40 ± 0.23	0.73 ± 0.042	18
5-(1-Acyl ^c)-3- <i>t</i> Bu 108-mix	0.47 ± 0.099	0.88 ± 0.45	1.7 ± 2.0	49
5-(1-Acyl ^c)-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 108	0.21 ± 0.035	0.80 ± 0.57	0.27 ± 0.12	20
5-(1-Acyl ^c)-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 108	0.47 ± 0.34	1.1 ± 0.44	1.7 ± 0.42	67
d4T 2	0.85 ± 0.64	1.1 ± 0.49	69 ± 70	220

^a50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. ^b50% cytotoxische Konzentration. ^c1-Acyl = 1-Acetoxyvinyl.

Tab. 12 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der 5-Acetyl- (**109-111**) und 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Sal-d4TMPs (**106-108**) sowie der Referenzverbindung **2**

Aus diesem Grund werden auch die EC₅₀-Werte der anti-HIV-2-Wirkung von **109** (EC₅₀ = 3.0 ± 3.0 μM) und **110** (EC₅₀ = 2.2 ± 2.3 μM) in CEM/0-Zellen dahin gehend interpretiert, dass eine mit d4T **2** vergleichbare Wirkung vorliegt. Somit weisen alle hier aufgeführten Triester in den Wildtyp-Zellen eine solche auf. In CEM/TK⁻-Zellen wurde für beide in der 3-Position unsubstituierte Verbindungen ein kompletter Verlust der antiviralen Aktivität gefunden (**106**, **109**: EC₅₀ > 50 μM). Auch für 5-Acetyl-3-methyl-*cyclo*Sal-d4TMP **110** wird in CEM/TK⁻-Zellen im Sinne der obigen Betrachtungen eine mit **2** zu vergleichende Aktivität angenommen. Diese Verbindung vollzieht den TK-Bypass somit höchstwahrscheinlich auch nicht. Das 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-methyl-*cyclo*Sal-d4TMP **107** hingegen weist in CEM/TK⁻-Zellen einen fast vollständigen Erhalt der anti-HIV-2-Aktivität auf. Das gleiche Resultat liefern auch die Diastereomerengemische der beiden 3-*tert*-Butyl-substituierten Verbindungen (**108-mix** und **111-mix**). Da die antivirale Aktivität des Diastereomerengemischs gewöhnlich zwischen denen der getrennten Diastereomere liegt und der hier

erhaltene Wert für **108-mix** ($EC_{50} = 1.7 \pm 2.0 \mu M$) eine große Standardabweichung aufweist, liegt für diese Verbindung möglicherweise sogar ein nahezu vollständiger Aktivitätserhalt vor. Die Werte für die Cytotoxizitäten der in Tab. 12 (S. 103) angegebenen Verbindungen zeigen den bereits zuvor (vgl. Tab. 3, S. 41) beobachteten Trend: Je höher die Wirksamkeit, desto höher die Cytotoxizität.

Im Vergleich der getrennten Diastereomere der Verbindungen **108** und **111** ist in beiden Fällen das (S_P)-Diastereomer das antiviral besser wirksame, wobei für dieses Diastereomer auch jeweils ein voller Erhalt der Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen gegeben ist. Eine ausführliche Betrachtung zu der Konfigurationsabhängigkeit der antiviralen Aktivität sowie der Vergleich mit reinen Diastereomeren anderer *cycloSal*-d4TMPs erfolgt im anschließenden Kapitel 4.3.

Die hohe TK⁻-Aktivität der Verbindung **108** insgesamt, vor allem aber der volle Erhalt der Aktivität für (S_P)-**108**, bestätigt die auf Grundlage der Hydrolyse-Halbwertszeiten gemachte Vermutung (vgl. S. 96), dass diese Verbindung zu stabil ist, um eine schnelle Hydrolyse und somit einen intrazellulären Einschluss zu gewährleisten. Da die Verbindungen **108** und **111** eine nahezu identische Wirksamkeit aufweisen, ist im Hinblick auf das Konzept der enzymatischen Aktivierung die *tert*-Butylgruppe als Substituent in 3-Position somit ungeeignet, da der Effekt, der durch die Modifikation der Acetylgruppe zu einer Enolesterfunktion erreicht werden soll, nicht gegeben ist. Die gute Aktivität von **111** im Vergleich zu den anderen 5-Acetyl-*cycloSal*-d4TMPs (**109**, **110**) ist auf die deutlich höhere Hydrolysestabilität bei einer für die Zellaufnahme vorteilhaften höheren Lipophilie zurückzuführen.

Die Gegenüberstellung der Aktivitäten des 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-methyl- (**107**) und des 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP (**108**) macht deutlich, dass ein effektiver intrazellulärer Einschluss (der durch enzymatische Spaltung freigesetzten Acetyl-Verbindung) ebenso wichtig ist, wie eine genügend hohe Lipophilie für eine wirksame Membranpenetration. Im Hinblick auf eine zukünftige Weiterentwicklung solcher Prodrugs wäre also eine Fokussierung auf lipophilere 3-Methyl-substituierte Enolester-Verbindungen ratsam.

4.3. Zusammenhang zwischen der absoluten Konfiguration von *cycloSal*-d4T-monophosphaten und ihrer antiviralen Aktivität in Thymidin-Kinase-defizienten Zellen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben, konnten im Rahmen dieser Arbeit von einigen der dargestellten *cycloSal*-d4TMPs die Diastereomere mittels präparativer RP-HPLC getrennt und auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur des langsamer eluierenden Diastereomers des 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **63** (vgl. Abb. 31, S. 34) die absolute Konfiguration zugeordnet werden. Die Hydrolyse-Halbwertszeiten dieser Verbindungen in Phosphatpuffer (pH = 7.3) und RPMI/FCS(10%), das Elutionsverhalten sowie die antivirale Aktivität gegen HIV-2 in CEM/TK⁻-Zellen sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Verbindung	<i>fast/</i> <i>slow</i> ^a	<i>t</i> _{1/2} [h] PBS (pH = 7.3) ^b	<i>t</i> _{1/2} [h] RPMI/FCS (10%; pH = 7.6) ^c	EC ₅₀ [μM] CEM/TK ⁻ HIV-2 ^d
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 63	<i>fast</i>	1.3	1.7	2.6 ± 1.9
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 63	<i>slow</i>	1.0	1.6	10 ± 0.0
5-(di-AM ^e)-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 41	<i>fast</i>	7.9	2.9	0.29 ± 0.16
5-(di-AM ^e)-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 41	<i>slow</i>	8.3	2.8	3.9 ± 2.7
5-(di-iBOM ^f)-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 104	<i>fast</i>	3.3	(5.7) ^h	1.4 ± 0.91
5-(di-iBOM ^f)-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 104	<i>slow</i>	3.8	(4.5) ^h	3.6 ± 0.42
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 111	<i>fast</i>	2.3	3.2	0.55 ± 0.36
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 111	<i>slow</i>	2.3	2.0	2.8 ± 1.1
5-(1-Acyl ^g)-3- <i>t</i> Bu (S_P)- 108	<i>fast</i>	13.5	8.5	0.27 ± 0.12
5-(1-Acyl ^g)-3- <i>t</i> Bu (R_P)- 108	<i>slow</i>	11.3	3.7	1.7 ± 0.42

^aElutionsverhalten der Verbindungen in der RP-HPLC. ^bHydrolyse-Halbwertszeit in 25 mM Phosphatpuffer (pH = 7.3) in Stunden. ^cHydrolyse-Halbwertszeit in RPMI/FCS(10%) (pH = 7.6) in Stunden. ^d50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation in Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen. ^edi-AM = Diacetoxyethyl. ^fdi-iBOM = Diisobutyroxymethyl ^g1-Acyl = 1-Acetoxyvinyl. ^hWerte sind auf Grund einer geringen Wasserlöslichkeit nur bedingt aussagekräftig.

Tab. 13 Zusammenfassung einiger analytischer Daten der in dieser Arbeit als getrennte Diastereomere erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs

In allen hier getrennt erhaltenen Diastereomerenpaaren ist das (**S_P**)-konfigurierte Diastereomer antiviral aktiver. Mit Blick auf die Hydrolyse-Halbwertszeiten von **108** und **111** im RPMI/FCS(10%) könnte dieses auf eine erhöhte Stabilität dieses Diastereomers zurückgeführt werden. Für die Diastereomere der Verbindungen **41** und **63** ist allerdings keine Differenz in der Hydrolysestabilität gegeben, sodass

dieses nicht der alleinige ausschlaggebende Faktor für die unterschiedliche Aktivität sein kann. Somit ist von einer verbesserten Zellaufnahme des (*S_P*)-Diastereomers auszugehen, die zu einer erhöhten intrazellulären d4TMP-Freisetzung und einer daraus resultierenden erhöhten antiviralen Aktivität führt.

Auch in den wenigen Fällen, in denen vor dieser Arbeit die Separation der Diastereomere der *cycloSal*-d4TMPs erfolgreich durchgeführt werden konnte, war immer ein Diastereomer deutlich antiviral aktiver als das andere. Einige Beispiele sind in Tab. 14 aufgeführt.⁸⁵

Verbindung	<i>fast/</i> <i>slow</i> ^a	absolute Konfiguration (Literatur)	<i>t</i> _{1/2} [h] PBS (pH = 7.3) ^b	EC ₅₀ [μM] CEM/TK ⁻ HIV-2 ^c
3-Me 9	<i>fast</i>	<i>S_P</i>	15.1 ⁸⁶	0.70
3-Me 9	<i>slow</i>	<i>R_P</i>	42.2 ⁸⁶	0.063
3- <i>t</i> Bu 11	<i>fast</i>	<i>R_P</i>	155 ⁸⁶	0.19
3- <i>t</i> Bu 11	<i>slow</i>	<i>S_P</i>	132 ⁸⁶	5.0
3-OMe 16	<i>fast</i>	<i>S_P</i>	n.v. ^e	9.67
3-OMe 16	<i>slow</i>	<i>R_P</i>	n.v. ^e	0.12
3,5-di-Me 10	<i>fast</i>	<i>S_P</i>	n.v. ^e	0.38
3,5-di-Me 10	<i>slow</i>	<i>R_P</i>	n.v. ^e	0.08
3-Sal ^d 169 ⁵⁷	<i>fast</i>	<i>R_P</i>	1.4	0.70
3-Sal ^d 169 ⁵⁷	<i>slow</i>	<i>S_P</i>	1.1	1.5

^aElutionsverhalten der Verbindungen in der RP-HPLC. ^bHydrolyse-Halbwertszeit in 12.5 mM (**9**, **11**) bzw. 25 mM Phosphatpuffer (**169**, pH = 7.3) in Stunden. ^c50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation in Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen. ^d3-Sal = 3-(Saligenyl-3'-yl)-*cycloSal*-d4TMP (vgl. Abb. 99, S. 121). ^en.v. = nicht verfügbar.

Tab. 14 Zusammenfassung einiger analytischer Daten getrennter Diastereomere bereits bekannter *cycloSal*-d4TMPs

Da für diese Verbindungen keine Daten in RPMI/FCS(10%) vorliegen, können die nachfolgenden Betrachtungen nur auf Unterschiede in der Hydrolyse im Phosphatpuffer (pH = 7.3) gestützt werden. Für **10** und **16** liegen keinerlei Halbwertszeiten der getrennten Diastereomere vor. Aus den vorhandenen Daten wird deutlich, dass die unterschiedlich hohe antivirale Aktivität auch hier nicht immer auf eine große Differenz in den Hydrolysestabilitäten zurückgeführt werden kann. So ist

beispielsweise für **11-fast** nicht anzunehmen, dass bei den sehr hohen Stabilitäten beider Diastereomere der Unterschied von 23 Stunden so ausschlaggebend ist, dass er zu einer 26-fachen Verbesserung der antiviralen Aktivität führt. Für **9-slow** wäre dies schon eher anzunehmen, da es eine dreifach erhöhte Hydrolysestabilität im Vergleich zu **9-fast** aufweist. Zu bemerken ist noch, dass die absoluten Halbwertszeiten von **9** und **11** nicht mit den in dieser Arbeit bestimmten Halbwertszeiten zu vergleichen sind, da die Werte für **9** und **11** in einem 12.5 mM Phosphatpuffer bestimmt wurden. In dieser Arbeit betrug die Konzentration 25 mM. Dadurch passen die Werte der getrennten Diastereomere von **9** auch nicht mit der in Tab. 1 (S. 10) für das Diastereomergemisch angegebenen Halbwertszeit zusammen.

Inkubationsuntersuchungen der tritiummarkierten Diastereomere des 3-Methyl-cycloSal-d4TMPs **9** in CEM/0-Zellen zeigten deutlich, dass durch **9-slow** intrazellulär zehnmal mehr d4TMP freigesetzt wird als durch **9-fast**. Daraus resultiert auch eine fünffach höhere Konzentration an letztendlich antiviral wirksamen d4TTP (Tab. 15).⁸⁵ Hierdurch kann die deutlich bessere antivirale Aktivität von **9-slow** eindrucksvoll erklärt werden.

Verbindung	absolute Konfiguration (Literatur)	CEM/0-Zellen [pmol/10 ⁹ Zellen]		
		d4TMP	d4TDP	d4TTP
9-fast ^a	S _P	91	7.6	151
9-slow ^a	R _P	16	1.8	36
9-fast/9-slow (1:1) ^a	S _P /R _P	49	5.1	101

^aZellen wurden mit je 0.17 µM Triester inkubiert.

Tab. 15 Unterschiedliche Freisetzung von d4TMP, d4TDP und d4TTP aus den Diastereomeren des 3-Methyl-cycloSal-d4TMPs **9**

Ob diese effektivere intrazelluläre Freisetzung von d4TMP tatsächlich durch die absolute Konfiguration bedingt ist oder aber aus den unterschiedlichen Halbwertszeiten resultiert, kann durch dieses Experiment nicht eindeutig bewiesen werden. Durch die bereits oben erwähnten vielen Beispiele an Diastereomerenpaaren von cycloSal-d4TMPs, die eine ähnlich unterschiedliche antivirale Aktivität bei gleicher Hydrolysestabilität aufweisen, ist allerdings davon auszugehen, dass die absolute Konfiguration der entscheidende Parameter ist.

Sehr überraschend war allerdings, dass im Rahmen dieser Arbeit dem besser antiviral wirksamen Diastereomer immer die (S_P)-Konfiguration zugeordnet werden konnte, in sämtlichen Vorarbeiten dies aber immer für die (R_P)-Konfiguration erfolgte. Im Folgenden wurde deshalb versucht dieses zu ergründen.

Dabei wurde sich eine in unserem Arbeitskreis gemachte, interessante Beobachtung zu Nutze gemacht. So wurde in einem Inhibitions-Test festgestellt, dass *cycloSal-d4TMPs* Inhibitoren der humanen Butyrylcholinesterase (humane BChE) sind bzw. sein können. Untersuchungen der getrennten Diastereomere zeigten dabei, dass das antiviral weniger aktive S_P -Diastereomer stets das stärker inhibierende ist.⁸⁷ Die Stärke der Inhibition scheint also eng mit der absoluten Konfiguration verbunden. Da davon auszugehen ist, dass die stärkere Inhibition der BChE ein stereospezifischer Effekt ist, sollte ein einheitliches Ergebnis für die jeweilige Konfiguration erhalten werden. Somit sollten die Messungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen genau die gegenteiligen Ergebnisse zu den bisherigen liefern. Hier müssten die antiviral aktiveren S_P -Diastereomere folglich auch die größere Inhibition der humanen BChE aufweisen. Die theoretischen Grundlagen, die Durchführung sowie die Ergebnisse der für die hier synthetisierten Verbindungen durchgeführten Messungen sind in den nachfolgenden Kapiteln erläutert.

4.3.1. Biologische Bedeutung von Cholinesterasen

Cholinesterasen kommen in vielen Spezies vor und gehören zu der Klasse der Serin-Hydrolasen. Beim Menschen wird zwischen der hochspezifischen Acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7; Synonym: echte Cholinesterase) und der Butyrylcholinesterase (BChE, E.C. 3.1.1.8.; Synonym: Pseudocholinesterase) unterschieden. Die AChE hat ihr hauptsächliches Vorkommen in Neuronen und wirkt vor allem im Zentralen Nervensystem. Sie ist ein essentielles Enzym aus der Nervenreizleitung, dessen Aufgabe in der Regulierung des Neurotransmitters Acetylcholin besteht. Dieses geschieht durch die Spaltung von Acetylcholin zu Essigsäure und Cholin (Abb. 89, S. 109). Die BChE wird in der Leber produziert und kommt hauptsächlich im Pankreas sowie im Blutplasma vor. Sie spaltet neben Acetylcholin auch viele andere Ester und ist unter anderem für den Abbau von Kokain, Heroin und Aspirin im menschlichen Körper verantwortlich. Die natürliche biologische Rolle der BChE ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Ihr wird aber

eine Schutzfunktion der AChE zugeschrieben.⁸⁸ Des Weiteren haben neuere Forschungsergebnisse gezeigt, dass die BChE bei Menschen mit neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer Demenz eine große Rolle spielt. Je weiter diese Erkrankung fortschreitet, desto schwächer wird die Aktivität der AChE, während die Aktivität der BChE zunimmt. Neue Ansätze zur Therapie einer fortgeschrittenen Alzheimer-Erkrankung basieren deshalb nicht nur auf einer AChE-Inhibition, sondern auf einer dualen Inhibition beider Enzyme. Dadurch wird sich ein noch besserer Erhalt der Acetylcholin-Konzentration und somit eine bessere kognitive Leistungsfähigkeit dieser Patienten versprochen.^{89,90}

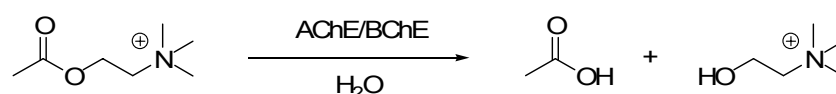


Abb. 89 Cholinesterase-katalysierte Hydrolyse von Acetylcholinchlorid

4.3.2. Inhibition von Cholinesterasen durch *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate

Viele Organophosphate sind bekannte starke Inhibitoren der AChE. Die bekanntesten Vertreter sind die Nervengifte Diisopropylfluorophosphat **170** (DFP), Tabun **171** und Sarin **172** sowie die Insektizide Malathion **173** und Salithion **174**. Das Salithion **174** bezieht seine Wirkung aus der Umwandlung in das Salioxon **175**, einen starken AChE-Hemmer, durch den Organismus der Insekten. Die Strukturen dieser Verbindungen sind in Abb. 90 gezeigt.

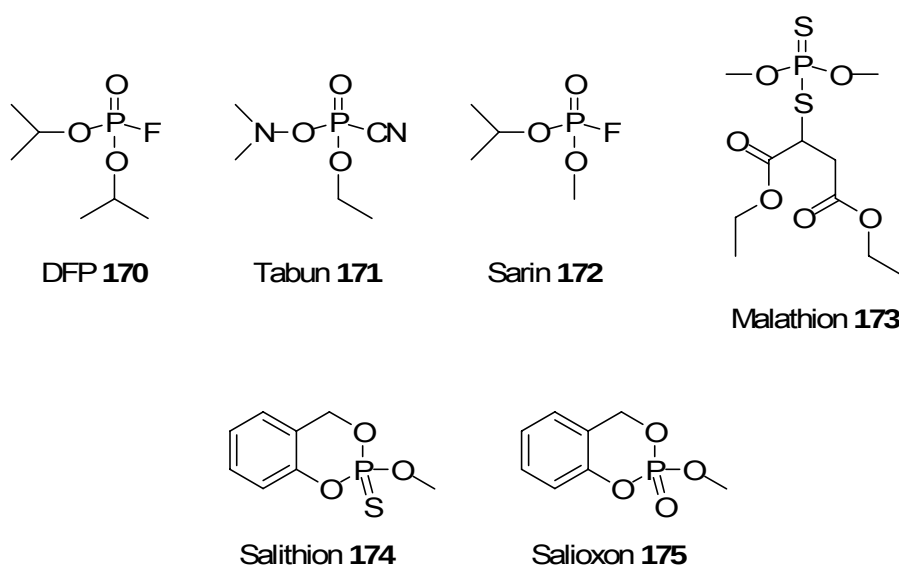
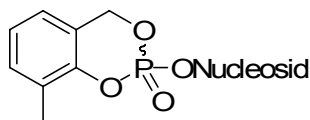


Abb. 90 Strukturen einiger starker AChE-Inhibitoren

Auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit des Salioxons **175** mit *cycloSal*-Pronucleotiden wurde für diese deshalb ebenfalls eine inhibitorische Potenz vermutet.

Ducho^{37,91} etablierte dazu zwei verschiedene Assays zur Untersuchung der Inhibitoraktivität von *cycloSal*-NMPs gegenüber Cholinesterasen. Der eine geht auf Arbeiten von *Rappaport et al.*⁹² zurück, der andere basiert auf Vorarbeiten von *Balzarini*. Für die Tests der AChE-Inhibition wurden gereinigte humane AChE sowie gereinigte AChE aus *electrophorus electricus* benutzt, für die Prüfung der BChE-Inhibition wurden gereinigte humane BChE und humanes Blutserum als BChE-Quelle verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate keine Inhibitoren der AChE sind, sehr wohl aber Inhibitoren der Butyrylcholinesterase sein können. Die Untersuchungen der BChE-Inhibition ergaben, dass humanes Blutserum eine geeignete BChE-Quelle für diese Untersuchungen ist. Die Versuche in diesem Medium lieferten vergleichbare Werte zu den Messungen mit gereinigter humaner BChE. Auch konnte gezeigt werden, dass beide der oben genannten Messverfahren eine fast identische Reihung in der Inhibitorstärke verschiedener untersuchter *cycloSal*-d4TMPs liefern. Da der Assay nach Balzarini schneller durchführbar ist und die für die Angabe von Inhibitoraktivitäten üblichen IC₅₀-Werte (IC₅₀ = die Substanzkonzentration, die 50% der untersuchten Reaktion inhibiert) liefert, wurde dieser für anschließende umfangreiche Tests standardmäßig verwendet.^{37,87} Die Methodik dieses Assays wird in Kapitel 4.3.3. ausführlich beschrieben.

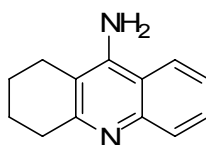
Die Stärke der BChE-Inhibition stellte sich als vom verwendeten Nucleosid abhängig heraus. Eine Testreihe mit verschiedenen 3-Methyl-*cycloSal*-NMPs zeigte beispielsweise für den 2',3'-Didesoxythymidin- (ddT) und den d4T-Triester (**9**) eine starke Inhibition der humanen BChE, bei der Verwendung von 2'-Desoxyguanosin (dG) oder BVdU wurde nur eine schwache Inhibition beobachtet (Tab. 16, S. 111).



Nucleosid	IC ₅₀ [μM] AChE (elec. elec.)	IC ₅₀ [μM] BChE (humanes Serum)
AZT 1	>50	40
dT	>50	36
ddT	>50	1.0
d4T 2	>50	1.2
BVdU	>50	>50
dG	>50	>50
dA	>50	28
ddA	>50	0.91
d4A	>50	1.2
ABC 5	>50	1.3

Tab. 16 IC₅₀-Werte der Diastereomerengemische einiger 3-Methyl-cycloSal-NMPs

Zurzeit existiert noch keine offizielle Klassifizierung von BChE-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Stärke. Als ein Beispiel für einen sehr leistungsfähigen Inhibitor soll hier Tacrin **176** (Abb. 91) angeführt werden. Dieser Cholinesterasehemmer wird unter dem Handelsnamen Cognex[®] vertrieben und ist zur Behandlung von leichter bis mittelschwerer Alzheimer Demenz vorgesehen.



Tacrin 176

Abb. 91 Struktur des Cholinesterasehemmers Tacrin **176** (Cognex[®])

Camps *et al.*⁹³ bestimmten für **176** eine IC₅₀ (diejenige Inhibitor-Konzentration, die eine Abnahme der Enzymaktivität um 50% bewirkt) von 43.9 ± 1.7 nM in humanem Blutserum. Für die Bewertung der Inhibitionsstärke der cycloSal-Prodrugs wurde deshalb selbst folgende Einteilung getroffen:

- IC₅₀ < 100 nM: sehr starker Inhibitor
- 100 nM < IC₅₀ < 1 μM: starker Inhibitor
- 1 μM < IC₅₀ < 10 μM: mittelstarker Inhibitor
- 10 μM < IC₅₀ < 100 μM: schwacher Inhibitor
- IC₅₀ > 100 μM: sehr schwacher Inhibitor

Balzarini konnte durch enzymkinetische Experimente den kompetitiven Charakter der BChE-Inhibition nachweisen, sodass die Bindung der Inhibitoren im aktiven Zentrum des Enzyms als belegt angesehen werden kann. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein Mechanismus der irreversiblen BChE-Inhibition durch *cycloSal*-NMPs postuliert (Abb. 92).³⁷

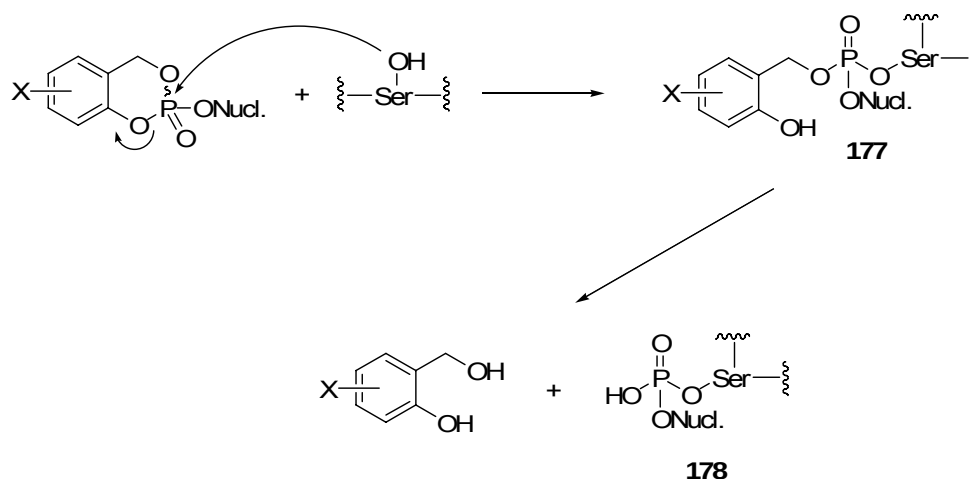


Abb. 92 Postulierter Mechanismus der irreversiblen BChE-Inhibition durch *cycloSal*-NMPs

In diesem wird davon ausgegangen, dass die Hydroxyfunktion des Serins aus der katalytischen Triade der BChE das Phosphatzentrum des *cycloSal*-NMPs angreift. Dadurch wird ein Benzylphosphattriester (**177**) ausgebildet, der anschließend nach dem bekannten Mechanismus hydrolysiert wird. Hieraus resultieren der entsprechende Salicylalkohol sowie ein Nucleosyl-Protein-Konjugat (**178**), welches keine katalytische Aktivität mehr besitzt. Die Phosphorylierungsaddukte **177** sind sehr hydrolyselabil, sodass ein Teil der belegten katalytischen Zentren auch wieder dephosphoryliert werden kann. Der zweite Schritt dieser sogenannten *suicide inhibition* führt dann dazu, dass dieser Prozess irreversibel wird. Er ist dem „Aging“ der irreversiblen Cholinesterase-Inhibition durch Organophosphate (dort Abspaltung eines Alkylrestes aus dem Phosphorylierungsaddukt) analog.

Der Einfluss des Substituentenmusters an der *cycloSal*-Maske auf die inhibitorische Potenz wurde anhand vieler *cycloSal*-d4TMPs untersucht. Sterisch anspruchsvolle Alkyl-Reste am aromatischen Ring reduzieren beispielsweise die Inhibitorstärke. Vor allem *cycloSal*-d4TMPs mit Alkylgruppen in der 3-Position und der 5-Position (3,5-Me (**10**): $IC_{50} = 46 \mu M$, 3,5-*t*Bu (**12**): $IC_{50} > 50 \mu M$) zeigen kaum noch eine Inhibition der BChE. Für diese Arbeit besonders entscheidend ist allerdings die bereits oben erwähnte Tatsache, dass von den getrennten Diastereomeren der

cycloSal-d4TMPs **9** (3-Me) und **11** (3-*t*Bu) jeweils nur ein Diastereomer die Inhibition der Butyrylcholinesterase verursacht. Dieses ist in beiden Fällen auch das antiviral weniger aktive Diastereomer (vgl. Tab. 17, S. 115). Denselben Trend zeigen auch getrennte Diastereomere anderer *cycloSal*-NMPs.⁸⁷ Bevor nun auf die ermittelten IC₅₀-Werte der getrennten Diastereomere einiger bekannter sowie der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten *cycloSal*-d4TMPs eingegangen wird, soll zunächst die Methodik der Messungen erklärt werden.

4.3.3. Methodik des verwendeten Cholinesterase-Assays

Der hier zur Bestimmung der BChE-Inhibition verwendete Cholinesterase-Assay beruht auf der photometrischen Verfolgung der in Abb. 89 (S. 109) gezeigten enzymatischen Reaktion in Anwesenheit des jeweiligen potenziellen Inhibitors. Die einzelnen Analyseproben sind dabei wie folgt zusammengesetzt:

- 430 μ L Wasser
- 370 μ L *m*-Nitrophenol-Lösung (0.75 g/L) in Phosphatpuffer (pH = 7.8)
- 40 μ L Acetylcholinchlorid-Lösung (750 mg/5 mL Wasser)
- 40 μ L Natriumchlorid-Lösung (0.15 M, versetzt mit Chloroform)
- 20 μ L zu untersuchendes *cycloSal*-Pronucleotid in DMSO
- 100 μ L humanes Blutserum (als BChE-Quelle)

Die Cholinesteraseaktivität wird dadurch gemessen, dass *m*-Nitrophenol in dem schwach alkalisch gepufferten Medium als Indikator fungiert. Es liegt bei pH = 7.8 teilweise deprotoniert als gelbes *m*-Nitrophenolat (Absorptionsmaximum bei λ = 420 nm) vor. Die durch den BChE-katalysierten Abbau des Acetylcholins freigesetzte Essigsäure führt zu einer Ansäuerung des Mediums und einer dadurch bedingten Abnahme der *m*-Nitrophenolat-Konzentration. Diese Abnahme und damit das Fortschreiten der enzymatischen Reaktion werden UV-spektroskopisch verfolgt. In Gegenwart eines Inhibitors wird die Reaktion verlangsamt, was eine geringere Extinktionsabnahme zur Folge hat. Das Prinzip dieses Assays ist in Abb. 93 (S. 114) grafisch dargestellt. Die Messungen werden für jedes *cycloSal*-Pronucleotid bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt und die Extinktionsabnahmen bei fünf und 15 Minuten ermittelt. Die so erhaltenen Werte werden gegen die Inhibitor-Konzentrationen aufgetragen. Nach einer linearen Regression des

pseudolinearen Bereichs kann dann über die Geradengleichung, in Bezugnahme auf einen Blindwert ohne Inhibitor, der IC_{50} -Wert berechnet werden. Die genaue experimentelle Durchführung sowie die Auswertung dieses Assays ist in Kapitel 9.5. (S. 276 ff.) beschrieben.

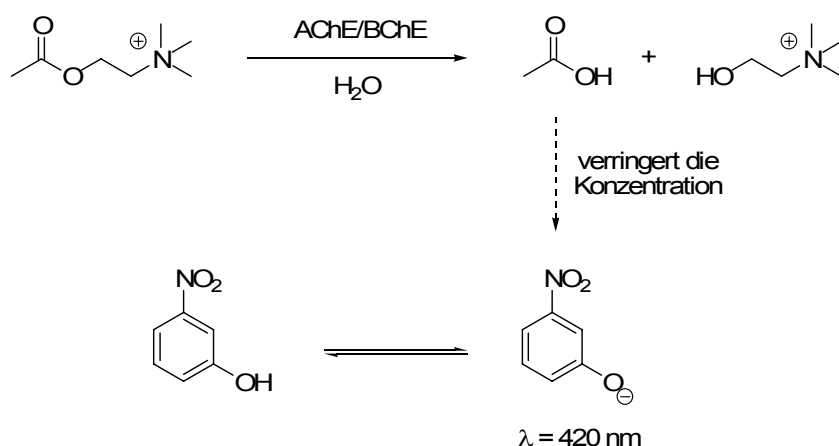


Abb. 93 Prinzip des verwendeten Cholinesterase-Assays

Die für diesen Assay verwendeten Lösungen konnten ursprünglich in einem Cholinesterase-Inhibitionstest-Kit der Firma Sigma (Produktnummer 420-MC) kommerziell erworben werden. Dieses Kit ist seit einigen Jahren nicht mehr am Markt erhältlich, sodass die verwendeten Lösungen selbst hergestellt werden mussten. Der Chloroformgehalt der 0.15 M Natriumchlorid-Lösung beträgt dabei laut Sicherheitsdatenblatt 0.2%.⁹⁴ Die genaue Konzentration des für die *m*-Nitrophenol-Lösung verwendeten Phosphatpuffers konnte trotz ausführlicher Recherchen nicht ermittelt werden. Deswegen wurde der für die Hydrolysestudien standardmäßig verwendete 50 mM Puffer verwendet und mittels 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf den pH-Wert von 7.8 eingestellt. In dem von *Rappaport et al.* entwickelten Test wird ein Phosphatpuffer vergleichbarer Konzentration eingesetzt.⁹² Um die Verwendbarkeit dieser selbst angesetzten Lösungen zu zeigen, wurden zunächst die IC_{50} -Werte einiger Verbindungen bestimmt, die mittels des gleichen Verfahrens aber mit den käuflich erworbenen Lösungen bestimmt wurden. Diese Werte sind mit anderen, eigens bestimmten Werten für getrennte Diastereomere von *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation in der Tab. 17 (S. 115) zusammengefasst.

4.3.4. Butyrylcholinesterase-Inhibition diastereomerenreiner *cycloSal*-d4T-monophosphate

Die Werte der Proben, die zum Vergleich der selbst hergestellten mit den käuflich erworbenen Lösungen vermessen wurden, zeigen, dass hier im Rahmen der Messgenauigkeit gleiche Ergebnisse erzielt werden können. Einzig der Wert für **11-slow** weicht stark von dem in der Literatur angegebenen ab. Dieser wurde allerdings nicht in unserem Arbeitskreis, sondern von Prof. J. Balzarini an der Universität Leuven bestimmt. Die selbst bestimmten Werte der getrennten Diastereomere von **11** sind aber mit dem schon zuvor bestimmten Wert für **11-mix** ($IC_{50} = 30 \mu M$)³⁷ konform, sodass die Werte für **11-fast** und **11-slow** als korrekt angesehen werden können. In Tab. 17 sind nur die bei fünf Minuten Reaktionszeit bestimmten IC_{50} -Werte aufgeführt, da nicht für alle Substanzen auch die bei 15 Minuten bestimmten Werte vorlagen. Die Proben **9-fast**, **9-slow**, **10-fast**, **10-slow** und **169-slow** lagen dabei noch aus anderen Arbeiten getrennt vor, **169-fast** war nicht mehr vorhanden. Für **11** war das Diastereomerengemisch noch in ausreichender Menge vorhanden, sodass nur die Trennung mittels präparativer RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v) selbst durchgeführt wurde.

Verbindung	absolute Konfiguration (Literatur)	$IC_{50} [\mu M]^a$ BChE (Literatur)	$IC_{50} [\mu M]^a$ BChE (eigene Messung)	$EC_{50} [\mu M]$ CEM/TK ⁻ HIV-2 ^b
9-fast (3-Me)	<i>S_P</i>	0.24	0.87	0.70
9-slow (3-Me)	<i>R_P</i>	>50	115	0.063
10-fast (3,5-di-Me)	<i>S_P</i>	n.v. ^d	23.2	0.38
10-slow (3,5-di-Me)	<i>R_P</i>	n.v. ^d	>250	0.08
11-fast (3- <i>t</i> Bu)	<i>R_P</i>	>50	>250	0.19
11-slow (3- <i>t</i> Bu)	<i>S_P</i>	2.6	15.9	5.0
169-fast (3-Sal ^c)	<i>R_P</i>	>50	n.v. ^d	0.70
169-slow (3-Sal ^c)	<i>S_P</i>	0.79	0.90	1.5
9-mix (3-Me)	<i>R_P/S_P</i>	1.2	2.9	0.048

^a IC_{50} -Werte gegenüber humaner BChE (Serum) für fünf Minuten Reaktionszeit. ^b50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation in Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen.

^c3-Sal = 3-(Saligenyl-3'-yl)-*cycloSal*-d4TMP (vgl. Abb. 95, S. 118). ^dn.v. = nicht verfügbar.

Tab. 17 Literaturbekannte und selbst bestimmte Inhibitor-Aktivitäten einiger diastereomerenreiner *cycloSal*-d4TMPs und von **9-mix** gegenüber humaner BChE im Vergleich zu ihren anti-HIV-2-Aktivitäten in CEM/TK⁻-Zellen

Wie bereits erwähnt, zeigt bei diesen Verbindungen in allen Fällen dasjenige Diastereomer die deutlich geringere Inhibitor-Aktivität bei gleichzeitig besserer antiviraler Aktivität, dem die S_P -Konfiguration zugeordnet wurde. Um einen deutlicheren Einblick in die Differenzen der Inhibitor-Potenziale zu erlangen, wurden im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten IC_{50} -Werte bis zu 250 μM ermittelt, auch wenn die eigentliche Inhibitor-Aktivität in diesem Bereich nicht mehr von großer biologischer Relevanz sein sollte. Für einen Fall sind erst in diesem Bereich überhaupt messbare Unterschiede zu zeigen (vgl. Werte für **108**, Tab. 18).

In Tab. 18 sind die IC_{50} -Werte der im Rahmen dieser Arbeit diastereomerenrein erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs zusammengefasst.

Verbindung	zugeordnete absolute Konfiguration	IC_{50} [μM] ^a BChE (5 min)	IC_{50} [μM] ^a BChE (15 min)	EC_{50} [μM] CEM/TK ⁻ HIV-2 ^b
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu 63-fast	S_P	>250	>250	2.6 ± 1.9
5-Formyl-3- <i>t</i> Bu 63-slow	R_P	9.7	6.8	10 ± 0.0
5-(di-AM ^c)-3- <i>t</i> Bu 41-fast	S_P	>250	242 ^f	0.29 ± 0.16
5-(di-AM ^c)-3- <i>t</i> Bu 41-slow	R_P	62	26	3.9 ± 2.7
5-(di-iBOM ^d)-3- <i>t</i> Bu 104-fast	S_P	>250	>250	1.4 ± 0.91
5-(di-iBOM ^d)-3- <i>t</i> Bu 104-slow	R_P	18.7	6.9	3.6 ± 0.42
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu 111-fast	S_P	>250	>250	0.55 ± 0.36
5-Acetyl-3- <i>t</i> Bu 111-slow	R_P	66	44	2.8 ± 1.1
5-(1-Acyl ^e)-3- <i>t</i> Bu 108-fast	S_P	>250	>250	0.27 ± 0.12
5-(1-Acyl ^e)-3- <i>t</i> Bu 108-slow	R_P	>250	165	1.7 ± 0.42

^a IC_{50} -Werte gegenüber humaner BChE (Serum). ^b50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation in Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen. ^cdi-AM = Diacetoxymethyl. ^ddi-iBOM = Diisobutyroxymethyl. ^e1-Acyl = 1-Acetoxyvinyl. ^fProbe leicht mit dem inhibierenden **41-slow** verunreinigt.

Tab. 18 Inhibitor-Aktivitäten der im Rahmen dieser Arbeit diastereomerenrein erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs gegenüber humaner BChE im Vergleich zu ihren anti-HIV-2-Aktivitäten in CEM/TK⁻-Zellen

Auch bei diesen Verbindungen ist stets das antiviral weniger aktive Diastereomer dasjenige, das eine stärkere Inhibition der Butyrylcholinesterase aufweist. Dabei konnte für alle *fast*-Derivate keine messbare Inhibition gefunden werden. Für **41-slow** wurde bei 15 Minuten Reaktionszeit eine sehr schwache Inhibition detektiert, diese ist aber höchstwahrscheinlich durch eine leichte Verunreinigung der Probe durch das inhibierende **41-fast** verursacht. Bei den inhibierenden *slow*-Derivaten zeigt einzig **63-slow** überhaupt eine mittelstarke Inhibition, **41-slow**, **104-slow** und **111-slow**

stellen nur schwache Inhibitoren dar. Für den sehr schwachen BChE-Inhibitor **108-slow** liegt nur bei 15 Minuten Reaktionszeit eine inhibierende Konzentration $< 250 \mu\text{M}$ vor (IC_{50} (15 min) = $165 \mu\text{M}$). Im Verlauf der Messung war auch bei fünf Minuten Reaktionszeit eine Inhibition zu erkennen, die Prodrugkonzentration, die zu 50% die BChE inhibieren würde, liegt aber deutlich über $250 \mu\text{M}$. Da in den mit **108-fast** durchgeführten Messungen nicht einmal bei einer Inhibitorkonzentration von $250 \mu\text{M}$ ansatzweise eine Inhibition zu erkennen war, bestätigt sich allerdings auch hier der allgemeine Trend der konfigurationsabhängigen BChE-Inhibition.

Nicht bestätigt werden konnte hingegen die in allen früheren Arbeiten gemachte Beobachtung, dass die S_P -konfigurierten Diastereomere die BChE stärker oder überhaupt hemmen, während die antiviral besser aktiven R_P -konfigurierten Diastereomere keine bzw. nur eine deutlich geringere Inhibition aufweisen. Vielmehr zeigen die selbst dargestellten Verbindungen genau den umgekehrten Fall (vgl. Tab. 18, S. 116). Die Tatsache, dass eine Konfigurationsabhängigkeit der BChE-Inhibition aber eindeutig gezeigt werden konnte und es keinerlei Anhaltspunkte dafür gab, weshalb bei allen zuvor dargestellten Verbindungen genau das entgegengesetzt konfigurierte Diastereomer einen Inhibitor darstellen sollte, legte die Vermutung nahe, dass entweder die in vorigen Arbeiten getroffene oder die eigene Zuordnung der absoluten Stereokonfiguration fehlerhaft ist. Da alle im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Konfigurationen in Bezug auf die mittels der Röntgenkristallstruktur von **63-slow** (vgl. Abb. 31, S. 34) eindeutig bewiesene absolute Konfiguration zugeordnet wurden, wurde das Verfahren der in früheren Arbeiten getroffenen Zuordnungen näher betrachtet.

Dieses basiert auf der Anwendung der CD-Spektroskopie. Hierzu war zunächst als Vergleichsverbindung das 5-Chlor-cycloSal(-)-menthyl-monophosphat **179** synthetisiert und die Diastereomere mittels präparativer RP-HPLC getrennt worden. Diese konnten anschließend kristallisiert und somit die absolute Konfiguration mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Die in Methanol aufgenommenen CD-Spektren (Abb. 94, S. 118) zeigten für das R_P -Diastereomer einen negativen Cotton-Effekt bei einer Wellenlänge von etwa 225 nm. Das S_P -Diastereomer wies an dieser Stelle einen positiven Cotton-Effekt auf. Da der Menthyl-Teil von **179** kein Chromophor besitzt und somit von diesem kein Einfluss auf die Absorption des UV-Lichts zu erwarten ist, wurde dieser entgegengesetzte Effekt auf die unterschiedliche

Stereochemie am Phosphat-Zentrum zurückgeführt. In Analogie dazu wurden von den getrennten Diastereomeren der *cycloSal*-d4TMPs ebenfalls CD-Spektren in Methanol aufgenommen und anhand der Korrelation der gefundenen Cotton-Effekte mit denen der Diastereomere von **179** die absolute Konfiguration indirekt bestimmt.⁸⁵

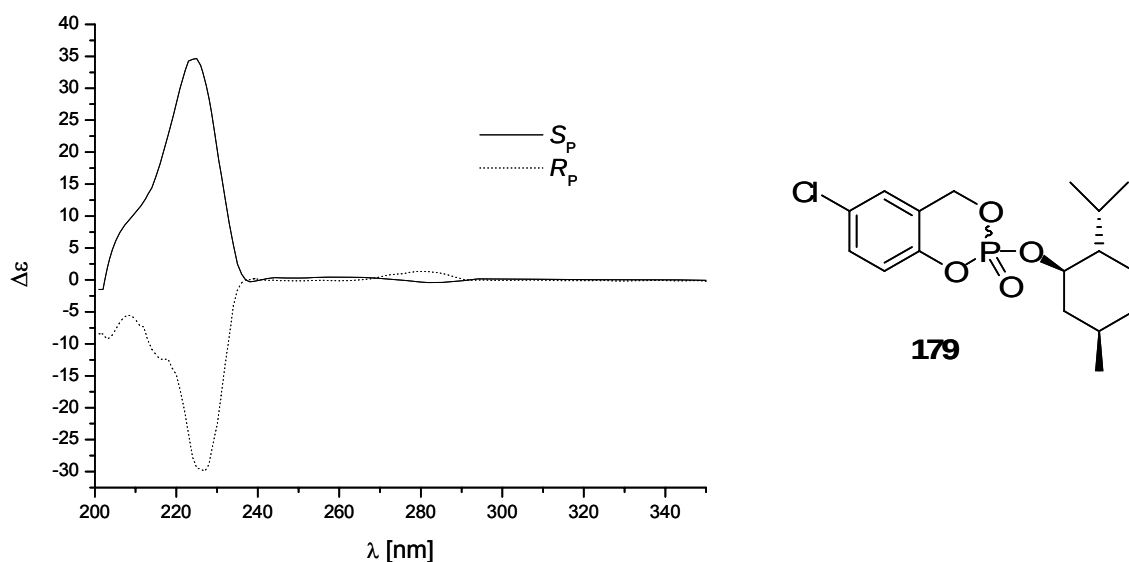


Abb. 94 CD-Spektren der getrennten Diastereomere von **179**

Für einige *cycloSal*-d4TMPs (**6** (5-Cl)⁸⁵, **16** (3-OMe)⁹⁵, **169** (3-Sal)³⁷) lieferte diese Methode eindeutige Ergebnisse. In diesen Fällen hat ein Diastereomer in dem Wellenlängenbereich von 225 bis 230 nm einen positiven, das andere Diastereomer einen negativen Cotton-Effekt. Die CD-Spektren der getrennten Diastereomere von **169** sind in Abb. 95 gezeigt (CD-Spektren von **6**, **16** im Anhang II, S. IV).

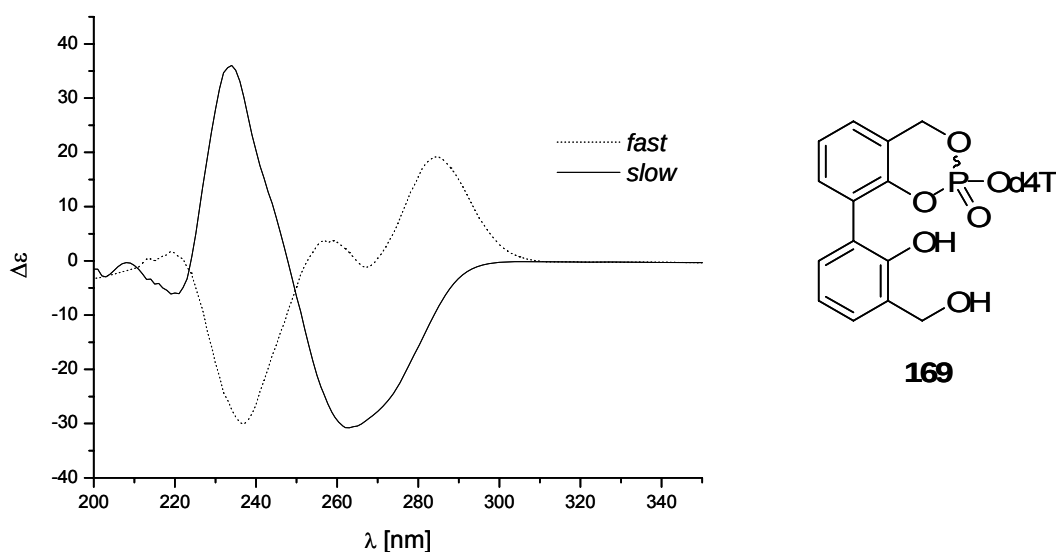


Abb. 95 CD-Spektren der getrennten Diastereomere des 3-Sal-*cycloSal*-d4TMPs **169**

Da **169-slow** den positiven Cotton-Effekt bei ungefähr 235 nm aufwies, wurde dieser Verbindung also die S_P -Konfiguration zugeordnet. Dementsprechend wurde **169-fast** mit (R_P)-**169** gleichgesetzt. Die leichten Unterschiede in der Wellenlänge, bei der das Maximum des Cotton-Effekts liegt, resultieren daraus, dass der Circular dichroismus ein Effekt des gesamten Moleküls ist und sich somit einzelne Cotton-Effekte überlagern oder leicht verschieben können. Für einige andere getrennte Diastereomere von *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation (**9** (3-Me), **11** (3-*t*Bu)) lies sich aus den CD-Spektren kein eindeutiges Ergebnis ablesen. Bei diesen Verbindungen zeigten jeweils beide Diastereomere einen positiven Cotton-Effekt bei ungefähr 220 nm. Allerdings waren die Effekte, bei gleichen Konzentrationen der vermessenen Lösungen, bei einem Diastereomer immer wesentlich intensiver als bei dem anderen. So beträgt $\Delta\epsilon$ bei einer Wellenlänge von 220 nm für **9-fast** ungefähr 15, für **9-slow** nur ungefähr 3.5 (Abb. 96). Die getrennten Diastereomere von **11** bieten ein vergleichbares Bild, nur dass hier das *slow*-Diastereomer den deutlich stärkeren Cotton-Effekt zeigt (Anhang II, S. V).

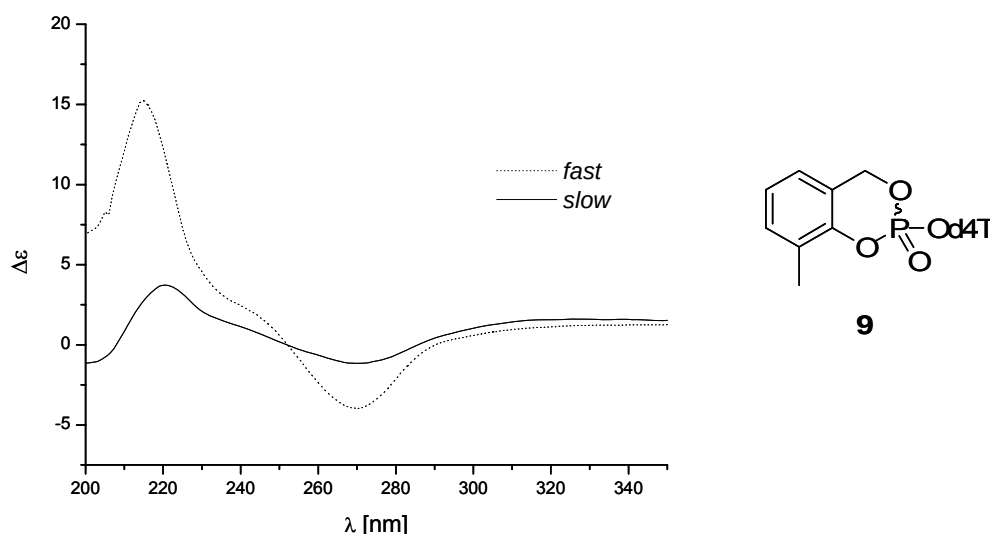


Abb. 96 CD-Spektren der getrennten Diastereomere des 3-Me-*cycloSal*-d4TMPs **9**

Da also **9-slow** und **11-fast** den intensiveren positiven Cotton-Effekt bei 220 nm zeigten und auch besser antiviral aktiv als das jeweilige andere Diastereomer waren (vgl. Tab. 17, S. 115), wurde ihnen (in Anbetracht der Ergebnisse der Verbindung **16** und den CD-Spektren der getrennten Diastereomere von **6** (Verbindung **169** wurde erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt synthetisiert)) die S_P -Konfiguration zugeordnet.^{42,85} Für Verbindung **10** (3,5-di-Me-*cycloSal*-d4TMP) konnte die Zuord-

nung nicht vollständig nachvollzogen werden, da weder CD-Spektren noch genügend Substanz zur eigenen Aufnahme dieser vorlagen.

Der Verlauf des CD-Spektrums desjenigen Diastereomers von **9**, **11**, **16** und **169**, dem so die S_P -Konfiguration zugeordnet wurde, ist nahezu konstant. So treten in allen Fällen ausschließlich zwei markante Cotton-Effekte auf: Ein positiver im Wellenlängenbereich von 220-240 nm und ein negativer zwischen 260-270 nm. Das CD-Spektrum des *slow*-Derivats des 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMPs **63** ((B) in Abb. 87, S. 99) zeigt ebenfalls solch einen Verlauf (positiver Cotton-Effekt: 220 nm, negativer Cotton-Effekt: 255 nm). Dessen absolute Konfiguration ist allerdings mittels Röntgenstrukturanalyse als R_P , also als genau entgegengesetzt konfiguriert, bestimmt (Abb. 31, S. 34).

In Anbetracht all dieser aufgeführten Indizien (antivirale Aktivität, BChE-Inhibition, Verlauf der CD-Spektren) ist also davon auszugehen, dass die früher getroffene Zuordnung der absoluten Konfiguration nicht korrekt ist. Eine genau umgedrehte Zuordnung der Stereokonfiguration am Phosphoratom für die in Tab. 17 (S. 115) aufgeführten Diastereomerenpaare ergibt auch im Vergleich mit den in Tab. 18 (S. 116) aufgeführten Verbindungen ein biologisch nachvollziehbares Gesamtbild. So ist nun bei allen bisher diastereomerenrein erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs, für die sowohl die antivirale Aktivität gegen HIV-2 in CEM/TK⁻-Zellen als auch die Stärke der Inhibition der Butyrylcholinesterase bekannt ist, das S_P -konfigurierte Diastereomer dasjenige, das besser antiviral aktiv und wesentlich schwächer bzw. gar nicht BChE-inhibierend wirkt. In Tab. 19 (S. 121) sind die Werte für die in vorigen Arbeiten diastereomerenrein erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs noch einmal mit der – auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse – neu zugeordneten absoluten Konfiguration aufgeführt. Im Folgenden werden ausschließlich diese neu zugeordneten absoluten Konfigurationen für die Diskussion verwendet.

Zusammenfassend soll noch bemerkt sein, dass somit über die Korrelation der antiviralen Aktivität und den Ergebnissen des nun wieder etablierten BChE-Inhibitionstests eine Möglichkeit zur Verfügung steht, von neuen diastereomerenreinen *cycloSal*-d4TMPs die absolute Konfiguration auch ohne eine Röntgenkristallstruktur abzuleiten. Diese könnte vor allem im Zuge der Versuche der

diastereoselektiven Synthese von *cycloSal*-d4TMPs (vgl. Kapitel 2.3.6.), beispielsweise hinsichtlich der Aufklärung des Reaktionsmechanismus des Austausches eines Aktivimids gegen ein Nucleosid(analogon) (Verlauf unter Inversion oder Retention der absoluten Konfiguration), von großem Nutzen sein. Prinzipiell sollte dies natürlich auch für alle weiteren *cycloSal*-NMPs möglich sein, eine Trennbarkeit der Diastereomere und eine messbare Inhibition der BChE (vgl. Abhängigkeit der BChE-Inhibition vom verwendeten Nucleosid, Tab. 16, S. 111) vorausgesetzt.

Verbindung	neu zugeordnete absolute Konfiguration	IC ₅₀ [μM] ^a BChE (Literatur)	IC ₅₀ [μM] ^a BChE (eigene Messung)	EC ₅₀ [μM] CEM/TK ⁻ HIV-2 ^b
9-fast (3-Me)	R_P	0.24	0.87	0.70
9-slow (3-Me)	S_P	>50	115	0.063
10-fast (3,5-di-Me)	R_P	n.v. ^d	23.2	0.38
10-slow (3,5-di-Me)	S_P	n.v. ^d	>250	0.08
11-fast (3- <i>t</i> Bu)	S_P	>50	>250	0.19
11-slow (3- <i>t</i> Bu)	R_P	2.6	15.9	5.0
169-fast (3-Sal ^c)	S_P	>50	n.v. ^d	0.70
169-slow (3-Sal ^c)	R_P	0.79	0.90	1.5

^aIC₅₀-Werte gegenüber humaner BChE (Serum) für fünf Minuten Reaktionszeit. ^b50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation in Thymidin-Kinase-defizienten CEM-Zellen.

^c3-Sal = 3-(Saligenyl-3'-yl)-*cycloSal*-d4TMP (vgl. Abb. 95, S. 118). ^dn.v. = nicht verfügbar.

Tab. 19 Literaturbekannte und selbst bestimmte Inhibitor-Aktivitäten einiger diastereomerenreiner *cycloSal*-d4TMPs gegenüber humaner BChE im Vergleich zu ihren anti-HIV-2-Aktivitäten in CEM/TK⁻-Zellen mit neu zugeordneter absoluter Konfiguration

Somit kann auch für zwei bisher nicht erwähnte *cycloSal*-d4TMPs aus der Reihe der „lock-in“-modifizierten Verbindungen, bei denen eine Trennung der Diastereomere möglich war⁹⁶ und bereits EC₅₀- und IC₅₀-Werte vorlagen³⁷, die absolute Konfiguration zugeordnet werden (3-(Me-Pr)-d4TMP **180** und 3-(Ac-Et)-d4TMP **181**; Strukturen im Anhang II, S. V-VI). In beiden Fällen ist das *fast*-Diastereomer *R_P*-konfiguriert und das *slow*-Diastereomer *S_P*-konfiguriert.

Auffällig ist die Tatsache, dass nicht nur die CD-Spektren der *R_P*-konfigurierten Diastereomere von **9**, **10**, **11**, **63** und **169** den charakteristischen Verlauf mit einem positiven und einem negativen Cotton-Effekt zeigen. Auch von allen weiteren im Rahmen dieser Arbeit diastereomerenrein erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs zeigt das

R_P -konfigurierte Diastereomer immer solch eine Form des CD-Spektrums (**111**: (D) in Abb. 87, S. 99; **41**, **104**, **108**: Anhang II, S. VI-VII), wobei für **104** der positive Cotton-Effekt nicht so intensiv ausgeprägt ist wie bei den anderen Verbindungen. Auch für die R_P -Diastereomere von **180** und **181** (CD-Spektren im Anhang II, S. V-VI)⁹⁶ sowie für (R_P)-**6** konnte ein vergleichbarer Verlauf beobachtet werden. Dieses Phänomen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass alle R_P -konfigurierten Diastereomere eine ähnliche räumliche Struktur aufweisen. Hierzu soll nun die Röntgenkristallstruktur von (R_P)-**63** näher betrachtet werden. Diese wurde bereits in Abb. 31 (S. 34) präsentiert, soll hier dennoch noch einmal gezeigt werden (Abb. 97).

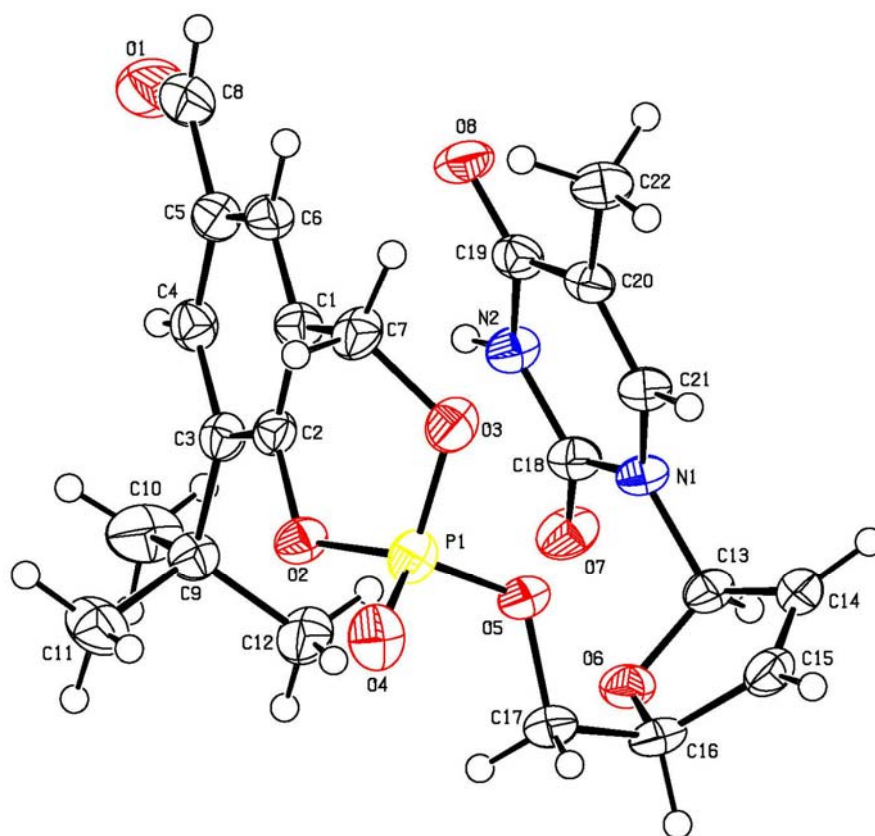


Abb. 97 Einkristallstruktur von (R_P)-**63**

Das Molekül (R_P)-**63** besteht aus zwei rigiden Untereinheiten mit einem Torsionswinkel von -62.4° um die Atomachse O5–C17–C16–O6, der ursächlich für die starke Faltung ist. Durch diese befinden sich die beiden aromatischen Systeme – der Benzolring der *cycloSal*-Maske und der Thymidinring – recht nah beieinander. Der Abstand der beiden Ringmittelpunkte beträgt 4.035 Å, wobei der Abstand der beteiligten Atome zwischen 3.546 Å (C5...C19) und 4.557 Å (N1...C2) liegt. Dies deutet auf eine π - π -Wechselwirkung der beiden aromatischen Ringe hin. Dabei

stehen die Ringe allerdings nicht genau parallel zueinander, ihre (über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechneten) Ebenen sind um ungefähr 23° zueinander verdreht.

Solch eine π - π -Wechselwirkung war bereits in Fluoreszenzstudien des 3-Methyl-*cycloSal*-m⁵KMPs (**182**) und des 3-Methyl-*cycloSal*-dm⁵KMPs (**183**) postuliert worden. Die entsprechenden Nucleoside m⁵K (**184**) und dm⁵K (**185**) sind intrinsisch stark fluoreszierend, so dass die *cycloSal*-Triester **182** und **183** mit dem Ziel der Anwendung für Fluoreszenz-Labeling-Studien synthetisiert wurden. Durch diese wurden sich genauere Kenntnisse über die Zellaufnahme und die intrazelluläre Verteilung von *cycloSal*-Pronucleotiden erhofft. Die Strukturformeln der Verbindungen **182-185** sind in Abb. 98 gezeigt.

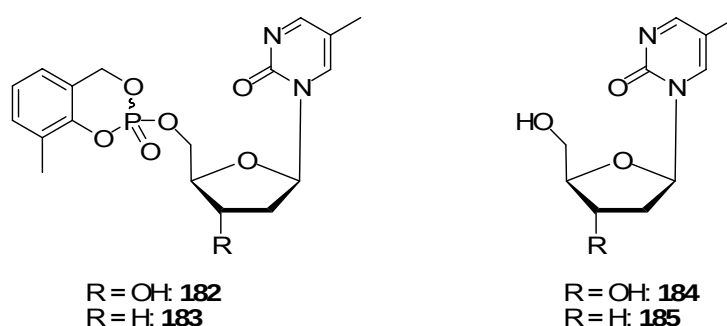


Abb. 98 Strukturformeln der Verbindungen **182-185**

In den Fluoreszenzuntersuchungen wurden für die *cycloSal*-Triester **182** und **183** um 40% geringere Fluoreszenz-Intensitäten bestimmt als es für die entsprechenden Nucleoside **184** bzw. **185** der Fall war. Durch Hydrolysestudien mit **182** und **183** in Phosphatpuffer (pH = 7.3) konnte gezeigt werden, dass die Nucleoside **184** und **185** nach erfolgter Abspaltung der Maske ihre volle Fluoreszenzintensität zurückerlangen. Deshalb wurde das partielle „Fluoreszenz-Quenching“ auf eine Wechselwirkung des Benzolrings der *cycloSal*-Maske mit dem Pyrimidin-2-on-Ring des jeweiligen Nucleosids zurückgeführt.⁹⁷ Diese Untersuchungen sind somit ein Hinweis darauf, dass eine Molekülfaltung mit π - π -Wechselwirkungen wie bei (*R_P*)-**63** nicht nur im Kristall auftritt, sondern anscheinend auch in Lösung erhalten bleibt.

In Bezug auf die in Abb. 97 (S. 122) gezeigte Kristallstruktur von (**R_P**)-**63** und die gleichartigen Verlaufsformen der CD-Spektren der *R_P*-Diastereomere der in diesem Kapitel vorgestellten *cycloSal*-d4TMPs lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Alle *R_P*-konfigurierten Diastereomere besitzen eine zu (**R_P**)-**63** vergleichbare Molekülfaltung. Diese führt zu einer sehr ähnlichen Verlaufsform der CD-Spektren, da die Grundstruktur annähernd identisch ist und nur die Einflüsse der Substituenten der *cycloSal*-Maske verschieden sind. Außerdem könnte das partielle „Fluoreszenz-Quenching“ bei den Verbindungen **182** und **183** nur vom *R_P*-konfigurierten Diastereomer verursacht werden. Ein Quenching um 50% durch das Diastereomergemisch, also ein vollständiges Quenching durch das *R_P*-Diastereomer, liegt wahrscheinlich aus dem Grund der Verdrillung der beiden aromatischen Systeme gegeneinander nicht vor. Möglicherweise besitzt das *S_P*-konfigurierte Diastereomer im Gegensatz dazu eine lineare Struktur oder zumindest eine Faltung mit nur geringen bzw. keinen π - π -Wechselwirkungen. Dies führt dann zu zum Teil sehr unterschiedlichen Verlaufsformen des CD-Spektrums (eine Ausnahme bildet hierbei vor allem (**S_P**)-**181**, das ein zu (**R_P**)-**181** sehr ähnliches Spektrum zeigt).

Die in Tab. 15 (S. 107; hier noch mit alter Zuordnung der Konfiguration aufgeführt) vorgestellten Ergebnisse der Zellaufnahmestudien mit den Tritium-markierten Diastereomeren des 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMPs **9** ergeben unter diesem Aspekt betrachtet ein interessantes Bild. Nach der im Rahmen dieser Arbeit neu erfolgten Zuordnung der absoluten Konfiguration (vgl. Tab. 19, S. 121) ist das *S_P*-konfigurierte **9-slow** dasjenige Diastereomer, dass wesentlich besser von der Zelle aufgenommen wird. Möglicherweise ist also ein stark gefaltetes *R_P*-Diastereomer nicht so gut für die Zellaufnahme geeignet wie ein möglicherweise lineares *S_P*-Diastereomer.

Da bisher noch von keinem *S_P*-konfigurierten diastereomerenreinen *cycloSal*-d4TMP eine Röntgenkristallstruktur erhalten wurde, konnte diese Vermutung bisher allerdings nicht bewiesen werden. Auch konnte das alleinige „Fluoreszenz-Quenching“ durch das *R_P*-Diastereomer noch nicht belegt werden, da die Trennung der Diastereomere von **182** und **183** nicht erfolgen konnte. Derzeitig wird in unserem Arbeitskreis an der Synthese weiterer fluoreszierender *cycloSal*-Pronucleotide gearbeitet, um unter anderem diese Fragestellung näher zu beleuchten. Auch kann

an dieser Stelle noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Vorschlag der Faltung des R_P -Diastereomers und der Linearität des S_P -Diastereomers überhaupt generalisiert werden kann oder ob die Molekülfaltung nicht doch wesentlich stärker von den Substituenten an der *cycloSal*-Maske als von der Konfiguration des Phosphoratoms abhängt (vgl. teilweise ähnliche Verläufe der CD-Spektren von R_P - und S_P -Diastereomer). Auf Grund dieser noch nicht bestätigten Vermutungen kann auch über einen Zusammenhang der Molekülfaltung und dem inhibierenden Effekt auf die Butyrylcholinesterase zu diesem Zeitpunkt noch keine relevante Aussage gemacht werden.

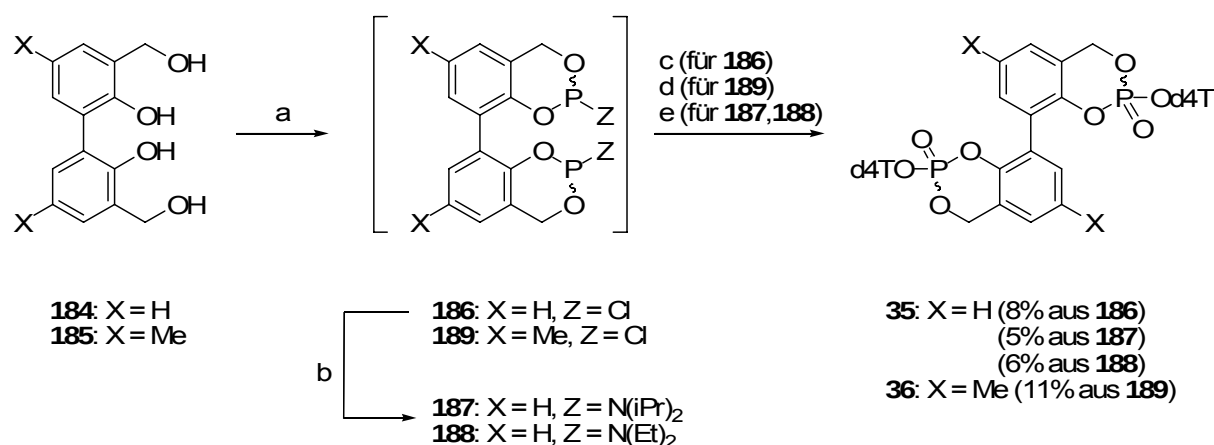
5. Synthese und Charakterisierung von Bis-(*cycloSal*-d4T-mono-phosphaten)

5.1. Kenntnisstand^{37,57}

Wie bereits eingangs (Kapitel 2.3.5.) erwähnt, stellen die Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36** (Abb. 14, S. 19) durch ihr Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1:2 ein Novum auf dem Feld der Pronucleotide dar. Diese Verbindungen bestehen formal aus zwei *cycloSal*-d4TMPs, die über eine Arylbrücke zwischen den jeweiligen 3-Positionen miteinander verknüpft sind. Um sie in der Nomenklatur von den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten neuen Verbindungen (allgemeine Struktur siehe Abb. 18, S. 22) abzugrenzen, sollen **35** und **36** im Folgenden als 3,3'-(Bis-*cycloSal*-d4TMPs) bezeichnet werden. Die neuen Verbindungen werden dann entsprechend 5,5'-(Bis-*cycloSal*-d4TMPs) genannt. Die zusätzliche Methylgruppe in der 5-Position jeder *cycloSal*-Einheit von **36** sollte dabei im Vergleich zu **35**, wie schon bei den „monomeren“ *cycloSal*-d4TMPs, eine stabilisierende Wirkung gegenüber der chemischen Hydrolyse haben.

Die Verbindungen **35** und **36** wurden ausgehend von dem jeweiligen Salicylalkoholderivat **184** bzw. **185** synthetisiert. Da es sich bei diesen Verbindungen und ihren geschützten Vorläufern um Biaryle handelt, erfolgt die Benennung dieser Verbindungen nicht nach der Nomenklatur für Salicylalkoholderivate, sondern nach der für Biphenylderivate gängigen. Dabei wird den Kohlenstoffatomen der Aryl-Aryl-Bindung die Position 1 bzw. 1' zugeordnet. Die Synthese von **35** aus **184** wurde über mehrere Wege erprobt. Es wurde zunächst die etablierte Methode über die Umwandlung von **184** in das Saligenylchlorphosphit **186** mit anschließender Umsetzung mit d4T **2** verwendet. Die Darstellung des Chlorphosphits **186** wies dabei die Schwierigkeit auf, dass, neben dem gewünschten Produkt, durch den Ringschluss über die zwei phenolischen Hydroxyfunktionen auch ein Nebenprodukt mit einem Siebenring entstand. Dieses entstand unter den Standardbedingungen (bei -20 °C) zu 30%. Die Bildung des Nebenprodukts konnte durch Absenken der Reaktionstemperatur auf -40 °C auf 13% verringert werden. Eine weitere Temperaturreduktion auf -60 °C brachte keine Verbesserung der Produktverhältnisse (88:12). Die Reaktion von **186** mit d4T **2** unter Standardbedingungen lieferte **35** mit einer Ausbeute von 8%. Die geringe Ausbeute wurde unter anderem durch eine sehr schwierige chromatografische Reinigung begründet. Um diese zu umgehen, wurde

186 zunächst in Phosphoramidite (**187** bzw. **188**) umgewandelt, die dann mit **2** zu **35** umgesetzt wurden. Für die Darstellung der Phosphoramidite musste zunächst das Protokoll der Chlorphosphitsynthese geändert werden (Austausch von Pyridin gegen Triethylamin), da die Anwesenheit von Pyridinhydrochlorid zu Umlagerungsprodukten führte. Da die Umsetzungen der Phosphoramidite **187** und **188** zu **35** mit Ausbeuten von 5% (für **187**) bzw. 6% (für **188**) keine Verbesserung erbrachten, wurde **36** ausgehend von **185** über das Chlorphosphit **189** dargestellt. Für die anschließende Umsetzung mit d4T **2** wurden weniger Äquivalente Chlorphosphit als in der Synthese von **35** eingesetzt und die Reaktionszeit auf sechs Stunden verlängert. Das 3,3'-Bis-(5-methyl-cycloSal-d4TMP) **36** konnte so mit einer Ausbeute von 11% synthetisiert werden. Die beschriebenen Reaktionen sind in Abb. 99 zusammengefasst.



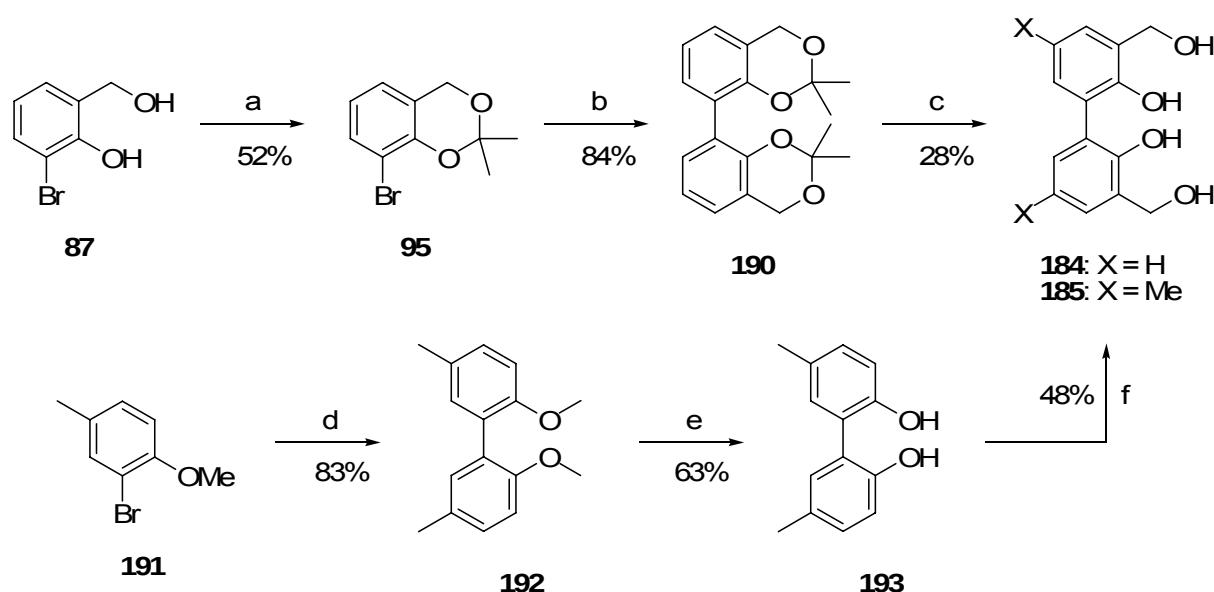
Reaktionsbedingungen: (a) (i) PCl₃, abs. Et₂O, -40 °C, 10 min; (ii) Pyridin oder Et₃N (für **186**, aus dem anschließend die Phosphoramidite **187** und **188** synthetisiert wurden), -40 °C, 2 h; (iii) Rt, 2 h. (b) (Alkyl)₂NH, abs. Et₂O, Rt, 3 h. (c) (i) d4T **2**, DIPEA, abs. CH₃CN, -20 °C - Rt, 1 h; (ii) *t*BuOOH, -20 °C - Rt, 1 h. (d) wie (c), nur 6 h Reaktionszeit bei (i). (e) (i) d4T **2**, Pyridin·HCl, abs. CH₃CN, 0 °C, 3 h.

Abb. 99 Literaturbekannte Synthese der 3,3'-Bis-(cycloSal-d4TMP)s **35** und **36**

Das Tetrol **184** wurde auf zwei verschiedenen Routen dargestellt, von denen hier nur eine erläutert werden soll. Diese basiert auf einer durch Eisen(III)-acetylacetonat (Fe(acac)₃) vermittelten Homokupplung des 6-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetals **95** zu **190**. Das Isopropylidenacetal **95** wurde dabei ausgehend von *ortho*-Bromphenol **87** über drei Stufen synthetisiert (vgl. auch Abb. 36, S. 46 und Abb. 38, S. 47). Die entschützte Verbindung **184** wurde durch eine Reaktion mit saurem Ionenaustauscher (Dowex 50X8) in Dichlormethan/Methanol hergestellt. Diese Reaktion gelang auf Grund der Bildung eines an der einen benzylichen Hydroxyfunktion methylierten Nebenprodukts nur mit 28%. Die hier nicht vorgestellte

weitere Syntheseroute zu **184** lieferte zwar eine bessere Gesamtausbeute bei weniger Reaktionsschritten, verwendete aber den hoch toxischen Chlormethylmethylether (MOM-Chlorid).

Verbindung **185** wurde ausgehend von 2-Brom-4-methylanisol **191** hergestellt. Dazu wurde **191** ebenfalls über eine durch $\text{Fe}(\text{acac})_3$ vermittelte Homokupplung in das Biaryl **192** überführt. Durch Spaltung der Methylether wurde Verbindung **193** dargestellt, die mittels einer Hydroxymethylierung in **185** überführt werden konnte. Die Darstellungen von **184** und **185** sind in Abb. 100 illustriert. Eine zur Synthese von **184** analoge Darstellung von **185** scheiterte in Ermangelung einer erfolgreichen Synthese des benötigten 6-Brom-4-methylsalicylalkoholisopropylidenacetals **96**. Die Darstellung dieser Verbindung gelang allerdings im Rahmen dieser Arbeit (vgl. Abb. 37, S. 46 und Abb. 38, S. 47), sodass sie bei Bedarf für diese Synthese zur Verfügung stünde.



Reaktionsbedingungen: (a) vgl. Abb. 36, S. 46 & Abb. 38, S. 47. (b) (i) $n\text{-BuLi}$, abs. THF, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h; (ii) $\text{Fe}(\text{acac})_3$, abs. THF, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Rt, 17 h. (c) Dowex 50X8, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 v/v, Rt, 65 h. (d) wie (b), nur 15 h Reaktionszeit bei (ii). (e) (i) BBr_3 , abs. CH_2Cl_2 , $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis Rt, 2 d. (f) (i) 37% $\text{HCHO}/\text{H}_2\text{O}$, NaOH , $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 d; (ii) $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$.

Abb. 100 Literaturbekannte Synthese von **184** und **185**

Da Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) zwei Phosphorzentren enthalten, die entweder R_P - oder S_P -konfiguriert sein können, sind theoretisch die vier Konfigurationskombinationen (R_P, R_P), (R_P, S_P), (S_P, R_P) und (S_P, S_P) möglich. Da die Kombinationen (R_P, S_P) und (S_P, R_P) aber identische Verbindungen darstellen, ist also nur die Bildung von drei Diastereomeren zu erwarten. Ohne das Auftreten einer intrinsischen Diastereoselektivität sollten diese im Verhältnis 1.0:2.0:1.0 entstehen. Die potenzielle

Bevorzugung einer Konfiguration am Phosphor erfolgt schon auf der Stufe des Saligenylchlorphosphits. Auf Grund der hohen Inversionsbarriere sind Phosphor(III)-Verbindungen trotz nur dreifacher Koordination konfigurationsstabil und könnten daher als reine Isomere erhalten werden. Mit zunehmendem elektronenziehenden Charakter der Substituenten nimmt die Inversionsbarriere allerdings ab.⁹⁸ Die Bis-(Saligenylchlorphosphite) werden somit als Gemisch eines Enantiomerenpaares (R_P, R_P und S_P, S_P) und einer dazu diastereomorphen *meso*-Verbindung (R_P, S_P (= S_P, R_P)) erhalten.

Für Verbindung **35** wurde beispielsweise laut ^{31}P -NMR ein Diastereomerenverhältnis von 1.1:2.0:1.9 ermittelt. Es konnte nicht geklärt werden, ob dies entweder tatsächlich auf eine intrinsische Diastereoselektivität oder aber auf den anteiligen Verlust eines Diastereomers bei der Chromatografie zurückzuführen ist. Das Minderdiastereomer von **35** (**35-fast**) konnte mittels präparativer RP-HPLC von den anderen beiden (**35-slow**) getrennt werden. Die Diastereomere von **36** waren ebenso nicht zu trennen wie die beiden Diastereomere des Gemischs **35-slow**.

Die Ergebnisse der mit **35-mix**, **35-fast**, **35-slow** und **36** durchgeführten Hydrolysen und antiviralen Tests werden vergleichend zu den Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** in Kapitel 5.3. bzw. 5.4 erläutert.

5.2. Synthese von 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphaten)

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die über die jeweiligen 5-Positionen Aryl-verbrückten Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** synthetisiert werden. Dabei sollten, wie schon bei den enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-d4TMPs (vgl. Kapitel 4), die Einflüsse von Methyl- bzw. *tert*-Butylgruppen in den jeweiligen 3-Positionen im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung untersucht werden. Die Strukturen dieser Zielverbindungen **194-196** sind in Abb. 101 (S. 130) gezeigt.

Da bereits im Verlauf der Darstellung der 4-Formylsalicylalkohole **46**, **60** und **61** die entsprechenden als Isopropylidenacetale geschützten 4-Bromsalicylalkohole **44**, **56** und **57** synthetisiert worden waren (vgl. Abb. 19, S. 23 und Abb. 21, S. 25), bot es sich an, eine zu der in Abb. 100 (S. 128) gezeigten Umsetzung von **95** analoge Syntheseroute über die Verbindungen **197-199** zu den entsprechenden Salicylalkoholderivaten **200-202** zu wählen.

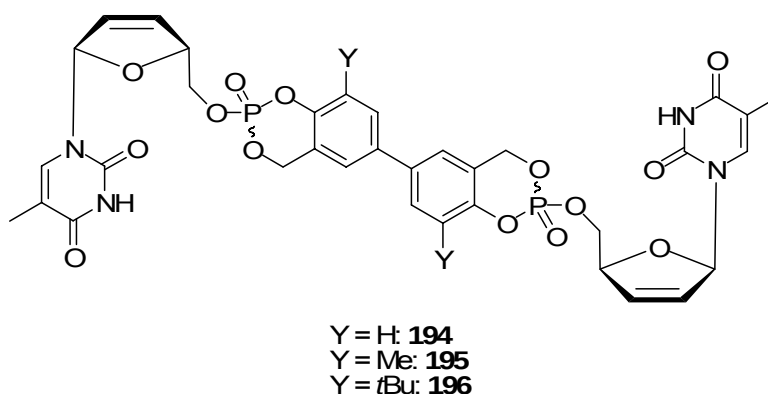


Abb. 101 Strukturen der 5,5'-Bis-(cycloSal-d4TMPs) **194-196**

Somit wurde zunächst mit den Isopropylidenacetallen **44**, **56** und **57** ebenfalls die durch $Fe(acac)_3$ vermittelte Homokupplung durchgeführt. Die 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetale **197-199** konnten so in Ausbeuten zwischen 37% und 75% isoliert werden. Die Reaktionszeit wurde dabei auf zwei Tage verlängert, da für die Umsetzung von **44** zu **197** so die Ausbeute von 47% (bei einer Reaktionszeit von 16 Stunden) auf 75% gesteigert werden konnte (Abb. 102).

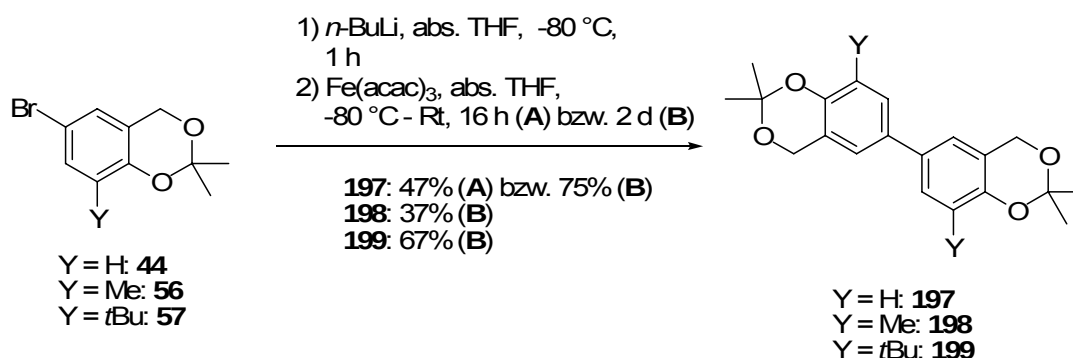


Abb. 102 Synthese der 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetale **197-199**

Die anschließenden Entschützungen zu den 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diolen **200-202** erfolgten dann unter Anwendung der bereits für die Entschützung der Formylsalicylalkoholisopropylidenacetale verwendeten sauren Entschützung. Für die Entschützungen von **198** und **199** war zum Lösen der Verbindungen die Zugabe von THF notwendig. Wie schon zuvor bei den Entschützungen der *tert*-Butyl-substituierten Formylsalicylalkoholisopropylidenacetale **59** und **100** musste auch zur Entschützung von **199** deutlich mehr Salzsäure verwendet werden. Mit 71-92% konnten insgesamt sehr gute Ausbeuten erzielt werden (Abb. 103, S. 131). Im Vergleich zu der Entschützung von **190** (Abb. 100, S. 128) konnten durch die

Verwendung dieser Methode nicht nur deutlich bessere Ausbeuten erzielt, sondern auch die Reaktionszeit von 65 Stunden auf wenige Minuten reduziert werden.

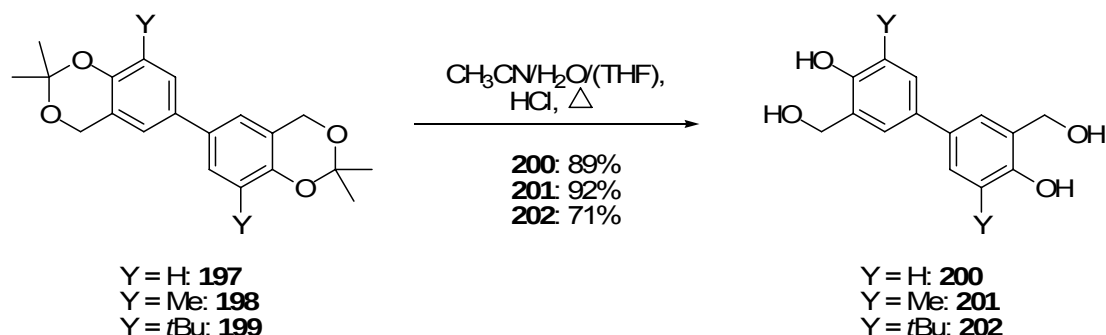


Abb. 103 Synthese von **200-202** durch saure Entschützung von **197-199**

Auf Grundlage der für die Synthese der 3,3'-Bis-(*cyclo*Sal-d4TMPs) **35** und **36** bekannten Ergebnisse (vgl. Abb. 99, S. 127) wurde die weitere Umsetzung der Alkohole **200-202** zu den Zielverbindungen **194-196** über die Syntheseroute der Chlorphosphite **203-205** vorgenommen. In diesen Fällen war wegen des größeren Abstands der Hydroxyfunktionen der unterschiedlichen *cyclo*Sal-Einheiten voneinander auch die Problematik der Siebenringbildung nicht gegeben. Die Umsetzungen erfolgten in abs. Diethylether/abs. THF 1:1 v/v (**200**, **201**) bzw. abs. Diethylether (**202**) und lieferten die Saligenylchlorphosphite **203-205** in Ausbeuten von 54-87% bei Reinheiten zwischen 59% und 89% (Abb. 104).

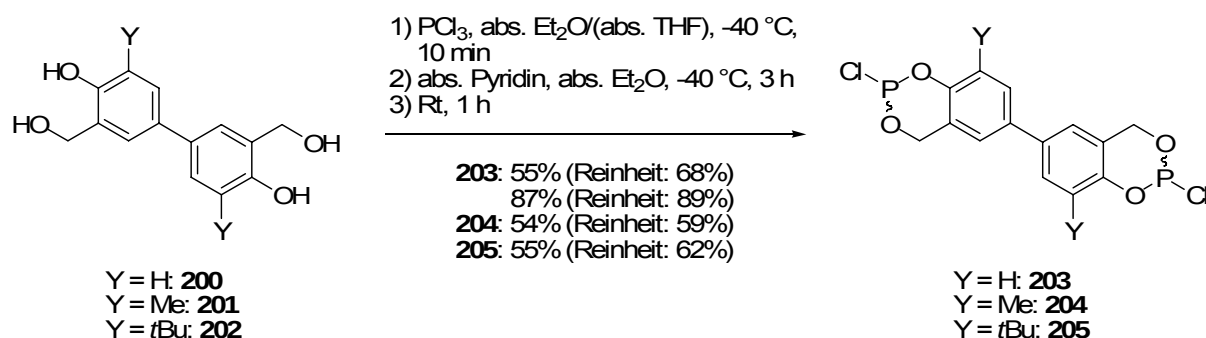


Abb. 104 Synthese der Bis-(saligenylchlorphosphite) **203-205**

In der Erwartung, dass die anschließenden Umsetzungen dieser Saligenylchlorphosphite mit d4T **2** zu den Zielverbindungen **194-196** nur mit niedrigen Ausbeuten verlaufen, wie sie für die Synthesen der Verbindungen **35** und **36** (vgl. Abb. 99, S. 127) erzielt werden konnten, wurden hier nicht die Chlorphosphite **203-205** sondern **2** im Überschuss eingesetzt. Es wurden pro reaktiver Chlorphosphit-Einheit 1.2 Äquivalente d4T **2** verwendet (also 2.4 Äquivalente **2** pro

Äquivalent Bis-(Saligenylchlorphosphit)). Von diesem Vorgehen wurde sich eine deutlich höhere Ausbeute der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** versprochen. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich in diesen Fällen somit nicht mehr auf **2**, sondern auf die berechnete Menge an reinem eingesetztem Chlorphosphit. Die ansonsten unter Standardbedingungen durchgeführten Synthesen lieferten **194-196** in vergleichsweise guten Ausbeuten von 28-37%. Für das *tert*-Butyl-Derivat **196** wurde eine zweite Reaktion mit Oxone[®] als Oxidationsmittel durchgeführt, in der das Produkt mit einer vergleichbaren Ausbeute von 30% isoliert werden konnte (Abb. 105).

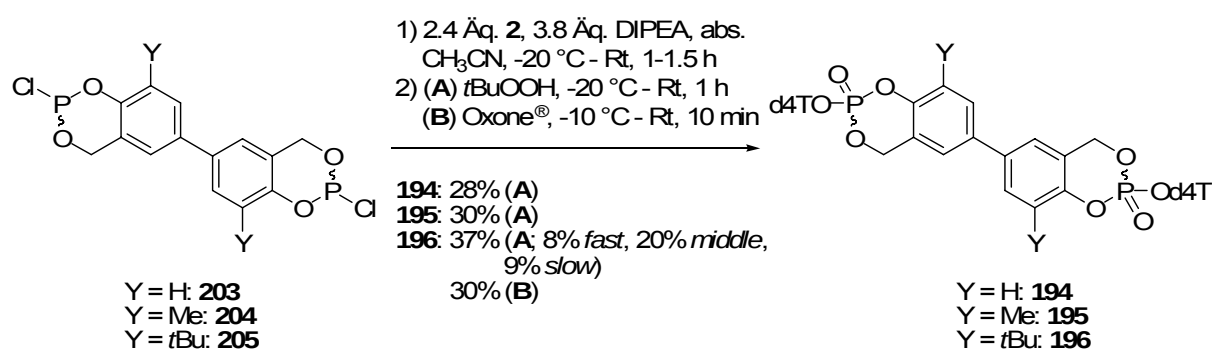


Abb. 105 Synthese der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196**

Die Separation der Produkte vom überschüssigen d4T **2** erfolgte in allen Fällen unter Verwendung der präparativen RP-HPLC. Bei der mit *tert*-Butylhydroperoxid durchgeführten Synthese von **196** wurde dabei eine Trennung aller drei Diastereomere erreicht (im Folgenden als **196-fast**, **196-middle** und **196-slow** benannt). Das ³¹P-NMR-Spektrum von **196-middle** enthält zwei Signale, die Spektren von **196-fast** und **196-slow** nur je eines von diesen. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden *cycloSal*-d4TMP-Einheiten in **196** voneinander unbeeinflusst sind und somit gleich konfigurierte Phosphoratome auch dieselbe Verschiebung zeigen. Das gleiche Bild zeigt sich in den ¹H-NMR-Spektren. Das ¹H-NMR-Spektrum von **196-middle** ist formal gesehen eine Addition der Spektren von **196-fast** und **196-slow**. Verbindung **196-middle** ist also das *R_P,S_P*-konfigurierte Diastereomer, während die anderen beiden Diastereomere diejenigen mit zwei gleich konfigurierten Phosphoratomen (*R_P,R_P* bzw. *S_P,S_P*) sind. Für **194** konnte im Zuge eines hier nicht dokumentierten Ansatzes die Abtrennung eines Diastereomers von den anderen beiden (**194-fast**: zwei Diastereomere; **194-slow**: ein Diastereomer) erreicht werden. Dabei wurde **194-fast** im Vergleich zu **194-slow** im Verhältnis 3:1 isoliert. Das

^{31}P -NMR-Spektrum von **194-fast** zeigt zwei Signale im Verhältnis 3:1. Im ^{31}P -NMR-Spektrum von **194-slow** ist nur das im Spektrum von **194-fast** zu 25% enthaltene Signal zu sehen. Bei **194-slow** handelt es sich also um ein Diastereomer mit zwei gleich konfigurierten Phosphoratomen. Das Signalverhältnis von 3:1 ist für **194-fast** auch im ^1H -NMR-Spektrum zu finden. Diese Signalverhältnisse sind ein Indiz dafür, dass die Diastereomere von **194** im Verhältnis 1:2:1 entstehen, die Reaktion also, wie auf Grund der räumlichen Entfernung der beiden Reaktionszentren voneinander zu erwarten, ohne intrinsische Diastereoselektivität verläuft. Definitiv kann dieses allerdings nicht belegt werden, da nur ein Teil des entstandenen **194** für die Trennung verwendet wurde. Auch das für **196** erhaltene Diastereomerenverhältnis von 1.0:2.6:1.25 ist eher auf leichte Verluste der „Rand-Diastereomere“ bei der chromatografischen Reinigung als auf eine Diastereoselektivität der Reaktion zurückzuführen.

Neben der Untersuchung der antiviralen Aktivität und der Hydrolyseeigenschaften der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** sollte auch deren Hydrolyseweg näher betrachtet werden. Die potenziell möglichen Hydrolysewege sind am Beispiel von **194** in Abb. 106 skizziert.

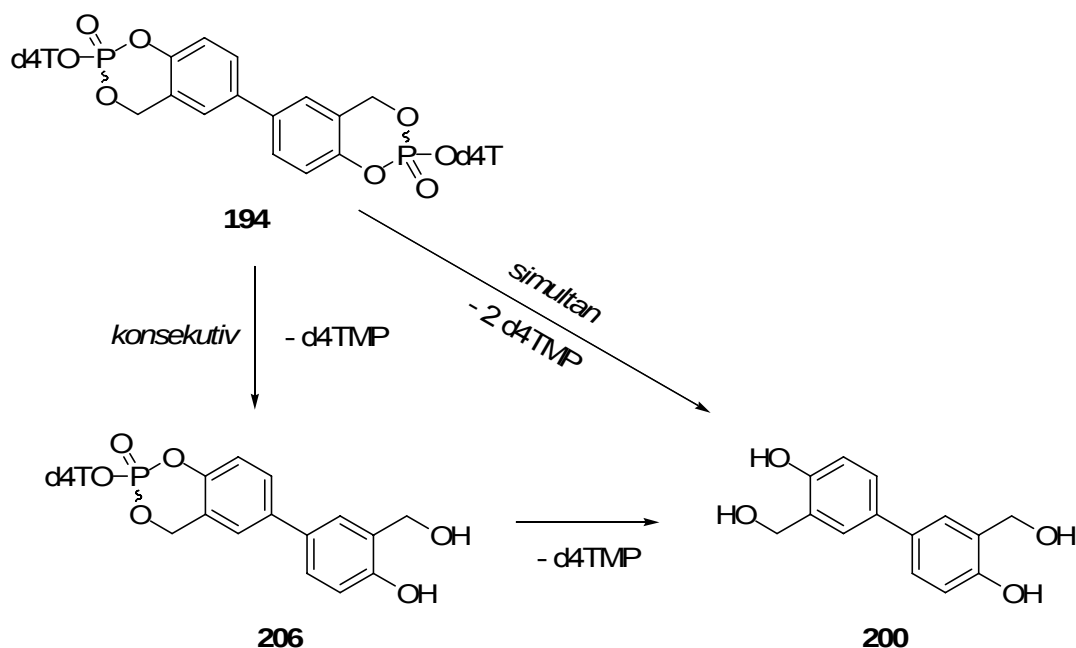


Abb. 106 Potenzielle Hydrolysewege von **194**

Theoretisch kann die Hydrolyse von **194** entweder simultan (beide Äquivalente d4TMP werden gleichzeitig freigesetzt) oder konsekutiv (erst wird das eine

Äquivalent d4TMP, dann das andere freigesetzt) erfolgen. Im Fall einer konsekutiven Hydrolyse würde 5-(Saligen-5'-yl)-*cyclo*Sal-d4TMP **206** als Zwischenprodukt entstehen. Diese Verbindung sollte also als Referenzverbindung ebenfalls synthetisiert werden. Die dazu durchgeführten Reaktionen sind in Kapitel 5.2.1. zusammengefasst.

5.2.1. Synthese des 5-(Saligen-5'-yl)-*cyclo*Sal-d4T-monophosphats **206**

Für das 3,3'-Bis-(*cyclo*Sal-d4TMP) **35** waren bereits vergleichbare Studien zum Hydrolyseweg erfolgt. Die dort genutzte Syntheseroute zu der zu **206** analogen Referenzverbindung **169** (Struktur in Abb. 95, S. 118) konnte hier nicht angewendet werden, da diese auf einer teilweise selektiven TBDPS-Schätzung einer der benzylichen Hydroxyfunktionen beruhte.⁵⁷ Dennoch war die Erkenntnis nützlich, dass die Freisetzung von **169** aus einem Isopropyliden-geschützten Vorläufer möglich ist. Dieser wiederum war über die Chlorphosphitroute aus einem Salicylalkoholderivat zugänglich, das eine Isopropyliden-geschützte und eine ungeschützte Salicylalkohol-Einheit besaß. Eine hierzu analoge Reaktionsstrategie sollte also auch zur Darstellung der Verbindung **206** verwendet werden. Das Retrosyntheschema ist in Abb. 107 gezeigt.

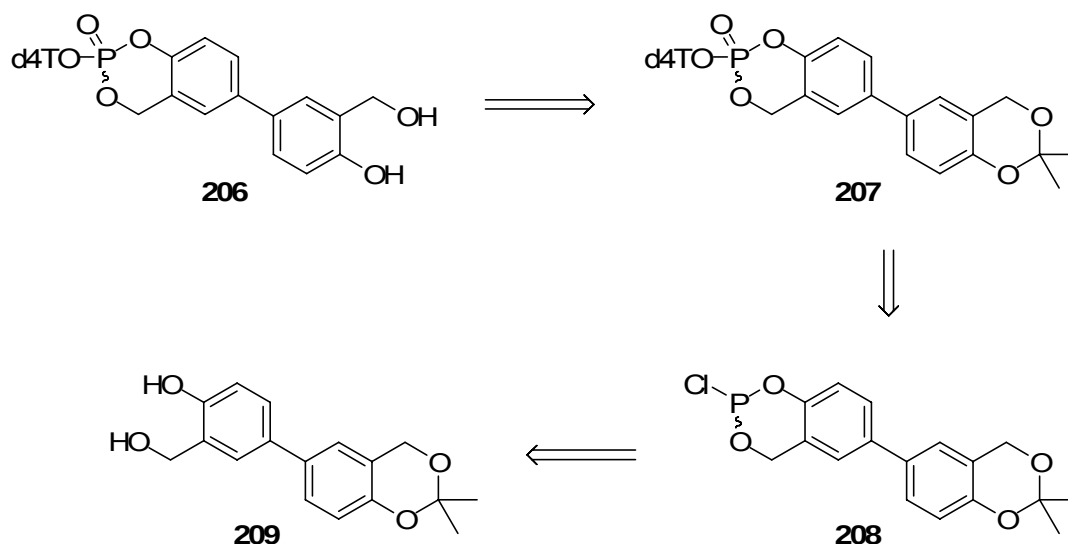


Abb. 107 Retrosyntheschema zur Darstellung von **206**

Die wesentliche Aufgabe bestand also zunächst in der Synthese des Salicylalkoholderivats **209**. Um eine selektive Entschätzung einer der beiden Salicylalkohol-Einheiten zu erreichen, mussten diese mit orthogonal spaltbaren Schutzgruppen versehen werden. Da die Möglichkeit einer selektiven Einführung

solcher Schutzgruppen nicht gegeben war, musste also ein Weg zur Kupplung zweier unterschiedlich geschützter Salicylalkohole gefunden werden. Als zu kuppelnde geschützte Salicylalkohole boten sich das 4-Bromsalicylalkohol-isopropylidenacetal **44** (Abb. 19, S. 23) und ein Silyl-geschützter Salicylalkohol an. Dazu wurde der 4-Bromsalicylalkohol **43** mit der bereits in den Synthesen der 1-Acetoxyvinylsalicylalkohole verwendeten Di-*tert*-butylsilyl-Schutzgruppe (S. 83 ff.) versehen. Die Synthese des Di-*tert*-butylsilyl-4-bromsalicylalkohols **210** gelang mit einer Ausbeute von 81% (Abb. 108).

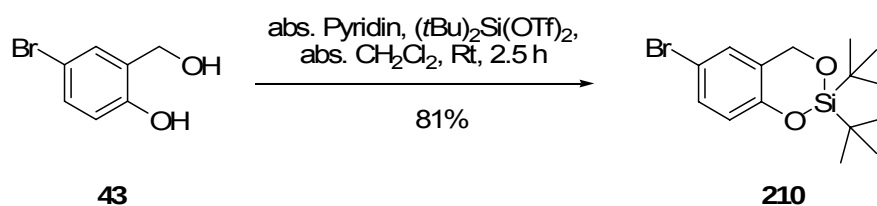


Abb. 108 Synthese des Di-*tert*-butylsilyl-4-bromsalicylalkohols **210**

Die beiden geschützten 4-Bromsalicylalkohole **44** und **210** wurden anschließend als Gemisch (1:1 n/n) unter den Bedingungen der Fe(acac)_3 vermittelten Homokupplung umgesetzt, da erwartet wurde, dass sich neben den beiden Homokupplungsprodukten **197** und **211** auch das gewünschte Heterokupplungsprodukt **212** bildet.

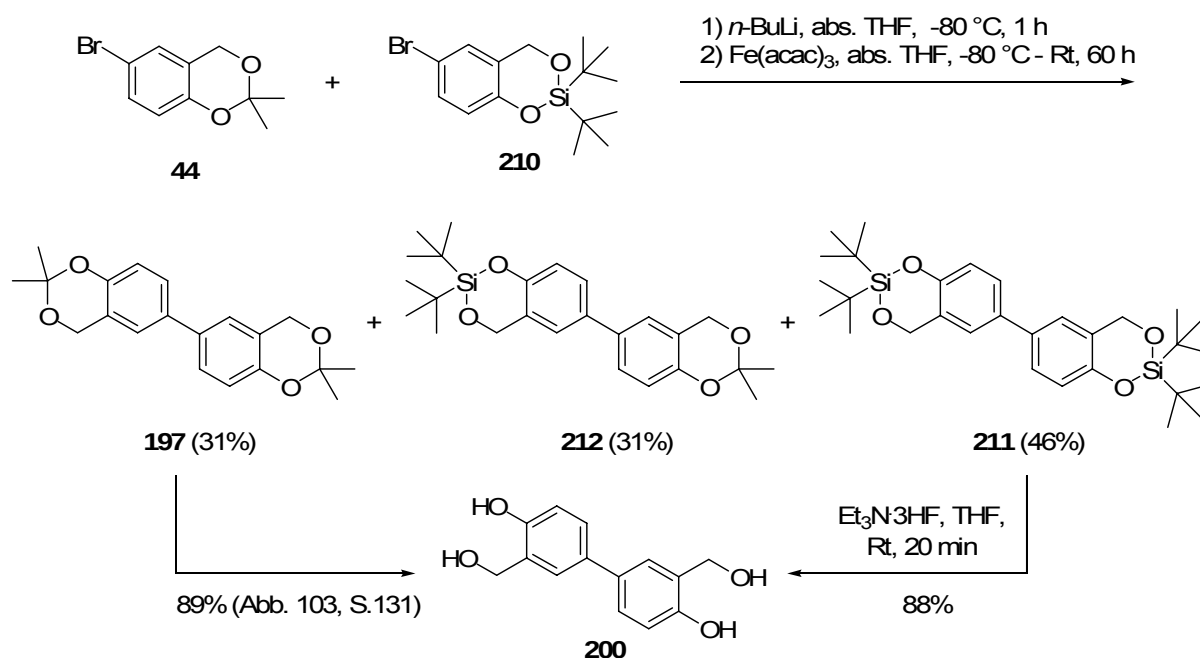


Abb. 109 Umsetzung von **44** und **210** unter den Bedingungen der Fe(acac)_3 vermittelten Homokupplung

Tatsächlich entstand ein problemlos trennbares Gemisch dieser drei Produkte. Verbindung **212** konnte dabei mit einer Ausbeute von 31% isoliert werden. Die Verbindungen **197** (31% Ausbeute) und **211** (46% Ausbeute) können jeweils sehr effizient (**197**: 89% (vgl. Abb. 103, S. 131); **211**: 88%) zu **200** entschützt (Abb. 109, S. 135) und für die Synthese des 5,5'-Bis-(*cyclo*Sal-d4TMPs) **194** genutzt werden. Verbindung **212** konnte anschließend unter Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid in THF in exzellenter Ausbeute (96%) selektiv zu der einfach Isopropyliden-geschützten Verbindung **209** entschützt werden (Abb. 110).

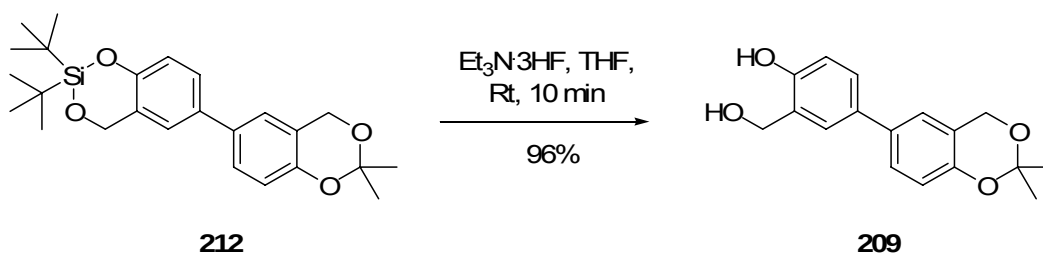


Abb. 110 Darstellung von **209** durch Fluorid-Entschützung von **212**

Die weitere Umsetzung von **209** erfolgte dann gemäß des in Abb. 107 (S. 134) gezeigten Retrosyntheseschemas. Das Chlorphosphit **208** konnte in reiner Form (Reinheit laut $^1\text{H-NMR}$ > 95%) mit einer Ausbeute von 83% isoliert werden. Die anschließende Umsetzung zum Triester **207** gelang mit einer guten Ausbeute von 45%, wobei auch hier ein Überschuss an d4T **2** eingesetzt und Oxone[®] als Oxidationsmittel verwendet wurde (Abb. 111).

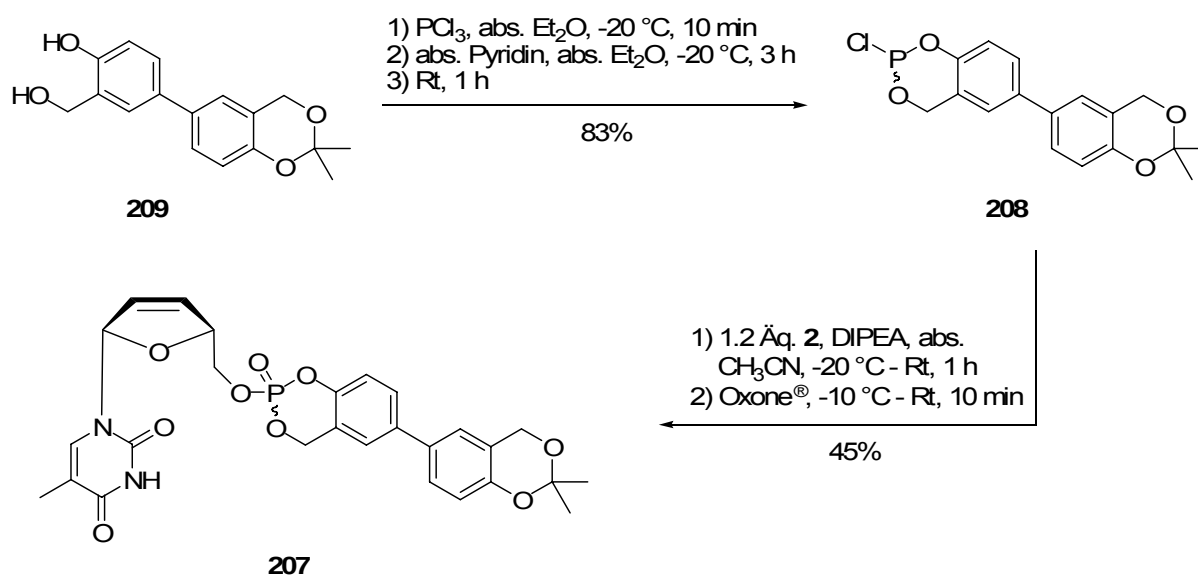


Abb. 111 Synthese von **207** aus **209**

Zur Entschützung des Isopropylidenacetals **207** konnte, wie schon für alle anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Spaltungen von Isopropylidenacetalen, die Methode der HCl-sauren Spaltung mit kurzem Erwärmen zur Siedehitze verwendet werden. Dabei war hier nur ein einziger Erhitzungsvorgang notwendig, um **207** quantitativ zu entschützen. Durch sofortiges Verdünnen der Reaktionslösung mit Wasser und anschließender Extraktion mit Ethylacetat konnte diese Reaktion ohne Zersetzung des Produkts **206** und Bildung von Nebenprodukten durchgeführt werden. Letztendlich konnte **206** mit einer sehr guten Ausbeute von 85% isoliert werden (Abb. 112).

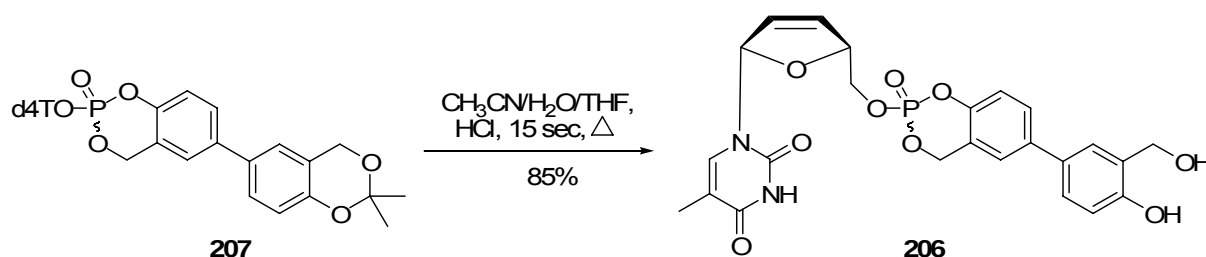


Abb. 112 Saure Entschützung von **207** zur Referenzverbindung **206**

Somit stand also auch die Referenzverbindung **206** für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die hier gezeigte Syntheseroute sollte prinzipiell auch für die in den jeweiligen 3-Positionen alkylierten Verbindungen zu verwenden sein. Für die Methylsubstituierte Verbindung würde noch ein weiterer Zugang zur Verfügung stehen. Während der Entschützung des 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetals **198** zum 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol **201** (vgl. Abb. 103, S. 131) konnte dünnschichtchromatografisch die Entstehung eines Zwischenprodukts beobachtet werden. Da dieses als die nur einfach geschützte Verbindung **213** vermutet wurde, wurde die Entschützungsreaktion von **198** in milderer Form erneut durchgeführt. Verbindung **213** konnte so mit einer Ausbeute von 43% dargestellt werden. Zusätzlich konnten 20% Edukt **198** und 37% der doppelt entschützten Verbindung **201** isoliert werden.

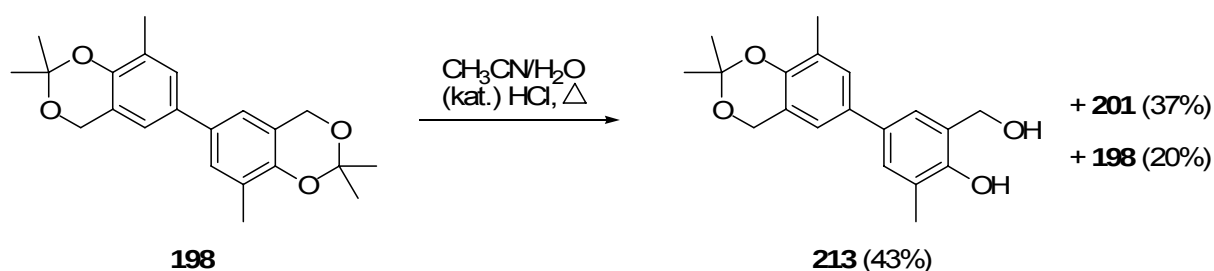


Abb. 113 Partielle Entschützung von **198** zu **213**

5.3. Charakterisierung der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphate) und der Referenzverbindung 206

Die 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** sowie die Referenzverbindung **206** wurden hinsichtlich ihres Hydrolyseverhaltens in Phosphatpuffer (pH = 7.3 und 7.6) und im Zellinkubationsmedium RPMI/FCS(10%) untersucht. In Diagramm 7 sind dabei zunächst die im Phosphatpuffer (pH = 7.3) bestimmten Werte im Vergleich zu den für die 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36** erhaltenen Werte⁵⁷ aufgeführt. Des Weiteren sind die Werte zweier Vergleichsverbindungen – 3-Phenyl- (**214**; 3-Ph) bzw. 5-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP (**215**; 5-Ph)³⁷ – mit aufgeführt.

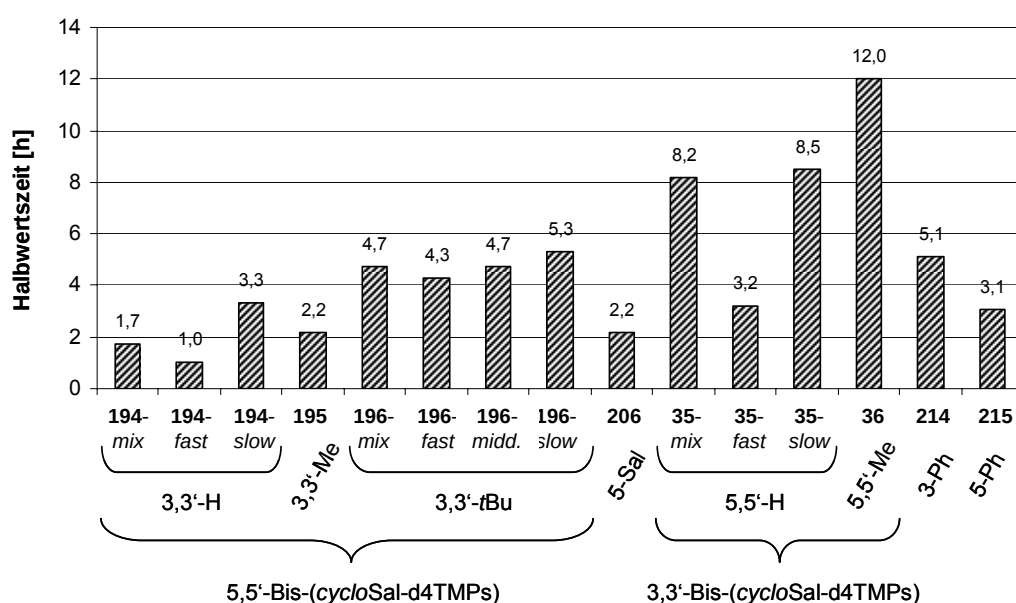


Diagramm 7 Hydrolyse-Halbwertszeiten der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196**, der Referenzverbindung **206**, der 3,3'- Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35**, **36** sowie der Vergleichsverbindungen **214**, **215** in Phosphatpuffer (pH = 7.3, 37 °C)

Im Vergleich der Diastereomerengemische der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** ist erkennbar, dass die Alkylgruppen in den jeweiligen 3-Positionen erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Stabilität gegenüber der chemischen Hydrolyse führen. Die *tert*-Butyl-Verbindung **196-mix** ist mit einer Halbwertszeit von 4.7 Stunden dabei deutlich stabiler als die unsubstituierte (**194-mix**; $t_{1/2}$ = 1.7 h) bzw. die Methyl-substituierte Verbindung (**195**; $t_{1/2}$ = 2.2 h). Verglichen mit den 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** ($t_{1/2}$ = 8.2 h) und **36** ($t_{1/2}$ = 12 h) sind diese Verbindungen allerdings deutlich hydrolyselabiler. Dies war auf Grund der Halbwertszeiten der Vergleichsverbindungen 3-Phenyl- (**214**; $t_{1/2}$ = 5.1 h) und 5-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP (**215**; $t_{1/2}$ = 3.1 h) tendenziell so erwartet worden. Angesichts einer Halbwertszeit von 4.4 Stunden für das unsubstituierte *cycloSal*-

d4TMP **8** (vgl. Tab. 1, S. 10) wirkt der zweite Phenylring in 3-Position somit als leichter Elektronendonator, in der 5-Position hingegen als leichter Akzeptor. In den Hydrolyse-Halbwertszeiten der getrennten Diastereomere der unsubstituierten Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **194** sind sehr starke Unterschiede zu finden. Beim 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMP) **35** ist das einzelne Diastereomer **35-fast** ($t_{1/2} = 3.2$ h) deutlich hydrolyselabiler als das Gemisch aus den beiden anderen Diastereomeren (**35-slow**; $t_{1/2} = 8.5$ h). Für das einzeln erhaltene Diastereomer von **194** (**194-slow**, $t_{1/2} = 3.3$ h) wurde hingegen eine signifikant höhere Halbwertszeit im Vergleich zu den zwei in **194-fast** enthaltenen Diastereomeren ($t_{1/2} = 1.0$ h) bestimmt. Die einzelnen Diastereomere von **196** zeigen hingegen mit Halbwertszeiten von 4.3-5.3 Stunden nur leicht voneinander abweichende Hydrolysestabilitäten. Mit zunehmender Substitution am Aromaten scheint also die Differenz der konfigurationsabhängigen Hydrolysestabilität abzunehmen. Die Hydrolyse-Halbwertszeit der Referenzverbindung **206** ist mit 2.2 Stunden im Vergleich zu der von **194-mix** leicht erhöht, sodass die Möglichkeit des Nachweises von **206** während der Hydrolyse von **194-mix** potenziell gegeben war (vgl. Kapitel 5.3.1.).

Die Halbwertszeiten der Hydrolysen der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** und der Referenzverbindung **206** in RPMI/FCS(10%) sowie im Phosphatpuffer (pH = 7.6) sind vergleichend zu den im Phosphatpuffer (pH = 7.3) bestimmten in Diagramm 8 gezeigt.

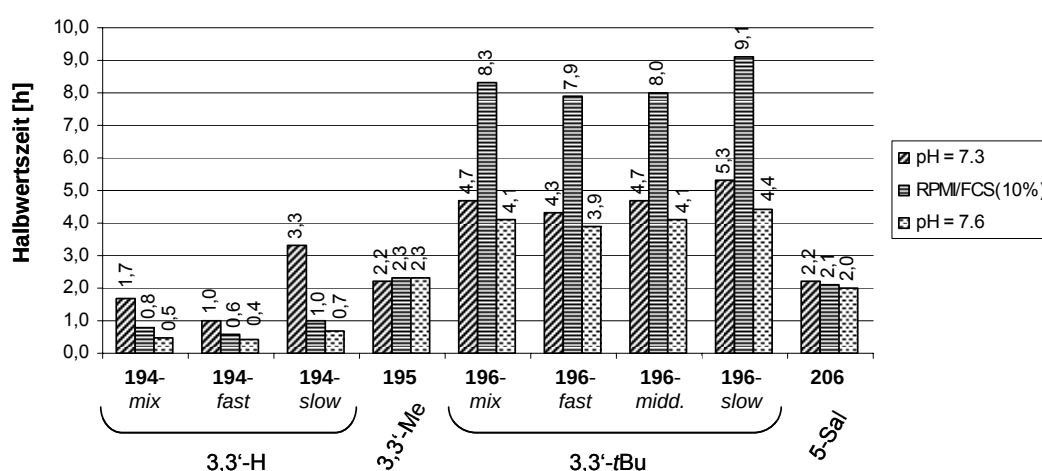


Diagramm 8 Hydrolyse-Halbwertszeiten der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** und der Referenzverbindung **206** in Phosphatpuffer (pH = 7.3 und pH = 7.6) sowie in RPMI/FCS(10%)

Während die Hydrolysestabilitäten der Verbindungen **195**, **196** und **206** bei dem leicht basischeren pH-Wert von 7.6 nahezu unverändert bleiben, zeigt die unsubstituierte Verbindung **194** eine starke Beeinflussung. So reduziert sich die Halbwertszeit für **194-mix** und **194-fast** in Phosphatpuffer (pH = 7.6) auf ungefähr ein Drittel im Vergleich zu den Studien in Phosphatpuffer (pH = 7.3). Bei **194-slow** ist die Reduktion noch ausgeprägter. Hier sinkt die Halbwertszeit von 3.3 Stunden auf 0.7 Stunden ab, sodass **194-fast** und **194-slow** bei diesem basischeren pH-Wert annähernd vergleichbare Hydrolysestabilitäten zeigen. Dieser Trend ist auch im Zellinkubationsmedium wiederzufinden (**194-fast**: $t_{1/2} = 0.6$ h; **194-slow**: $t_{1/2} = 1.0$ h). Für Verbindung **196** wurden in RPMI/FCS(10%) deutlich erhöhte Werte gefunden. Sowohl das Diastereomerengemisch **196-mix** als auch die einzelnen Diastereomere weisen eine um ungefähr den Faktor zwei erhöhte Halbwertszeit im Vergleich zu den Hydrolysen im Phosphatpuffer auf. Diese sind, wie es bereits für die sehr lipophilen 5-Diisobutyryloxymethyl-cycloSal-d4TMPs **103** und **104** beobachtet wurde (vgl. Diagramm 4, S. 61), mit Löslichkeitsproblemen der Verbindungen im wässrigen Medium zu erklären. Auch hier blieb am Anfang der Hydrolysen immer ein Teil der Substanz ungelöst und löste sich erst im Laufe der Hydrolyse, sodass insgesamt deutlich verzögerte Substanzabnahmen beobachtet wurden.

Zu bemerken ist, dass die Hydrolyse von **195** nicht vollständig dem Verlauf einer Kinetik erster Ordnung folgt. So ist zunächst eine schnelle Abnahme der Verbindung **195** zu beobachten, die im Laufe der Hydrolyse allerdings wesentlich langsamer wird. Die in Diagramm 8 (S. 139) angegebene Halbwertszeit von 2.3 Stunden bezieht sich nur auf die Messwerte zwischen dem Start und einer Inkubationszeit von einer Stunde. Die Werte der Hydrolysestudie von **195** in RPMI/FCS(10%) (auf den Ausgangswert der Hydrolyse (t_0) normiert) sowie exponentielle Ausgleichskurven (*für alle Werte: gestrichelte Linie; für die Werte zwischen 0-1 h Inkubationszeit: durchgängige Linie*) sind in Diagramm 9 (S. 141; Erläuterung der allgemeinen Auswertung in Kapitel 9.3.) dargestellt. Der dort gezeigte Verlauf der Messwerte entspricht dem typischen Verlauf von Hydrolysen beim Vorliegen von unspezifischen Proteinbindungen. Bei diesem Phänomen findet zunächst eine schnelle Adsorption des Moleküls an Proteine statt, die zu einer scheinbar schnellen Abnahme der Verbindung während der Hydrolyse führen. Hat sich das Gleichgewicht zwischen gelöster und Protein-gebundener Form eingestellt, fungiert das Protein als Depot und

die Hydrolyse erscheint nun stark verlangsamt. Solch ein Verhalten war bereits für das unsubstituierte *cycloSal*-d4TMP **8** beobachtet worden.³⁷ Die beiden anderen 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194** und **196** zeigten solch ein Verhalten nicht, wobei diese Aussage für **196** auf Grund der Löslichkeitsprobleme unter Vorbehalt betrachtet werden muss.

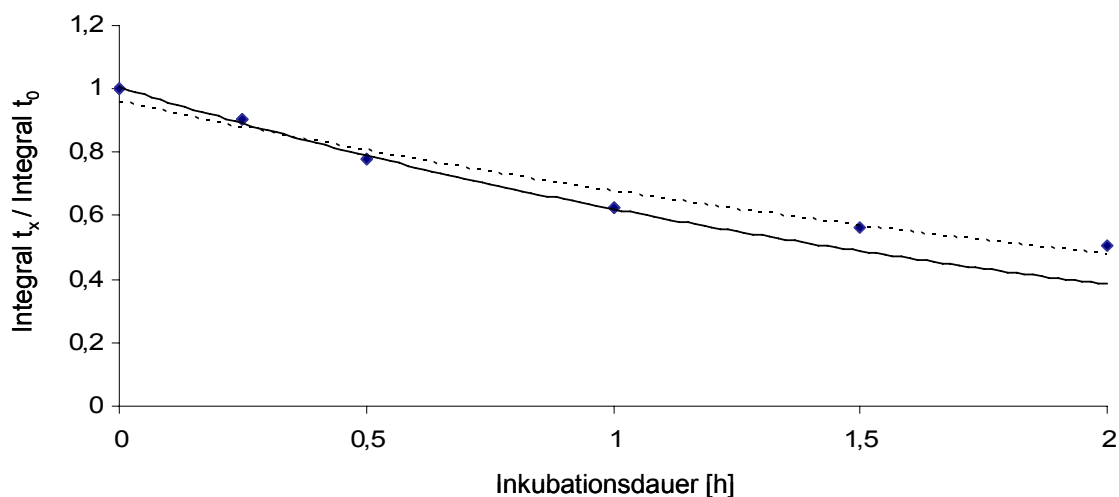


Diagramm 9 Auswertung der Hydrolyse von **195** in RPMI/FCS(10%)

Einige *cycloSal*-d4TMPs der ersten Generation (vgl. Kapitel 2.3.2.), also Verbindungen ohne enzymatisch spaltbaren Substituenten, waren auf eine potenzielle Beteiligung von Enzymen an ihrem Abbau hin untersucht worden. Durch Studien sowohl in CEM/0-Zellextrakten als auch in RPMI/FCS(10%) konnte dies allerdings ausgeschlossen werden.⁷⁰ Die Untersuchungen in CEM/0-Zellextrakten wurde für die 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) beispielhaft mit der Verbindung **195** durchgeführt. Wie schon in RPMI/FCS(10%) (vgl. Diagramm 9) verläuft auch hier die Hydrolyse nicht vollständig nach erster Ordnung (Diagramm 10, S. 142). Anhand der exponentiellen Ausgleichskurven (*für alle Werte*: gestrichelte Linie; *für die Werte zwischen 0-2 h Inkubationszeit*: durchgängige Linie) ist zu erkennen, dass im Zellextrakt die unspezifische Proteinbindung deutlich ausgeprägter ist als noch in RPMI/FCS(10%). Hier weicht die für alle Werte bestimmte Ausgleichskurve wesentlich stärker von dem Verlauf der Kurve für die Werte zu Beginn der Hydrolyse ab. Da die Hydrolyse also deutlich von einer Kinetik nach erster Ordnung abweicht, kann auch keine Halbwertszeit angegeben werden. Die anhand der Ausgleichskurve für die Werte zwischen 0-2 Stunden Inkubationszeit (durchgängige Linie in Diagramm 10, S. 142) bestimmte Halbwertszeit entspricht mit 2,2 h genau den bereits in anderen Medien bestimmten Halbwertszeiten von **195** (vgl. Diagramm 8, S. 139).

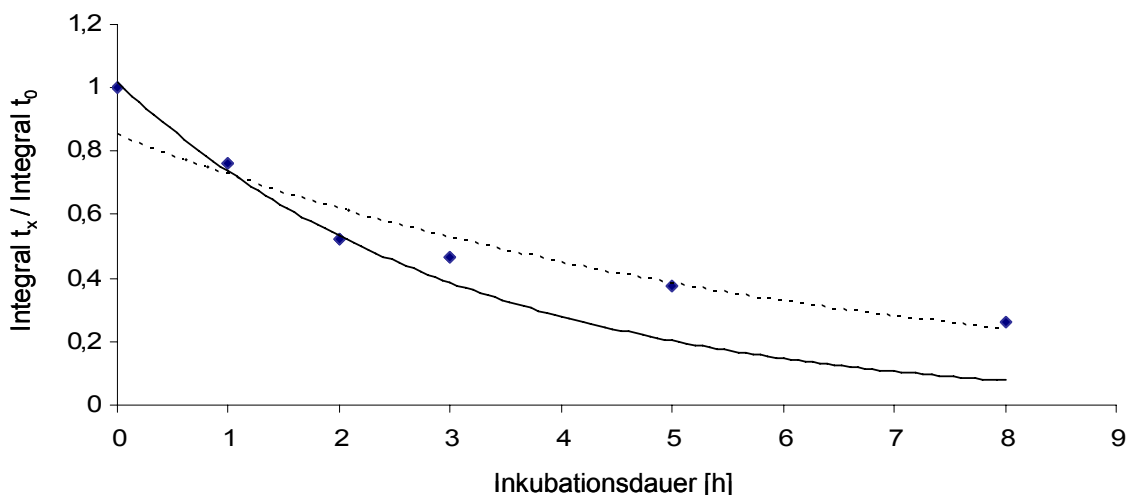


Diagramm 10 Auswertung der Hydrolyse von **195** im CEM/0-Zellextrakt

Die mittels analytischer HPLC (Methoden I und II) untersuchte Hydrolyse von **195** in CEM/0-Zellextrakten lieferte anhand der beobachteten Signale keine Hinweise auf eine enzymatische Beteiligung am Abbau dieser Verbindung.

Bevor nun auf die Ergebnisse der antiviralen *in vitro*-Tests dieser Verbindungen eingegangen wird, soll zunächst genauer auf die möglichen Hydrolysewege der 5,5'-Bis-(*cyclo*Sal-d4TMPs) eingegangen werden, die beispielhaft an der Hydrolyse der unsubstituierten Verbindung **194** untersucht wurde.

5.3.1. Untersuchungen zum Hydrolyseweg des 5,5'-Bis-(*cyclo*Sal-d4T-monophosphats) **194**

Wie bereits in Abb. 106 (S. 133) angedeutet, kann das 5,5'-Bis-(*cyclo*Sal-d4TMP) **194** auf zwei möglichen Wegen hydrolysiert werden. Diese Hydrolysewege sind in Abb. 114 (S. 143) noch einmal in detaillierter Form dargestellt. Der simultane Hydrolyseweg würde über den Bis-(Benzylphosphatdiester) **216** führen. Dieser kann ebenfalls entweder simultan oder konsekutiv zerfallen. Der simultane Zerfall führte zu einer Freisetzung von zwei Äquivalenten d4TMP sowie **200**. Die konsekutive Hydrolyse von **216** würde zunächst unter Freisetzung von einem Äquivalent d4TMP zu dem Intermediat **218** führen. Aus diesem resultieren dann ein weiteres Äquivalent d4TMP sowie **200**. Die konsekutive Hydrolyse von **194** würde zunächst die Bildung des Benzylphosphatdiesters **217** bedingen, der dann unter Freisetzung von d4TMP und der Referenzverbindung **206** weiter zerfallen sollte. Aus der weiteren Hydrolyse

würden dann über **218** wieder Verbindung **200** und ein weiteres Äquivalent d4TMP resultieren.

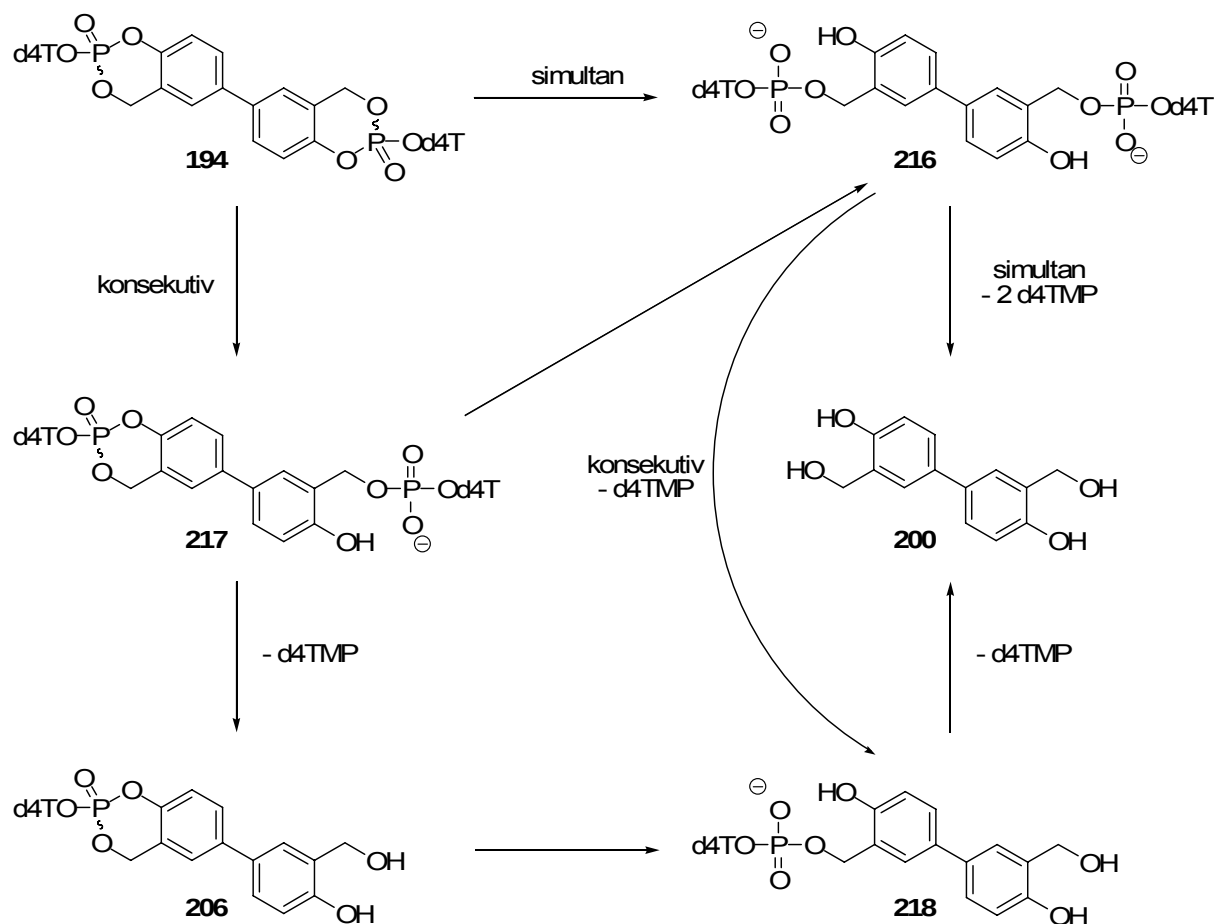


Abb. 114 Detaillierte Darstellung der potenziellen Hydrolysewege des 5,5'-Bis-(cycloSal-d4TMPs) **194**

In der Hydrolyse von **194** in Phosphatpuffer (pH = 7.3) konnte das Entstehen der Referenzverbindung **206** mittels Coinjektion zweifelsfrei nachgewiesen werden. In Abb. 115 (S. 144) sind die analytischen HPL-Chromatogramme des Starts der Hydrolyse von **194**, nach einer Stunde Inkubationszeit sowie der analytische Vergleichslauf der Referenzverbindung **206** gezeigt. Dadurch ist belegt, dass **194** mindestens anteilig über den konsekutiven Weg hydrolysiert wird.

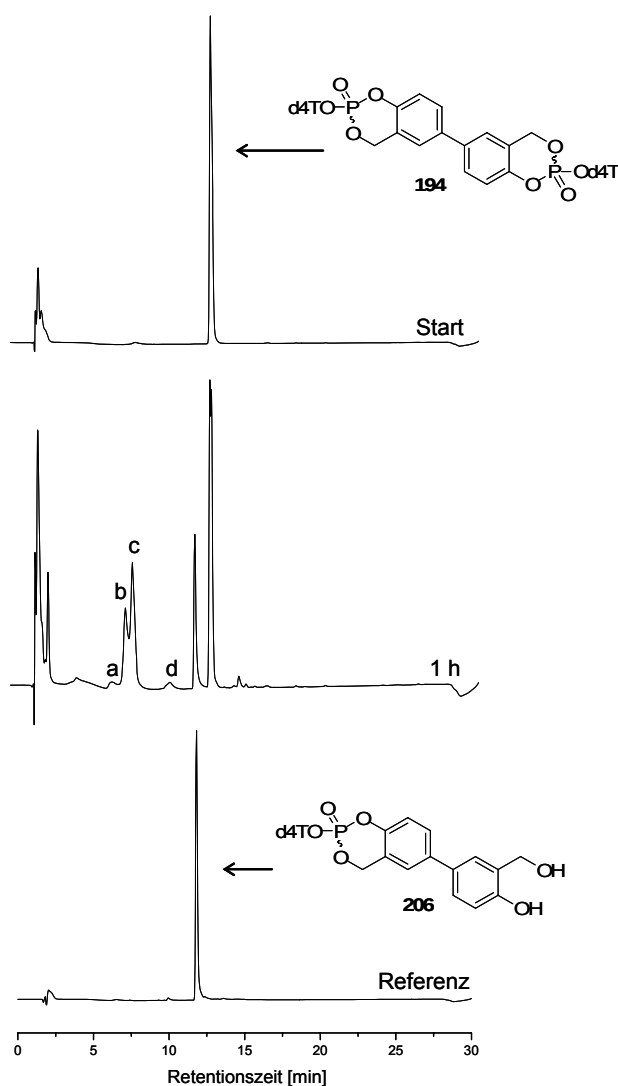


Abb. 115 HPLC-analytischer Nachweis des Entstehens von **206** in der Hydrolyse von **194** (Methode I)

Bei der für die Vermessung der in Abb. 115 gezeigten Chromatogramme verwendeten Methode I (Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (5-100%)) eluieren polare Verbindungen wie beispielsweise das zweifach negativ geladene d4TMP sehr schnell von der RP-Säule und erzeugen Signale im Retentionszeitenbereich von 0-3 Minuten. Das Signal des Bis-Benzylphosphatdiesters **216**, so er denn entsteht, wäre also auch in diesem Bereich zu erwarten. Auf Grund der Überlagerung mit dem d4TMP-Signal sowie dem recht deutlichen Einspritzpeak (vor allem durch das verwendete DMSO bedingt) kann über dessen (Nicht-)Vorhandensein hier keine Aussage getroffen werden. Die nur einfach geladenen Intermediate **217** und **218** sollten auf Grund der geringeren Polarität erst mit einem höheren Acetonitrilanteil von

der RP-Säule eluiert werden. Ihre Signale sollten also bei höheren Retentionszeiten zu finden sein. Die im nach einer Stunde Inkubationszeit aufgenommenen Chromatogramm deutlich vorhandenen Signale b ($t_R = 7.4$ min) und c ($t_R = 7.8$ min) verschwinden im Laufe der Hydrolyse wieder, sodass diese Signale möglicherweise von diesen Hydrolyseintermediaten stammen. In der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Hydrolyse der Referenzverbindung **206** (HPL-Chromatogramme im Anhang III, S. VIII) wurde ein Signal in diesem Bereich bei einer Retentionszeit von 6.5 Minuten detektiert. Dies ist exakt die Retentionszeit die das in Abb. 115 (S. 144) nur in Spuren vorhandene Signal a aufweist. Somit ist davon auszugehen, dass dieses Signal von der Verbindung **218** stammt, die zu diesem Zeitpunkt der Hydrolyse noch nicht in großer Menge gebildet worden ist. Zu diesem Zeitpunkt ebenfalls erst in Spuren zu detektieren ist das Salicylalkoholderivat **200** ($t_R = 9.7$ min), also das neben d4TMP auftretende Endprodukt der Hydrolyse (in Abb. 115, S. 144, mit d gekennzeichnet; Referenz-HPL-Chromatogramm im Anhang III, S. VIII). Die beiden Signale b und c sollten also von dem Intermediat **217** stammen. Da das Phosphoratom der nicht hydrolysierten *cycloSal*-d4TMP-Einheit sowohl R_P - als auch S_P -konfiguriert sein kann, entstehen in dem Hydrolyseschritt von **194** zu **217** zwei Diastereomere, die je ein Signal erzeugen können. Es ist also denkbar, dass die Signale b und c je einem dieser Diastereomere zugeordnet werden können. Da die Intermediate **216-218** allerdings nicht als Referenzverbindungen synthetisiert werden können, kann die hier erfolgte Signalzuordnung nicht endgültig bewiesen werden. Nichtsdestoweniger weist vieles darauf hin, dass **194** vornehmlich auf dem konsekutiven Weg hydrolysiert wird. Der potenzielle simultane Hydrolyseweg kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Eine weitere Methode, die zur Untersuchung der Hydrolyse von *cycloSal*-Nucleotiden genutzt wird, ist die Hydrolyseverfolgung mittels ^{31}P -NMR (vgl. Prüfung der selektiven Freisetzung von d4TMP aus **63-mix** (Abb. 32, S. 38) und **111-mix** (Abb. 86, S. 97)). Diese wurde auch zur Aufklärung des Hydrolyseweges von **194** genutzt. Zunächst wurde allerdings die Hydrolyse der Referenzverbindung **206** untersucht, um die Signale, die aus dieser Hydrolyse resultieren, später in der Hydrolyse von **194-mix** identifizieren zu können. Ausgewählte Spektren der ^{31}P -NMR-spektroskopischen Verfolgung der Hydrolyse von **206** in einem Imidazol/Salzsäure-Puffer (pH = 7.3) bei Raumtemperatur sind nachfolgend in

Abb. 116 gezeigt. Zu Beginn der Hydrolyse ((a) in Abb. 116) sind nur die zwei Signale der beiden Diastereomere von **206** im Spektrum enthalten. Im weiteren Verlauf entsteht zunächst ein neues Signal bei ungefähr -0.1 ppm ((b) in Abb. 116), das dem Benzylphosphatester **218** zugeordnet werden kann. Aus diesem wird dann d4TMP freigesetzt ((c) in Abb. 116), welches am Ende der Hydrolyse als einzig detektierbares Produkt vorliegt ((d) in Abb. 116). Somit wird also auch die Verbindung **206** selektiv zum d4TMP hydrolysiert.

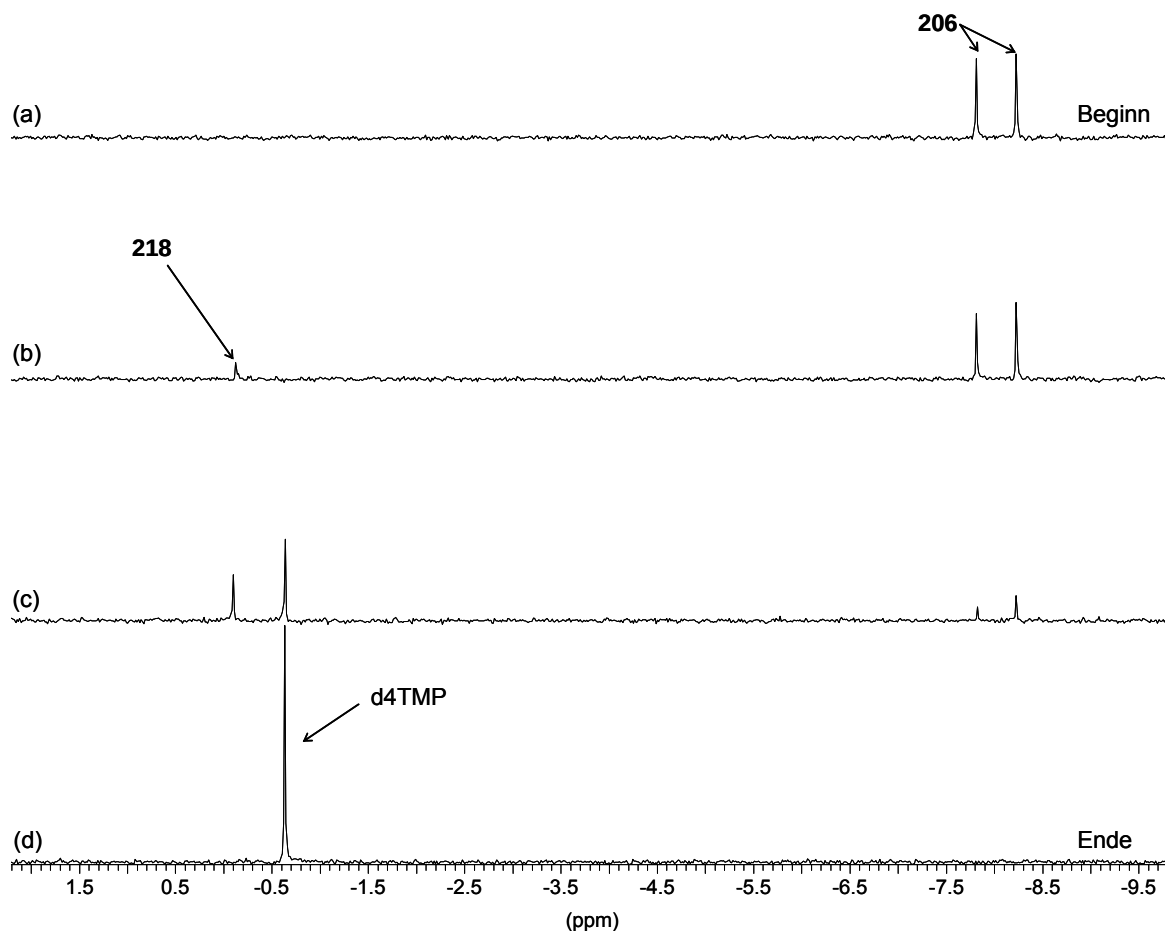


Abb. 116 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse des 5-(Saligen-5'-yl)-*cycloSal*-d4T-monophosphats **206** in einem Imidazol/Salzsäure-Puffer (pH = 7.3, Raumtemperatur)

In Abb. 117 (S. 147) sind ausgesuchte Spektren der unter gleichen Bedingungen durchgeführten NMR-Hydrolyse von **194-mix** gezeigt. Zu Beginn der Hydrolyse ((i) in Abb. 117) sind drei Signale in dem für *cycloSal*-NMPs typischen Bereich (von -10 bis -6 ppm) im ^{31}P -NMR-Spektrum sichtbar, die alle der Verbindung **194-mix** zugehörig sind. Im Verlauf der Hydrolyse werden zunächst ((ii) in Abb. 117) neue Signale bei -0.12 ppm sowie bei -7.9 ppm und -8.2 ppm erkennbar. Die beiden letzteren sind eindeutig der Verbindung **206** zuzuordnen (vgl. (a) in Abb. 116). Das Signal bei

-0.12 ppm könnte somit vom Benzylphosphatdiester **217** stammen, aus dem **206** entsteht. Die beiden Signale der noch nicht hydrolysierten *cycloSal*-d4TMP-Einheit von **217** sind mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Signale der Verbindung **194-mix** überlagert. Es wäre zwar ebenso denkbar, dass die Signale von **217** gar nicht zu detektieren sind und das Signal bei -0.12 ppm schon vom Intermediat **218** stammt, allerdings wäre dies auf Grund der guten Nachweisbarkeit dieser Verbindung in der mittels analytischer HPLC vermessenen Hydrolyse (vgl. Abb. 115, S. 144) verwunderlich.

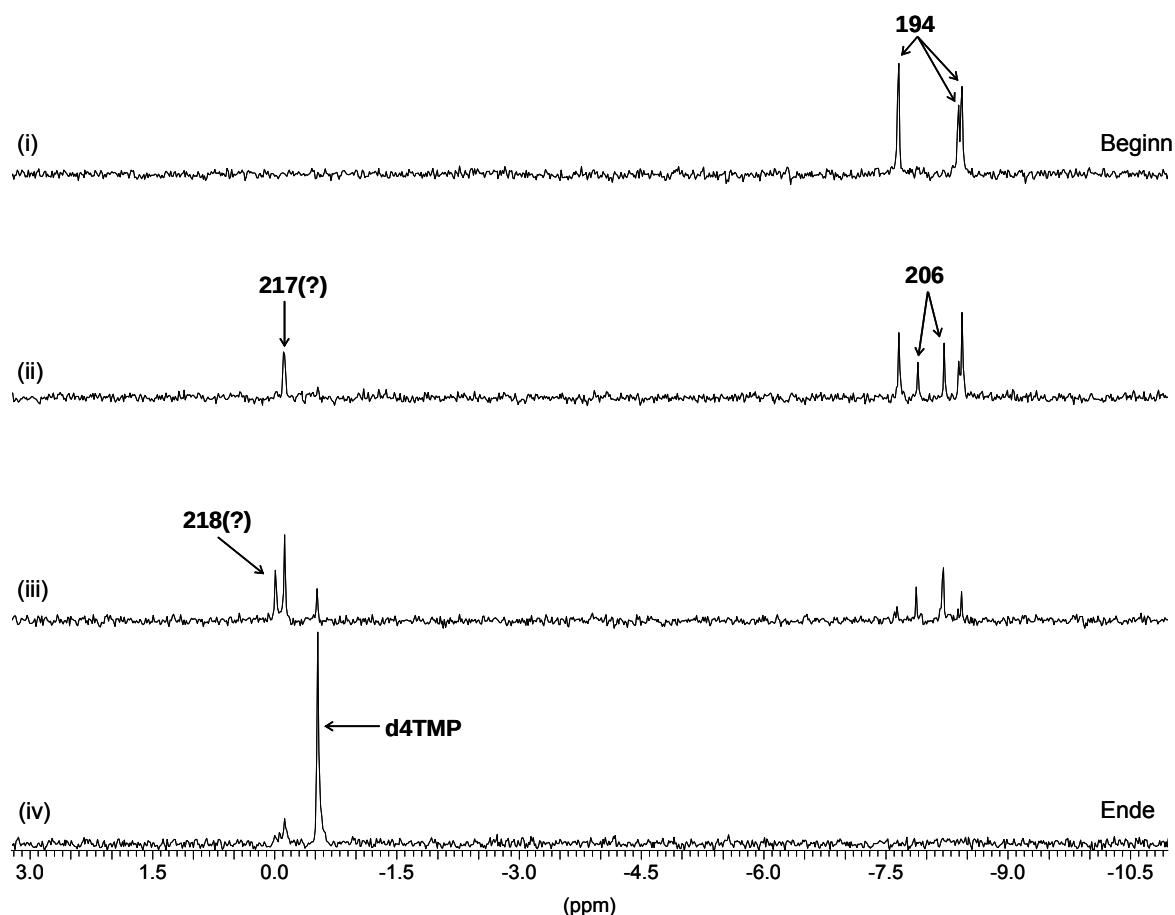


Abb. 117 ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse des 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphats) **194** in einem Imidazol/Salzsäure-Puffer (pH = 7.3, Raumtemperatur)

In der weiteren Folge der Hydrolyse ((iii) in Abb. 117) war die Bildung eines weiteren Signals ($\delta = -0.01$ ppm) zu beobachten, dass ebenfalls im typischen Bereich für Benzylphosphatdiester liegt. Dieses wäre nach der logischen Folge des Hydrolyseverlaufes dem Intermediat **218** zuzuordnen. Dass die chemische Verschiebung dieses Signals nicht mit der in Spektrum (c) der Abb. 116 (S. 146) identisch ist, hängt mit der leichten, konzentrationsabhängigen Beeinflussung der Signale durch die Anwesenheit anderer Verbindungen ab. Dieses Phänomen wurde schon in vielen

vergleichbaren Hydrolysen beobachtet. Um zu zeigen, dass das in Abb. 117 (S. 147) unter (iii) der Verbindung **218** zugeordnete Signal tatsächlich dieser entstammt, sind diese beiden Spektren noch einmal zueinander im Vergleich in Abb. 118 gezeigt. Dabei wurden beide Spektren auf dieselbe chemische Verschiebung des d4TMPs kalibriert, wodurch die Signale der Verbindung **206** nicht mehr gleich verschoben sind. Durch die Differenz der Verschiebung der Benzylphosphatdiestersignale zum d4TMP wird deutlich, dass das in Spektrum (iii) weiter ins Tieffeld verschobene Signal tatsächlich **218** zuzuordnen ist.

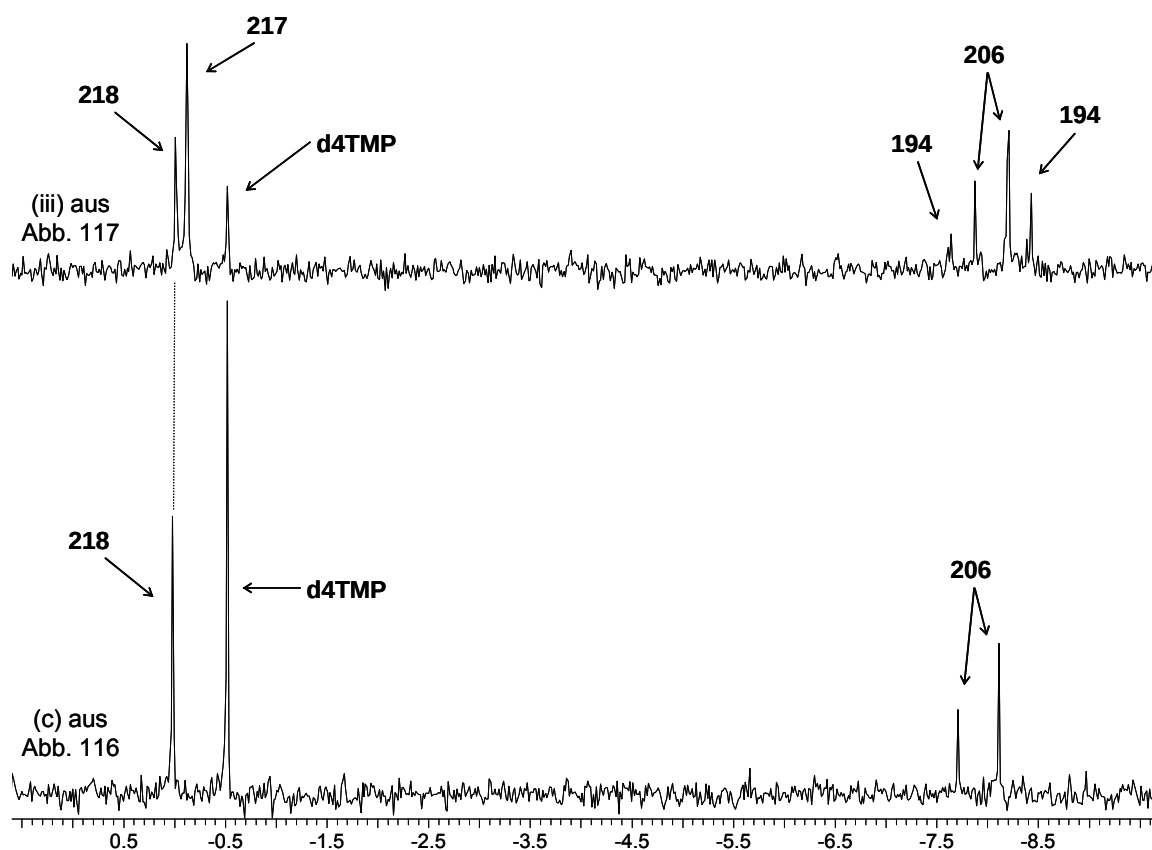


Abb. 118 Vergleichende Darstellung von ^{31}P -NMR-Spektren aus den Hydrolysen von **206** ((c) aus Abb. 116) und **194** ((iii) aus Abb. 117) kalibriert auf das Signal des d4TMPs

Im Spektrum (iv) der Abb. 117 (S. 147) ist neben d4TMP nur noch das Signal eines Benzylphosphatdiesters sichtbar. Dieses sollte auf Grund des Fehlens von Signalen im Bereich von -10 bis -6 ppm ebenfalls der Verbindung **218** zugeordnet werden können, auch wenn die chemische Verschiebung wiederum leicht verändert ist. Am Ende der Hydrolyse von **194** war ausschließlich d4TMP zu detektieren, das Spektrum entsprach somit genau dem Spektrum (d) der Abb. 116 (S. 146).

Ogleich eine simultane Hydrolyse auf Grund von möglichen Signalüberlagerungen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, so zeigen diese ^{31}P -NMR-Hydrolysen dennoch, dass die Verbindung **194** zum Großteil, vermutlich sogar ausschließlich, über den konsekutiven Weg hydrolysiert wird. Ein ähnliches Ergebnis war bereits aus den ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien des 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** abgeleitet worden. Da dort allerdings die zu **206** analoge Referenzverbindung **169** (Struktur Abb. 95, S. 118) in den Spektren nicht nachgewiesen werden konnte³⁷, sind die hier durchgeführten Experimente ein wesentlich nachhaltigerer Beleg.

5.4. Antivirale *in vitro*-Tests der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphate)

Die Daten der erneut in Kooperation mit Prof. Dr. J. Balzarini von der Universität in Leuven (Belgien) ermittelten antiviralen *in vitro*-Aktivitäten der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** sowie der Referenzverbindung **206** gegen HIV-1 und HIV-2 sind in Tab. 20 (S. 150) aufgeführt. Dort sind zum Vergleich auch die antiviralen Daten der 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36**⁵⁷ mit aufgenommen. Da diese aus zwei unterschiedlichen Testreihen stammen, ist für jede Testreihe der entsprechende Referenzwert für d4T **2** mit angegeben. Der im Zuge der Messungen der 5,5'-Verbindungen bestimmte Wert ist sowohl in CEM/0- als auch in CEM/TK⁻-Zellen etwas höher, liegt aber vor allem in den CEM/TK⁻-Zellen auf einem vergleichbaren Niveau, sodass auch ein abschätzender qualitativer Vergleich der antiviralen Wirkung der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** mit der Aktivität der 3,3'-Derivate **35** und **36** möglich ist.

Die antiviralen Aktivitäten der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) in den CEM/0-Wildtypzellen entsprechen im Rahmen der Standardabweichung ungefähr der von d4T **2**. Da hier aus einer Verbindung zwei Moleküle d4TMP freigesetzt werden, wäre eigentlich eine verbesserte antivirale Aktivität zu erwarten. Ein denkbarer Grund ist eine schlechtere Membrangängigkeit der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) auf Grund ihres hohen Molekulargewichts. In CEM/TK⁻-Zellen ist für nahezu alle Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) sowie für die Referenzverbindung **206** ein Verlust an antiviraler Aktivität im Vergleich zu den Aktivitäten in CEM/0-Zellen zu beobachten. Der nicht vollständige TK-Bypass dieser Verbindungen ist ebenfalls ein Hinweis auf eine eingeschränkte Membranpenetration, die wahrscheinlich zu der Hydrolyse eines Teils der Prodrugs im extrazellulären Raum führt. Im Vergleich der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196** mit

den 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36** ist erkennbar, dass die 5,5'-Derivate deutlich weniger an Aktivität verlieren.

Das 5,5'-Bis-(3-methyl-*cycloSal*-d4TMP) **195** weist als einzige dieser Verbindungen sogar einen vollen Erhalt an anti-HIV-2-Aktivität in CEM/TK⁻-Zellen auf. Ob dies im Zusammenhang mit den oben erläuterten unspezifischen Proteinbindungen (vgl. S. 140-142) in Verbindung steht, kann allerdings nur vermutet werden.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
5,5'-Bis-(3-H) 194-mix	0.51 ± 0.21	0.62 ± 0.51	12 ± 8.8	115 ± 58
5,5'-Bis-(3-H) 194-fast	0.46 ± 0.27	1.2 ± 0.0	4.4 ± 2.1	107 ± 39
5,5'-Bis-(3-H) 194-slow	0.47 ± 0.20	1.2 ± 0.21	3.3 ± 1.8	78 ± 2.1
5-Sal 206	0.73 ± 0.042	0.91 ± 0.28	3.7 ± 1.1	82 ± 1.4
5,5'-Bis-(3-Me) 195	0.40 ± 0.0	0.83 ± 0.24	0.85 ± 0.61	64 ± 7.1
5,5'-Bis-(3- <i>t</i> Bu) 196-mix	0.88 ± 0.18	1.3 ± 0.071	2.9 ± 1.2	20 ± 0.71
5,5'-Bis-(3- <i>t</i> Bu) 196-fast	0.81 ± 0.25	1.6 ± 0.95	2.8 ± 1.7	18 ± 1.4
5,5'-Bis-(3- <i>t</i> Bu) 196-middle	0.49 ± 0.45	1.0 ± 0.085	3.2 ± 0.64	19 ± 0.0
5,5'-Bis-(3- <i>t</i> Bu) 196-slow	0.86 ± 0.31	2.0 ± 0.0	2.6 ± 0.85	20 ± 1.4
d4T 2	0.56 ± 0.20	0.79 ± 0.19	29 ± 3.8	>250
3,3'-Bis-(5-H) 35-mix	0.19 ± 0.05	0.27 ± 0.11	2.33 ± 0.58	27.8 ± 11.0
3,3'-Bis-(5-H) 35-fast	0.25 ± 0.14	0.30 ± 0.09	3.33 ± 2.31	107 ± 13
3,3'-Bis-(5-H) 35-slow	0.21 ± 0.17	0.22 ± 0.16	2.37 ± 1.48	90.7 ± 16.1
3,3'-Bis-(5-Me) 36	0.37 ± 0.25	0.41 ± 0.19	1.60 ± 0.57	67.1 ± 7.1
d4T 2	0.25 ± 0.00	0.19 ± 0.10	21.7 ± 10.4	105 ± 78

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

Tab. 20 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **194-196**, des 5-(Saligen-5'-yl)-*cycloSal*-d4TMPs **206**, der 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35, 36** sowie der Referenzverbindung **2**

Im Vergleich der getrennten Diastereomere von **194** und **196** untereinander konnte wie schon für **35** kein signifikanter Unterschied in der antiviralen Aktivität festgestellt werden. Neben diesen Verbindungen wurden auch **200-202** auf ihr Verhalten in den anti-HIV-Tests untersucht (Tab. 21, S. 151). Hierbei wurden sehr interessante Beobachtungen gemacht. So ist zwar für alle drei Verbindungen die antivirale Aktivität in CEM/0-Zellen deutlich geringer als für d4T **2**, dennoch nimmt diese mit zunehmender Verzweigung und damit mit der Stärke des Donorsubstituenten in den

jeweiligen 3-Positionen zu. Das 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-*tert*-butyl-4,4'-diol **202** weist in CEM/TK⁻-Zellen sogar eine bessere antivirale Aktivität als das d4T **2** auf. Der EC₅₀-Wert für **200** in CEM/TK⁻-Zellen ist logisch nicht zu erklären. Hier müsste, wie für **201** und **202** gefunden, eine ähnliche Aktivität wie in den CEM/0-Zellen vorliegen. Somit ist hier von einem Messfehler oder einem Fehler in der Datenübermittlung auszugehen.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]		CC ₅₀ ^b [μM]	
	CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0	
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
200 (H)	99 ± 4.9	117 ± 41	18 ± 0.71	> 250
201 (Me)	20 ± 2.8	>50	>50	96 ± 0.71
202 (tBu)	7.9 ± 3.0	7.9 ± 3.0	6.9 ± 2.7	20 ± 0.71
d4T 2	0.56 ± 0.20	0.79 ± 0.19	29 ± 3.8	>250

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

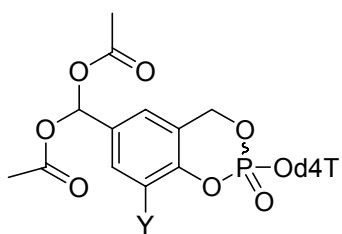
Tab. 21 Antivirale *in vitro*-Aktivitäten der Salicylalkoholderivate **200-202** sowie von d4T **2**

Anhand des für die Verbindung **202** erhaltenen Cytotoxizitätswerts ist deutlich zu erkennen, dass die Cytotoxizität der Verbindung **196** aus der Giftigkeit der freigesetzten Maske resultiert, was neben den bereits in Kapitel 5.3. beschriebenen Löslichkeitsproblemen die Verbindung **196** für eine potenzielle Verwendung als Medikamentenvorläufer ausschließt. Der Grund für die antivirale Wirkung von **202** ist noch unklar. Sollte sich diese in einem Wiederholungsexperiment bestätigen lassen, könnten hierzu weitere Studien durchgeführt werden. Da die antivirale Wirkung allerdings nicht bahnbrechend gut ist und **202** im Vergleich zu dieser eine recht hohe Cytotoxizität aufweist (SI = 3) kann der Nutzen dieses Aufwands bezweifelt werden.

6. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung einer neuen Klasse von *cycloSal*-Pronucleotiden – den enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-d4T-monophosphaten – sowie der Darstellung und Analyse von neuartigen 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphaten).

Aufbauend auf eigenen Vorarbeiten wurde zunächst die allgemeine Anwendbarkeit der bereits zur Synthese von **33** entwickelten Syntheseroute zu neuen 5-Diacetoxymethyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs (**40**, **41**) geprüft und bestätigt (S. 23-32). Anhand detaillierter Untersuchungen in Hydrolysestudien und *in vitro* anti-HIV-Tests

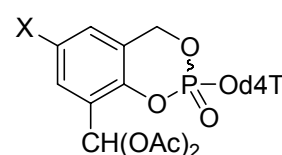


Y = H(**33**), Me(**40**), tBu(**41**)

konnte die Abhängigkeit der antiviralen Aktivität dieser Verbindungen von der Stabilität gegenüber der chemischen und der enzymatischen Spaltung, ihrer Lipophilie, den Eigenschaften der aus ihnen durch enzymatische Spaltung freigesetzten 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) sowie der absoluten Konfiguration

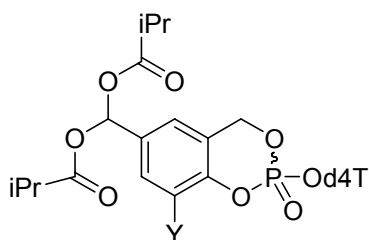
gezeigt werden. Bei den 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs weist vor allem die 3-*tert*-Butyl-substituierte Verbindung (**S_P**)-**41** eine vielversprechende antivirale Aktivität auf. Allerdings wurde für alle 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs ein starker Verlust an Hydrolysestabilität im Inkubationsmedium der antiviralen Tests (RPMI/FCS(10%)) sowie eine anteilige Spaltung der Acylalfunktion in diesem Medium festgestellt (S. 35-44).

Daher wurden 3-Diacetoxymethyl-5-alkyl- (**73**, **74**) und 3-Formyl-5-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs (**76**, **77**), also die analogen Verbindungen mit getauschten Positionen der Substituenten am aromatischen Ring der *cycloSal*-Maske, synthetisiert (S. 45-56), um die Stabilität der Diacetoxymethylfunktion in dieser Position zu untersuchen. Diese zeigen, wie konzeptionell erwünscht, eine deutlich größere Differenz in der chemischen Hydrolysestabilität zueinander als die 5-Diacetoxymethyl- zu den 5-Formyl-Derivaten. Allerdings erwiesen sich die 3-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs im Vergleich in ihrer antiviralen Wirkung nur als gleichwertig bzw. schlechter und waren dabei cytotoxischer. Auch wurde hier ebenfalls eine Spaltung der Acylalfunktionen in RPMI/FCS(10%) festgestellt (S. 56-59).



X = Me(**73**), tBu(**74**)

Da durch diese Verschiebung der Substituenten die Problematik der Acylalspaltung im Inkubationsmedium nicht behoben werden konnte, wurden *cycloSal*-d4TMPs mit einer stärker verzweigten Acylalfunktion in der 5-Position der *cycloSal*-Maske entwickelt. Diese 5-Diisobutyroxymethyl-5-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs (**103**, **104**) wiesen



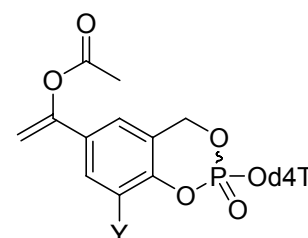
Y = Me(**103**), tBu(**104**)

auch die erwartete deutlich höhere Stabilität gegenüber einer enzymatischen Spaltung auf. Die Spaltung in RPMI/FCS(10%) konnte hierdurch stark verringert, wenn auch nicht vollständig verhindert werden. Erstaunlicherweise führte die höhere Verzweigung der Acylalfunktion zu einem deutlichen

Verlust an chemischer Hydrolysestabilität. Außerdem traten bei diesen sehr lipophilen Verbindungen große Löslichkeitsprobleme in wässrigen Medien auf, sodass im Hinblick auf die antivirale Aktivität auch hier keine Verbesserung erzielt werden konnte (S. 60-65).

Infolgedessen wurde ein weiterer Typ von enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-Pronucleotiden – die Enolester-substituierten *cycloSal*-d4TMPs – entwickelt. Um diesen Substanztyp grundlegend zu untersuchen, wurden verschiedene 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** dargestellt, wobei hier der Alkylsubstituent in der 3-Position der *cycloSal*-Maske variiert wurde (S. 67-90). Für diese

Enolester konnte die erwartete enzymatische Spaltung zu den entsprechenden 5-Acetyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs **109-111** belegt werden. Außerdem konnte die effektive, selektiv verlaufende Freisetzung von d4TMP aus diesen Verbindungen gezeigt werden. Die 5-Acetyl-*cycloSal*-



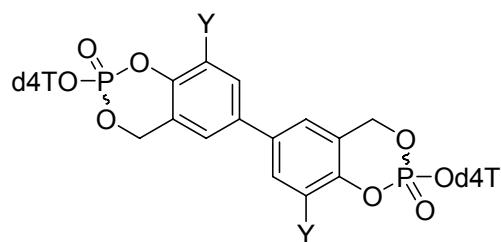
d4TMPs **109-111** weisen im Vergleich zu den Y = H(**106**), Me(**107**), tBu(**108**) 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMPs **34**, **62** und **63** eine deutlich höhere chemische Hydrolysestabilität auf (S. 94-102). Dies hat zur Folge, dass für das 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **108** der gewünschte Effekt einer enzymatischen Aktivierung durch die Freisetzung der entsprechenden Acetyl-Verbindung **111** ausbleibt. 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-methyl-*cycloSal*-d4TMP **107** hingegen lieferte aussichtsreiche antivirale Daten, die auch auf einen erfolgreichen Zelleinschluss des aus dieser Verbindung enzymatisch freigesetzten 5-Acetyl-3-methyl-*cycloSal*-d4TMPs **110** zurückzuführen ist (S. 102-104). Allerdings wurde auch

bei allen 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs **106-108** eine anteilige Spaltung im RPMI/FCS(10%) beobachtet (S. 96). Im Hinblick darauf ist eine zukünftige Entwicklung weiterer 5-(1-Acyloxyvinyl)-3-methyl-*cycloSal*-d4TMPs zu empfehlen, deren Enolesterfunktionen eine höhere Stabilität gegenüber der enzymatischen Spaltung aufweisen (siehe Abb. 119, S. 158).

Die absolute Konfiguration aller im Rahmen dieser Arbeit diastereomerenrein erhaltenen *cycloSal*-d4TMPs (**41**, **63**, **104**, **108**, **111**) konnte auf Grundlage einer Röntgenkristallstruktur von (*R_P*)-**63**, der ersten existierenden Röntgenkristallstruktur eines diastereomerenreinen *cycloSal*-Nucleosidmonophosphats überhaupt, eindeutig zugeordnet werden (S. 33-34, 38-39, 60-61, 98-100). Bei all diesen Verbindungen weist das *S_P*-konfigurierte Diastereomer die bessere anti-HIV-2-Aktivität in Thymidin-Kinase defizienten CEM-Zellen auf. Mittels eines photometrisch verfolgten Assays zur Stärke der Butyrylcholinesterase-Inhibition der reinen Diastereomere wurde ein bereits für andere diastereomerenreine *cycloSal*-d4TMPs beobachteter Zusammenhang zwischen der absoluten Konfiguration am Phosphoratom und dem Inhibitions-potenzial sowie der antiviralen Effektivität bestätigt. So inhibiert in allen Fällen dasjenige Diastereomer die humane Butyrylcholinesterase schwächer oder überhaupt nicht, das die bessere antivirale Aktivität besitzt. Für die im Zuge dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen war dies in allen Fällen das *S_P*-konfigurierte Diastereomer. Dies stellte genau den Gegensatz zu der in vorigen Arbeiten getroffenen Zuordnung dar (S. 115-117). Aus diesem Grund wurde die seinerzeit anhand von Ergebnissen aus der CD-Spektroskopie getroffene Zuordnung überprüft. Durch einen Vergleich der dort zur Zuordnung verwendeten CD-Spektren mit denen der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen konnte eindeutig belegt werden, dass die damals getroffene Zuordnung nicht korrekt war (S. 117-121). Durch dieses nun schlüssige Gesamtbild des von der absoluten Konfiguration abhängigen biologischen Verhaltens der diastereomerenreinen *cycloSal*-d4TMPs steht über die Korrelation der antiviralen Aktivität mit den Ergebnissen des Butyrylcholinesterase-Inhibitions-Assays eine Möglichkeit zur Verfügung, die absolute Konfiguration neuer diastereomerenreiner *cycloSal*-d4TMPs auch ohne Kristallstruktur abzuleiten.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit neuartige „dimere“ *cycloSal*-d4TMPs synthetisiert und umfassend analysiert. In diesen 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs)

194-196 sind zwei gleichartige *cycloSal*-d4TMP-Einheiten über die jeweiligen 5-Positionen der aromatischen Ringe miteinander verknüpft. Über zusätzliche Alkyl-

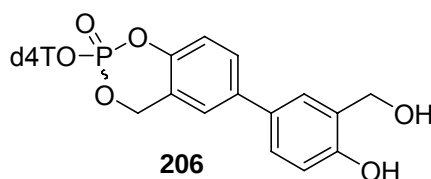


Y = H(**194**), Me(**195**), tBu(**196**)

substituenten in den jeweiligen 3-Positionen wurde auch hier die Hydrolysestabilität variiert. Die Synthese dieser Verbindungen konnte analog zum Syntheseweg der bereits bekannten 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) **35** und **36**, mit einer Eisen(III)-acetylacetonat-

vermittelten Homokupplung entsprechender 4-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetale als zentralem Reaktionsschritt, durchgeführt werden. Durch Verwendung einer alternativen Methode zur Entschützung der daraus resultierenden Kupplungsprodukte konnte die Ausbeute dieses Reaktionsschritts erheblich gesteigert (71-92% vs. 28%) und zeitgleich die Reaktionszeit deutlich minimiert werden (wenige Minuten vs. 65 h). Durch leichte Änderungen in der Reaktionsführung der beiden anschließenden Schritte konnten wesentlich bessere Ausbeuten der Zielverbindungen (28-37% vs. 8-11%) als zuvor erzielt werden (S. 129-133). Trotz deutlich geringerer Hydrolysestabilitäten im Vergleich zu den 3,3'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) (**35**, **36**; S. 138-140) gelang mit der Synthese des 5,5'-Bis-(3-methyl-*cycloSal*-d4TMPs) **195** erstmals die Darstellung eines Bis-(*cycloSal*-d4TMPs), das einen vollen Erhalt der anti-HIV-2-Aktivität in Thymidin-Kinase defizienten CEM-Zellen zeigt (S. 150).

Ebenso war die detaillierte Untersuchung des Hydrolyseweges der 5,5'-Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) (S. 143) Gegenstand dieser Arbeit. Dieser wurde am Beispiel der unsubstituierten Verbindung **194** analysiert. Durch Anwendung der Homokupplungsbedingungen für eine Heterokupplung zweier geschützter 4-Bromsalicylalkohole mit orthogonal spaltbaren Schutzgruppen als Kernsyntheseschritt gelang die Darstellung des potenziellen Hydrolyseintermediats **206**, aus dem bereits ein Äquivalent d4TMP hydrolytisch freigesetzt wurde (S. 134-137). Über die Auswertung der Hydrolysestudien dieser Verbindungen mittels analytischer RP-HPLC (S. 144-145) sowie durch ³¹P-NMR-Hydrolysestudien (S. 145-149) konnte schließlich eindeutig die Bildung dieses Intermediats nachgewiesen und somit der konsekutive Verlauf der Hydrolyse der Bis-(*cycloSal*-d4TMPs) postuliert werden.



7. Summary

This thesis deals with the synthesis and the investigation of the structure-activity-relationship of a new class of *cycloSal*-pronucleotides – enzymatically activated *cycloSal*-d4T-monophosphates – as well as with the synthesis and the analysis of new 5,5'-bis-(*cycloSal*-d4T-monophosphates).

As one type of enzymatically activated *cycloSal*-d4TMPs different diacyloxymethyl-substituted compounds have been synthesized. Using initially synthesized 5-diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs (**33**, **40**, **41**) with different substituents (H, CH₃, *t*Bu) in the 3-position of the *cycloSal*-mask (p. 23-32), the general applicability with regard to the designed concept was shown. A dependence of the antiviral *in vitro* activity against HIV of these compounds on their hydrolysis behaviour, the absolute configuration at the phosphorus atom as well as the properties of the released respective 5-formyl-*cycloSal*-d4TMPs (**34**, **62**, **63**) has been found. But, as a general problem, an enormous loss of hydrolysis stability and a partial cleavage of the acylal function in the cell culture medium for the antiviral testings (RPMI/FCS(10%)) occurred (p. 35-44).

Moving the diacetoxymethyl group to the 3-position did not result in any improvement (p. 45-59). So, 5-diisobutyroxymethyl-3-alkyl-*cycloSal*-d4TMPs (**103**, **104**) have been synthesized. These compounds showed the expected higher stability against enzymatic cleavage and the decomposition of the acylal-group in the RPMI media could be alleviated. However, these compounds have a decreased stability against chemical hydrolysis and entailed solubility problems in aqueous media (p. 60-65). Because no auspicious antiviral data were obtained, a new type of enzymatically activated prodrugs was developed (p. 67-90).

These 5-(1-acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs (**106-108**) proved to release 5-acetyl compounds (**109-111**) by intracellular enzymatic cleavage and were found to be more stable against chemical hydrolysis compared to their respective acylal substituted counterparts (p. 94-102). For the 3-alkyl substituted enolic esters promising antiviral data were observed (p. 102-104). But only for the methyl substituted compound further enhancements are reasonable because only the 5-acetyl-3-methyl-*cycloSal*-d4TMP **110** ensures an effective intracellular trapping due to its lower lipophilicity and

its faster chemical hydrolysis. Here, further studies are necessary because a partial cleavage of the ester functionality in the cell culture medium was found for the 5-(1-acetoxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs (**106-108**) as well (p. 96). By the usage of acyl residues with branched alkyl chains or a phenyl ring this problem might be solved.

Some of the synthesized compounds could be isolated as pure diastereomers by preparative RP-HPLC. Based on a single crystal X-ray structure of (*R_P*)-**63** all absolute configurations could be attributed (p. 33-34, 38-39, 60-61, 98-100). All *S_P*-configured compounds showed better anti-HIV-activity. In a butyrylcholinesterase inhibition assay it was shown that these compounds always have the lower inhibition potency, too. This coherence was found before but has been attributed to the *R_P*-configuration (p. 115-117). This former attribution has been scrutinized and was found to be wrong (p. 117-121). Now, it should be possible to attribute the absolute configuration of new diasteromerically pure *cycloSal*-d4TMPs by the correlation of the antiviral activity and the BChE-inhibition potency without having an X-ray structure.

In a further project *cycloSal*-prodrugs with a mask-to-drug ratio of 1:2 have been investigated and a highly efficient synthetic route to 5,5'-bis-(*cycloSal*-d4TMPs) (**194-196**) has been developed (p. 129-133). Although these compounds showed lower hydrolysis stabilities compared to the already known 3,3'-derivatives (**35**, **36**) 5,5'-bis-(3-methyl-*cycloSal*-d4TMP) **195** was the only biaryl pronucleotide that retained full antiviral activity in TK deficient CEM cells (p.150). The complex hydrolysis pathway of these compounds (p. 143) has been studied exemplarily on the hydrolysis of unsubstituted 5,5'-bis-(*cycloSal*-d4TMP) **194**. By the synthesis of the possible hydrolysis intermediate **206** (p. 134-137) and detailed hydrolysis studies in phosphate buffer (pH = 7.3) and in ³¹P-NMR experiments (p. 144-149) a consecutive pathway could be postulated.

8. Ausblick

Aus den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zu den enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-d4T-monophosphaten lässt sich schließen, dass die Enolester-substituierten Verbindungen die vielversprechenderen sind, da wie bereits in Kapitel 4.1.8. angemerkt (vgl. S. 65), eine weitere Modifikation der Diacyloxymethyl-Verbindungen nicht als zielführend erscheint. Eine weitere Verzweigung der Alkylgruppe in der Acylalfunktion, die zu einer höheren Stabilität gegenüber der enzymatischen Spaltung führte, würde gleichzeitig sowohl die Stabilität gegenüber der chemischen Hydrolyse herabsetzen als auch noch größere Löslichkeitsprobleme in wässrigen Medien als Resultat haben. Außerdem könnte die gewünschte intrazelluläre enzymatische Spaltung so stark verlangsamt werden, dass die chemische Hydrolyse der schneller verlaufende Schritt werden würde, was dem Konzept der enzymatischen Aktivierung widerspricht. Daher ist also eine Konzentration auf die 5-(1-Acyloxyvinyl)-*cycloSal*-d4TMPs ratsam. Hier empfiehlt sich die Modifikation der Enolesterfunktion bei Verwendung eines Methylsubstituenten in der 3-Position. Dieser ist für eine ausreichend hohe Hydrolysestabilität unverzichtbar und das resultierende 5-Acetyl-3-methyl-*cycloSal*-d4TMP **110** garantiert einen effektiven Zelleinschluss (vgl. S. 103-104). Um den Enolester gegenüber einer enzymatischen Spaltung, vor allem der unerwünschten in RPMI/FCS(10%), zu stabilisieren, könnten auch hier stärker verzweigte (Alkyl)-Reste verwendet werden. Diese potenziellen Zielverbindungen sind in Abb. 119 gezeigt.

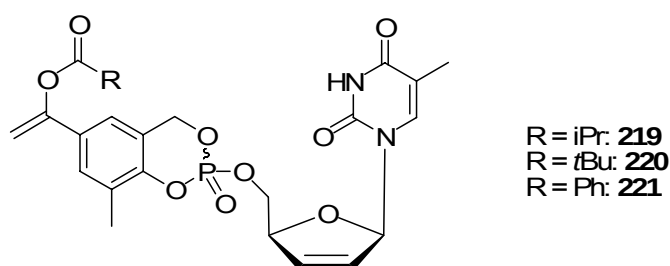


Abb. 119 Mögliche zukünftige 5-(1-Acyloxyvinyl)-3-methyl-*cycloSal*-d4TMPs **219-221**

Da hier im Vergleich zu den geminalen Dicarboxylaten anstatt zweier Acylreste nur einer mit deutlich lipophileren Resten versehen werden würde, sollten für diese potenziellen Verbindungen die Löslichkeitsprobleme noch keine entscheidende Rolle spielen. Abzuwarten bleibt allerdings, wie sich diese Modifikationen der Enolesterfunktion auf die chemische Hydrolysestabilität auswirken. Die Verbindungen

219-221 sollten prinzipiell über die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Route (vgl. S. 84-90) zugänglich sein. Dazu müssten die entsprechenden Isopropenylester **222-224** für eine Umwandlung des di-*tert*-Butylsilyl-4-acetyl-6-methylsalicylalkohols **155** in die entsprechenden Enolester hergestellt werden. Für die Isopropenylester **222** und **224** ist eine Synthese von *Hanefeld et al.*⁹⁹ bekannt, die auch für die Darstellung von **223** anwendbar sein sollte. Da diese Produkte allerdings teilweise als Öl oder Feststoff vorliegen, müsste eine Synthese unter Verwendung eines Lösungsmittels entwickelt werden (Abb. 120).

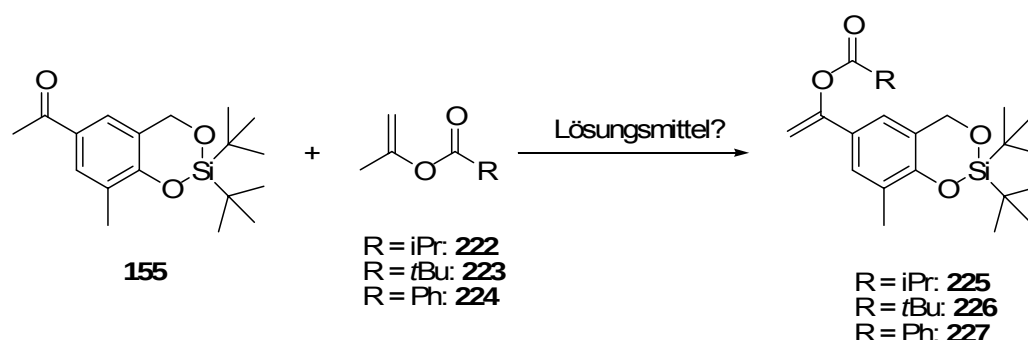


Abb. 120 Entscheidener Syntheseschritt auf dem Weg zu den Zielverbindungen **219-221**

Wie aber schon mehrfach in dieser Arbeit erwähnt, ist eine Untersuchung der tatsächlichen *in vivo*-Aktivität der *cycloSal*-d4TMPs gegen HIV unabdingbar, um weitere sinnvolle Optimierungen dieses Prodrug-Systems vorzunehmen. Erst hieraus könnte ein wirklich aussagekräftiger Vergleich der Effektivität solcher enzymatisch aktivierten *cycloSal*-Verbindungen zu dem in den *in vitro*-Tests bisher antiviral aktivsten 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **9** gezogen werden.

Im Hinblick auf das Erlangen weiterer Kenntnisse über die potenziell unterschiedliche Zellaufnahme und Zellverteilung der beiden Diastereomere von *cycloSal*-NMPs sowie der daraus resultierenden unterschiedlichen antiviralen Aktivität sollte der Fokus auch auf die Entwicklung von Verbindungen gerichtet sein, die für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen geeignet sind. Einen vielversprechenden Ansatz hierzu stellen *cycloSal*-Verbindungen mit BCNAs (bicyclic pyrimidine nucleoside analogs) als Nucleosidbaustein dar. Diese von *McGuigan et al.*¹⁰⁰ entwickelten intrinsisch fluoreszierenden Nucleosidanaloga zeigen für diese Analytik sehr gut geeignete spektrale Eigenschaften. Die allgemeine Struktur solcher potenziellen *cycloSal*-BCNA-monophosphate ist in Abb. 121 (S. 160) gezeigt.

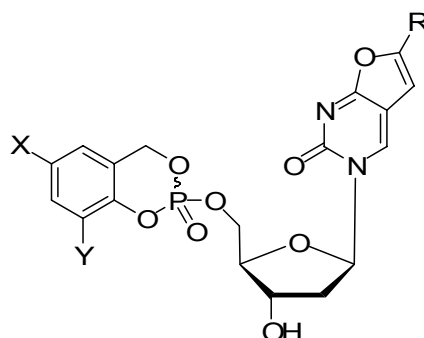


Abb. 121 Allgemeine Struktur der potenziellen *cycloSal*-BCNA-monophosphate

Wird der Rest R nicht zu groß gewählt, sollten diese Verbindungen nur wenig von den zu Grunde liegenden Pyrimidinstrukturen abweichen und so einen Vergleich des Diffusionsverhaltens mit den *cycloSal*-d4TMPs zulassen. Ein noch exakterer Vergleich wäre natürlich möglich, wenn die Darstellung eines entsprechenden d4-Derivats der BCNAs gelänge. Im Hinblick auf den Vergleich der Eigenschaften einer enzymatisch aktivierten Verbindung mit dem entsprechenden 3-Methyl-Derivat wäre also die Synthese der entsprechenden Verbindungen (X = 1-Acyloxyvinyl, Y = CH₃ sowie X = H, Y = CH₃ in Abb. 121) von großem Interesse.

Auch könnten über diese Verbindungen weitere Erkenntnisse über die Molekülfaltung der *cycloSal*-Pronucleotide erhalten werden. Bei erfolgreicher Trennung der Diastereomere wären potenziell Fluoreszenzstudien möglich, wie sie mit den Triestern **182** und **183** (vgl. S. 123-124) bereits durchgeführt wurden. Möglicherweise könnte hier das ausschließlich von einem Diastereomer verursachte „Fluoreszenz-Quenching“ belegt werden.

9. Experimentalteil

9.1. Allgemeines

9.1.1. Edukte und Reagenzien

Sämtliche Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Acros, Aldrich, Fluka und VWR in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung für die Synthesen verwendet. 2'-Desoxythymdin wurde von der Firma ChemGenes erworben.

Diisopropylethylamin (DIPEA): mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas destilliert und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Essigsäureanhydrid: unter Inertgas destilliert.

Isobuttersäureanhydrid: unter Inertgas destilliert.

Isopropenylacetat: unter Inertgas destilliert.

Phosphor(III)-chlorid: unter Inertgas destilliert.

Triethylamin: mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas destilliert und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

9.1.2. Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung (Reaktionen und Arbeitsschritte ohne Inertgasbedingungen, Chromatografie) gereinigt. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan: über Calciumchlorid getrocknet und destilliert.

Diethylether: am Rotationsverdampfer destilliert, über KOH gelagert.

Ethylacetat: über Calciumchlorid getrocknet und destilliert.

Methanol: destilliert.

9.1.3. Absolute Lösungsmittel

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

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

CDCl₃: über Molekularsieb (0.4 nm) getrocknet.

Dichlormethan: unter Rückfluss über Phosphor(V)-oxid getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

Diethylether: unter Rückfluss über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

N,N-Dimethylacetamid: Fluka Nr. 38839, absolut über Molekularsieb.

N,N-Dimethylformamid (DMF): Fluka Nr. 40248, absolut über Molekularsieb.

Dimethylsulfoxid (DMSO): Fluka Nr. 41648, absolut über Molekularsieb.

DMSO-d₆: über Natrium getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) aufbewahrt.

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

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

9.1.4 Chromatografie

Dünnschichtchromatografie

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (VWR Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Alle R_F-Werte wurden bei Kammer-sättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Nucleosidische Substanzen wurden darüber hinaus mittels eines Gemischs aus *p*-Methoxybenzaldehyd (0.5 mL),

Ethanol (20 mL), konz. Schwefelsäure (0.5 mL), Essigsäure (0.1 mL) und Wasser (20 mL) angefärbt.

Zirkulare präparative Dünnschichtchromatografie (Chromatotron)

Mittels eines Chromatotrons der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4 g getrennt. Als Trennmittel diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF₂₅₄ (VWR Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Säulenchromatografie

Für säulenchromatografische Trennungen wurde VWR Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) verwendet. Für anspruchsvollere Trennprobleme kam die klassische Säulenchromatografie zum Einsatz, für einfachere Trennprobleme wurden Säulenfiltrationen in einer Glasfritte durchgeführt.

Umkehrphasenchromatografie

Für Dünnschichtchromatogramme wurde Kieselgel 60 RP-18 F_{254s} DC-Folie (VWR 5559) verwendet, für die Säulenchromatografie wurde LiChroprep RP-18 (40-63 µm) eingesetzt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

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

Software:	Chromatography Data Station Software
Interface:	D-7000
Pumpe:	L-7100
Automatischer Probenwechsler:	L-7200
Detektion:	Diode Array Detector L-7455
Analytische Säule:	LiChroCart 125-3 mit LiChrospher 100 RP 18 (5 µm) Füllmaterial

Methoden:

Methode I: Von 0 bis 25 min Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (5-100%), bis 35 min isokratisch Acetonitril/Wasser 5:95 v/v, Flussrate 0.5 mL/min, UV-Detektion (240-260 nm).

Methode II: Von 0 bis 22 min Ionenpuffer mit einem Acetonitril-Gradienten (8-92%), bis 27 min reines Acetonitril, bis 33 min isokratisch Acetonitril/Ionenpuffer 8:92 v/v, Flussrate 0.6 mL/min, UV-Detektion (240-260 nm).

Methode III: Von 0 bis 20 min isokratisch Acetonitril/Wasser 25:75 v/v, von 20 bis 40 min isokratisch Acetonitril/Wasser 35:65 v/v, von 40 bis 50 min Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (35-100%), dann für 15 min isokratisch Acetonitril/Wasser 25:75 v/v, Flussrate 0.5 mL/min, UV-Detektion (240-260 nm).

Methode IV: Von 0 bis 20 min isokratisch Acetonitril/Wasser 25:75 v/v, von 20 bis 45 min isokratisch Acetonitril/Wasser 55:45 v/v, von 45 bis 55 min Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (55-100%), dann für 15 min isokratisch Acetonitril/Wasser 25:75 v/v, Flussrate 0.5 mL/min, UV-Detektion (240-260 nm).

Lösungsmittel:

Für alle HPLC-Anwendungen wurde Acetonitril des Reinheitsgrads „HPLC grade“ (Firma Acros oder VWR) sowie Reinstwasser (Milli-Q) verwendet.

Ionenpuffer:

Stammlösung (9.8 mM TBAH): Es wurden 1000 mL Wasser mit 6.6 mL einer Lösung von Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) in Wasser (ca. 40%, 1.5 M) versetzt und mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 3.8 eingestellt.

Verwendete Lösung (0.55 mM TBAH): Es wurden 60 mL der 9.8 mM Stammlösung mit 1000 mL Wasser verdünnt.

Die präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatografie wurde isokratisch mit einer Merck-Hitachi L-6250 Intelligent Pump mit 5 mL-Schleife durchgeführt. Als Detektor diente ein Merck-Hitachi LaChrom UV-Detektor L-7400 mit einem Merck-Hitachi D-2500A Chromato-Integrator. Die verwendete Säule war eine Merck Hibar Fertigsäule RT 250-25 mit LiChrospher 100 RP-18e (5 µm) Füllmaterial. Die Flussrate betrug 10 mL/min, die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Das zu trennende Gemisch wurde dabei, sofern nicht anders angegeben, im jeweils verwendeten Eluenten gelöst und vor der Injektion über einen Einmal-Filter (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 μM) filtriert. Die für einen einzelnen HPLC-Lauf injizierten Mengen wurden so gewählt, dass die injizierte Menge des Substanzgemischs maximal 50 mg betrug. Für anspruchsvollere Trennungen (beispielsweise von Diastereomergemischen) wurde die injizierte Menge pro HPLC-Lauf auf maximal 25 mg begrenzt. Die Produkte wurden anschließend durch direkte Gefriertrocknung der gesammelten Lösungen isoliert.

9.1.5. 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 den Modellen AMX 400 und AV 400 wurden 400 MHz- ^1H -NMR-, 101 MHz- ^{13}C -NMR- und 162 MHz- ^{31}P -NMR-Spektren, auf dem Modell DRX 500 wurden 500 MHz- ^1H -NMR- und 126 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren gemessen. Zusätzlich wurden auf den Modellen AV 400 und DRX 500 von allen nicht luftempfindlichen Verbindungen ^1H , ^1H - sowie ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren (H,H-COSY, HMQC, HMBC) aufgenommen. Sämtliche ^{31}P -NMR-Spektren wurden ^1H -entkoppelt gemessen.

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale kalibriert, wobei DMSO- d_6 auf 2.50 (^1H) bzw. 39.52 (^{13}C) ppm, CDCl_3 auf 7.26 (^1H) bzw. 77.16 (^{13}C) ppm und Benzol- d_6 auf 7.16 (^1H) bzw. 128.06 (^{13}C) ppm kalibriert wurde. Die Verschiebungen der ^{31}P -NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard von 85%iger Phosphorsäure angegeben. Luftempfindliche Substanzen wurden in zuvor getrocknetem CDCl_3 vermessen.

Massenspektrometrie (MS)

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg an einem doppel-fokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical aufgenommen. Dabei wurde eine *meta*-Nitrobenzylalkohol-Matrix sowie Xenon als Stoßgas verwendet.

Die ESI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg an einem Finnigan ThermoQuest MAT 95 XL-Spektrometer aufgenommen.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren der als KBr-Presslinge oder mit Hilfe von NaCl-Platten vermessenen Substanzen wurden an einem Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR aufgenommen. Für alle direkt vermessenen Verbindungen wurde ein Alpha-P FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker verwendet.

Ultraviolett-Spektroskopie (UV) und Fotometrie

Als UV-Spektrometer und Fotometer kam ein Varian Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer mit einem Varian Cary Temperature Controller zum Einsatz. Für alle *cycloSal*-Nucleotide wurden die UV-Spektren der HPLC-Analysen zur Auswertung verwendet.

Circularer Dichroismus

Die Messungen des Circular Dichroismus wurden an einem CD Instrument Model 215 der Firma AVIV durchgeführt.

9.1.6. Weitere verwendete Geräte

Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wässriger oder wasserhaltiger Lösungen wurde an einer Christ ALPHA 2-4-Gefriertrocknungsanlage durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung wurde mit einem Schmelzpunktbestimmer apotec der Firma Otto Stein durchgeführt.

Thermomixer

Als Thermomixer wurde ein Eppendorf Thermomixer 5436 verwendet.

Zentrifuge

Als Zentrifuge kam eine Biofuge *pico* der Firma Heraeus zum Einsatz.

9.2. Synthesen

9.2.1. Synthese bereits bekannter Verbindungen

Folgende Substanzen wurden ohne Veränderung der Durchführung nach bereits in der Literatur beschriebenen Verfahren dargestellt:

2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, **2**) aus 2'-Desoxythymidin über drei Stufen³⁷, 5-Formyl-cycloSal-d4TMP (**34**) aus 5-Bromsalicylaldehyd (**42**) über sechs Stufen⁵⁵, 4-Brom-6-methylsalicylalkohol (**48**) aus 3-Methylsalicylsäure (**50**) über drei Stufen³⁷, 3-*tert*-Butylsalicylaldehyd (**54**)⁶³, 6-Bromsalicylalkoholisopropyliden-acetal (**95**)⁵³, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyacetophenon (**140**)⁷⁹.

9.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Salicylalkohol-Derivaten durch Reduktion von Carbonylverbindungen (AAV 1)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente (für Salicylaldehyde als Edukt) bzw. 2.0 Äquivalente (für Salicylsäureester als Edukt) Lithiumaluminiumhydrid in abs. THF suspendiert. Zu dieser Suspension wurde bei Raumtemperatur unter Rühren eine Lösung von 1.0 Äquivalenten der Carbonylverbindung in abs. THF innerhalb von 30-45 Minuten getropft. Zunächst wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur, dann eine Stunde unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde mit 2 N Salzsäure auf pH 4-5 angesäuert. Durch die anschließende Zugabe von Wasser und Ethylacetat wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die so erhaltenen Rohprodukte wurden chromatografisch gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur *ortho*-Chlormethylierung von Phenolen und anschließender Umsetzung zu Salicylalkohol-Derivaten (AAV 2)

Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Phenols in konzentrierter Salzsäure gelöst, mit 4.1 Äquivalenten einer 37%igen Formaldehyd-Lösung versetzt und für vier Stunden bei 50 °C gerührt. Die nach Filtration oder Extraktion erhaltenen rohen Produkte wurden ohne weitere Reinigung in einer nucleophilen Substitutionsreaktion zum jeweiligen Salicylalkohol umgesetzt.

Ein Äquivalent des jeweiligen rohen *ortho*-Chlormethylphenols wurde in wässrigem THF gelöst, mit 1.5 Äquivalenten Calciumcarbonat und zusätzlichem Wasser (4 mL pro 10 mL THF) versetzt und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 6 eingestellt, weiter mit Wasser (halbes Volumen der Lösung) verdünnt und viermal mit Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach chromatografischer Reinigung konnten die reinen Salicylalkohole isoliert werden.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Isopropyliden-Schätzung von Salicylalkoholen (AAV 3)

Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Salicylalkohols in Aceton gelöst und mit fünf Äquivalenten 2,2-Dimethoxypropan, drei Äquivalenten wasserfreiem Natriumsulfat und 0.1 Äquivalenten *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert und der Rückstand in Ethylacetat und Wasser aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 1 M Natronlauge und einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden chromatografisch gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bis-Silylschätzung von Salicylalkoholen (AAV 4)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Salicylalkohols in abs. Pyridin gelöst und mit 4.0 Äquivalenten des Chlorids der verwendeten Silylschutzgruppe sowie 7.0 Äquivalenten Imidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde für vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser bei 0 °C abgebrochen und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Die resultierenden Rohprodukte wurden chromatografisch gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Di-*tert*-butylsilyl-Schützung von Salicylalkoholen (AAV 5)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Salicylalkohols in abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde mit 4.4 Äquivalenten abs. Pyridin sowie 1.3 Äquivalenten Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluormethansulfonat) versetzt und anschließend bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung in Eiswasser gegeben. Nach zweifacher Extraktion mit Dichlormethan wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Durch chromatografische Reinigung wurden die reinen Produkte isoliert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Formylierung von Brom-substituierten Salicylalkoholen (AAV 6)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Brom-substituierten Salicylalkohols in abs. THF gelöst. Die Lösung wurde auf -78 °C (Innentemperatur) abgekühlt und so mit 2.0 Äquivalenten einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung versetzt, dass die Innentemperatur immer unter -78 °C blieb. Nach zwei Stunden Rühren bei -78 °C wurde eine Lösung aus 10 Äquivalenten abs. *N,N*-Dimethylformamid in abs. THF (1:1 v/v) hinzugegeben. Die resultierende Lösung wurde noch 45 Minuten bei -78 °C gerührt und dann langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Zugabe von Wasser und Diethylether wurden die Phasen getrennt und die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden noch einmal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Eine abschließende chromatografische Reinigung ergab jeweils die reinen Produkte.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von 1-Acetoxyvinyl-substituierten Salicylalkoholen aus Acetyl-substituierten Salicylalkoholen (AAV 7)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Der entsprechende Acetyl-substituierte Salicylalkohol (1.0 Äquivalente) wurde in Isopropenylacetat gelöst

und mit *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (0.3 Äquivalente) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 18 Stunden bei 110 °C gerührt. Anschließend wurden die Phasen mit Diethylether und Wasser getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Die Rohprodukte wurden chromatografisch gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Homokupplung Brom-substituierter Salicylalkohole (AAV 8)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Der jeweilige Brom-substituierte Salicylalkohol (1.0 Äquivalente) wurde in abs. THF gelöst, diese Lösung auf -80 °C abgekühlt und mit 1.0 Äquivalenten einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei -80 °C gerührt und anschließend in ein auf -80 °C gekühltes Gemisch von 1.1 Äquivalenten Eisen(III)-acetylacetonat in abs. THF überführt. Nach fünfminütigem Rühren bei -80 °C wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch für die angegebene Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Ethylacetat und 2 N Salzsäure aufgenommen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend dreimal mit 2 N Salzsäure, zweimal mit destilliertem Wasser sowie zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurden die Rohprodukte chromatografisch gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entschützung von Isopropyliden-geschützten Salicylalkoholen (AAV 9)

Variante I

Ein Äquivalent des jeweiligen Salicylalkoholisopropylidenacetals wurde in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch gelöst und mit wenigen Tropfen rauchender Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für dreißig Sekunden zum Sieden erhitzt. Die quantitative Entschützung wurde dünnschichtchromatografisch (Laufmittel: Dichlormethan) überprüft und die Prozedur gegebenenfalls mehrfach wiederholt. Anschließend wurden mit Wasser und Ethylacetat die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen

Phasen nach Trocknung über Natriumsulfat am Rotationsverdampfer eingengt. Die Rückstände wurden chromatografisch gereinigt.

Variante II

Die Synthese erfolgte analog zu Variante I, allerdings wurden einige Milliliter rauchende Salzsäure eingesetzt und für eine Minute zum Sieden erhitzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entschützung von Silyl-geschützten Salicylalkoholen (AAV 10)

*Variante I (mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid)*

Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Silyl-geschützten Salicylalkohols in THF (über KOH gelagert) gelöst und mit 2.5 Äquivalenten Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bis zur vollständigen Entschützung bei Raumtemperatur gerührt (dünnschichtchromatografische Kontrolle) und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Eine abschließende chromatografische Reinigung lieferte die reinen Produkte.

Variante II (mit Triethylamin-Trihydrofluorid)

Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Silyl-geschützten Salicylalkohols in THF (über KOH gelagert) gelöst und mit 3.0 Äquivalenten Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde bis zur vollständigen Entschützung bei Raumtemperatur gerührt und die Phasen anschließend mit Diethylether und Wasser getrennt. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen dann mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und durch anschließende chromatografische Reinigung konnten die reinen Produkte isoliert werden.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Saligenylchlorphosphiten (AAV 11)

Variante I

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente des jeweiligen Salicylalkoholderivats in abs. Diethylether gelöst bzw. suspendiert und auf -20 °C abgekühlt. Es wurden zunächst 1.2 Äquivalente Phosphor(III)-chlorid hinzugegeben. Nach zehn Minuten wurden über einen Zeitraum

von 1.5 bis drei Stunden 2.3 Äquivalente abs. Pyridin, verdünnt mit dem fünffachen Volumen an abs. Diethylether, zugetropft. Zur Synthese von Bis-(saligenylchlorphosphen) wurden entsprechend die doppelten Äquivalente PCl_3 und abs. Pyridin verwendet. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Durch Aufbewahrung im Gefrierschrank ($-27\text{ }^{\circ}\text{C}$) über Nacht wurde ein möglichst vollständiges Ausfallen des entstandenen Pyridinhydrochlorids herbeigeführt. Nach Filtration unter Stickstoff als Inertgas (Nachwaschen mit abs. Diethylether) und Abkondensation des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde das jeweilige Saligenylchlorphosphit als Rohprodukt erhalten, das ohne weitere Reinigung zur Synthese der *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate verwendet wurde. Die Reinheit der isolierten Saligenylchlorphosphite wurde aus dem ^1H -NMR-Spektrum über das Verhältnis der Integrale eines aromatischen Protons des Chlorphosphits und des einzelnen Protons des Pyridinhydrochlorids bestimmt (bei Bis-(saligenylchlorphosphen) zwei Protonen vs. zwei Protonen des Pyridinhydrochlorids). Bei einer Reinheit von $> 95\%$ laut ^1H -NMR-Spektrum wird hier die Verbindung als rein angesehen.

Variante II

Die Synthese erfolgte analog zu der Variante I, allerdings mit abs. THF als Lösungsmittel (Waschen nach Filtration mit abs. Diethylether).

Variante III

Die Synthese erfolgte analog zu der Variante I, allerdings mit abs. THF als Lösungsmittel. Vor der Lagerung im Gefrierschrank wurde das THF im Ölpumpenvakuum ankondensiert und der Rückstand in der entsprechenden Menge abs. Diethylether aufgenommen.

Variante IV

Die Synthese erfolgte analog zu der Variante I, allerdings mit einem 3:1-Gemisch (v/v) aus abs. Diethylether und abs. THF als Lösungsmittel. Das abs. Pyridin wurde mit dem fünffachen Volumen an abs. Diethylether verdünnt (Waschen nach Filtration mit abs. Diethylether).

Variante V

Die Synthese erfolgte analog zu der Variante I, allerdings bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von *cycloSal*-d4T-monophosphaten (AAV 12)

Variante I (Überschuss an Saligenylchlorphosphit)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente d4T **2** in abs. Acetonitril gelöst und auf -20 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden 1.6 Äquivalente DIPEA sowie 2.0 Äquivalente des *cycloSal*igenylchlorphosphits (gelöst in abs. Acetonitril) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz des d4Ts **2** bei Raumtemperatur gerührt (DC-Verfolgung). Anschließend wurde auf -20 °C gekühlt und 3.0 Äquivalente *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Nonan) tropfenweise zugegeben. Danach wurde bis zur vollständigen Oxidation bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser oder eines geeigneten Puffers beendet und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die anschließende chromatografische Reinigung ergab die reinen Produkte meist als farblose Öle, die nach einer Gefriertrocknung (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v) als farblose Watten vorlagen.

*Variante II (Überschuss an d4T **2**)*

Die Synthese erfolgte analog zu der Variante I, allerdings wurden pro 1.0 Äquivalente Saligenylchlorphosphit-Einheit 1.2 Äquivalente d4T **2**, 1.9 Äquivalente DIPEA und 3.6 Äquivalente *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Nonan) verwendet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Diacyloxymethyl-substituierten *cycloSal*-d4T-monophosphaten aus Formyl-substituierten *cycloSal*-d4T-monophosphaten (AAV 13)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurde ein Äquivalent des jeweiligen Formyl-substituierten *cycloSal*-d4TMPs in abs. Acetonitril gelöst und mit ungefähr 25 Äquivalenten des jeweiligen Säureanhydrids versetzt. Nach der Zugabe von 0.5 Äquivalenten Zirkonium(IV)-chlorid wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt und dabei dünnschichtchromatografisch verfolgt. Nach Zugabe von Phosphatpuffer (pH = 7.3) und Ethylacetat wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Die Produkte wurden abschließend

chromatografisch gereinigt und lagen nach einer Gefriertrocknung (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v) als farblose Watten vor.

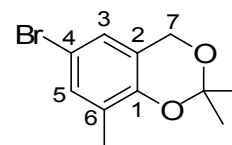
9.2.3. Synthese der 4-Formylsalicylalkohole

Synthese von 4-Brom-6-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **56**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 durchgeführt. Es wurden 3.00 g (13.8 mmol) 4-Brom-6-methylsalicylalkohol **48**, 8.70 mL (70.2 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 262 mg (1.38 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 6.0 g wasserfreies Natriumsulfat in 60 mL Aceton eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (0–30%)).

Ausbeute: 2.78 g (10.8 mmol, 83%) eines gelben Öls

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.22–7.20 (m, 1H, H-5), 7.12–7.10 (m, 1H, H-3), 4.78 (s, 2H, H-7), 2.08 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.46 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 148.16 (C-1), 131.14 (C-5), 127.99 (C-6), 125.03



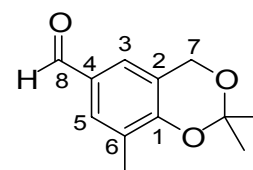
(C-3), 121.36 (C-2), 111.09 (C-4), 99.63 (Acetal-C), 59.64 (C-7), 24.59 (Acetal-CH₃), 14.81 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 256.0 [M], gef.: 256.0. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1471, 1384, 1374, 1279, 1263, 1245, 1202, 1139, 891, 840. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 286, 222. R_f-Wert = 0.67 (Dichlormethan).

Synthese von 4-Formyl-6-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **58**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 2.20 g (8.56 mmol) 4-Brom-6-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **56** in 50 mL abs. THF, 10.7 mL (17.1 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 6.60 mL (85.7 mmol) abs. *N,N*-Dimethylformamid in 6.6 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}).

Ausbeute: 1.40 g (6.79 mmol, 80%) eines braunen Öls

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.81 (s, 1H, H-8), 7.63–7.60 (m, 1H, H-5), 7.53–7.50 (m, 1H, H-3), 4.92 (s, 2H, H-7), 2.17 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.52 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 191.50 (C-8), 154.30 (C-1),



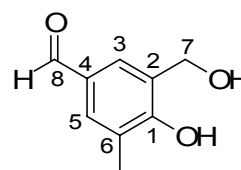
130.06 (C-5), 128.48 (C-4), 126.15 (C-6), 125.35 (C-3), 119.40 (C-2), 100.62 (Acetal-C), 59.93 (C-7), 24.73 (Acetal-CH₃), 15.10 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 207.1 [M+H⁺], gef.: 207.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1692, 1602, 1483, 1386, 1376, 1300, 1278, 1260, 1205, 1128, 874. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 278, 222. R_F-Wert = 0.49 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Synthese von 4-Formyl-6-methylsalicylalkohol 60

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 1.22 g (5.92 mmol) 4-Formyl-6-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **58** in 30 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und drei Tropfen rauchende Salzsäure (fünf Durchgänge, nach dem dritten erneut 20 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) zugegeben) eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–2%)).

Ausbeute: 922 mg (5.55 mmol, 94%) eines gelben Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.78 (s, 1H, H-8), 7.71 (d, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.56 (d, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, H-5), 4.59 (s, 2H, H-7), 2.23 (s, 3H, Aryl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 191.41 (C-8), 158.32 (C-1), 131.07 (C-5), 129.07 (C-4), 128.20 (C-2), 127.07 (C-3), 124.69 (C-6), 58.89 (C-7), 16.17 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 167.1 [M+H⁺], gef.: 167.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3411, 1673, 1590, 1480, 1313, 1197, 1139, 1070, 933. Smp.: 108–110 °C. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 280, 222. R_F-Wert = 0.42 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

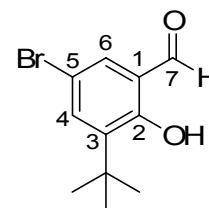


Synthese von 5-Brom-3-*tert*-butylsalicylaldehyd 55

Zu einer Lösung von 16.4 g (92.1 mmol) 3-*tert*-Butylsalicylaldehyd **54** in 46 mL Essigsäure wurde innerhalb von 20 Minuten eine Lösung aus 5.18 mL (102 mmol) Brom in 20 mL Essigsäure getropft. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Dichlormethan verdünnt. Durch Waschen mit 39%iger Natriumhydrogensulfit-Lösung wurde überschüssiges Brom entfernt. Anschließend wurde die organische Phase mit Wasser, einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einer gesättigten Kochsalz-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Nach einer Säulenchromatografie (Petrol-ether_{50/70}/Dichlormethan (0–20%)) wurde das reine Produkt erhalten.

Ausbeute: 14.2 g (55.5 mmol, 60%) eines gelben Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 11.73 (s, 1H, Phenol-OH), 9.81 (s, 1H, H-7), 7.58 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.52 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.4 Hz, 1H, H-4), 1.40 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 196.15 (C-7), 160.37 (C-2), 141.31 (C-3), 137.16 (C-6), 133.76 (C-4), 121.86 (C-1), 111.29 (C-5), 35.30



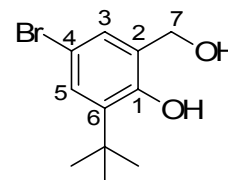
(Aryl-*t*Bu-C), 29.17 (Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 257.0 $[\text{M}+\text{H}^+]$, gef.: 257.0. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2969, 1659, 1429, 1303, 1273, 1197, 1166, 868, 768, 713. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 344, 262, 222. Smp.: 58–60 °C. R_f -Wert = 0.76 (Dichlormethan).

Synthese von 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol 49

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 15.0 g (58.6 mmol) 5-Brom-3-*tert*-butylsalicylaldehyd **55** in 80 mL abs. THF und 2.29 g (57.8 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 110 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels einer Kieselgelfiltration (Dichlormethan).

Ausbeute: 14.3 g (55.5 mmol, 95%) eines gelben Öls

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.77 (s, 1H, Phenol-OH), 7.23 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-3), 7.23 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-5), 5.75 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.58 (s, 2H, H-7), 1.34 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 151.81 (C-



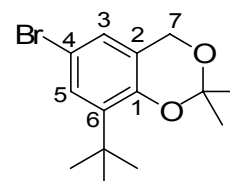
1), 139.36 (C-6), 131.20 (C-2), 127.62 (C-3), 127.34 (C-5), 110.94 (C-4), 60.03 (C-7), 34.59 (Aryl-*t*Bu-C), 29.31 (Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 258.0 $[\text{M}]$, gef.: 258.0. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3371, 2958, 1471, 1441, 1419, 1392, 1224, 698. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 284, 230. R_f -Wert = 0.39 (Dichlormethan).

Synthese von 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal 57

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 durchgeführt. Es wurden 5.17 g (20.0 mmol) 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **49**, 12.6 mL (102 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 379 mg (2.00 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 8.7 g wasserfreies Natriumsulfat in 90 mL Aceton eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (0–30%)).

Ausbeute: 5.63 g (18.8 mmol, 94%) eines gelben Öls

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.17–7.15 (m, 1H, H-5), 7.15–7.12 (m, 1H, H-3), 4.81 (s, 2H, H-7), 1.48 (s, 6H, Acetal- CH_3), 1.30 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 148.56 (C-1), 139.68 (C-6), 127.30 (C-5), 125.50 (C-3), 122.11 (C-2), 111.68 (C-4), 99.08 (Acetal-C), 59.91 (C-7), 34.44 (Aryl-*t*Bu-C), 29.09 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 24.46 (Acetal- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 298.1 [M], gef.: 298.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2958, 1440, 1384, 13746, 1280, 1250, 1203, 1140, 891, 846. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 282, 230. R_f -Wert = 0.78 (Dichlormethan).

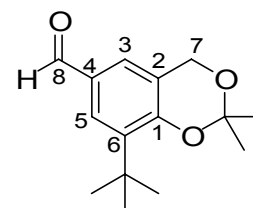


Synthese von 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **59**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 2.83 g (9.46 mmol) 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **57** in 55 mL abs. THF, 11.8 mL (18.9 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 10.9 mL (142 mmol (15 Äquivalente, Abweichung von der AAV 6)) abs. *N,N*-Dimethylformamid in 10.9 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (0–50%)).

Ausbeute: 1.66 g (6.68 mmol, 71%) eines gelben Öls

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.84 (s, 1H, H-8), 7.69–7.66 (m, 1H, H-5), 7.54–7.51 (m, 1H, H-3), 4.93 (s, 2H, H-7), 1.54 (s, 6H, Acetal- CH_3), 1.36 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 191.72 (C-8), 154.75 (C-1), 137.70 (C-6), 128.36 (C-4), 126.22 (C-5), 125.54 (C-3), 120.09 (C-2), 100.09 (Acetal-C), 60.18 (C-7), 34.36 (Aryl-*t*Bu-C), 29.10 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 24.59 (Acetal- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 249.1 [$\text{M}+\text{H}^+$], gef.: 249.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2998, 2960, 1685, 1589, 1387, 1375, 1278, 1258, 1210, 1127, 877. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 282, 222. R_f -Wert = 0.27 (Dichlormethan).



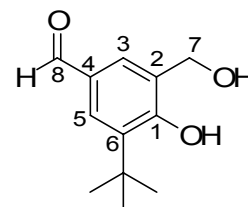
Synthese von 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **61**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 587 mg (2.36 mmol) 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **59** in 30 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und 3 mL rauchende Salzsäure (zwei Durch-

gänge) eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 393 g (1.89 mmol, 80%) eines orangenen Öls

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.81 (s, 1H, H-8), 7.68 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-5), 7.65 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-3), 4.69 (s, 2H, H-7), 1.39 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 191.61 (C-8), 159.92 (C-1), 136.97 (C-6), 128.37 (C-2), 127.97 (C-4), 127.58 (C-3), 127.32 (C-5), 60.59



(C-7), 34.45 (Aryl-*t*Bu-C), 29.25 (Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 209.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$, gef.: 209.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3311, 2958, 1676, 1596, 1431, 1388, 1294, 1263, 1206, 1139. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 280, 230. R_f -Wert = 0.43 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v)

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 1.88 g (7.57 mmol) 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylaldehyd **59** in 30 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und 1 mL rauchende Salzsäure (vier Durchgänge, nach zweitem erneute 20 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) zugegeben) eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (50–75%), dann Dichlormethan/Methanol (0–2%)). Mischfraktionen wurden erneut am Chromatotron gereinigt (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:3 v/v).

Ausbeute: 1.12 g (5.38 mmol, 71%) eines orangenen Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

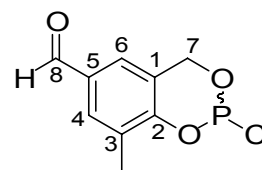
9.2.4. Synthese der 5-Formylsaligenylchlorphosphite

Synthese von 5-Formyl-3-methylsaligenylchlorphosphit **64**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante III der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 750 mg (4.51 mmol) 4-Formyl-6-methylsalicylaldehyd **60** in 35 mL abs. THF, 0.46 mL (5.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.81 mL (10 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 623 mg (2.72 mmol, 60%) eines reinen, farblosen Öls als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 9.89 (s, 1H, H-8), 7.70–7.66 (m, 1H, H-6), 7.42–7.38 (m, 1H, H-4), 5.50 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 2.8$ Hz, 1H, H-7a), 5.10 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 9.6$ Hz, 1H, H-7b), 2.32 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 141.1 ppm.

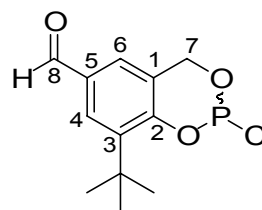


Synthese von 5-Formyl-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **65**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 1.15 g (5.52 mmol) 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **61** in 38 mL abs. Diethylether, 0.59 mL (6.7 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 1.05 mL (13.0 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 1.5 h) verwendet.

Ausbeute: 860 mg (3.15 mmol, 57%) eines reinen, gelben Harzes als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 9.81 (s, 1H, H-8), 7.73–7.71 (m, 1H, H-4), 7.33–7.31 (m, 1H, H-6), 5.38 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 2.8$ Hz, 1H, H-7a), 5.02 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 9.3$ Hz, 1H, H-7b), 1.33 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 138.9 ppm.



Weitere Synthesen:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 144 mg (0.691 mmol) 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **61** in 5 mL abs. THF, 70 μL (0.80 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.13 mL (1.6 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 167 mg eines gelben Harzes mit einer Reinheit von 50% (entspricht 83.5 mg reinem **65** (0.306 mmol, 44%)) als Gemisch zweier Enantiomere

Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

Die Reaktion wurde gemäß der Variante III der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 280 mg (1.34 mmol) 4-Formyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **61** in 10 mL abs. THF, 0.14 mL (1.6 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.25 mL (3.1 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. Die Reaktionslösung wurde in Abweichung von der AAV 11 anschließend für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 135 mg eines gelben Öls mit einer Reinheit von 70% (entspricht 94.5 mg reinem **65** (0.347 mmol, 26%)) als Gemisch zweier Enantiomere

Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

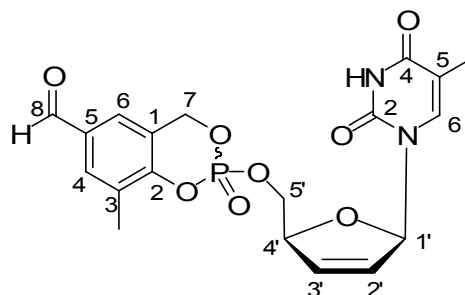
9.2.5. Synthese der 5-Formyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

Synthese von 5-Formyl-3-methyl-*cycloSal*-d4T-monophosphat **62**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 620 mg (2.71 mmol) 5-Formyl-3-methylsaligenylchlorphosphit **64** in 6 mL abs. Acetonitril, 285 mg (1.27 mmol) d4T **2** gelöst in 24 mL abs. Acetonitril, 0.35 mL (2.0 mmol) DIPEA und 0.70 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (3.9 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 1.5 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (+ 0.1% Essigsäure) (0–5%)).

Ausbeute: 282 mg (0.649 mmol, 51%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.9:1.0

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.37 (s, 1H, 1 x NH), 11.34 (s, 1H, 1 x NH), 9.91 (s, 1H, 1 x H-8), 9.90 (s, 1H, 1 x H-8), 7.84–7.81 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.72–7.68 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.19 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.16 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.81–6.76 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.44–6.41 (m, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.05–6.00 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.64–5.53 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.51–5.42 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.98–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.38–4.25 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.29 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.26 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 1.67 (s, 2 x 3H, 2 x Th-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 191.49 (1 x C-8), 191.46 (1 x C-8), 163.63 (1 x Th-C-4), 163.60 (1 x Th-C-4), 152.24 (1 x C-2), 152.22 (1 x C-2), 150.62 (2 x Th-C-2), 135.62 (2 x Th-C-6), 132.71 (1 x C-



3'), 132.61 (1 x C-3'), 132.36 (2 x C-4), 131.94 (2 x C-5), 127.30 (2 x C-2'), 125.17 (1 x C-6), 125.14 (1 x C-6), 122.00 (1 x C-1), 121.92 (1 x C-1), 109.62 (1 x Th-C-5), 109.51 (1 x Th-C-5), 89.26 (1 x C-1'), 89.21 (1 x C-1'), 84.05 (1 x C-4'), 83.98 (1 x C-4'), 68.80 (d, $^2J_{C,P}$ = 6.1 Hz, 2 x C-5'), 67.97 (d, $^2J_{C,P}$ = 8.1 Hz, 1 x C-7), 67.91 (d, $^2J_{C,P}$ = 7.1 Hz, 1 x C-7), 14.80 (1 x Aryl-CH₃), 14.71 (1 x Aryl-CH₃), 11.79 (1 x Th-CH₃), 11.75 (1 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.07, -9.53 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 457.0777 [M+Na⁺], gef.: 457.0787. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 260. R_F-Wert = 0.44 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 11.7, 11.3 min (Methode I).

Synthese von 5-Formyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat **63**

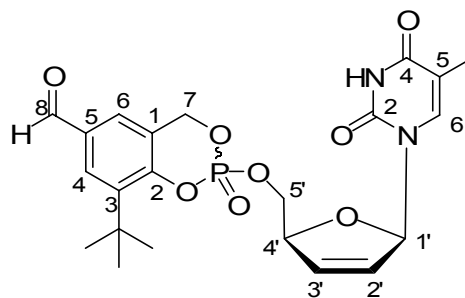
Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 130 mg 5-Formyl-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **65** (Reinheit 70%, entspricht 91 mg reinem **65** (0.33 mmol (1.5 Äquivalente, Abweichung von der AAV 12))) in 4 mL abs. Acetonitril, 50 mg (0.22 mmol) d4T **2** gelöst in 4 mL abs. Acetonitril, 60 μL (0.34 mmol) DIPEA und 0.12 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (0.67 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 1.5 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (+ 0.1% Essigsäure) (0–5%)).

Ausbeute: 52 mg (0.11 mmol) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0

Daten zur Charakterisierung des Diastereomerengemischs **63**:

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.35 (s, 1H, 1 x NH), 11.32 (s, 1H, 1 x NH), 9.96 (s, 2 x 1H, 2 x H-8), 7.94–7.91 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.78–7.75 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.22 (s, 1H, Th-H-6), 7.19 (s, 1H, Th-H-6), 6.84–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.45–6.39 (m, 2 x 1H, 2 x H-3'),

6.06–6.01 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.61–5.44 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.01–4.95 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.39–4.33 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.61 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.57 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.38 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.35 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 191.95 (2 x C-8), 163.75 (1 x Th-C-4), 163.70 (1 x Th-C-4), 153.07 (2 x C-2), 150.72 (2 x Th-C-2), 139.39 (1 x C-3), 139.32 (1 x C-3),



135.88 (2 x Th-C-6), 132.94 (1 x C-3'), 132.90 (1 x C-3'), 131.96 (2 x C-5), 129.33 (2 x C-4), 127.47 (1 x C-2'), 127.32 (1 x C-2'), 125.77 (2 x C-6), 123.89 (1 x C-1), 123.80 (1 x C-1), 109.70 (1 x Th-C-5), 109.59 (1 x Th-C-5), 89.35 (1 x C-1'), 89.22 (1 x C-1'), 84.11 (2 x C-4'), 69.28 (1 x C-5'), 69.23 (1 x C-5'), 67.85 (d, $^2J_{C,P} = 6.1$ Hz, 2 x C-7), 34.57 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.50 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 29.28 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.24 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.82 (2 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.07, -9.46$ ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 499.1246 [M+Na⁺], gef.: 499.1252. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 260. R_F-Wert = 0.56 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v), 0.47 (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v).

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 860 mg (3.15 mmol) 5-Formyl-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **65** in 25 mL abs. Acetonitril, 332 mg (1.46 mmol) d4T **2** gelöst in 27 mL abs. Acetonitril, 0.40 mL (2.3 mmol) DIPEA und 0.80 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (4.5 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 246 mg (0.520 mmol, 36%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 181) angegebenen.

Aus 40 mg Diastereomerengemisch **63** konnten mittels präparativer RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v + 0.5% Essigsäure) 18 mg **63-fast** und 13 mg **63-slow** isoliert werden.

Daten zur Charakterisierung von **63-fast**:

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.35$ (s, 1H, NH), 9.96 (s, 1H, H-8), 7.92 (s, 1H, H-4), 7.79–7.75 (m, 1H, H-6), 7.22 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 1H, Th-H-6), 6.84–6.80 (m, 1H, H-1'), 6.44–6.40 (m, 1H, H-3'), 6.05–6.01 (m, 1H, H-2'), 5.61–5.45 (m, 2 x 1H, H-7a, H-7b), 5.00–4.96 (m, 1H, H-4'), 4.40–4.31 (m, 2H, H-5'), 1.61 (s, 3H, Th-CH₃), 1.35 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 191.97$ (C-8), 163.76 (Th-C-4), 153.06 (d, $^2J_{C,P} = 7.6$ Hz, C-2), 150.73 (Th-C-2), 139.30 (C-3), 135.75 (Th-C-6), 132.80 (C-3'), 131.92 (C-5), 129.35 (C-4), 127.38 (C-2'), 125.68 (C-6), 123.91

(C-1), 109.71 (Th-C-5), 89.13 (C-1'), 84.08 (d, $^3J_{C,P} = 7.6$ Hz, C-4'), 69.27 (d, $^2J_{C,P} = 7.6$ Hz, C-5'), 67.87 (d, $^2J_{C,P} = 6.9$ Hz, C-7), 34.51 (Aryl-*t*Bu-C), 29.24 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.84 (Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.43$ ppm. Analytische HPLC: $t_R = 14.2$ min (Methode I); 16.1 min (Methode III); 18.7 min (Methode IV). Präparative HPLC: $t_R = 34.8$ min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v + 0.5% Essigsäure).

Daten zur Charakterisierung von 63-slow:

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.33$ (s, 1H, NH), 9.97 (s, 1H, H-8), 7.93 (s, 1H, H-4), 7.79–7.76 (m, 1H, H-6), 7.20 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 1H, Th-H-6), 6.82–6.79 (m, 1H, H-1'), 6.45–6.41 (m, 1H, H-3'), 6.07–6.03 (m, 1H, H-2'), 5.62–5.40 (m, 2 x 1H, H-7a, H-7b), 5.01–4.97 (m, 1H, H-4'), 4.41–4.34 (m, 2H, H-5'), 1.58 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 3H, Th-CH₃), 1.39 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 191.88$ (C-8), 163.65 (Th-C-4), 152.97 (C-2), 150.66 (Th-C-2), 139.38 (C-3), 135.66 (Th-C-6), 132.69 (C-3'), 131.90 (C-5), 129.20 (C-4), 127.36 (C-2'), 125.68 (C-6), 123.83 (C-1), 109.55 (Th-C-5), 89.27 (C-1'), 84.06 (d, $^3J_{C,P} = 8.1$ Hz, C-4'), 69.13 (d, $^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, C-5'), 67.84 (d, $^2J_{C,P} = 5.9$ Hz, C-7), 34.53 (Aryl-*t*Bu-C), 29.26 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.75 (Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.06$ ppm. Analytische HPLC: $t_R = 14.2$ min (Methode I); 17.0 min (Methode III); 19.7 min (Methode IV). Präparative HPLC: $t_R = 37.4$ min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v + 0.5% Essigsäure).

9.2.6. Synthese der 5-Diacyloxymethyl-cycloSal-d4T-monophosphate

9.2.6.1. Vorbereitende Synthesen

Versuch der Synthese von Bis-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-diisobutyroxymethylsalicylalkohol 69

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 185 mg (0.294 mmol) Bis-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-formylsalicylalkohol **68** in 0.5 mL abs. Dichlormethan gelöst, mit 0.15 mL (0.90 mmol) Isobuttersäureanhydrid **67** versetzt und auf 0 °C gekühlt. Nach 15 Minuten Rühren bei 0 °C wurden 3.2 mg (20 µmol) wasserfreies FeCl₃ hinzugegeben. Die Lösung wurde für zwei Stunden bei 0 °C gerührt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatografisch (Dichlormethan) verfolgt. Da kein Umsatz erkennbar war, wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für einen Tag bei dieser Temperatur gerührt. Da auch hiernach kein Umsatz erkennbar war, wurden weitere 0.45 mL (2.7 mmol) **67** und

6.3 mg (39 μ mol) wasserfreies FeCl_3 zugegeben. Nach fünf Tagen Rühren bei Raumtemperatur ohne erkennbaren Umsatz wurde die Reaktion abgebrochen.

Synthese von Diisobutyroxymethylbenzol **70**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 0.5 mL (5 mmol) Benzaldehyd **66** mit 2.5 mL (15 mmol) Isobuttersäureanhydrid **67** sowie 58 mg (0.25 mmol) ZrCl_4 versetzt. Die Mischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 7:1 v/v) verfolgt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt und anschließend je einmal mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat (0–10%)) gereinigt.

Ausbeute: 1.56 g eines gelben Öls, das laut ^1H -NMR aus 71% **70** und 29% **67** bestand

*^1H -NMR-spektroskopische Daten von Diisobutyroxymethylbenzol **70**:*

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.19 (s, 1H, CH), 7.66–7.62 (m, 2H, 2 x Aryl- H_{ortho}), 7.24–7.13 (m, 3H, 2 x Aryl- H_{meta} , Aryl- H_{para}), 2.44 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 2H, 2 x $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.13 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.07 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

*^1H -NMR-spektroskopische Daten von Isobuttersäureanhydrid **67**:*

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 2.36 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.36 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.8 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.06 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.8 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.03 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

Weitere Synthesen:

Es wurden zwei separate Reaktionen unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden je 0.1 mL (1 mmol) Benzaldehyd **66** in 2.5 mL abs. Dichlormethan bzw. abs. Acetonitril gelöst und mit 0.5 mL (3 mmol) Isobuttersäureanhydrid **67** sowie 12 mg (51 μ mol) ZrCl_4 versetzt. Die Mischungen wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösungen wurde mit Ethylacetat verdünnt und

anschließend je einmal mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

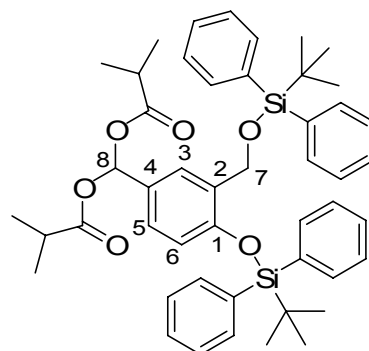
Aus den ^1H -NMR-Spektren der Rohprodukte war ersichtlich, dass bei dem Reaktionsansatz in Dichlormethan kein Produkt **70** entstanden war. Das Rohspektrum des in Acetonitril durchgeführten Ansatzes enthielt **70** und **66** im Verhältnis 64:36. Daher wurde Acetonitril als Lösungsmittel für den folgend beschriebenen Vorversuch verwendet.

Synthese von Bis-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-diisobutyroxymethylsalicylalkohol **69**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 204 mg (0.324 mmol) Bis-(*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-formylsalicylalkohol **68** in 0.3 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.16 mL (0.93 mmol) Isobuttersäureanhydrid **67** und 4.0 mg (17 μmol) ZrCl_4 versetzt und diese Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatografische Kontrolle (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v) zeigte nach drei Stunden noch vorhandenen Salicylalkohol **68**, was sich auch nach 20 Stunden Reaktionszeit nicht änderte. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt und anschließend zweimal mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einmal mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat (0–10%)) gereinigt.

Ausbeute: 240 mg (0.305 mmol, 94%) eines gelben Öls

^1H NMR (400 MHz, Benzol- d_6): δ = 8.37 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-3), 8.19 (s, 1H, H-8), 7.91–7.85 (m, 4H, TBDPS-H), 7.67–7.63 (m, 4H, TBDPS-H), 7.27–7.20 (m, 6H, TBDPS-H), 7.13–7.05 (m, 6H, TBDPS-H), 7.01 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-5), 6.55 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1H, H-6), 5.31 (s, 2H, H-7), 2.34 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2 x 1H, 2 x $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.30 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3), 1.04 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.96 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, Benzol- d_6): δ =



174.54 (2 x OCO), 153.22 (C-1), 136.06 (TBDPS-C_{tert}), 135.65 (TBDPS-C_{tert}), 133.56 (TBDPS-C_{quart}), 132.41 (TBDPS-C_{quart}), 132.16 (C-2), 130.31 (TBDPS-C_{tert}), 130.10 (TBDPS-C_{tert}), 128.23 (TBDPS-C_{tert}), 127.75 (TBDPS-C_{tert}), 126.40 (C-5), 125.96 (C-3), 118.44 (C-6), 90.20 (C-8), 62.23 (C-7), 34.15 (2 x CH(CH₃)₂), 27.23 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 26.57 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 19.73 (TBDPS-*t*Bu-C), 19.63 (TBDPS-*t*Bu-C), 18.88 (CH(CH₃)₂), 18.65 (CH(CH₃)₂) ppm. R_f-Wert = 0.50 (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v).

9.2.6.2. Synthese der 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

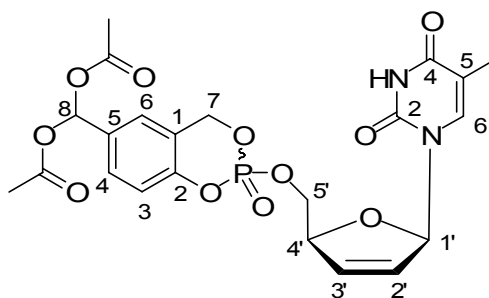
Synthese von 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4T-monophosphat 33

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 40 mg (95 µmol) 5-Formyl-*cycloSal*-d4TMP **34** in 0.5 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 30 µL (0.32 mmol) Essigsäureanhydrid sowie 2.0 mg (8.6 µmol) ZrCl₄ versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und dabei dünnschichtchromatografisch (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) verfolgt. Da nach einer Stunde kein Umsatz erkennbar war, wurden weitere 0.10 mL (1.1 mmol) Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde auch weiteres ZrCl₄ (3.0 mg, 13 µmol) hinzugefügt. Als nach weiteren 1.5 Stunden noch viel Edukt detektiert werden konnte, wurden nochmals 0.10 mL (1.1 mmol) Essigsäureanhydrid und (6.0 mg, 26 µmol) ZrCl₄ hinzugegeben. Nach 30 Minuten war das Edukt **34** vollständig umgesetzt und die Reaktion wurde durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH = 7.3) abgebrochen. Nach Zugabe von Ethylacetat wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).

Ausbeute: 22 mg (42 µmol, 44%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.37–11.31 (m, 2 x 1H, 2 x NH), 7.58–7.49 (m, 4 x 1H, 2 x H-4, 2 x H-8), 7.49–7.45 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.25–7.14 (m, 4 x 1H, 2 x H-4, 2 x Th-H-6), 6.85–6.76 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.44–6.40 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.39–6.35 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.06–5.98 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.55 (dd, ²J_{H,H} = 14.8 Hz, ³J_{H,P} = 7.9 Hz, 1H, 1 x H-7a), 5.52 (dd, ²J_{H,H} = 16.4 Hz, ³J_{H,P} = 7.9 Hz, 1H, 1 x H-7a), 5.47–

5.39 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.99–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.39–4.25 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.11 (s, 4 x 3H, 4 x OC(O)CH₃), 1.67 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.61 (s, 3H, 1 x Th-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.57 (4 x OC(O)CH₃), 163.68 (2 x Th-C-4), 150.66 (2 x Th-C-2), 149.42 (d, ²J_{C,P} = 8.1 Hz, 2 x C-2), 138.72 (2 x C-3), 135.66 (1 x Th-C-6), 135.58 (1 x Th-C-6), 132.70 (2 x C-3'), 131.08 (1 x C-5), 131.06 (1 x C-5), 127.36 (1 x C-2'), 127.31 (1 x C-2'), 125.59 (2 x C-4), 123.36 (d, ³J_{C,P} = 8.1 Hz, 2 x C-1), 122.78 (2 x C-6), 109.68 (1 x Th-C-5), 109.61 (1 x Th-C-5), 89.19 (1 x C-1'), 89.06 (1 x C-1'), 88.60 (2 x C-8), 84.12 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, 1 x C-4'), 84.06 (d, ³J_{C,P} = 5.9 Hz, 1 x C-4'), 68.92 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, 2 x C-5'), 68.00 (d, ²J_{C,P} = 7.3 Hz, 1 x C-7), 67.98 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, 1 x C-7), 34.41 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.35 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 29.36 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.32 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.51 (4 x OC(O)CH₃), 11.70 (2 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.52 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 545.0937 [M+Na⁺], gef.: 545.0939. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265. R_f-Wert = 0.55 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 13.2 min (Methode I).

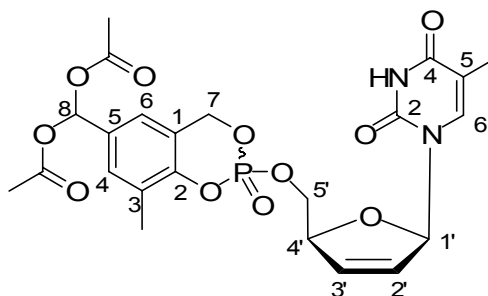


Synthese von 5-Diacetoxymethyl-3-methyl-cycloSal-d4T-monophosphat 40

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 25 mg (58 μmol) 5-Formyl-3-methyl-cycloSal-d4TMP **62** in 0.5 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 20 μL (0.21 mmol) Essigsäureanhydrid sowie 1.3 mg (5.6 μmol) ZrCl₄ versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und dabei dünnschichtchromatografisch (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) verfolgt. Da nach drei Stunden kein Umsatz erkennbar war, wurden weitere 0.10 mL (1.1 mmol) Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurden zusätzliche 1.5 mg (6.4 μmol) ZrCl₄ hinzugefügt. Zwanzig Minuten danach war kein Edukt **62** mehr zu detektieren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH = 7.3) abgebrochen und die Phasen nach Zugabe von Ethylacetat getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).

Ausbeute: 10 mg (19 μ mol, 32%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.36–11.31 (m, 2 x 1H, 2 x NH), 7.48 (s, 2 x 1H, 2 x H-8), 7.43–7.40 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.30–7.27 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.19 (s, 2 x 1H, 2 x Th-H-6), 6.82–6.78 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43–6.40 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.39–6.35 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.05–5.99 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.56–5.46 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.43–5.35 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.98–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.35–4.22 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.24 (s, 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.21 (s, 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.10 (s, 4 x 3H, 4 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.64 (s, 3H, 1 x Th- CH_3), 1.62 (s, 3H, 1 x Th- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.53 (4 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 163.65 (2 x Th-C-4), 150.65 (2 x Th-C-2), 148.60 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.6 Hz, 2 x C-2), 135.61 (2 x Th-C-6), 132.75 (1 x C-3'), 132.71 (1 x C-3'), 129.12 (2 x C-4), 127.31 (1 x C-2'), 127.29 (1 x C-2'), 122.75 (2 x C-1), 121.99 (2 x C-6), 109.68 (1 x Th-C-5), 109.63 (1 x Th-C-5), 89.19 (1 x C-1'), 89.13 (1 x C-1'), 88.34 (2 x C-8), 84.07 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.6 Hz, 1 x C-4'), 84.02 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.1 Hz, 1 x C-4'), 68.67–68.55 (m, 2 x C-5'), 68.05 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.1 Hz, 1 x C-7), 67.96 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.1 Hz, 1 x C-7), 20.51 (4 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 14.84 (1 x Aryl- CH_3), 14.71 (1 x Aryl- CH_3), 11.77 (1 x Th- CH_3), 11.69 (1 x Th- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = -8.82, -8.93 ppm. HRMS (ESI $^+$, m/z): ber.: 559.1094 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 559.1103. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265. R_f -Wert = 0.51 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 13.8 min (Methode I).



Auf Grundlage dieses Versuches und der zuvor beschriebenen Darstellung von **33** wurde die AAV 13 formuliert.

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 50 mg (0.12 mmol) 5-Formyl-3-methyl-cycloSal-d4TMP **62** in 0.5 mL abs. Acetonitril, 0.27 mL (2.8 mmol) Essigsäureanhydrid und 13 mg (56 μ mol) ZrCl_4 verwendet. Reaktionszeit: 1 h. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 28 mg (52 μmol , 45%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.8:1.0

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 188) angegebenen.

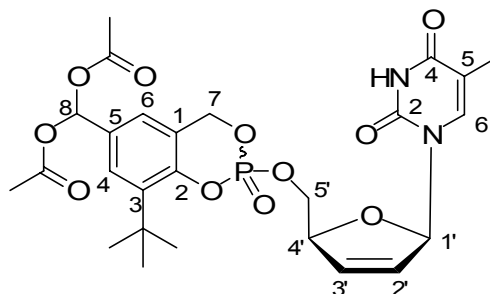
Synthese von 5-Diacetoxymethyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat **41**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 39 mg (82 μmol) 5-Formyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMP **63** in 1 mL abs. Acetonitril, 0.20 mL (2.1 mmol) Essigsäureanhydrid und 9.4 mg (40 μmol) ZrCl_4 verwendet. Reaktionszeit: 1 h. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 11 mg (19 μmol , 23%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0 sowie 9 mg produkthaltige Mischfraktionen

Daten zur Charakterisierung des Diastereomergemischs **41**:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11.35 (s, 1H, 1 x NH), 11.33 (s, 1H, 1 x NH), 7.52 (s, 2 x 1H, 2 x H-8), 7.47–7.44 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.39–7.36 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.22 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.18 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.84–6.78 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.44–6.38 (m, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.06–6.01 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.54–5.36 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.00–4.94 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.40–4.29 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.11 (s, 4 x 3H, 4 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.59 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 3H, 1 x Th- CH_3), 1.57 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 3H, 1 x Th- CH_3), 1.35 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu- CH_3), 1.31 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 168.52 (4 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 163.68 (1 x Th-C-4), 163.64 (1 x Th-C-4), 150.66 (2 x Th-C-2), 149.42 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 8.1 Hz, 2 x C-2), 138.72 (2 x C-3), 135.66 (1 x Th-C-6), 135.58 (1 x Th-C-6), 132.70 (2 x C-3'), 131.08 (1 x C-5), 131.06 (1 x C-5), 127.36 (1 x C-2'), 127.31 (1 x C-2'), 125.59 (2 x C-4), 123.36 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.1 Hz, 2 x C-1), 122.78 (2 x C-6), 109.68 (1 x Th-C-5), 109.61 (1 x Th-C-5), 89.19 (1 x C-1'), 89.06 (1 x C-1'), 88.60 (2 x C-8), 84.12 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-4'), 84.06 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 5.9 Hz, 1 x C-4'), 68.92 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.6 Hz, 2 x C-5'), 68.00 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-7), 67.98 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.6 Hz, 1 x C-7), 34.41 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.35 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 29.36 (1 x Aryl-*t*Bu- CH_3), 29.32 (1 x Aryl-*t*Bu- CH_3), 20.51 (4 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 11.70 (2 x Th- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = -8.71, -9.06 ppm. HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 601.1563 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.:



601.1594. UV (HPLC): $\lambda_{\max}$ [nm]: 265. R_f -Wert = 0.61 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 44 mg (92 μ mol) 5-Formyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMP **63** in 1 mL abs. Acetonitril, 0.22 mL (2.3 mmol) Essigsäureanhydrid und 10.5 mg (45.1 μ mol) $ZrCl_4$ verwendet. Reaktionszeit: 1.5 h. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v). Durch die Verwendung der präparativen RP-HPLC konnten die Diastereomere von **41** erfolgreich getrennt werden.

Ausbeute: 8 mg **41-fast** und 8 mg **41-slow** (insgesamt 16 mg (28 μ mol, 31%)) als farblose Watten

Daten zur Charakterisierung von **41-fast**:

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 11.35 (s, 1H, NH), 7.52 (s, 1H, H-8), 7.47–7.44 (m, 1H, H-4), 7.39–7.36 (m, 1H, H-6), 7.22 (d, $^4J_{H,H}$ = 1.0 Hz, 1H, Th-H-6), 6.84–6.78 (m, 1H, H-1'), 6.42 (ddd, $^3J_{H,H}$ = 6.0 Hz, $^3J_{H,H}$ = 1.8 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.5 Hz, 1H, H-3'), 6.05–6.01 (m, 1H, H-2'), 5.53–5.38 (m, 2 x 1H, H-7a, H-7b), 4.99–4.94 (m, 1H, H-4'), 4.38–4.28 (m, 2H, H-5'), 2.11 (s, 2 x 3H, 2 x OC(O)CH₃), 1.59 (d, $^4J_{H,H}$ = 1.0 Hz, 3H, Th-CH₃), 1.31 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 168.54 (2 x OC(O)CH₃), 163.69 (Th-C-4), 150.69 (Th-C-2), 149.42 (d, $^2J_{C,P}$ = 8.1 Hz, C-2), 138.73 (d, $^3J_{C,P}$ = 7.3 Hz, C-3), 135.66 (Th-C-6), 132.79 (C-3'), 131.06 (C-5), 127.31 (C-2'), 125.61 (C-4), 123.40 (C-1), 122.77 (C-6), 109.68 (Th-C-5), 89.06 (C-1'), 88.62 (C-8), 84.05 (d, $^3J_{C,P}$ = 8.1 Hz, C-4'), 68.99 (d, $^2J_{C,P}$ = 5.9 Hz, C-5'), 67.98 (d, $^2J_{C,P}$ = 6.6 Hz, C-7), 34.35 (Aryl-*t*Bu-C), 29.32 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.52 (2 x OC(O)CH₃), 11.69 (Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $DMSO-d_6$): δ = -9.06 ppm. Analytische HPLC: t_R = 15.7 min (Methode I); 29.2 min (Methode III). Präparative HPLC: t_R = 59.5 min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v).

Daten zur Charakterisierung von **41-slow**:

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 11.31 (s, 1H, NH), 7.52 (s, 1H, H-8), 7.47–7.44 (m, 1H, H-4), 7.39–7.36 (m, 1H, H-6), 7.18 (d, $^4J_{H,H}$ = 1.3 Hz, 1H, Th-H-6), 6.82–6.79 (m, 1H, H-1'), 6.40 (ddd, $^3J_{H,H}$ = 6.0 Hz, $^3J_{H,H}$ = 1.8 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.8 Hz, 1H, H-3'), 6.06–

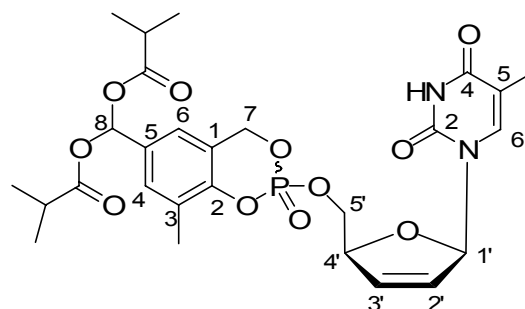
6.02 (m, 1H, H-2'), 5.53–5.36 (m, 2 x 1H, H-7a, H-7b), 5.00–4.94 (m, 1H, H-4'), 4.40–4.28 (m, 2H, H-5'), 2.11 (s, 2 x 3H, 2 x OC(O)CH₃), 1.57 (d, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 3H, Th-CH₃), 1.35 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.54 (2 x OC(O)CH₃), 163.64 (Th-C-4), 150.63 (Th-C-2), 149.39 (d, ²J_{C,P} = 7.9 Hz, C-2), 138.76 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, C-3), 135.52 (Th-C-6), 132.65 (C-3'), 131.09 (C-5), 127.43 (C-2'), 125.60 (C-4), 123.37 (d, ³J_{C,P} = 8.8 Hz, C-1), 122.79 (C-6), 109.63 (Th-C-5), 89.20 (C-1'), 88.61 (C-8), 84.08 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, C-4'), 68.94 (d, ²J_{C,P} = 5.9 Hz, C-5'), 68.01 (d, ²J_{C,P} = 7.3 Hz, C-7), 34.42 (Aryl-*t*Bu-C), 29.37 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.52 (2 x OC(O)CH₃), 11.74 (Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -8.71 ppm. Analytische HPLC: t_R = 16.0 min (Methode I); 30.2 min (Methode III). Präparative HPLC: t_R = 67.4 min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v).

9.2.6.3. Synthese der 5-Diisobutyroxymethyl-*cycloSal*-d4T-monophosphate

Synthese von 5-Diisobutyroxymethyl-3-methyl-*cycloSal*-d4T-monophosphat 103

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 51 mg (0.12 mmol) 5-Formyl-3-methyl-*cycloSal*-d4TMP **62** in 1 mL abs. Acetonitril, 0.20 mL (1.2 mmol) Isobuttersäureanhydrid **67** und 30 mg (0.13 mmol) ZrCl₄ (Abweichung von der AAV 13: 1.0 Äquivalente) verwendet. Nach 45 Minuten sowie nach 1.5 Stunden wurden jeweils 0.10 mL (0.60 mmol) Isobuttersäureanhydrid hinzugegeben (Abweichung von der AAV 13: nur 20 Äquivalente, partielle Zugabe). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.35–11.32 (m, 2 x 1H, 2 x NH), 7.49 (s, 2 x 1H, 2 x H-8), 7.42–7.39 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.30–7.28 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.21–7.17 (m, 2 x 1H, 2 x Th-H-6), 6.82–6.78 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43–6.40 (m, 1H, 1 x H-3'),



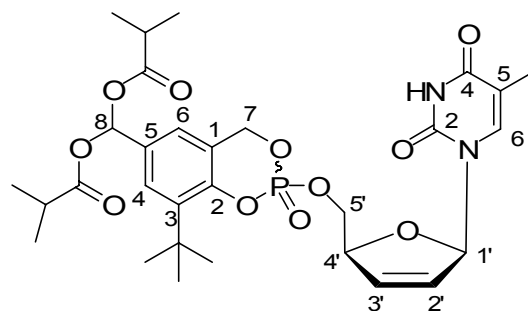
6.39–6.35 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.04–5.99 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.56–5.46 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.45–5.35 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.98–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.34–4.24 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.61 (hept, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 4 x 1H, 4 x CH(CH₃)₂), 2.24 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.21 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 1.63–1.61 (m, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.61–1.59 (m, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.11 (d, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2 x 6H, 2 x CH(CH₃)₂), 1.08 (d, ³J_{H,H} = 6.9

Hz, 2 x 6H, 2 x CH(CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.20 (4 x OCO), 163.34 (2 x Th-C-4), 150.65 (1 x Th-C-2), 150.56 (1 x Th-C-2), 148.19 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, 2 x C-2), 135.62 (1 x Th-C-6), 135.58 (1 x Th-C-6), 132.75 (1 x C-3'), 132.71 (1 x C-3'), 129.07 (1 x C-4), 129.03 (1 x C-4), 127.32 (2 x C-2'), 121.91 (2 x C-6), 121.39 (2 x C-1), 109.64 (2 x Th-C-5), 89.19 (1 x C-1'), 89.11 (1 x C-1'), 88.34 (2 x C-8), 84.26 (d, ³J_{C,P} = 5.6 Hz, 1 x C-4'), 84.09 (d, ³J_{C,P} = 5.1 Hz, 1 x C-4'), 69.07–68.87 (m, 2 x C-5'), 68.05–67.86 (m, 2 x C-7), 33.02 (4 x CH(CH₃)₂), 18.54 (2 x CH(CH₃)₂), 18.20 (2 x CH(CH₃)₂), 14.87 (1 x Aryl-CH₃), 14.75 (1 x Aryl-CH₃), 11.74 (1 x Th-CH₃), 11.67 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -8.73, -8.82 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 615.1714 [M+Na⁺], gef.: 615.1704. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 263. R_F-Wert = 0.49 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 18.1 min (Methode I).

Synthese von 5-Diisobutyroxymethyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4T-monophosphat **104**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 98 mg (0.21 mmol) 5-Formyl-3-*tert*-butyl-*cycloSal*-d4TMP **63** in 2 mL abs. Acetonitril, 0.85 mL (5.1 mmol) Isobuttersäureanhydrid **67** und 24 mg (0.10 mmol) ZrCl₄ verwendet. Nach einer Stunde wurden weitere 24 mg (0.10 mmol) ZrCl₄ zugegeben. (Abweichung von der AAV 13: insgesamt 1.0 Äquivalente ZrCl₄, partielle Zugabe). Reaktionszeit: 2.5 h. Bei der Extraktion entstand ein polymerartiger Niederschlag, der mittels Filtration abgetrennt wurde. Das erhaltene Filtrat wurde gemäß der AAV 13 weiter extrahiert. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 5:2 v/v (zur Isolierung des Diastereomeregemischs) bzw. Acetonitril/Wasser 3:2 v/v (zur Diastereomerentrennung)).

Ausbeute: Durch die Reinigung am Chromatotron wurden 46 mg produkthaltige Fraktionen sowie 11 mg **63** isoliert. Die in zwei Portionen durchgeführte Reinigung der produkthaltigen Fraktionen mittels präparativer RP-HPLC ergab 15 mg **104-mix**, 8 mg **104-fast** und 9 mg **104-slow** (insgesamt 32 mg (50 μ mol, 25%)) als farblose Watten.

Daten zur Charakterisierung des Diastereomeregemischs 104:¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.35(s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.54 (s, 2 x 1H, 2 x H-8), 7.44 (s, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.36 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.21 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.18 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.83–6.79 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.42 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz,

$^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.40 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.05–6.01 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.53–5.38 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.00–4.96 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.41–4.29 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.62 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 4 x 1H, 4 x CH(CH₃)₂), 1.57 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.54 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.34 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.31 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.11 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 2 x 6H, 2 x CH(CH₃)₂), 1.09 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 2 x 6H, 2 x CH(CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.20 (4 x OCO), 163.68 (1 x Th-C-4), 163.62 (1 x Th-C-4), 150.69 (1 x Th-C-2), 150.66 (1 x Th-C-2), 149.43–149.30 (m, 2 x C-2), 138.74 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-3), 138.72 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-3), 135.66 (1 x Th-C-6), 135.59 (1 x Th-C-6), 132.80 (1 x C-3'), 132.71 (1 x C-3'), 131.16 (2 x C-5), 127.38 (1 x C-2'), 127.33 (1 x C-2'), 125.24 (2 x C-4), 123.47 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.8 Hz, 1 x C-1), 123.43 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.1 Hz, 1 x C-1), 122.67 (1 x C-6), 122.64 (1 x C-6), 109.68 (1 x Th-C-5), 109.61 (1 x Th-C-5), 89.18 (1 x C-1'), 89.06 (1 x C-1'), 88.45 (2 x C-8), 84.13 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 6.6 Hz, 1 x C-4'), 84.07 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-4'), 68.98 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.9 Hz, 1 x C-5'), 68.94 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.9 Hz, 1 x C-5'), 68.00 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.1 Hz, 2 x C-7), 34.42 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.37 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 33.05 (4 x CH(CH₃)₂), 29.35 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.32 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 18.49 (2 x CH(CH₃)₂), 18.27 (2 x CH(CH₃)₂), 11.67 (2 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -8.57, -8.96 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 657.2184 [M+Na⁺], gef.: 657.2184. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 263. R_F-Wert = 0.60 (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v). Präparative HPLC: *t*_R = 15.2, 14.5 min (Acetonitril/Wasser 5:2 v/v).

Daten zur Charakterisierung von 104-fast:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.34 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 1H, H-8), 7.44 (s, 1H, H-4), 7.36 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.6 Hz, 1H, H-6), 7.21 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.83–6.80 (m, 1H, H-1'), 6.42 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.6 Hz, 1H, 1 x H-

3'), 6.04–6.01 (m, 1H, H-2'), 5.53–5.39 (m, 2 x 1H, H-7a, H-7b), 5.00–4.96 (m, 1H, H-4'), 4.37–4.31 (m, 2H, H-5'), 2.62 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2 x 1H, 2 x CH(CH₃)₂), 1.57 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.31 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.11 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H, 1 x CH(CH₃)₂), 1.10 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, 1 x CH(CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 174.23$ (2 x OCO), 163.71 (Th-C-4), 150.71 (Th-C-2), 149.41 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, C-2), 138.72 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.4$ Hz, C-3), 135.68 (Th-C-6), 132.83 (C-3'), 131.17 (C-5), 127.35 (C-2'), 125.32 (C-4), 123.42 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.8$ Hz, 1 x C-1), 122.67 (1 x C-6), 109.70 (1 x Th-C-5), 89.06 (1 x C-1'), 88.48 (1 x C-8), 84.09 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.3$ Hz, 1 x C-4'), 69.01 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4$ Hz, 1 x C-5'), 68.01 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4$ Hz, 1 x C-7), 34.39 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 33.06 (2 x CH(CH₃)₂), 29.33 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 18.52 (1 x CH(CH₃)₂), 18.28 (1 x CH(CH₃)₂), 11.71 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -8.96$ ppm. Analytische HPLC: $t_{\text{R}} = 19.9$ min (Methode I); 30.6 min (Methode IV). Präparative HPLC: $t_{\text{R}} = 26.5$ min (Acetonitril/Wasser 3:2 v/v).

Daten zur Charakterisierung von 104-slow:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.32$ (s, 1H, NH), 7.54 (s, 1H, H-8), 7.44 (s, 1H, H-4), 7.35 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 1H, H-6), 7.18 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.82–6.79 (m, 1H, H-1'), 6.40 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.05–6.02 (m, 1H, H-2'), 5.53–5.38 (m, 2 x 1H, H-7a, H-7b), 5.00–4.96 (m, 1H, H-4'), 4.40–4.30 (m, 2H, H-5'), 2.62 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2 x 1H, 2 x CH(CH₃)₂), 1.55 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.34 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.11 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H, 1 x CH(CH₃)₂), 1.10 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6H, 1 x CH(CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 174.22$ (2 x OCO), 163.65 (Th-C-4), 150.69 (Th-C-2), 149.41 (C-2), 138.75 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, C-3), 135.62 (Th-C-6), 132.74 (C-3'), 131.18 (C-5), 127.41 (C-2'), 125.31 (C-4), 123.50 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 9.2$ Hz, 1 x C-1), 122.71 (1 x C-6), 109.63 (1 x Th-C-5), 89.18 (1 x C-1'), 88.47 (1 x C-8), 84.16 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 1 x C-4'), 68.96 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4$ Hz, 1 x C-5'), 68.03 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.4$ Hz, 1 x C-7), 34.35 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 33.06 (2 x CH(CH₃)₂), 29.36 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 18.53 (1 x CH(CH₃)₂), 18.28 (1 x CH(CH₃)₂), 11.70 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -8.57$ ppm. Analytische HPLC: $t_{\text{R}} = 20.2$ min (Methode I); 31.2 min (Methode IV). Präparative HPLC: $t_{\text{R}} = 28.3$ min (Acetonitril/Wasser 3:2 v/v).

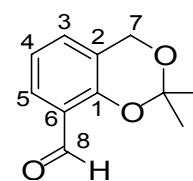
9.2.7. Synthese der 6-Formylsalicylalkohole

Synthese von 6-Formylsalicylalkoholisopropylidenacetal **98**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 3.10 g (12.8 mmol) 6-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **95** in 70 mL abs. THF, 15.9 mL (25.5 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 9.70 mL (125 mmol) abs. *N,N*-Dimethylformamid in 9.7 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 0–2%).

Ausbeute: 1.87 g (9.73 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.29 (d, ⁴*J*_{H,H} = 0.5 Hz, 1H, H-8), 7.61–7.57 (m, 1H, H-5), 7.42–7.37 (m, 1H, H-3), 7.04 (dd, ³*J*_{H,H} = 7.9 Hz, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-4), 4.91 (s, 2H, H-7), 1.55 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 188.48



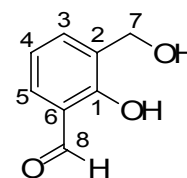
(C-8), 153.52 (C-1), 131.57 (C-3), 126.24 (C-5), 123.47 (C-6), 120.94 (C-2), 119.99 (C-4), 100.54 (Acetal-C), 59.83 (C-7), 24.52 (Acetal-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 193.1 [M+H⁺], gef.: 193.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2864, 1700, 1685, 1595, 1457, 1396, 1385, 1285, 1250, 1132, 1057, 881. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 323, 256, 216. Smp.: 61 °C. R_F-Wert = 0.44 (Dichlormethan).

Synthese von 6-Formylsalicylalkohol **81**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 1.87 g (9.73 mmol) 6-Formylsalicylalkoholisopropylidenacetal **98** in 60 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und zwei Tropfen rauchende Salzsäure (drei Durchgänge) eingesetzt. In Abweichung zur AAV 9 wurde die Reaktionslösung nach quantitativer Entschützung mit Dichlormethan und Wasser verdünnt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde dreimal mit Wasser extrahiert. Nach fünfmaliger Extraktion der vereinigten wässrigen Phasen mit Ethylacetat wurden die organischen Phasen vereint, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Ausbeute: 1.47 g (9.66 mmol, 99%) eines gelben Feststoffs

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.97 (s, 1H, Phenol-OH), 10.06 (s, 1H, H-8), 7.72–7.62 (m, 2H, H-3, H-5), 7.07 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz, 1H, H-4), 5.21 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.56 (s, 2H, H-7), ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 196.73 (C-8), 157.40 (C-1), 134.38 (C-3), 131.31 (C-5), 130.49 (C-2), 120.58 (C-6), 119.41 (C-4), 57.16 (C-7) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 175.0 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, gef.: 174.9 $[\text{M}+\text{Na}^+]$. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3308, 2930, 2866, 1655, 1619, 1442, 1304, 1225, 1067, 726, 650. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 329, 257, 217. Smp.: 62–63 °C. R_f -Wert = 0.05 (Dichlormethan), 0.47 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

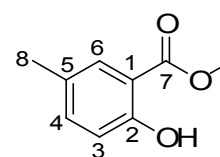


Synthese von 5-Methylsalicylsäuremethylester 90

Es wurden 5.00 g (32.9 mmol) 5-Methylsalicylsäure **89** in 80 mL Methanol gelöst und langsam bei 0 °C 16 mL (0.30 mol) konz. Schwefelsäure hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und in 250 mL Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Ausbeute: 5.18 g (31.2 mmol, 95%) einer farblosen Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.30 (s, 1H, Phenol-OH), 7.59–7.56 (m, 1H, H-6), 7.34 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-4), 6.88 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, 1H, H-3), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 2.24 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 169.26 (C-7), 157.97 (C-2), 136.42 (C-4), 129.52 (C-6), 128.09 (C-5), 117.20 (C-3), 112.42 (C-1), 52.29 (OCH_3), 19.77 (Aryl- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 167.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$, gef.: 167.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3205, 1676, 1617, 1490, 1441, 1331, 1293, 1217, 1092, 795. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 315, 239, 215. R_f -Wert = 0.62 (Dichlormethan).



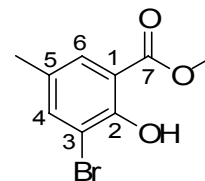
Synthese von 3-Brom-5-methylsalicylsäuremethylester 91

Es wurden 6.61 g (39.7 mmol) 5-Methylsalicylsäuremethylester **90** in 65 mL Chloroform vorgelegt und anschließend 2.02 mL (39.5 mmol) Brom in 40 mL

Chloroform innerhalb von 45 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatografisch (Dichlormethan) verfolgt. Während der Reaktion war eine geringe Gasentwicklung zu beobachten, die nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur nicht mehr auftrat. Die Reaktionslösung wurde noch einen Tag lang weiter gerührt und sodann mit einer gesättigten Natriumhydrogensulfit-Lösung gewaschen, um nicht umgesetztes Brom zu reduzieren. Im Anschluss wurde die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert. Im Methanol verbliebenes Produkt wurde mittels Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 3:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 8.93 g (36.5 mmol, 92%) eines gelben Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.92 (s, 1H, Phenol-OH), 7.72–7.69 (m, 1H, H-4), 7.64–7.60 (m, 1H, H-6), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 2.25 (s, 3H, Aryl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 168.99 (C-7), 154.47 (C-2), 139.17 (C-4), 129.77 (C-5), 129.20 (C-6), 113.52 (C-1), 110.22 (C-3), 52.83 (OCH₃), 19.39 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 244.0 [M], gef.: 244.0. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3101, 2958, 1442, 1337, 1255, 1214, 1195, 790, 781, 729. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 321, 246, 213. Smp.: 102 °C. R_f-Wert = 0.69 (Dichlormethan).

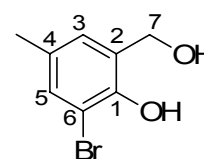


Synthese von 6-Brom-4-methylsalicylalkohol 79

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 3.80 g (15.5 mmol) 3-Brom-5-methylsalicylsäuremethylester **91** in 50 mL abs. THF und 1.18 g (31.1 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 80 mL abs. THF eingesetzt. Die Abtrennung von Salzurückständen erfolgte durch eine Kieselgelfiltration (Ethylacetat). Die Abkondensation des Ethylacetats am Rotationsverdampfer ergab das Rohprodukt, welches am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) gereinigt wurde.

Ausbeute: 3.06 g (14.1 mmol, 91%) eines gelben Öls

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.85 (s, 1H, Phenol-OH), 7.22–7.18 (m, 1H, H-5), 7.09–7.03 (m, 1H, H-3), 5.31 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.52 (d, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, 2H, H-7), 2.20 (s, 3H, Aryl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 148.36 (C-1), 130.78 (C-2), 130.72



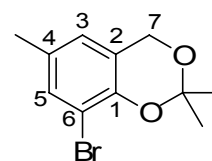
(C-5), 129.76 (C-4), 127.30 (C-3), 110.34 (C-6), 59.29 (C-7), 19.77 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 216.0 [M], gef.: 216.0. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3340, 2922, 1483, 1281, 1236, 1189, 1114, 1000, 857, 767. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 290, 284, 218. R_F-Wert = 0.46 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

Synthese von 6-Brom-4-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **96**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 durchgeführt, die Reaktionszeit allerdings auf vier Tage verlängert. Es wurden 2.16 g (10.0 mmol) 6-Brom-4-methylsalicylalkohol **79**, 6.32 mL (51.0 mmol) 2,2-Dimethoxypropan, 191 mg (1.11 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 4.3 g wasserfreies Natriumsulfat in 45 mL Aceton eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 9:1 v/v).

Ausbeute: 1.90 g (7.39 mmol, 74%) eines farblosen Öls

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.29–7.25 (m, 1H, H-5), 6.90–6.86 (m, 1H, H-3), 4.78 (s, 2H, H-7), 2.21 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.47 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 145.15 (C-1), 131.37 (C-5), 130.42 (C-4), 124.69 (C-3), 121.13 (C-2), 109.38 (C-6), 100.30 (Acetal-C), 59.85 (C-7), 24.47 (Acetal-CH₃), 19.69 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 256.0 [M], gef.: 256.0. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2995, 2859, 1477, 1374, 1280, 1268, 1204, 1127, 1067, 883. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 290, 283, 212. R_F-Wert = 0.21 (Petrolether/Dichlormethan 9:1 v/v).

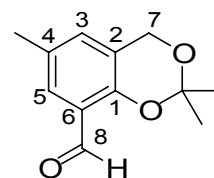


Synthese von 6-Formyl-4-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **99**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 1.81 g (7.04 mmol) 6-Brom-4-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **96** in 40 mL abs. THF, 8.80 mL (14.1 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 5.43 mL (69.8 mmol) abs. *N,N*-Dimethylformamid in 5.4 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (0–40%)).

Ausbeute: 1.15 g (5.58 mmol, 80%) eines gelben Öls

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.26 (s, 1H, H-8), 7.41–7.38 (m, 1H, H-5), 7.24–7.20 (m, 1H, H-3), 4.86 (s, 2H, H-7), 2.26 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.54 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ¹³C NMR



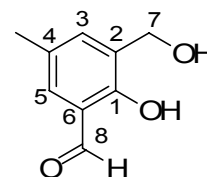
(101 MHz, DMSO- d_6): δ = 188.35 (C-8), 151.48 (C-1), 131.92 (C-3), 128.88 (C-4), 126.08 (C-5), 123.18 (C-6), 120.73 (C-2), 100.23 (Acetal-C), 59.76 (C-7), 24.42 (Acetal-CH₃), 19.77 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 206.1 [M], gef.: 206.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2995, 2945, 2858, 1685, 1600 1478, 1376, 1301, 1254, 1235, 1133, 8757. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 334, 259, 216. R_f-Wert = 0.33 (Dichlormethan).

Synthese von 6-Formyl-4-methylsalicylalkohol 82

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 1.87 g (9.06 mmol) 6-Formyl-4-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **99** in 50 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und drei Tropfen rauchende Salzsäure (zwei Durchgänge) eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol (0–3%)).

Ausbeute: 1.30 g (7.82 mmol, 86%) eines gelben Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.76 (s, 1H, Phenol-OH), 10.00 (s, 1H, H-8), 7.53–7.48 (m, 1H, H-3), 7.46–7.41 (m, 1H, H-5), 5.21 (t, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, Benzyl-OH), 4.53 (d, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 2H, H-7), 2.29 (s, 3H, Aryl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz,



DMSO- d_6): δ = 196.35 (C-8), 155.34 (C-1), 135.29 (C-3), 130.52 (C-5), 130.16 (C-2), 128.09 (C-4), 120.38 (C-6), 57.08 (C-7), 19.70 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 167.1 [M+H⁺], gef.: 167.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3289, 1646, 1457, 1380, 1322, 1252, 1216, 1079, 1043, 740. Smp.: 70–72 °C. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 341, 261, 216. R_f-Wert = 0.59 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

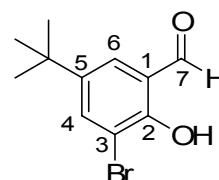
Synthese von 3-Brom-5-*tert*-butylsalicylaldehyd 94

Zu einer Lösung von 4.35 g (24.4 mmol) 5-*tert*-Butylsalicylaldehyd **93** in 5 mL Essigsäure wurde tropfenweise eine Lösung von 1.29 mL (25.2 mmol) Brom in 12 mL Essigsäure zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 18 Stunden bei 50 °C gerührt und die Reaktion dabei dünnschichtchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v) verfolgt. Nach drei Stunden wurden weitere 0.43 mL (8.4 mmol) Brom in 1.7 mL Essigsäure zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und durch Waschen mit 39%iger Natriumhydrogensulfid-Lösung überschüssiges Brom entfernt. Die organische Phase wurde mit Wasser,

gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Nach der Reinigung am Chromatotron (Petrolether_{50/70}) wurde das reine Produkt erhalten.

Ausbeute: 5.79 g (22.5 mmol, 92%) eines gelben Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 11.41 (s, 1H, Phenol-OH), 9.85 (s, 1H, H-7), 7.81 (d, ⁴J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-6), 7.51 (d, ⁴J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-4), 1.33 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 194.98 (C-7), 155.99 (C-2), 144.36 (C-5), 137.89 (C-6), 129.56 (C-4), 120.81 (C-1), 110.98 (C-3), 34.42 (Aryl-*t*Bu-C), 31.32 (Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 256.0 [M], gef.: 256.0. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 1659, 1457, 1381, 1265, 1220, 1161, 737, 695. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 338, 262, 218. Smp.: 84–87 °C. R_f-Wert = 0.49 (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v).

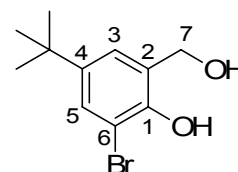


Synthese von 6-Brom-4-*tert*-butylsalicylalkohol 80

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 5.69 g (22.1 mmol) 3-Brom-5-*tert*-butylsalicylaldehyd **94** in 40 mL abs. THF und 750 mg (19.8 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 60 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte durch eine Kieselgelfiltration (Ethylacetat).

Ausbeute: 5.25 g (20.3 mmol, 92%) eines gelben Öls

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.89 (s, 1H, Phenol-OH), 7.34–7.28 (m, 2H, H-3, H-5), 5.34 (t, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 1H, Benzyl-OH), 4.55 (d, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 2H, H-7), 1.24 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 148.44 (C-1), 143.27 (C-4), 130.29 (C-2), 127.27 (C-5), 123.67 (C-3), 110.26 (C-6), 59.57 (C-7), 33.84 (Aryl-*t*Bu-C), 31.17 (Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 258.0 [M], gef.: 258.0. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3346, 2962, 1484, 1364, 1286, 1205, 1153, 1105, 1009, 714. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 282, 220. R_f-Wert = 0.64 (Ethylacetat).



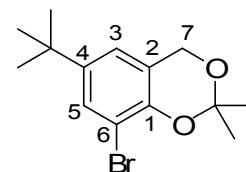
Synthese von 6-Brom-4-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal 97

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 durchgeführt. Es wurden 5.00 g (19.3 mmol) 6-Brom-4-*tert*-butylsalicylalkohol **80**, 12.2 mL (98.4 mmol) 2,2-Dimethoxypropan,

370 mg (1.92 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 8.4 g wasserfreies Natriumsulfat in 90 mL Aceton eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (0–30%)).

Ausbeute: 4.96 g (16.5 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.41 (d, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-5), 7.12–7.08 (m, 1H, H-3), 4.82 (s, 2H, H-7), 1.48 (s, 6H, Acetal-CH₃), 1.24 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101



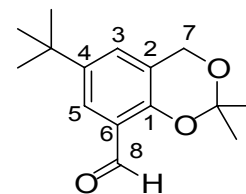
MHz, DMSO-*d*₆): δ = 145.17 (C-1), 143.91 (C-4), 128.01 (C-5), 121.22 (C-3), 120.78 (C-2), 109.38 (C-6), 100.45 (Acetal-C), 60.13 (C-7), 33.94 (Aryl-*t*Bu-C), 31.04 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 24.59 (Acetal-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 298.1 [M], gef.: 298.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2995, 2964, 2863, 1483, 1384, 1365, 1351, 1302, 1270, 1235, 1206, 721, 663. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 288, 280, 220. Smp.: 111–113 °C. R_f-Wert = 0.71 (Dichlormethan).

Synthese von 6-Formyl-4-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal 100

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 2.35 g (7.85 mmol) 6-Brom-4-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **97** in 45 mL abs. THF, 9.0 mL (14 mmol; in Abweichung zur AAV 6 nur 1.8 Äquivalente) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 6.0 mL (78 mmol) abs. *N,N*-Dimethylformamid in 6 mL abs. THF eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels einer Säulenchromatografie (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

Ausbeute: 1.48 g (5.96 mmol, 76%) eines gelben Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.27 (s, 1H, H-8), 7.57 (d, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-5), 7.47 (d, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-3), 4.89 (s, 2H, H-7), 1.53 (s, 6H, Acetal-CH₃), 1.26 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 188.66 (C-8),



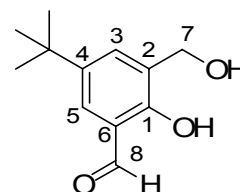
151.68 (C-1), 142.32 (C-4), 129.01 (C-3), 122.81 (C-6), 122.37 (C-5), 120.60 (C-2), 100.48 (Acetal-C), 60.12 (C-7), 33.97 (Aryl-*t*Bu-C), 31.01 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 24.64 (Acetal-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 248.1 [M], gef.: 248.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 1683, 1599, 1485, 1396, 1382, 1243, 1221, 1140, 1112, 879. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 332, 260, 220. Smp.: 85–88 °C. R_f-Wert = 0.29 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v), 0.44 (Dichlormethan).

Synthese von 6-Formyl-4-*tert*-butylsalicylalkohol **83**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 1.30 g (5.24 mmol) 6-Formyl-4-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **100** in 50 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und 3 mL rauchende Salzsäure (drei Durchgänge) eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels einer Säulenchromatografie (Dichlormethan/Methanol (0–3%).

Ausbeute: 960 mg (4.61 mmol, 88%) eines orangenen Öls

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.82 (s, 1H, Phenol-OH), 10.05 (s, 1H, H-8), 7.75 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-3), 7.64 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-5), 5.25 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.4 Hz, 1H, Benzyl-OH), 4.55 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 4.8 Hz, 2H, H-7), 1.29 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm.



^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 197.08 (C-8), 155.52 (C-1), 141.76 (C-4), 132.00 (C-3), 129.98 (C-6), 127.37 (C-5), 120.06 (C-2), 57.41 (C-7), 33.95 (Aryl-*t*Bu-C), 31.10 (Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 208.1 [M], gef.: 208.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3386, 2962, 1654, 1459, 1383, 1364, 1321, 1268, 1216, 1071, 1036, 731. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 338, 261, 217. R_f -Wert = 0.59 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v)

9.2.8. Synthese der 3-Formylsaligenylchlorphosphite

Versuch der Synthese von 3-Formylsaligenylchlorphosphit **84**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 250 mg (1.65 mmol) 6-Formylsalicylalkohol **81** in 13 mL abs. THF, 0.18 mL (2.1 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.31 mL (3.8 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 wurde anschließend für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 100 mg eines gelben Öls

Das ^{31}P -NMR-Spektrum des erhaltenen Rohprodukts wies neben einem Signal bei 140.7 ppm weitere Signale auf, die wahrscheinlich aus einer Zersetzung von **84** stammen. Verbindung **84** scheint somit sehr labil zu sein. Da das ^1H -NMR-Spektrum fast ausschließlich Pyridinhydrochlorid zeigte, war die Ausbeute an möglicherweise entstandem Chlorphosphit **84** so gering, dass eine anschließende testweise

Umsetzung zum Triester **75** keinen Erfolg brachte. Auch weitere, vergleichbare Versuche zur Darstellung von **84** blieben ohne Erfolg.

Synthese von 3-Formyl-5-methylsaligenylchlorphosphit **85**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 250 mg (1.51 mmol) 6-Formyl-4-methylsalicylalkohol **82** in 11 mL abs. THF, 0.16 mL (1.8 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.28 mL (3.4 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 75 mg eines gelblichen Öls, das neben **85** (als Gemisch zweier Enantiomere) noch zwei weitere Verbindungen **X** (vgl. Erläuterungen hierzu S. 49-52) enthielt (Verhältnis **85**:**X**: 52:48); laut $^1\text{H-NMR}$ war nur wenig Pyridinhydrochlorid enthalten.

Weitere Synthesen (Änderung der Reaktionstemperatur):

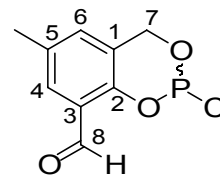
Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 11 durchgeführt. Allerdings erfolgten die Zugaben von PCl_3 und der abs. Pyridin/THF-Mischung bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden 312 mg (1.88 mmol) 6-Formyl-4-methylsalicylalkohol **82** in 14 mL abs. THF, 0.20 mL (2.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.35 mL (4.3 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 310 mg eines gelblichen Öls, das neben **85** (als Gemisch zweier Enantiomere) noch zwei weitere Verbindungen **X** enthielt (Verhältnis **85**:**X**: 88:12); laut $^1\text{H-NMR}$ kein Pyridinhydrochlorid enthalten

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 11 durchgeführt. Allerdings erfolgten die Zugaben von PCl_3 und der abs. Pyridin/THF-Mischung bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$. Nach beendeter Zugabe wurde ebenfalls bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$ noch eine Stunde weitergerührt. Es wurden 500 mg (3.01 mmol) 6-Formyl-4-methylsalicylalkohol **82** in 18 mL abs. THF, 0.25 mL (2.9 mmol (1.0 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11) Phosphor(III)-chlorid und 0.46 mL (5.7 mmol (1.9 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 415 mg (1.81 mmol, 60%) eines reinen, gelben Feststoffs als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 10.39 (s, 1H, H-8), 7.64–7.61 (m, 1H, H-4), 7.05–7.02 (m, 1H, H-6), 5.48 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.4 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-7a), 5.05 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.4 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 9.6 Hz, 1H, H-7b), 2.34 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 140.5 ppm.

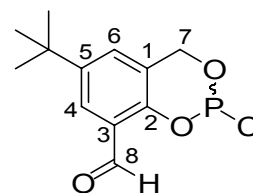


Synthese von 3-Formyl-5-*tert*-butylsaligenylchlorophosphit **86**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 11 durchgeführt. Allerdings erfolgten die Zugaben von PCl_3 und der abs. Pyridin/THF-Mischung bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$. Nach beendeter Zugabe wurde ebenfalls bei $-55\text{ }^\circ\text{C}$ noch eine Stunde weitergerührt. Es wurden 230 mg (1.10 mmol) 6-Formyl-4-*tert*-butylsalicylalkohol **83** in 8 mL abs. THF, 0.11 mL (1.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.21 mL (2.6 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 295 mg eines gelben Öls mit einer Reinheit von 55% (entspricht 162 mg reinem **86** (0.594 mmol, 54%)) als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 10.41 (s, 1H, H-8), 7.85–7.83 (m, 1H, H-4), 7.23–7.21 (m, 1H, H-6), 5.53–5.45 (m, 1H, H-7a), 5.13–5.04 (m, 1H, H-7b), 1.31 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 140.9 ppm.



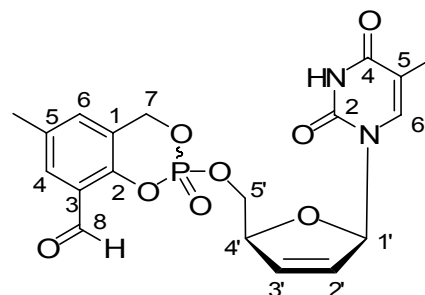
9.2.9. Synthese der 3-Formyl-*cyclo*Sal-d4T-monophosphate

Synthese von 3-Formyl-5-methyl-*cyclo*Sal-d4T-monophosphat **76**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 410 mg (1.79 mmol) 3-Formyl-5-methylsaligenylchlorophosphit **85** in 14 mL abs. Acetonitril, 170 mg (0.758 mmol) d4T **2** gelöst in 21 mL abs. Acetonitril, 0.22 mL (1.3 mmol) DIPEA und 0.43 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (2.4 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (+ 0.1% Essigsäure) 19:1 v/v).

Ausbeute: 145 mg (0.332 mmol, 44%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.32 (s, 1H, 1 x NH), 11.30 (s, 1H, 1 x NH), 10.26 (s, 1H, 1 x H-8), 10.23 (s, 1H, 1 x H-8), 7.58–7.55 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.42–7.39 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.16 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.15 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.78–6.74 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.42 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.35 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.04–5.97 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.61–5.50 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.48–5.36 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.98–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.42–4.28 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.32 (s, 2 x 3H, 2 x Aryl- CH_3), 1.66 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th- CH_3), 1.62 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 187.67 (1 x C-8), 187.65 (1 x C-8), 163.61 (2 x Th-C-4), 150.60 (2 x Th-C-2), 149.38 (2 x C-2), 135.64 (1 x Th-C-6), 135.49 (1 x Th-C-6), 134.02 (2 x C-5), 132.78 (2 x C-4), 132.54 (2 x C-3'), 128.31 (1 x C-6), 128.13 (1 x C-6), 127.36 (1 x C-2'), 127.34 (1 x C-2'), 122.21 (1 x C-1), 122.12 (1 x C-1), 109.64 (1 x Th-C-5), 109.54 (1 x Th-C-5), 89.22 (2 x C-1'), 84.08 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.1 Hz, 1 x C-4'), 83.92 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.1 Hz, 1 x C-4'), 68.84 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.9 Hz, 2 x C-5'), 68.08 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.6 Hz, 1 x C-7), 67.87 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-7), 19.96 (2 x Aryl- CH_3), 11.88 (1 x Th- CH_3), 11.81 (1 x Th- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = -9.62, -10.19 ppm. HRMS (ESI^+ , m/z): ber.: 457.0777 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 457.0785. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 254. R_f -Wert = 0.34 (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 11.9, 11.6 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R = 12.4, 11.9 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

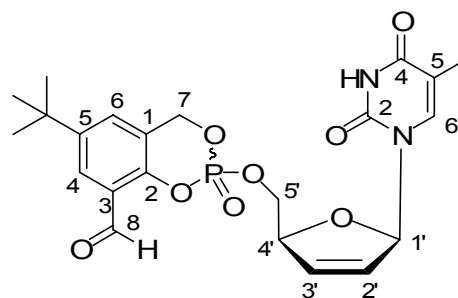


Synthese von 3-Formyl-5-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat 77

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 290 mg (1.06 mmol) 3-Formyl-5-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **86** in 10 mL abs. Acetonitril, 110 mg (0.495 mmol) d4T **2** gelöst in 15 mL abs. Acetonitril, 0.14 mL (0.80 mmol) DIPEA und 0.26 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (1.4 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (+ 0.1% Essigsäure) (0–2%)).

Ausbeute: 86 mg (0.18 mmol, 36%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.32 (s, 2 x 1H, 2 x NH), 10.27 (s, 1H, 1 x H-8), 10.26 (s, 1H, 1 x H-8), 7.77–7.72 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.71–7.68 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.20 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.16 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.82–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.45–6.41 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.38–6.34 (m, 1H, 1 x H-3'), 6.05–6.01 (m, 1H, 1 x H-2'), 6.01–5.97 (m, 1H, 1 x H-2'), 5.61 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.8 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 6.0 Hz, 1H, 1 x H-7a), 5.57 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 15.1 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 5.0 Hz, 1H, 1 x H-7a), 5.51–5.43 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.99–4.94 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.43–4.21 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.65 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.60 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.29 (s, 2 x 9H, 2 x Aryl-*t*Bu-CH₃), ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 187.92 (1 x C-8), 187.87 (1 x C-8), 163.70 (1 x Th-C-4), 163.67 (1 x Th-C-4), 150.71 (1 x Th-C-2), 150.67 (1 x Th-C-2), 149.40 ($^2J_{\text{C,P}}$ = 4.6 Hz, 1 x C-2), 149.31 ($^2J_{\text{C,P}}$ = 4.6 Hz, 1 x C-2), 147.04 (1 x C-3), 147.02 (1 x C-3), 135.72 (1 x Th-C-6), 135.56 (1 x Th-C-6), 132.86 (1 x C-3'), 132.69 (1 x C-3'), 129.76 (1 x C-6), 129.71 (1 x C-6), 127.41 (2 x C-2'), 124.76 (1 x C-4), 124.48 (1 x C-4), 124.22 (1 x C-5), 124.19 (1 x C-5), 122.15 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 9.2 Hz, 1 x C-1), 122.10 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 9.9 Hz, 1 x C-1), 109.71 (1 x Th-C-5), 109.66 (1 x Th-C-5), 89.21 (2 x C-1'), 84.11 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.6 Hz, 2 x C-4'), 68.91 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.3 Hz, 2 x C-5'), 68.30 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.9 Hz, 1 x C-7), 68.16 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.9 Hz, 1 x C-7), 34.39 (2 x Aryl-*t*Bu-C), 30.85 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 30.81 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.92 (1 x Th-CH₃), 11.85 (1 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = -9.68, -10.03 ppm. HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 499.1241 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 499.1242. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 254. R_f -Wert = 0.50 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v), 0.47 (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 15.2 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R = 26.8 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v), 15.3 min (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).



9.2.10. Synthese der 3-Diacetoxymethyl-cycloSal-d4T-monophosphate

Synthese von 3-Diacetoxymethyl-5-methyl-cycloSal-d4T-monophosphat 73

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 60 mg (0.14 mmol) 3-Formyl-5-methyl-cycloSal-d4TMP **76** in 0.6 mL abs. Acetonitril, 0.32 mL (3.4 mmol) Essigsäureanhydrid und 16 mg (67 μmol) ZrCl_4 verwendet. Reaktionszeit: 45 min. Reinigung: Chromatotron (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Ausbeute: 14 mg (26 μ mol, 19%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.6:1.0; außerdem wurden 14 mg (32 μ M, 23%) Edukt **76** reisoliert.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.33 (s, 2

x 1H, 2 x NH), 7.78 (s, 1H, 1 x H-8), 7.74 (s,

1H, 1 x H-8), 7.39–7.35 (m, 2 x 1H, 2 x H-4),

7.21–7.16 (m, 4 x 1H, 2 x H-6, 2 x Th-H-6),

6.82–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.41 (ddd,

$^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz,

1H, 1 x H-3'), 6.34 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, 1 x H-3'),

6.05–5.98 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.54–5.45 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.41–5.32 (m, 2 x

1H, 2 x H-7b), 4.98–4.91 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.35–4.19 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.31

(s, 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.31 (s, 3H, 1 x Aryl- CH_3), 2.12 (s, 3H, 1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.11 (s,

3H, 1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.11 (s, 3H, 1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.10 (s, 3H, 1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.66

(d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 3H, 1 x Th- CH_3), 1.60 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 3H, 1 x Th- CH_3) ppm. ^{13}C

NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.43 (1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 168.36 (2 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$),

168.34 (1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 163.66 (2 x Th-C-4), 150.65 (2 x Th-C-2), 145.13 (1 x C-2),

144.85 (1 x C-2), 135.64 (1 x Th-C-6), 135.46 (1 x Th-C-6), 134.00 (2 x C-5), 132.72

(1 x C-3'), 132.57 (1 x C-3'), 127.91 (2 x C-6), 127.54 (1 x C-4), 127.46 (1 x C-4),

127.37 (2 x C-2'), 121.78 (2 x C-1), 109.67 (1 x Th-C-5), 109.65 (1 x Th-C-5), 89.16

(1 x C-1'), 89.09 (1 x C-1'), 84.22 (1 x C-8), 84.06 (1 x C-8), 83.99 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.1$ Hz,

1 x C-4'), 83.97 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.1$ Hz, 1 x C-4'), 68.63–68.52 (m, 2 x C-5'), 68.14 (d, $^2J_{\text{C,P}}$

= 7.3 Hz, 1 x C-7), 68.11 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 1 x C-7), 20.39 (1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.38 (1

x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.36 (1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.34 (1 x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.17 (1 x Aryl- CH_3),

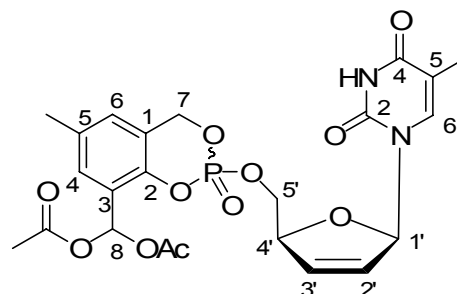
20.15 (1 x Aryl- CH_3), 11.80 (1 x Th- CH_3), 11.67 (1 x Th- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162

MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = -9.56, -9.67 ppm. HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 559.1094 [$\text{M}+\text{Na}^+$],

gef.: 559.1084. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 266. R_f -Wert = 0.41 (Ethylacetat/Methanol

9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 14.1, 13.9 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R =

18.2, 17.5 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).



Synthese von 3-Diacetoxymethyl-5-tert-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat **74**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 33 mg (69 μ mol) 3-Formyl-5-tert-butyl-cycloSal-d4TMP **77** in 1 mL abs. Acetonitril, 0.17 mL (1.8 mmol) Essigsäureanhydrid und 7.8 mg (33 μ mol) ZrCl_4 verwendet.

Reaktionszeit: 1 h. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Ausbeute: Die Reinigung am Chromatotron ergab 15 mg farbloser Watten, die laut ^{31}P -NMR aus **74** und einem weiteren Triester im Verhältnis 1.0:0.7 bestanden. Nicht umgesetztes Edukt **77** wurde bereits am Chromatotron abgetrennt. Das Chromatogramm der Trennung mittels präparativer HPLC zeigte neben Edukt **77** (nur in geringem Maße vorhanden) und Produkt **74** zwei weitere Verbindungen. Es konnten in diesem Versuch allerdings keine charakterisierbaren Mengen dieser Verbindungen isoliert werden, was auf Löslichkeitsprobleme zurückgeführt werden konnte.

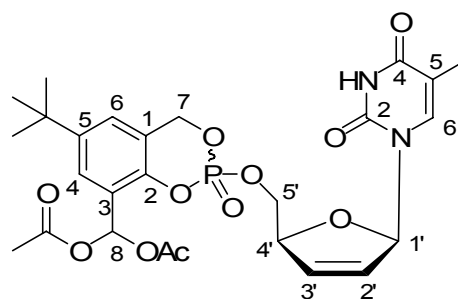
Weitere Synthesen:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 42 mg (88 μmol) 3-Formyl-5-*tert*-butyl-cycloSal-d4TMP **77** in 2 mL abs. Acetonitril, 0.22 mL (2.3 mmol) Essigsäureanhydrid und 19 mg (82 μmol (1.0 Äquivalente, Abweichung zur AAV 13)) ZrCl_4 verwendet. Außerdem wurden nach 30 Minuten Reaktionszeit weitere 0.7 Äquivalente ZrCl_4 (15 mg, 64 μmol) zugegeben. Reaktionszeit: 2.5 h. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–2%); alle triesterhaltigen Fraktionen vereinigt) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v; Substanzgemisch zur Injektion in gekühltem Lösungsmittelgemisch gelöst).

Ausbeute: 5 mg (9 μmol , 10%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.9:1.0; auch in diesem Versuch reichten die Mengen an isolierten Nebenprodukten (siehe oben) nicht zu einer Charakterisierung dieser aus.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11.34 (s, 2

x 1H, 2 x NH), 7.79 (s, 1H, 1 x H-8), 7.76 (s, 1H, 1 x H-8), 7.51–7.47 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.46–7.42 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.19 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.17 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.83–6.79 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.41 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.34 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.07–5.97 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.59–5.48 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.42 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.1 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 5.8 Hz, 1H, 1 x H-7b), 5.39 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.3 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 6.5 Hz, 1H, 1 x H-7b), 4.99–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.37–4.22 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.12 (s, 3H, 1 x OC(O)CH₃), 2.12 (s, 3H, 1



x OC(O)CH₃), 2.11 (s, 3H, 1 x OC(O)CH₃), 2.10 (s, 3H, 1 x OC(O)CH₃), 1.63 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.55 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.28 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.27 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.43 (4 x OC(O)CH₃), 163.73 (1 x Th-C-4), 163.71 (1 x Th-C-4), 150.70 (1 x Th-C-2), 150.69 (1 x Th-C-2), 147.14 (1 x C-5), 147.12 (1 x C-5), 144.98 (2 x C-2), 135.51 (2 x Th-C-6), 135.12 (2 x C-6), 132.78 (1 x C-3'), 132.66 (1 x C-3'), 127.47 (1 x C-2'), 127.43 (1 x C-2'), 124.86 (1 x C-4), 124.83 (1 x C-4), 121.58 (1 x C-1), 121.50 (1 x C-1), 109.74 (1 x Th-C-5), 109.73 (1 x Th-C-5), 89.17 (1 x C-1'), 89.10 (1 x C-1'), 84.56 (1 x C-8), 84.47 (1 x C-8), 84.09 (d, ³J_{C,P} = 8.3 Hz, 1 x C-4'), 84.03 (d, ³J_{C,P} = 8.3 Hz, 1 x C-4'), 68.38 (d, ²J_{C,P} = 7.3 Hz, 2 x C-5'), 67.49 (d, ²J_{C,P} = 6.4 Hz, 1 x C-7), 67.37 (d, ²J_{C,P} = 6.4 Hz, 1 x C-7), 34.47 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.38 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 30.94 (2 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.43 (1 x OC(O)CH₃), 20.41 (2 x OC(O)CH₃), 20.37 (1 x OC(O)CH₃), 11.78 (1 x Th-CH₃), 11.65 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.52, -9.57 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 601.1558 [M+Na⁺], gef.: 601.1607. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 265. R_F-Wert = 0.42 (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 16.9 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R = 46.5 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v), 21.2 min (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 50 mg (0.10 mmol) 3-Formyl-5-*tert*-butyl-*cyclo*Sal-d4TMP **77** in 2 mL abs. Acetonitril, 0.26 mL (2.8 mmol) Essigsäureanhydrid und 24 mg (0.10 mmol (1.0 Äquivalente, Abweichung zur AAV 13)) ZrCl₄ verwendet. Reaktionszeit: 1.5 h. Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%); alle triesterhaltigen Fraktionen vereinigt) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v; Substanzgemisch zur Injektion in Acetonitril/Wasser 1:1 v/v (gekühlt) gelöst).

Ausbeute: 10 mg (17 μmol, 17%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.7:1.0.

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 208) angegebenen.

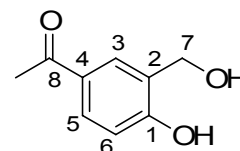
9.2.11. Synthese der 4-Acetylsalicylalkohole

Synthese von 4-Acetylsalicylalkohol **112** durch Hydroxymethylierung von 4-Hydroxyacetophenon **130**

Es wurden 6.80 g (49.9 mmol) 4-Hydroxyacetophenon **130** in 750 mL destilliertem Wasser gelöst und mit 150 mL konzentrierter Salzsäure und 30 mL Eisessig versetzt. Nach Zugabe von 11.0 g (0.366 mol) *para*-Formaldehyd wurde die Reaktionslösung zunächst fünf Stunden bei Raumtemperatur und anschließend 13 Stunden bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde eine Säulenchromatografie (Ethylacetat/Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2.5:1.5 v/v/v) durchgeführt, wobei aus mehreren, neben dem Produkt **112** entstandenen Verbindungen 4-Acetylsalicylalkoholmethylenacetal **131** und 7-O-Acetyl-4-acetylsalicylalkohol **132** identifiziert werden konnten.

Ausbeute: 190 mg (1.14 mmol, 2%) eines farblosen Feststoffs sowie 750 mg (4.21 mmol, 8%) 4-Acetylsalicylalkoholmethylenacetal **131** und 800 mg (3.84 mmol, 8%) 7-O-Acetyl-4-acetylsalicylalkohol **132** als ebenfalls farblose Feststoffe.

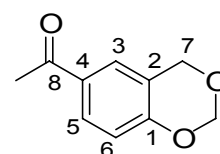
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.96–7.93 (m, 1H, H-3), 7.72 (dd, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, H-5), 6.84 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1H, H-6), 4.49 (s, 2H, H-7), 2.47 (s, 3H, Acetyl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 196.23 (C-8), 158.82



(C-1), 128.78 (C-3), 128.75 (C-4), 128.41 (C-2), 127.94 (C-5), 114.25 (C-6), 57.84 (C-7), 26.23 (Acetyl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 167.1 [M+H⁺], gef.: 167.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3393, 3162, 1668, 1597, 1444, 1361, 1296, 1033, 964, 821, 603. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 276, 222. Smp.: 121 °C. R_F-Wert = 0.11 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

Analytische Daten von 4-Acetylsalicylalkoholmethylenacetal **131**:

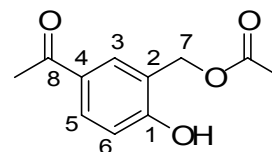
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.78 (dd, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, H-5), 7.64–7.61 (m, 1H, H-3), 6.91 (d, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, 1H, H-6), 5.29 (s, 2H, OCH₂O), 4.93 (s, 2H, H-7), 2.54 (s, 3H, Acetyl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 196.84 (C-8), 156.78 (C-1),



130.76 (C-4), 129.11 (C-5), 126.18 (C-3), 121.14 (C-2), 116.94 (C-6), 91.69 (OCH₂O), 56.35 (C-7), 26.43 (Acetyl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 179.1 [M+H⁺], gef.: 179.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1694, 1608, 1247, 1168, 986, 964, 818, 693, 613. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 268, 220. Smp.: 55–56 °C. R_f-Wert = 0.67 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

Analytische Daten von 7-O-Acetyl-4-acetylsalicylalkohol 132:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.64 (s, 1H, Phenol-OH), 7.94 (d, ⁴J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-3), 7.89 (dd, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-5), 6.98 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, H-6), 5.15 (s, 2H, H-7), 2.56 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.12 (s, 3H, OC(O)CH₃) ppm.



¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 196.99 (C-8), 173.86 (OC(O)CH₃), 160.31 (C-1), 133.29 (C-3), 131.98 (C-5), 130.17 (C-4), 121.84 (C-2), 117.69 (C-6), 62.92 (C-7), 26.43 (Acetyl-CH₃), 20.98 (OC(O)CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 209.1 [M+H⁺], gef.: 209.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3104, 2978, 1737, 1655, 1584, 1286, 1223, 1143, 824, 570. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 272, 222. Smp.: 113–114 °C. R_f-Wert = 0.40 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

Versuch der Synthese von 4-Acetylsalicylalkohol 112 durch Entschützung von 4-Acetylsalicylalkoholmethylenacetal 131

Es wurden 0.74 g (4.2 mmol) 4-Acetylsalicylalkoholmethylenacetal **131** in 10 mL einer 2 M HCl-Lösung gelöst und die Reaktionslösung für zwei Stunden refluxiert. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Mittels Dünnschichtchromatografie (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) war zu erkennen, dass eine vollständige Zersetzung zu einer Vielzahl von Produkten stattgefunden hatte, wobei **112** nicht entstanden war.

Synthese von 4-Acetylsalicylalkohol 112 durch Entschützung von 7-O-Acetyl-4-acetylsalicylalkohol 132

Es wurden 0.79 g (3.8 mmol) 7-O-Acetyl-4-acetylsalicylalkohol **132** in 20 mL 2 M Salzsäure aufgenommen. Durch Zugabe von 20 mL Acetonitril wurde das Edukt vollständig gelöst. Die Reaktionslösung wurde für zwei Stunden refluxiert und

anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung erfolgte mittels Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 89 mg (0.53 mmol, 15%) eines farblosen Feststoffs

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 210) angegebenen.

Synthese von 4-Acetylsalicylalkohol **112 durch Chlormethylierung von 4-Hydroxyacetophenon **130** und einer anschließenden Substitutionsreaktion**

*Darstellung von 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133**:*

Für die Chlormethylierung wurden zu einer Suspension aus 15.0 g (0.123 mol) 4-Hydroxyacetophenon **130** in 110 mL konzentrierter Salzsäure 37.4 mL (0.507 mol) einer 37%igen Formaldehydlösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde für vier Stunden bei 50 °C gerührt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur der entstandene rote Feststoff durch Filtration isoliert. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser und anschließender Gefriertrocknung wurden 18.6 g des rohen Produkts gewonnen, welches ohne weitere Reinigung in der anschließenden Substitutionsreaktion eingesetzt wurde.

*Versuche zur Darstellung von 4-Acetylsalicylalkohol **130** aus 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133**:*

Um die Synthese möglichst effizient zu gestalten, wurde das rohe 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133** mit verschiedenen Basen in verschiedenen Lösungsmitteln umgesetzt. Diese Versuche sind bereits in der Tab. 9 (S. 74) zusammengefasst worden.

Unter Anwendung der effizientesten Reaktionsbedingungen wurden 12.5 g des rohen 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **133** in 90 mL wässrigem THF gelöst, mit 10 g (0.10 mol) CaCO₃ versetzt und für einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert des Reaktionsgemischs mit verdünnter Salzsäure auf sechs eingestellt, weiter mit Wasser verdünnt und dann viermal mit Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Für die säulenchromatografische Reinigung wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Dabei fiel ein leicht rosafarbener

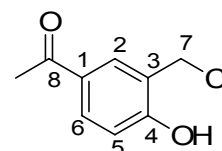
Feststoff aus, der durch Filtration abgetrennt wurde. Dieser konnte als das reine 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133** identifiziert werden. Nach Abkondensation des Dichlormethans wurde der verbleibende Rückstand säulenchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 1:1 v/v) gereinigt. Erhaltene unreine Fraktionen wurden mittels einer weiteren Säulenchromatografie (Dichlormethan/Methanol (5–10%)) gereinigt.

Ausbeute: 2.12 g (12.8 mmol, 16%) eines farblosen Feststoffs sowie 5.60 g (30.3 mmol) 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133** als leicht rosafarbenen Feststoff

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 210) angegebenen.

*Analytische Daten von 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133**:*

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.87 (s, 1H, Phenol-OH), 7.98 (d, ⁴*J*_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.82 (dd, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-6), 6.95 (d, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, 1H, H-5), 4.74 (s, 2H, H-7), 2.48 (s, 3H, Acetyl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 195.92 (C-8), 160.24 (C-4), 131.73 (C-2), 130.98 (C-6), 128.58 (C-1), 123.88 (C-3), 115.32 (C-5), 41.61 (C-7), 26.28 (Acetyl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 185.0 [M+H⁺], gef.: 185.1. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3151, 1655, 1584, 1512, 1430, 1361, 1288, 1262, 1161, 1129, 1076, 985, 835, 616, 572. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 272, 222. Smp.: 172–174 °C (Sublimation und Zersetzung). R_F-Wert = 0.48 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).



*Umsetzung des reinen 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133**:*

Es wurden 1.00 g (5.42 mmol) 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **133** in 20 mL wässrigem THF gelöst, mit 0.81 g (8.1 mmol) CaCO₃ versetzt und für einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatografische Kontrolle (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) zeigte noch viel nicht umgesetztes Edukt. Nach der Zugabe von 8.0 mL (0.44 mol) destilliertem Wasser und einem weiteren Tag Rühren bei Raumtemperatur zeigte die dünnschichtchromatografische Kontrolle kein Edukt mehr. Die Aufarbeitung erfolgte wie bereits oben (S. 212) bei der Umsetzung des rohen 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **133** beschrieben.

Analog wurden 4.00 g (21.7 mmol) **133** in 80 mL wässrigem THF mit 3.2 g (32 mmol) CaCO₃ und 32 mL (1.8 mol) destilliertem Wasser für einen Tag bei Raumtemperatur

umgesetzt. Auch hier zeigte die dünnschichtchromatografische Kontrolle kein Edukt mehr.

Die Rückstände beider Ansätze wurden vereinigt und säulenchromatografisch (Dichlormethan/Methanol (5–10%)) gereinigt.

Ausbeute: 3.98 g (24.0 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffs

Die analytischen Daten von **112** entsprachen den oben (S. 210) angegebenen.

Die Bedingungen der Darstellung des rohen 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **133** (S. 212) und der hier beschriebenen anschließenden Umsetzung der reinen Verbindung wurden zu der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 zusammengefasst.

*Darstellung von 4-Acetylsalicylalkohol **112** unter Verwendung der AAV 2:*

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Für die Chlormethylierung wurden 3.00 g (22.0 mmol) 4-Hydroxyacetophenon **130**, 22 mL konz. Salzsäure und 7.5 mL (0.10 mol) einer 37%igen Formaldehydlösung verwendet. Durch Filtration wurden 3.80 g des rohen 3-Chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **133** als roter Feststoff erhalten.

Diese wurden in 75 mL wässrigem THF mit 3.1 g (31 mmol) CaCO₃ und 30 mL dest. Wasser zum 4-Acetylsalicylalkohol **112** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatografisch (Dichlormethan/Methanol (5–10%)).

Ausbeute: 2.27 g (13.7 mmol, 62% über 2 Stufen) eines farblosen Feststoffs

Die analytischen Daten von **112** entsprachen den oben (S. 210) angegebenen.

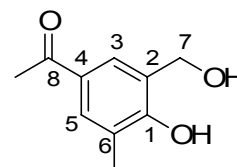
Synthese von 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **113**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Für die Chlormethylierung wurden 1.00 g (6.66 mmol) 4-Hydroxy-3-methylacetophenon **134**, 5 mL konz. Salzsäure und 2.0 mL (27 mmol) einer 37%igen Formaldehydlösung verwendet. Das rohe Chlormethylierungsprodukt wurde erhalten, indem die wässrige Reaktionslösung dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Es wurden 1.30 g des rohen 3-Chlormethyl-4-hydroxy-5-methylacetophenons **136** als violetter Feststoff erhalten.

Diese wurden in 10 mL wässrigem THF mit 0.98 g (9.8 mmol) CaCO_3 und 10 mL (0.55 mol) dest. Wasser zum 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **113** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 1:1 v/v).

Ausbeute: 708 mg (3.93 mmol, 59% über 2 Stufen) eines leicht orangefarbenen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.32 (s, 1H, Phenol-OH), 7.76 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-3), 7.64 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-5), 5.39 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.58 (s, 2H, H-7), 2.47 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.21 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz,



$\text{DMSO}-d_6$): δ = 196.46 (C-8), 157.15 (C-1), 129.87 (C-5), 128.42 (C-4), 128.10 (C-2), 125.91 (C-3), 123.95 (C-6), 59.20 (C-7), 26.33 (Acetyl- CH_3), 16.28 (Aryl- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 181.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$, gef.: 181.2. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ $[\text{cm}^{-1}]$ = 3150, 1659, 1587, 1361, 1275, 1006, 883, 556. Smp.: 113–115 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 275, 221. R_f -Wert = 0.41 (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 1:1 v/v).

Wiederholung der Synthese in größerem Maßstab:

Dabei wurden 8.93 g (59.5 mmol) 4-Hydroxy-3-methylacetophenon **134**, 45 mL konz. Salzsäure und 18 mL (0.24 mol) 37%ige Formaldehydlösung eingesetzt. Die erhaltenen 15.2 g des rohen 3-Chlormethyl-4-hydroxy-5-methylacetophenons **136** wurden in 290 mL wässrigem THF mit 11.9 g (118 mmol) CaCO_3 und 117 mL (6.50 mol) dest. Wasser zum 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **113** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte zunächst säulenchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 1:1 v/v). Dabei erhaltene produktthaltige Mischfraktionen wurden am Chromatotron erneut getrennt (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v).

Ausbeute: 4.81 g (26.7 mmol, 45% über 2 Stufen) eines leicht orangefarbenen Feststoffs

Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

Synthese von 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114** aus 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyacetophenon **135**

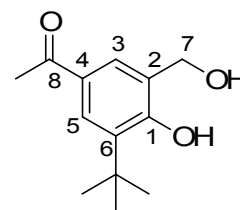
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Für die Chlormethylierung wurden 7.03 g (36.6 mmol) 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyacetophenon **135**, 36 mL konz. Salzsäure und 12.4 mL (168 mmol) einer 37%igen Formaldehyd-Lösung verwendet. In Abweichung zur AAV 2 wurde für fünf Stunden bei 50 °C gerührt, wobei sich ein Teil des Eduktes nicht löste. Das rohe Chlormethylierungsprodukt wurde erhalten, indem die wässrige Reaktionslösung dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Es wurden 8.33 g des rohen 5-*tert*-Butyl-3-chlormethyl-4-hydroxyacetophenons **137** als violetter Feststoff erhalten.

Diese wurden in 220 mL wässrigem THF mit 8.8 g (88 mmol) CaCO₃ und 90 mL (5.0 mol) dest. Wasser zum 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte teilweise säulenchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat (20-35%)), teilweise mittels Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v). Nicht umgesetztes Edukt **135** fiel dabei beim Lösen im Laufmittel aus und wurde vorab durch Filtration zurückgewonnen.

Ausbeute: 894 mg (4.02 mmol, 11% über 2 Stufen) eines gelb- bis orangefarbenen Feststoffs; außerdem konnten 3.18 g (16.6 mmol) Edukt **135** reisoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.54 (s, 1H, Phenol-OH), 7.72 (s, 2H, H-3, H-5), 5.97 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.69 (s, 2H, H-7), 2.48 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.38 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 196.56 (C-8), 158.81 (C-1), 136.25 (C-6), 128.14 (C-2), 127.32 (C-4), 126.71 (C-3), 125.57 (C-5), 60.96 (C-7), 34.46 (Aryl-*t*Bu-C), 29.34 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 26.26 (Acetyl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 223.1 [M+H⁺], gef.: 223.3. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3224, 2953, 1653, 1587, 1313, 1293, 1024, 8806, 572. Smp.: 136–138 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 279, 224. R_f-Wert = 0.54 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).



Weitere Synthese:

Es wurden 2.66 g (13.8 mmol) 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyacetophenon **135** in 27 mL konz. Salzsäure gelöst, mit 5.8 mL (65 mmol) einer 37%igen Formaldehyd-Lösung versetzt und für 2.5 Stunden bei 100 °C gerührt. Danach war in der dünnschicht-

chromatografischen Kontrolle (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) kein Edukt mehr zu detektieren. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur wurde der entstandene violette Feststoff durch Zugabe von Ethylacetat und Wasser gelöst und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene rohe 5-*tert*-Butyl-3-chlormethyl-4-hydroxyacetophenon **137** (4.04 g) wurde ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt.

Dazu wurde es in 110 mL wässrigem THF gelöst, mit 4.2 g (42 mmol) CaCO₃ und 44 mL (2.4 mol) dest. Wasser versetzt und für sechs Stunden bei 50 °C gerührt. Die Aufarbeitung wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Die Reinigung erfolgte zunächst säulenchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v). Dabei erhaltene Mischfraktionen wurden mittels Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 4:1 v/v) nochmals gereinigt.

Ausbeute: 895 mg (4.03 mmol, 29% über 2 Stufen) eines gelb- bis orangefarbenen Feststoffs. Als das hauptsächliche Nebenprodukt dieser Reaktion konnte das 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkoholmethylenacetal **143** (gelb- bis orangefarbener, klebriger Feststoff) identifiziert werden (größtenteils in Mischfraktionen mit weiteren Verbindungen isoliert).

Die analytischen Daten des Produkts **114** entsprachen den oben (S. 216) angegebenen.

*Analytische Daten von 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkoholmethylenacetal **138**:*

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.80 (d, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-5),

7.49–7.45 (m, 1H, H-3), 5.33 (s, 2H, OCH₂O), 4.95 (s, 2H, H-7),

2.54 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.40 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C

NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 197.25 (C-8), 155.99 (C-1), 138.39

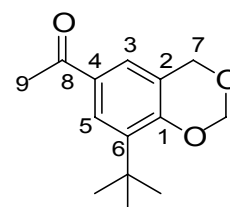
(C-6), 130.14 (C-2), 125.87 (C-3), 124.29 (C-5), 121.12 (C-4),

91.05 (OCH₂O), 66.52 (C-7), 34.98 (Aryl-*t*Bu-C), 29.45 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 26.41 (Acetyl-

CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 235.1 [M+H⁺], gef.: 235.3. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3001,

2955, 2913, 2869, 1672, 1591, 1359, 1235, 1187, 1084, 989. UV (Methanol):

λ_{max} [nm]: 220, 268. R_F-Wert = 0.90 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).



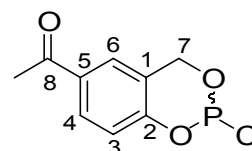
9.2.12. Synthese der 5-Acetylsaligenylchlorphosphite

Synthese von 5-Acetylsaligenylchlorphosphit **115**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante IV der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 500 mg (3.01 mmol) 4-Acetylsalicylalkohol **112** in 40 mL abs. Diethylether/THF (3:1 v/v), 0.25 mL (2.9 mmol (1.0 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) Phosphor(III)-chlorid und 0.44 mL (5.4 mmol (1.8 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 wurde anschließend 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 616 mg (2.67 mmol, 89%) eines reinen, farblosen Öls als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.89–7.85 (m, 1H, H-4), 7.66–7.64 (m, 1H, H-6), 7.05 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 1H, H-3), 5.49 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.4 Hz, $^3J_{\text{P,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-7a), 5.09 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.4 Hz, $^3J_{\text{P,H}}$ = 9.7 Hz, 1H, H-7b), 2.57 (s, 3H, Acetyl- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 140.9 ppm.

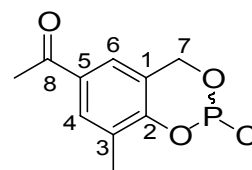


Synthese von 5-Acetyl-3-methylsaligenylchlorphosphit **116**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante IV der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 500 mg (2.77 mmol) 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **113** in 40 mL abs. Diethylether/THF (3:1 v/v), 0.23 mL (2.6 mmol (1.0 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) Phosphor(III)-chlorid und 0.40 mL (4.9 mmol (1.8 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 2.5 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 wurde anschließend 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 610 mg (2.50 mmol, 90%) eines reinen, farblosen Öls als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.74 (s, 1H, H-4/H-6), 7.48 (s, 1H, H-4/H-6), 5.47 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.1 Hz, $^3J_{\text{P,H}}$ = 2.8 Hz, 1H, H-7a), 5.09 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.1 Hz, $^3J_{\text{P,H}}$ = 9.6 Hz, 1H, H-7b), 2.56 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.30 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 141.2 ppm.

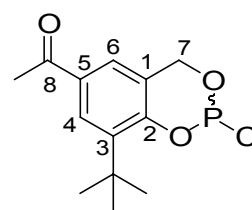


Synthese von 5-Acetyl-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **117**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 500 mg (2.25 mmol) 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114** in 30 mL abs. Diethylether, 0.19 mL (2.2 mmol (1.0 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) Phosphor(III)-chlorid und 0.32 mL (4.0 mmol (1.8 Äquivalente, Abweichung von der AAV 11)) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 wurde anschließend 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 629 mg (2.19 mmol, 97%) eines reinen, gelben Öls als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.91 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.49–7.47 (m, 1H, H-6), 5.45 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.1 Hz, $^3J_{\text{P,H}}$ = 2.8 Hz, 1H, H-7a), 5.07 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.1 Hz, $^3J_{\text{P,H}}$ = 9.3 Hz, 1H, H-7b), 2.57 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.42 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 139.6 ppm.



9.2.13. Synthese der 5-Acetyl-cycloSal-d4T-monophosphate

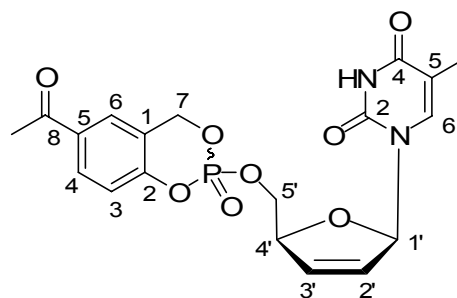
Synthese von 5-Acetyl-cycloSal-d4T-monophosphat **109**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 305 mg (1.26 mmol) 5-Acetylsaligenylchlorphosphit **115** in 4 mL abs. Acetonitril, 195 mg (0.870 mmol) d4T **2** gelöst in 9 mL abs. Acetonitril, 0.22 mL (1.3 mmol) DIPEA und 0.48 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (2.7 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 83 mg (0.19 mmol, 22%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.4:1.0

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11.36–11.33 (m, 2 x 1H, 2 x NH), 7.97–7.91 (m, 4 x 1H, 2 x H-4, 2 x H-6), 7.26 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, 1H, 1 x H-3), 7.22 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, 1H, 1 x H-3), 7.17 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.16 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.81–6.78 (m, 1H, 1 x H-1'), 6.78–6.75 (m, 1H, 1 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.37 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.04–6.00 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.62–5.53 (m, 2

x 1H, 2 x H-7a), 5.49–5.37 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.98–4.94 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.38–4.24 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.56 (s, 2 x 3H, 2 x Acetyl-CH₃), 1.67 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.62 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 196.25 (2 x C-8), 163.65 (2 x Th-C-4), 152.74 (2 x C-2), 150.63 (2 x Th-C-2), 135.61 (2 x Th-C-6), 133.07 (2 x C-5), 132.73 (1 x C-3'), 132.65 (1 x C-3'), 130.20 (1 x C-4), 130.13 (1 x C-4), 127.35 (1 x C-2'), 127.31 (1 x C-2'), 126.80 (1 x C-6), 126.70 (1 x C-6), 121.40 (1 x C-1), 121.30 (1 x C-1), 118.45 (1 x C-3), 118.37 (1 x C-3), 109.60 (1 x Th-C-5), 109.58 (1 x Th-C-5), 89.25 (1 x C-1'), 89.21 (1 x C-1'), 84.01 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 2 x C-4'), 68.63 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$ Hz, 1 x C-5'), 68.58 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$ Hz, 1 x C-5'), 68.15 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 1 x C-7), 67.98 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 1 x C-7), 26.58 (2 x Acetyl-CH₃), 11.89 (1 x Th-CH₃), 11.83 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.81, -10.01 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 457.0777 [M+Na⁺], gef.: 457.0788. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 254. R_f-Wert = 0.42 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 11.1 min (Methode I).



Weitere Synthese:

Um andere Oxidationsmittel (Oxone[®] (2 KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄) bzw. ein Pyridin/Iod-Gemisch) im Vergleich zum standardmäßig verwendeten *tert*-Butylhydroperoxid zu testen, wurde zunächst das 5-Acetylsaligenylchlorphosphit **115** synthetisiert und dann gleichmäßig auf drei Reaktionen zu **109** aufgeteilt. Alle Reaktionen wurden dabei zunächst identisch durchgeführt, die Oxidationen sowie die Aufarbeitungen erfolgten dann nach individuellen Protokollen.

Reaktion: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden je 56 mg (0.25 mmol) d4T **2** in 5.5 mL abs. Acetonitril gelöst und diese Lösungen auf -20 °C abgekühlt. Zu diesen Lösungen wurden je 70 μ L (0.40 mmol) DIPEA sowie 115 mg (0.499 mmol) 5-Acetylsaligenylchlorphosphit **115** (in 2 mL abs. Acetonitril) hinzugegeben. Die Reaktionslösungen wurden für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (dünnschichtchromatografische Kontrolle mit Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v)).

Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid: Es wurde auf -20 °C gekühlt und 0.14 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (0.77 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) wurden zugegeben. Danach wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst über eine Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) vorgereinigt. Nach der Reinigung mittels Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) und einer anschließenden Gefriertrocknung (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v) wurde das reine Produkt isoliert.

Ausbeute: 20 mg (46 µmol, 19%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.4:1.0

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 219) angegebenen.

Oxidation mit Oxone[®]: Es wurde auf -20 °C gekühlt und 614 mg (1.00 mmol) Oxone[®] in 5 mL kaltem, destilliertem Wasser wurden zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und für zehn Minuten gerührt. Die Reaktion wurde dann sofort zweimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abkondensiert. Das Rohprodukt wurde zunächst über eine Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) vorgereinigt. Nach der Reinigung mittels Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) und einer anschließenden Gefriertrocknung (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v) wurde das reine Produkt isoliert.

Ausbeute: 20 mg (46 µmol, 19%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.4:1.0

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 219) angegebenen.

Oxidation mit einer Pyridin/Iod-Lösung: Es wurde auf -20 °C gekühlt und 5 mL einer frisch angesetzten Pyridin/Iod-Lösung (0.1 mL Reinstwasser, 1 mL abs. Pyridin, 4 mL abs. THF, 130 mg Iod) wurden zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und für zehn Minuten gerührt. Anschließend wurden nach Zugabe von Ethylacetat und einer 22%igen Natriumhydrogensulfit-Lösung sofort die Phasen

getrennt. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst über eine Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) vorgereinigt. Nach der Reinigung mittels Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–3%)) und einer anschließenden Gefriertrocknung (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v) wurde das noch leicht verunreinigte Produkt isoliert.

Ausbeute: 12 mg (26 μ mol, 11%) einer leicht verunreinigten gelben Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.4:1.0

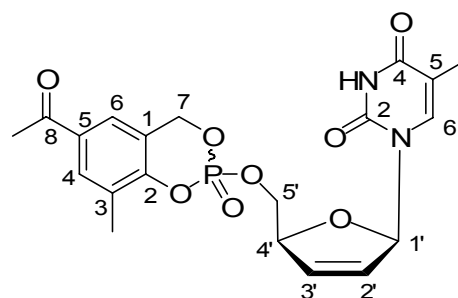
Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 219) angegebenen.

Synthese von 5-Acetyl-3-methyl-cycloSal-d4T-monophosphat **110**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 605 mg (2.47 mmol) 5-Acetyl-3-methylsaligenylchlorphosphit **116** in 5 mL abs. Acetonitril, 283 mg (1.26 mmol) d4T **2** gelöst in 25 mL abs. Acetonitril, 0.34 mL (2.0 mmol) DIPEA und 0.70 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (3.9 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 2 h. Oxidation: 30 min. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 143 mg (0.319 mmol, 26%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.5:1.0

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.33 (s, 1H, 1 x NH), 11.31 (s, 1H, 1 x NH), 7.87 (s, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.75 (s, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.19 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.15 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.81–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.38 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.05–6.00 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.61–5.49 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.48–5.37 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 5.00–4.92 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.36–4.23 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.54 (s, 2 x 3H, 2 x Acetyl-CH₃), 2.27 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.24 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 1.66–1.60 (m, 2 x 3H, 2 x



Th-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 196.42 (1 x C-8), 196.40 (1 x C-8), 163.65 (1 x Th-C-4), 163.61 (1 x Th-C-4), 151.33 (1 x C-2), 151.32 (1 x C-2), 150.64 (2 x Th-C-2), 135.62 (2 x Th-C-6), 132.75 (1 x C-3'), 132.65 (1 x C-3'), 132.53 (2 x C-5), 131.13 (1 x C-4), 131.10 (1 x C-4), 127.31 (2 x C-2'), 127.24 (1 x C-3), 127.22 (1 x C-3), 124.22 (2 x C-6), 121.31 (1 x C-1), 121.22 (1 x C-1), 109.63 (1 x Th-C-5), 109.54 (1 x Th-C-5), 89.25 (1 x C-1'), 89.22 (1 x C-1'), 84.07 (1 x C-4'), 84.00 (1 x C-4'), 68.74 (d, ²J_{C,P} = 5.9 Hz, 1 x C-5'), 68.68 (d, ²J_{C,P} = 5.9 Hz, 1 x C-5'), 68.06 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, 1 x C-7), 67.92 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, 1 x C-7), 26.55 (2 x Acetyl-CH₃), 14.87 (1 x Aryl-CH₃), 14.77 (1 x Aryl-CH₃), 11.81 (1 x Th-CH₃), 11.76 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -8.87, -9.33 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 471.0928 [M+Na⁺], gef.: 471.0931. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 256. R_f-Wert = 0.24 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 11.9, 11.6 min (Methode I).

Synthese von 5-Acetyl-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat **111**

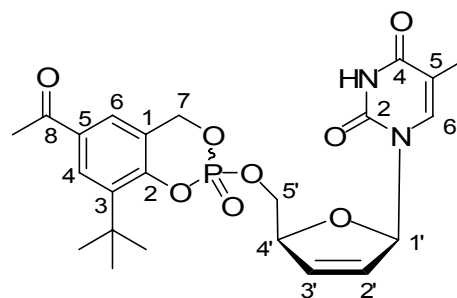
Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 620 mg (2.16 mmol) 5-Acetyl-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **117** in 10 mL abs. Acetonitril, 246 mg (1.10 mmol) d4T **2** gelöst in 25 mL abs. Acetonitril, 0.30 mL (1.7 mmol) DIPEA und 0.60 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (3.3 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 3 h. Oxidation: 2 h. Reaktionsabbruch: 1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5). Reinigung: Säulenfiltration (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v) und Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 97 mg (0.20 mmol, 18%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.8:1.0

Daten zur Charakterisierung des Diastereomereengemischs **111**:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.35 (s, 1H, 1 x NH), 11.32 (s, 1H, 1 x NH), 7.90–7.85 (m, 4 x 1H, 2 x H-4, 2 x H-6), 7.22 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.19 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.86–6.78 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.46–6.39 (m, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.07–6.01

(m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.59–5.39 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.01–4.96 (m, 2 x



^1H , 2 x H-4'), 4.38–4.30 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.56 (s, 2 x 3H, 2 x Acetyl-CH₃), 1.60 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.59 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.37 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.34 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 196.56$ (2 x C-8), 163.68 (2 x Th-C-4), 152.16 (2 x C-2), 150.73 (1 x Th-C-2), 150.71 (1 x Th-C-2), 138.59 (2 x C-3), 135.67 (2 x Th-C-6), 132.75 (1 x C-3'), 132.70 (1 x C-3'), 132.41 (2 x C-5), 127.32 (2 x C-2'), 127.00 (1 x C-4), 126.96 (1 x C-4), 125.37 (2 x C-6), 123.07 (2 x C-1), 109.71 (1 x Th-C-5), 109.59 (1 x Th-C-5), 89.26 (1 x C-1'), 89.11 (1 x C-1'), 84.13 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.6$ Hz, 1 x C-4'), 84.08 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.6$ Hz, 1 x C-4'), 69.18 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.1$ Hz, 1 x C-5'), 69.05 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.8$ Hz, 1 x C-5'), 68.03 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.8$ Hz, 1 x C-7), 67.99 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.8$ Hz, 1 x C-7), 34.52 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.45 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 29.29 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.24 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 26.53 (2 x Acetyl-CH₃), 11.75 (2 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.12$, -9.42 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 513.1397 [M+Na⁺], gef.: 513.1397. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 256. R_F-Wert = 0.50 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Aus 45 mg Diastereomerengemisch **111** konnten mittels präparativer RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v) 21 mg **63-fast** und 17 mg **63-slow** isoliert werden.

*Daten zur Charakterisierung von **111-fast**:*

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.35$ (s, 1H, NH), 7.88–7.85 (m, 2H, H-4, H-6), 7.22 (s, 1H, Th-H-6), 6.83–6.79 (m, 1H, H-1'), 6.46–6.40 (m, 1H, H-3'), 6.06–6.01 (m, 1H, H-2'), 5.58–5.42 (m, 2H, H-7a, H-7b), 5.01–4.96 (m, 1H, H-4'), 4.38–4.30 (m, 2H, H-5'), 2.56 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.60 (s, 3H, Th-CH₃), 1.34 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 196.58$ (C-8), 163.70 (Th-C-4), 152.09 (C-2), 150.69 (Th-C-2), 138.63 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.0$ Hz, C-3), 135.68 (Th-C-6), 132.76 (C-3'), 132.42 (C-5), 127.33 (C-2'), 127.02 (C-4), 125.39 (C-6), 123.06 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.1$ Hz, C-1), 109.67 (Th-C-5), 89.12 (C-1'), 84.05 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, C-4'), 69.15 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.6$ Hz, C-5'), 67.96 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.6$ Hz, C-7), 34.42 (Aryl-*t*Bu-C), 29.25 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 26.55 (Acetyl-CH₃), 11.76 (Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.42$ ppm. Analytische HPLC: *t*_R = 14.2 min (Methode I); 21.5 min (Methode III). Präparative HPLC: *t*_R = 39.3 min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v).

*Daten zur Charakterisierung von **111-slow**:*

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.32$ (s, 1H, NH), 7.90–7.85 (m, 2H, H-4, H-6), 7.19 (s, 1H, Th-H-6), 6.83–6.78 (m, 1H, H-1'), 6.43–6.39 (m, 1H, H-3'), 6.07–6.02 (m,

1H, H-2'), 5.59–5.39 (m, 2H, H-7a, H-7b), 5.01–4.96 (m, 1H, H-4'), 4.39–4.31 (m, 2H, H-5'), 2.56 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.59 (s, 3H, Th-CH₃), 1.37 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 196.57 (C-8), 163.65 (Th-C-4), 152.11 (C-2), 150.66 (Th-C-2), 138.64 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, C-3), 135.65 (Th-C-6), 132.70 (C-3'), 132.42 (C-5), 127.35 (C-2'), 126.96 (C-4), 125.37 (C-6), 123.01 (d, ³J_{C,P} = 8.8 Hz, C-1), 109.55 (Th-C-5), 89.27 (C-1'), 84.08 (d, ³J_{C,P} = 8.1 Hz, C-4'), 69.04 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-5'), 67.98 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-7), 34.47 (Aryl-*t*Bu-C), 29.29 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 26.54 (Acetyl-CH₃), 11.76 (Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.12 ppm. Analytische HPLC: *t*_R = 14.4 min (Methode I); 22.7 min (Methode III). Präparative HPLC: *t*_R = 42.2 min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v).

9.2.14. Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole

9.2.14.1. Vorbereitende Versuche

Synthese von 1-Phenylvinylacetat 128 aus Acetophenon 129

Diese Reaktion wurde mehrfach durchgeführt, wobei Temperatur, Reaktionsdauer sowie die Äquivalente der eingesetzten Reagenzien variiert wurden. Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Acetophenon **129** (1.0 Äquivalente; Ansatzgröße: 200-500 mg) wurde in Isopropenylacetat gelöst und mit *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt. Die Reaktionslösung wurde für die angegebene Zeit bei der angegebenen Temperatur gerührt. Anschließend wurden die Phasen mit Diethylether und Wasser getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:1 v/v) gereinigt.

Die Ergebnisse dieser Reaktionen sind bereits in Tab. 8 (S. 71) zusammengefasst. Aus diesen Ergebnissen wurde die AAV 7 abgeleitet.

Versuch der Synthese von 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol 118 aus 4-Acetylsalicylalkohol 112

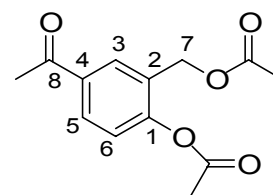
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurde ein Gemisch aus 50 mg (0.30 mmol) 4-Acetylsalicylalkohol **112**, 12 mg (63 μ mol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 1.3 mL Isopropenylacetat für 18 Stunden bei

110 °C gerührt. Die resultierende braune, zähflüssige Reaktionslösung wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur in Diethylether und Wasser aufgenommen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde einrotiert und am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (67–100%)) gereinigt.

Ausbeute: 25 mg eines farblosen Öls, das sich als Gemisch des diacetylierten 4-Acetylsalicylalkohols **139** und des diacetylierten 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohols **140** im Verhältnis 1.0:0.6 erwies.

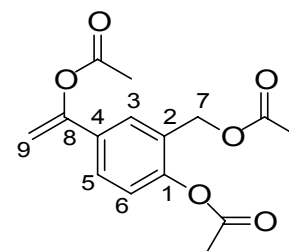
*¹H-NMR-spektroskopische Daten von 1-O,7-O-Diacetyl-4-acetylsalicylalkohol **139**:*

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.05 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-3), 7.96 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.4 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.22 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 1H, H-6), 5.12 (s, 2H, H-7), 2.60 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.35 (s, 3H, O_{ph}C(O)CH₃), 2.09 (s, 3H, O_{bn}C(O)CH₃) ppm.



*¹H-NMR-spektroskopische Daten von 1-O,7-O-Diacetyl-4-(1-acetoxyvinyl)-salicylalkohol **140**:*

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.53 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-3), 7.45 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.4 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.09 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 1H, H-6), 5.46 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 1H, H-9a), 5.06 (s, 2H, H-7), 5.05 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 1H, H-9b), 2.32 (s, 3H, O_{ph}C(O)CH₃), 2.27 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2.07 (s, 3H, O_{bn}C(O)CH₃) ppm.



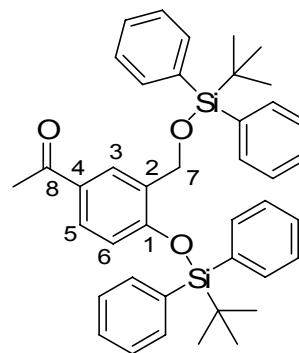
9.2.14.2. Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole unter Verwendung acyclischer Silylether als Vorstufen

Synthese von Bis-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetylsalicylalkohol **141**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 500 mg (3.01 mmol) 4-Acetylsalicylalkohol **112**, 14 mL abs. Pyridin, 1.44 g (21.1 mmol) Imidazol und 3.12 mL (12.0 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid eingesetzt. Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: 1.74 g (2.71 mmol, 90%) eines viskosen, farblosen Öls

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.25–8.23 (m, 1H, H-3), 7.76–7.73 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.62–7.59 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.50 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-5), 7.48–7.37 (m, 8H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-4, TBDPS-H-5), 7.37–7.31 (m, 4H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-5), 6.38 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, 1H, H-6), 5.01 (s, 2H, H-7), 2.51 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.19 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3), 0.93 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C



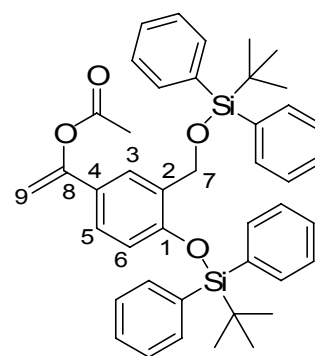
NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 197.31 (C-8), 156.40 (C-1), 135.74 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 135.37 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 133.55 (TBDPS-C-1), 131.95 (TBDPS-C-1), 131.48 (C-2), 130.69 (C-4), 130.30 (TBDPS-C-4), 129.91 (TBDPS-C-4), 128.27 (C-3), 128.15 (C-5), 128.07 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 127.91 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 118.27 (C-6), 61.70 (C-7), 27.08 (TBDPS-*t*Bu- CH_3), 26.51 (Acetyl- CH_3), 26.45 (TBDPS-*t*Bu- CH_3), 19.55 (TBDPS-*t*Bu-C) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 643.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$, gef.: 643.4. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3071, 3049, 2958, 2931, 2857, 1681, 1601, 1428, 1271, 1114, 928, 822, 701, 503. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 272, 222. R_f -Wert = 0.56 (Dichlormethan).

Synthese von Bis-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-salicylalkohol 156

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 3.02 g (4.67 mmol) Bis-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetylsalicylalkohol **141**, 40 mL Isopropenylacetat und 280 mg (1.47 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Die Reinigung erfolgte durch eine Säulenchromatografie (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Ausbeute: 2.03 g (2.97 mmol, 64%) eines farblosen Öls

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.79–7.77 (m, 1H, H-3), 7.74–7.71 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.60–7.58 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.45–7.36 (m, 8H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-4, TBDPS-H-5), 7.33–7.30 (m, 4H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-5), 6.96 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-5), 6.31 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, 1H, H-6), 5.32 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-9a), 4.97 (s, 2H, H-7), 4.86 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-9b), 2.19 (s, 3H, OC(O) CH_3), 1.16 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3),



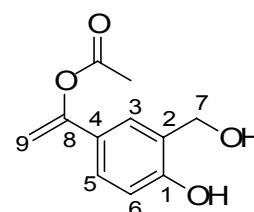
0.89 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 169.28 (OC(O)CH₃), 153.09 (C-8), 152.72 (C-1), 135.73 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 135.44 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 133.65 (TBDPS-C-1), 132.46 (TBDPS-C-1), 131.54 (C-2), 130.13 (TBDPS-C-4), 129.86 (TBDPS-C-4), 127.99 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 127.91 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 126.89 (C-4), 123.99 (C-3), 123.51 (C-5), 118.17 (C-6), 100.12 (C-9), 61.85 (C-7), 27.11 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 26.52 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 21.06 (OC(O)CH₃), 19.59 (TBDPS-*t*Bu-C), 19.54 (TBDPS-*t*Bu-C) ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 707.2983 [M+Na⁺], gef.: 707.2991. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2931, 2857, 1765, 1497, 1428, 1272, 1206, 1114, 701. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 257, 215. R_f-Wert = 0.25 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Synthese von 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol **118** durch Entschützung von **156** mit TBAF

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 130 mg (0.190 mmol) Bis-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetylsalicylalkohol **156**, 3 mL Tetrahydrofuran (über KOH gelagert) und 0.57 mL einer 1 M TBAF-Lösung (0.57 mmol) verwendet. In der dünnschichtchromatografischen Verfolgung (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) wurde dabei eine anteilige Zersetzung des entstehenden Produkts **118** detektiert. Die Reaktionszeit betrug eine Stunde, die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan).

Ausbeute: 11 mg (53 μ mol, 28%) eines leicht gelben Öls

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.69 (s, 1H, Phenol-OH), 7.43 (d, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, H-3), 7.19 (dd, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, H-5), 6.75 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1H, H-6), 5.38 (d, ²J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-9a), 5.02 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.79 (d, ²J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-9b), 4.46 (s, 2H, H-7), 2.23 (s, 3H,



OC(O)CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.74 (OC(O)CH₃), 154.96 (C-8), 152.74 (C-1), 128.68 (C-2), 124.43 (C-4), 123.96 (C-3), 123.77 (C-5), 114.49 (C-6), 99.13 (C-9), 57.95 (C-7), 20.66 (OC(O)CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 208.2 [M], gef.: 208.1. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3456, 3260, 3133, 1734, 1646, 1437, 1371, 1280, 1232, 987, 829. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 260, 205. R_f-Wert = 0.17 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 440 mg (0.642 mmol) Bis-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetylsalicylalkohol **156**, 14 mL Tetrahydrofuran (über KOH gelagert) und 1.95 mL einer 1 M TBAF-Lösung (1.95 mmol) verwendet. Die Reaktionszeit betrug zehn Minuten, die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan).

Ausbeute: 93 mg (0.44 mmol, 69%) eines leicht gelben Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 228) angegebenen.

Synthese von 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol 118 durch Entschützung von 156 mit Triethylamin-Trihydrofluorid

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 1.67 g (2.44 mmol) Bis-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetylsalicylalkohol **156**, 80 mL Tetrahydrofuran (über KOH gelagert) und 1.2 mL (7.5 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet. Reaktionszeit: 30 Minuten. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–3%)).

Ausbeute: 420 mg (2.02 mmol, 83%) eines leicht gelben Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 228) angegebenen.

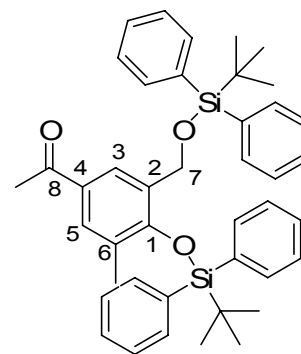
Synthese von Bis-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetyl-6-methylsalicylalkohol 142

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 3.94 g (21.9 mmol) 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **113**, 100 mL abs. Pyridin, 10.5 g (0.154 mol) Imidazol und 22.8 mL (87.7 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid eingesetzt. Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Säulenchromatografie (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 2:1 v/v).

Ausbeute: 4.72 g (7.19 mmol, 33%) eines farblosen Feststoffs

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.11 (d, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-3), 7.60 (d, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-5), 7.58–7.53 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.53–7.47 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.45–7.37 (m, 2H, TBDPS-H-4), 7.36–7.29 (m, 6H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-4, TBDPS-H-5), 7.25–7.18 (m, 4H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-

5), 4.71 (s, 2H, H-7), 2.54 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.90 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.08 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu-CH₃), 0.90 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 197.73 (C-8), 155.01 (C-1), 135.66 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 134.92 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 133.58 (TBDPS-C-1), 133.45 (TBDPS-C-1), 131.68 (C-2), 130.88 (C-4), 130.18 (C-5), 130.04 (TBDPS-C-4), 129.77 (TBDPS-C-4), 128.06 (C-6), 127.85 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 127.83 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 126.33 (C-3), 62.54 (C-7), 27.02 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 26.82 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 26.52 (Acetyl-CH₃), 20.18 (TBDPS-*t*Bu-C), 19.42 (TBDPS-*t*Bu-C), 19.22 (Aryl-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 657.3 [M+H⁺], gef.: 657.5. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2928, 1678, 1471, 1427, 1319, 1188, 1112, 878, 740, 703, 505. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 268, 216. Smp.: 110–112 °C. R_F-Wert = 0.58 (Dichlormethan).

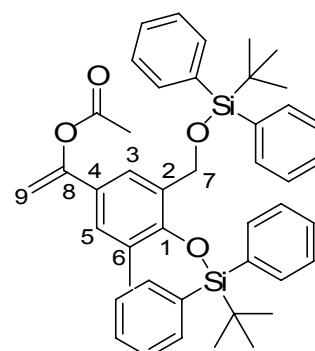


Synthese von Bis-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **157**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 2.91 g (4.54 mmol) Bis-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetyl-6-methylsalicylalkohol **142**, 38 mL Isopropenylacetat und 266 mg (1.40 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Die Reinigung erfolgte durch eine Säulenchromatografie (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (25–50%)).

Ausbeute: 2.19 g (3.14 mmol, 69%) eines farblosen Öls

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.67 (d, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, H-3), 7.58–7.53 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.53–7.48 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.43–7.38 (m, 2H, TBDPS-H-4), 7.36–7.28 (m, 6H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-4, TBDPS-H-5), 7.24–7.17 (m, 4H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-5), 7.06 (d, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, H-5), 5.38 (d, ²J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, H-9a), 4.89 (d, ²J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, H-9b), 4.69 (s, 2H, H-7), 2.20 (s, 3H, OC(O)CH₃), 1.83 (Aryl-CH₃), 1.06 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu-CH₃), 0.85 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 169.41 (OC(O)CH₃), 153.21 (C-8), 151.26 (C-1), 135.61 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 134.92 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 133.94 (TBDPS-C-1), 133.44 (TBDPS-C-1),



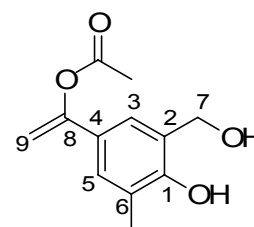
131.76 (C-2), 129.87 (TBDPS-C-4), 129.70 (TBDPS-C-4), 127.82 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 127.76 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 127.49 (C-6), 127.09 (C-4), 126.62 (C-3), 121.16 (C-5), 100.19 (C-9), 62.65 (C-7), 27.00 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 26.76 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 21.12 (OC(O)CH₃), 20.11 (TBDPS-*t*Bu-C), 19.44 (TBDPS-*t*Bu-C), 19.39 (Aryl-CH₃) ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 721.3145 [M+Na⁺], gef.: 721.3129. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2931, 2858, 1761, 1471, 1428, 1218, 908, 700, 608. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 260, 214. R_f-Wert = 0.60 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Synthese von 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **119** durch Entschützung von **157**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 990 mg (1.42 mmol) Bis-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **157**, 50 mL THF und 0.72 mL (4.4 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid eingesetzt. Reaktionszeit: 30 Minuten. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–10%)).

Ausbeute: 259 mg (1.17 mmol, 82%) eines rötlichen Öls

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.78 (s, 1H, Phenol-OH), 7.17 (d, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, H-5), 6.94 (d, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-3), 5.28 (d, ²J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-9a), 4.86 (d, ²J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, H-9b), 4.78 (s, 2H, H-7), 2.76 (s, 1H, Benzyl-OH), 2.25 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2.23 (s, 3H, Aryl-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz,



CDCl₃): δ = 169.64 (OC(O)CH₃), 155.51 (C-1), 153.02 (C-8), 127.42 (C-5), 125.86 (C-6), 125.82 (C-4), 124.01 (C-2), 122.23 (C-3), 100.25 (C-9), 64.93 (C-7), 21.14 (OC(O)CH₃), 15.87 (Aryl-CH₃) ppm. MS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 245.08 [M+Na⁺], gef.: 245.01. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3373, 2923, 1743, 1599, 1488, 1370, 1315, 1186, 1023, 875. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 262, 220. R_f-Wert = 0.38 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).

Versuch der Synthese von Bis-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **143a**

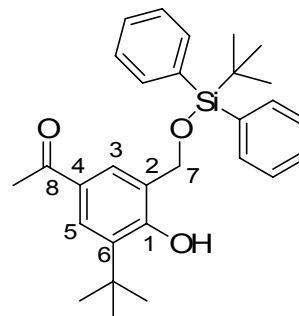
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 883 mg (3.97 mmol) 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114**, 20 mL abs. Pyridin, 1.91 g (28.1 mmol)

Imidazol und 4.10 mL (15.8 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid eingesetzt. Die Reinigung erfolgte durch eine Säulenchromatografie (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden. Als Hauptprodukt dieser Reaktion konnte allerdings das einfach TBDPS-geschützte Produkt **144a** (vorliegend als farbloses Öl) identifiziert werden. Da es zum Großteil in Mischfraktionen mit dem hydrolysierten Schutzgruppenreagenz vorlag, wird hier auf die Angabe einer Ausbeute verzichtet.

Analytische Daten von 7-O-(tert-Butyldiphenylsilyl)-4-acetyl-6-tert-butylsalicylalkohol
144a:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.00 (s, 1H, Phenol-OH), 7.87 (d, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, 1H, H-3), 7.69–7.61 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.50–7.43 (m, 2H, TBDPS-H-4), 7.43–7.35 (m, 4H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-5), 7.16 (d, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, 1H, H-5), 4.91 (s, 2H, H-7), 2.44 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.48 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.07 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ =



197.15 (C-8), 160.68 (C-1), 137.49 (C-6), 135.71 (TBDPS-C-2, TBDPS-C-6), 131.86 (TBDPS-C-1), 130.45 (TBDPS-C-4), 128.84 (C-4), 128.15 (TBDPS-C-3, TBDPS-C-5), 127.53 (C-3), 126.45 (C-5), 124.20 (C-2), 67.16 (C-7), 35.08 (Aryl-*t*Bu-C), 29.55 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 26.82 (TBDPS-*t*Bu-CH₃), 26.33 (Acetyl-CH₃), 19.28 (TBDPS-*t*Bu-C) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 461.7 [M+H⁺], gef.: 461.3. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3312, 2957, 2859, 1675, 1591, 1472, 1428, 1361, 1222, 1114, 1046, 701. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 260, 214. R_F-Wert = 0.59 (Dichlormethan).

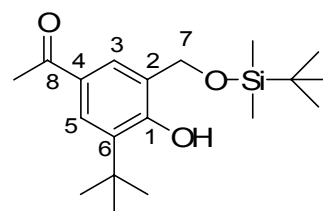
Versuch der Synthese von Bis-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-4-acetyl-6-tert-butylsalicylalkohol 143b

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.450 mmol) 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114**, 5 mL abs. Pyridin, 283 mg (4.15 mmol) Imidazol und 273 mg (1.81 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Chromatotron (Petrolether_{50/70}).

Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden. Als Hauptprodukt dieser Reaktion konnte allerdings das einfach TBDMS-geschützte Produkt **144b** (vorliegend als farbloses Öl) identifiziert werden. Da es zum Großteil in Mischfraktionen mit dem hydrolysierten Schutzgruppenreagenz vorlag, wird hier auf die Angabe einer Ausbeute verzichtet.

*Analytische Daten von 7-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-4-acetyl-6-tert-butylsalicylalkohol **144b**:*

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.99 (s, 1H, Phenol-OH), 7.86 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.49 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, 1H, H-5), 4.93 (s, 2H, H-7), 2.54 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.43 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3), 0.92 (s, 9H, TBDMS-*t*Bu- CH_3), 0.13 (s, 6H, TBDMS- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101



MHz, CDCl_3): δ = 197.32 (C-8), 160.84 (C-1), 137.31 (C-6), 127.93 (C-4), 127.66 (C-3), 125.88 (C-5), 124.46 (C-2), 66.35 (C-7), 35.00 (Aryl-*t*Bu-C), 29.46 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 26.39 (Acetyl- CH_3), 25.77 (TBDMS-*t*Bu- CH_3), 17.03 (TBDMS-*t*Bu-C), -5.35 (TBDMS- CH_3) ppm. HRMS (ESI $^+$, m/z): ber.: 359.2018 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 359.2025. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3292, 2954, 1675, 1595, 1472, 1420, 1392, 1244, 1053, 890. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 278, 225. R_f -Wert = 0.59 (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 2:1 v/v).

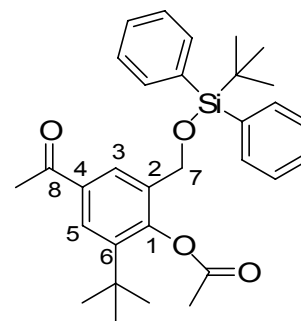
Versuch der Synthese von 7-O-(tert-Butyldiphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-6-tert-butylsalicylalkohol **145**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 170 mg (0.369 mmol) 7-O-(tert-Butyldiphenylsilyl)-4-acetyl-6-tert-butylsalicylalkohol **144a**, 3.2 mL Isopropenylacetat und 22 mg (0.12 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (50–100%)).

Ausbeute: Das Produkt **145** konnte nicht isoliert werden. Stattdessen wurden 20 mg 1-O-Acetyl-7-O-(tert-butyl diphenylsilyl)-4-acetyl-6-tert-butylsalicylalkohol **146** als leicht verunreinigtes, gelbes Öl, 15 mg 1-O-Acetyl-7-O-(tert-butyl diphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-6-tert-butylsalicylalkohol **147** als verunreinigtes, farbloses Öl sowie 30 mg Mischfraktionen dieser beiden Produkte isoliert.

*Analytische Daten von 1-O-Acetyl-7-O-(tert-butyldiphenylsilyl)-4-acetyl-6-tert-butylsalicylalkohol **146**:*

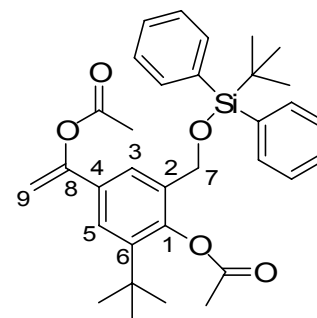
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.16 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-3), 8.00 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-5), 7.69–7.64 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.47–7.35 (m, 6H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-4, TBDPS-H-5), 4.60 (s, 2H, H-7), 2.60 (s, 3H, $\text{O}_{\text{ph}}\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.13 (s, 3H, Aryl- CH_3), 1.35 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3), 1.11 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3) ppm. MS (ESI^+ , m/z):



ber.: 541.2 $[\text{M}+\text{K}^+]$, gef.: 541.3. R_f -Wert = 0.24 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

*Analytische Daten von 1-O-Acetyl-7-O-(tert-butyldiphenylsilyl)-4-(1-acetoxyvinyl)-6-tert-butylsalicylalkohol **147**:*

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.73 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-3), 7.69–7.64 (m, 4H, TBDPS-H-2, TBDPS-H-6), 7.46 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.44–7.35 (m, 6H, TBDPS-H-3, TBDPS-H-4, TBDPS-H-5), 5.48 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9a), 5.03 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-9b), 4.54 (s, 2H, H-7), 2.24 (s, 3H, $\text{O}_{\text{ph}}\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.08 (s, 3H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.32 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3), 1.09 (s, 9H, TBDPS-*t*Bu- CH_3) ppm.



MS (ESI^+ , m/z): ber.: 583.2 $[\text{M}+\text{K}^+]$, gef.: 583.2. R_f -Wert = 0.30 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

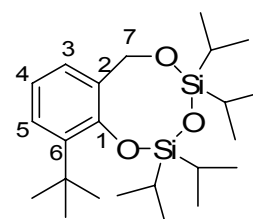
9.2.14.3. Synthese der 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohole unter Verwendung cyclischer Silylether als Vorstufen

Synthese von 1-O,7-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-6-tert-butylsalicylalkohol **150** (Modellreaktion)

Es wurden 100 mg (0.555 mmol, 1.0 Äquivalente) 6-*tert*-Butylsalicylalkohol **148** in 10 mL abs. THF gelöst und anschließend 0.62 mL (4.4 mmol, 4.0 Äquivalente) abs. Triethylamin sowie 0.24 mL (1.1 mmol, 2.0 Äquivalente) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und dabei dünnschichtchromatografisch verfolgt (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v). Nach einem Tag war kein Edukt **148** mehr detektierbar und die Reaktion wurde durch Hydrolyse in Eiswasser abgebrochen. Nach zweimaliger

Extraktion mit Ethylacetat wurden die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach anschließender Reinigung am Chromatotron wurden 81 mg Mischfraktionen, die, wie die NMR-spektroskopische und die massenspektrometrische Untersuchung zeigte, aus dem gewünschten Produkt **150** und einer Verbindung **151** bestanden, in der zwei Moleküle des 6-*tert*-Butylsalicylalkohols **148** jeweils mit der benzyllischen Hydroxyfunktion über die Schutzgruppe miteinander verknüpft waren. Diese konnten nach zahlreichen Trennversuchen letztendlich über eine RP-18 Phase mit Acetonitril als Eluent getrennt werden. Auf Grund der vielen versuchten Trennungen können hier keine genauen Ausbeuten für **150** und **151** angegeben werden. Laut des ^1H -NMR-Spektrums der bei der Chromatotrontrennung erhaltenen Mischfraktionen lagen die beiden Verbindungen im Verhältnis 2.5:1.0 vor, was ungefähr 58 mg (0.14 mmol, 25%) **150** und 23 mg (38 μmol , 14%) **151** entspricht. Des Weiteren wurden bei der Trennung mittels Chromatotron 60 mg (0.14 mmol, 25%) der Verbindung **149** (gelbliches Öl) isoliert, in der nur die benzyllische Hydroxyfunktion mit dem Schutzgruppenreagenz reagiert hat und das zweite Chlorid durch die wässrige Aufarbeitung in eine Hydroxygruppe überführt wurde.

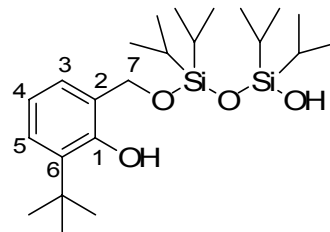
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.30 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, H-5), 7.13 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, H-3), 6.87 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H, H-4), 4.75 (s, 2H, H-7), 1.40 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.29–1.20 (m, 2H, Si-*i*Pr-CH), 1.14 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 12H, Si-*i*Pr-CH₃), 1.11



(d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 12H, Si-*i*Pr-CH₃), 1.05–0.95 (m, 2H, Si-*i*Pr-CH) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 153.07 (C-1), 139.82 (C-6), 130.64 (C-3), 129.16 (C-2), 127.87 (C-5), 120.94 (C-4), 63.32 (C-7), 35.26 (Aryl-*t*Bu-C), 30.46 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 17.93, 17.78, 17.12 (Si-*i*Pr-CH₃), 14.58, 13.16 (Si-*i*Pr-CH) ppm. MS (ESI⁺, m/z): ber.: 461 [M+K⁺], gef.: 461. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2947, 2868, 1465, 1433, 1252, 1064, 1014, 933, 885, 748, 692, 598. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 275, 217. R_f -Wert = 0.74 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v), 0.20 (Acetonitril).

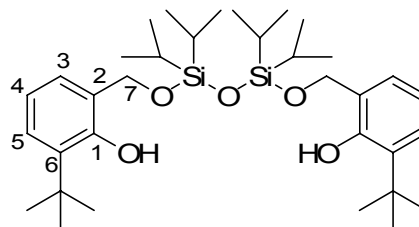
*Analytische Daten von 7-O-(3-Hydroxy-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1-yl)-6-tert-butylsalicylalkohol **149**:*

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.15 (s, 1H, Phenol-OH), 7.22 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-5), 6.83 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.3 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-3), 6.75 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.8 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.3 Hz, 1H, H-4), 5.01 (s, 2H, H-7), 1.98 (s, 1H, Si-OH), 1.41 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.08–1.00 (m, 28H, Si-*i*Pr-CH, Si-*i*Pr-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 155.96 (C-1), 137.44 (C-6), 126.62 (C-5), 125.21 (C-3), 124.74 (C-2), 119.09 (C-4), 65.91 (C-7), 34.88 (Aryl-*t*Bu-C), 29.68 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 17.28, 17.26, 17.24, 17.21 (Si-*i*Pr-CH₃), 13.34, 12.86 (Si-*i*Pr-CH) ppm. MS (ESI⁺, m/z): ber.: 463.27 [M+Na⁺], gef.: 463.29. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3369, 2945, 2868, 1464, 1443, 1234, 1038, 885, 795, 747, 691. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 276, 216. R_f-Wert = 0.46 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).



*Analytische Daten von 1,3-Di-(6-tert-butylsaligen-7-O-yl)-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan **151**:*

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.24–7.19 (m, 2H, H-5), 6.86–6.81 (m, 4H, H-3, H-4), 4.96 (s, 4H, H-7), 1.42 (s, 18H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.21–1.11 (m, 4H, Si-*i*Pr-CH), 1.09 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.6 Hz, 12H, Si-*i*Pr-CH₃), 1.06 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.9 Hz, 12H, Si-*i*Pr-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 152.99 (C-1), 138.93 (C-6), 127.27 (C-2), 126.29 (C-5), 124.46 (C-3), 120.34 (C-4), 65.30 (C-7), 34.98 (Aryl-*t*Bu-C), 29.94 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 16.69, 16.66 (Si-*i*Pr-CH₃), 12.88 (Si-*i*Pr-CH) ppm. MS (ESI⁺, m/z): ber.: 625 [M+Na⁺], gef.: 625. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2949, 2868, 1464, 1439, 1246, 1228, 1055, 907, 803, 762, 746. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 275, 216, 207. R_f-Wert = 0.70 (Petrolether/Dichlormethan 1:2 v/v), 0.37 (Acetonitril).



Weitere Synthesen:

Die Durchführung erfolgte analog zu der ersten Synthese (S. 234), allerdings wurde 6-*tert*-Butylsalicylalkohol **148** in 20 mL abs. THF gelöst, katalytisch DMAP als Aktivator zugesetzt und die Reaktionslösung für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit waren dünnschichtchromatografisch (Petrolether_{50/70}/

Dichlormethan 1:2 v/v) weder das Edukt **148** noch **149** zu detektieren. Zunächst wurde mittels Säulenchromatografie das Gemisch aus Produkt **150** und Verbindung **151** aus dem Rohgemisch isoliert. Durch anschließende Säulenchromatografie über eine RP-18 Phase (Acetonitril) konnten auch diese beiden Verbindungen getrennt werden.

Ausbeute: 117 mg (0.277 mmol, 50%) **150** als farbloses Öl sowie 17 mg (28 µmol, 10%) **151** als farbloses Öl

Die analytischen Daten von **150** (S. 235) und **151** (S. 236) entsprachen den oben angegebenen.

Die Durchführung erfolgte analog der zweiten Synthese, allerdings wurden 0.93 mL (6.6 mmol, 6.0 Äquivalente) abs. Triethylamin und 0.36 mL (1.7 mmol, 3.0 Äquivalente) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan verwendet.

Ausbeute: 116 mg (0.275 mmol, 50%) **150** als farbloses Öl sowie 17 mg (28 µmol, 10%) **151** als farbloses Öl

Die analytischen Daten von **150** (S. 235) und **151** (S. 236) entsprachen den oben angegebenen.

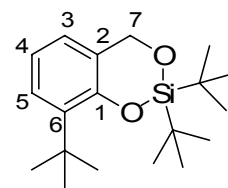
Diese Synthesen sind auch in Tab. 10 (S. 83) zusammengefasst.

Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **152** (Modellreaktion)

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.555 mmol) 6-*tert*-Butylsalicylalkohol **148** in 15 mL abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde mit 0.20 mL (2.5 mmol) abs. Pyridin und 0.24 mL (0.73 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluormethansulfonat) versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt (dünnschichtchromatografische Kontrolle: Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v). Die Reaktionslösung wurde in Eiswasser gegeben und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abkondensiert. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (0–10%)).

Ausbeute: 145 mg (0.452 mmol, 86%) eines farblosen Öls

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.21 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 1H, H-3), 6.85–6.76 (m, 2H, H-4, H-5), 5.02 (s, 2H, H-7), 1.45 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.08 (s, 18H, Si-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 153.17 (C-1), 138.78 (C-6), 126.42 (C-2), 126.16 (C-3), 124.34 (C-5), 120.31 (C-4), 65.77 (C-7), 35.05 (Aryl-*t*Bu-C), 30.23 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 27.12 (Si-*t*Bu-CH₃), 21.60 (Si-*t*Bu-C) ppm. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2936, 2861, 1473, 1440, 1245, 1230, 1070, 905, 828, 791, 655. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 276, 216. R_f -Wert = 0.75 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).



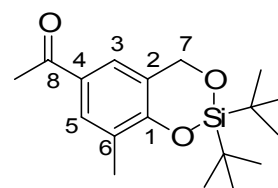
Auf Grundlage dieser Reaktion wurde die AAV 5 formuliert.

Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-4-acetyl-6-methylsalicylalkohol **155**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 400 mg (2.22 mmol) 4-Acetyl-6-methylsalicylalkohol **113** in 60 mL abs. Dichlormethan, 0.79 mL (9.8 mmol) abs. Pyridin und 0.95 mL (2.9 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluormethansulfonat) eingesetzt. Die dünnschichtchromatografische Kontrolle (Petrolether_{50/70}/Ethylacetat 1:1 v/v) zeigte nach zwei Stunden einen kompletten Umsatz des Edukts **113**. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

Ausbeute: 445 mg (1.39 mmol, 63%) eines gelben Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.71 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 1H, H-5), 7.46 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, H-3), 5.02 (s, 2H, H-7), 2.53 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.28 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.05 (s, 18H, Si-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 197.20 (C-8), 157.08 (C-1), 130.64 (C-5), 129.97 (C-4), 127.97 (C-6), 126.23 (C-2), 124.85 (C-3), 65.48 (C-7), 26.95 (Si-*t*Bu-CH₃), 26.41 (Acetyl-CH₃), 21.49 (Si-*t*Bu-C), 15.87 (Aryl-CH₃) ppm. MS (ESI⁺, m/z): ber.: 343.17 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 343.21. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2935, 2861, 1672, 1598, 1481, 1312, 1196, 1065, 1042, 853, 827, 667, 655. Smp.: 112–114 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 275, 222, 210. R_f -Wert = 0.33 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

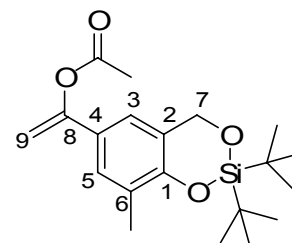


Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **158**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.936 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-acetyl-6-methylsalicylalkohol **155**, 8.1 mL Isopropenylacetat und 56 mg (0.29 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

Ausbeute: 234 mg (0.645 mmol, 69%) eines farblosen Öls

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.17 (d, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, H-5), 6.89 (d, ⁴J_{H,H} = 1.6 Hz, 1H, H-3), 5.32 (d, ²J_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, H-9a), 4.97 (s, 2H, H-7), 4.88 (d, ²J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, H-9b), 2.27 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2.23 (s, 3H, Aryl-CH₃), 1.04 (s, 18H, Si-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 169.39 (OC(O)CH₃), 153.34 (C-1), 153.01 (C-



8), 127.94 (C-6), 126.60 (C-5), 126.37 (C-4), 126.26 (C-2), 120.59 (C-3), 100.43 (C-9), 65.65 (C-7), 27.01 (Si-*t*Bu-CH₃), 21.49 (Si-*t*Bu-C), 21.22 (OC(O)CH₃), 15.97 (Aryl-CH₃) ppm. MS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 416.10 [M+K⁺], gef.: 416.10. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2935, 2861, 1757, 1698, 1604, 1475, 1232, 1185, 828, 656. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 268, 213. R_f-Wert = 0.46 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 1:2 v/v).

Synthese von 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **119** durch Entschützung von **158**

Es wurden 160 mg (0.441 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **158** in 15 mL THF (über KOH gelagert) gelöst und mit 0.22 mL (1.3 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–2%)) gereinigt.

Ausbeute: 52 mg (0.23 mmol, 53%) eines gelben Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 231) angegebenen.

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 202 mg (0.557 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **158**,

20 mL THF und 0.28 mL (1.7 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid eingesetzt. Reaktionszeit: 20 Minuten. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–2%)).

Ausbeute: 105 mg (0.472 mmol, 85%) eines leicht rötlichen Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 231) angegebenen.

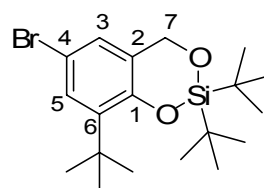
Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-4-brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **154**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 7.75 g (30.0 mmol) 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **49** in 200 mL abs. Dichlormethan, 10.7 mL (0.132 mol) abs. Pyridin und 12.8 mL (39.5 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluormethansulfonat) eingesetzt. Die dünnschichtchromatografische Kontrolle (Dichlormethan) zeigte nach zwei Stunden einen kompletten Umsatz des Edukts **49**. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenfiltration (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 7:1 v/v).

Ausbeute: 10.7 g (26.8 mmol, 90%) eines gelben Öls

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.29 (d, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-5), 6.93 (d, ⁴J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-3), 4.97 (s, 2H, H-7), 1.42 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.07 (s, 18H, Si-*t*Bu-CH₃) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 152.29 (C-1), 141.23 (C-6), 129.21 (C-5), 128.25 (C-2), 126.90 (C-3), 112.80 (C-4), 65.17 (C-7), 35.26 (Aryl-*t*Bu-C), 29.93 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 27.03 (Si-*t*Bu-CH₃), 21.58 (Si-*t*Bu-C) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 398.1 [M], gef.: 398.2. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960, 2861, 1468, 1439, 1242, 1169, 1078, 905, 837, 828, 654. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 284, 231, 212. R_F-Wert = 0.39 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 7:1 v/v), 0.74 (Dichlormethan).



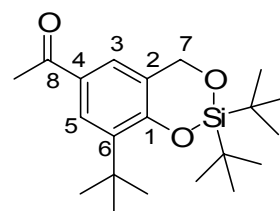
Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **153**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 3.33 g (8.34 mmol, 1.0 Äquivalente) Di-*tert*-butylsilyl-4-brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **154** in 35 mL abs. THF gelöst, diese Lösung auf -78 °C (Innentemperatur) abgekühlt und mit 6.28 mL (10.0 mmol, 1.2 Äquivalente) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung versetzt, sodass die Innentemperatur immer unter -78 °C blieb. Nach zwei Stunden Rühren bei -78 °C wurden 1.15 mL (12.4 mmol, 1.5 Äquivalente) abs. *N,N*-Dimethylacetamid so hinzugegeben, dass die Innentemperatur unter -50 °C blieb. Die resultierende

Lösung wurde noch 45 Minuten bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann in 100 mL einer Lösung aus 1 N Salzsäure und Eiswasser (1:1 v/v) hydrolysiert. Nach dem Auftauen der Lösung auf Raumtemperatur wurde dreimal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan (20–100%)).

Ausbeute: 1.67 g (4.61 mmol, 63%) eines leicht gelben Öls

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.88 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.46–7.44 (m, 1H, H-3), 5.06 (s, 2H, H-7), 2.54 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.45 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3), 1.08 (s, 18H, Si-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 197.29 (C-



8), 157.81 (C-1), 139.10 (C-6), 129.81 (C-4), 127.05 (C-5), 126.25 (C-2), 125.42 (C-3), 65.59 (C-7), 35.21 (Aryl-*t*Bu-C), 30.08 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 27.00 (Si-*t*Bu- CH_3), 26.40 (Acetyl- CH_3), 21.57 (Si-*t*Bu-C) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 385.12 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, gef.: 385.22. IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2956, 2860, 1670, 1475, 1362, 1233, 1158, 1085, 909, 856, 658. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 275, 224, 214. R_F -Wert = 0.46 (Dichlormethan).

Weitere Synthesen:

Die Durchführung erfolgte analog zu der ersten Synthese (S. 240). Es wurden 2.92 g (7.31 mmol, 1.0 Äquivalente) Di-*tert*-butylsilyl-4-brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **154** in 30 mL abs. THF, 9.14 mL (14.6 mmol, 2.0 Äquivalente) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 2.03 mL (21.9 mmol, 3.0 Äquivalente) abs. *N,N*-Dimethylacetamid verwendet.

Ausbeute: 1.67 g (4.61 mmol, 63%) eines leicht gelben Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 240) angegebenen.

Die Durchführung erfolgte analog zu der ersten Synthese (S. 240). Es wurden 3.21 g (8.04 mmol, 1.0 Äquivalente) Di-*tert*-butylsilyl-4-brom-6-*tert*-butylsalicylalkohol **154** in 35 mL abs. THF, 10.0 mL (16.0 mmol, 2.0 Äquivalente) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 7.44 mL (80.0 mmol, 10.0 Äquivalente) abs. *N,N*-Dimethylacetamid verwendet.

Ausbeute: 1.62 g (4.47 mmol, 56%) eines leicht gelben Öls

Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 240) angegebenen.

Diese Synthesen sind auch in Tab. 11 (S. 85) zusammengefasst.

Synthese von 4-Acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **114 durch Entschützung **153****

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 993 mg (2.74 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **153**, 55 mL Tetrahydrofuran (über KOH gelagert) und 6.8 mL einer 1 M TBAF-Lösung (6.8 mmol) verwendet. Die Reaktionszeit betrug eine Stunde. Der Rückstand der einrotierten Reaktionslösung wurde in Petrolether_{50/70} aufgenommen. Dadurch fiel ein Teil des Produkts als beiger Feststoff aus. Dieser wurde durch Filtration isoliert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand erneut in Petrolether_{50/70} aufgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. So wurden 500 mg **114** isoliert. Der noch im Filtrat verbliebene Anteil von **114** wurde am Chromatotron (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 6:1 v/v) gereinigt, wodurch weitere 76 mg **114** isoliert wurden.

Ausbeute: 576 mg (2.59 mmol, 95%) eines beigen Feststoffs

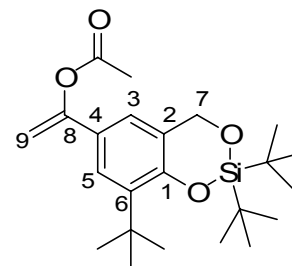
Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 216) angegebenen.

Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **159**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 1.60 g (4.41 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-acetyl-6-*tert*-butylsalicylalkohol **153**, 38 mL Isopropenylacetat und 265 mg (1.39 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug – in Abweichung zu der AAV 7 – 90 Stunden. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: 1.05 g (2.60 mmol, 59%) eines gelben Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.32 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 1H, H-5), 6.88 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-3), 5.34 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 1H, H-9a), 5.00 (s, 2H, H-7), 4.89 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 1H, H-9b), 2.27 (s, 3H, OC(O)CH_3), 1.43 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3), 1.07 (s, 18H, Si-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 169.39 (OC(O)CH_3), 154.06 (C-1), 153.21 (C-8), 138.91 (C-6), 126.24 (C-2), 126.04 (C-4), 123.03 (C-5), 121.04 (C-3), 100.33 (C-9), 65.76 (C-7), 35.12 (Aryl-*t*Bu-C), 30.04 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 27.06 (Si-*t*Bu- CH_3), 21.58 (Si-*t*Bu-C), 21.16 (OC(O)CH_3) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 443.2 [$\text{M}+\text{K}^+$], gef.: 443.2. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2965, 2862, 1764, 1646, 1474, 1369, 1240, 1206, 1165, 870, 828, 655. Smp.: 82–84 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 263, 214. R_f -Wert = 0.62 (Dichlormethan).

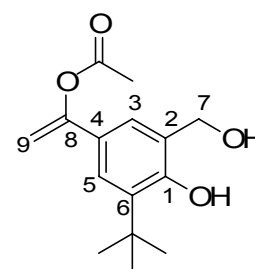


Synthese von 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol 120

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 790 mg (1.95 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **159**, 35 mL THF und 0.90 mL (5.5 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid eingesetzt. Reaktionszeit: 20 Minuten. In Abweichung zur AAV 10 wurde Ethylacetat zur Extraktion verwendet. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan).

Ausbeute: 507 mg (1.92 mmol, 98%) eines orangefarbenen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.97 (s, 1H, Phenol-OH), 7.23–7.14 (m, 2H, H-3, H-5), 5.87 (s, 1H, Benzyl-OH), 5.41 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 1.9 Hz, 1H, H-9a), 4.81 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 1.9 Hz, 1H, H-9b), 4.64 (s, 2H, H-7), 2.24 (s, 3H, OC(O)CH_3), 1.37 (s, 9H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 168.82 (OC(O)CH_3), 154.93 (C-1), 152.821 (C-8), 136.35 (C-6), 127.73 (C-2), 124.36 (C-4), 121.95 (C-3), 121.55 (C-5), 99.56 (C-9), 61.16 (C-7), 34.40 (Aryl-*t*Bu-C), 29.40 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 20.66 (OC(O)CH_3) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 287.1 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 287.0. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3463, 2963, 2945, 1742, 1644, 1269, 1253, 1232, 1202, 1028, 874. Smp.: 103–105 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 265, 216. R_f -Wert = 0.51 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v).



Zuvor durchgeführte Testansätze:

Es wurden 30 mg (74 μ mol) Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **159** in 1.5 mL THF (über KOH gelagert) gelöst und mit 30 μ L (0.18 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)). Aus einer Vielzahl an Produkten konnte **120** nicht isoliert werden.

Es wurden 35 mg (87 μ mol) Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **159** in 1.5 mL THF (über KOH gelagert) gelöst und mit 40 μ L (0.25 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur zeigte die dünnschichtchromatografische Kontrolle (Dichlormethan und Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) eine vollständige Entschützung zu einem Produkt. Zur Überprüfung einer möglichen Zersetzung bei der Reaktion wurde dennoch weiter gerührt. Auch nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur zeigte die dünnschichtchromatografische Kontrolle nur das eine Produkt. Die Phasen wurden mit Wasser und Diethylether getrennt und die wässrige Phase anschließend noch einmal mit Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende dünnschichtchromatografische Kontrolle zeigte hier die vollständige Zersetzung des entstandenen Produkts in zwei neue Produkte.

Es wurden 30 mg (74 μ mol) Di-*tert*-butylsilyl-4-(1-acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **159** in 1.5 mL THF (über KOH gelagert) gelöst und mit 30 μ L (0.18 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurden die Phasen mit Wasser und Diethylether getrennt und die wässrige Phase noch einmal mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende dünnschichtchromatografische Kontrolle zeigte das intakte Produkt (durch ^1H -NMR-Spektrum des Rohprodukts bestätigt).

Auf Grundlage dieser Testsynthesen wurde die AAV 10 (Variante II) formuliert.

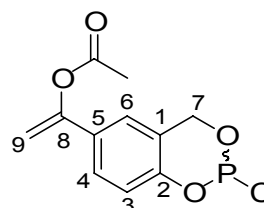
9.2.15. Synthese der 5-(1-Acetoxyvinyl)-saligenylchlorphosphite

Synthese von 5-(1-Acetoxyvinyl)-saligenylchlorphosphit **121**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 393 mg (1.89 mmol) 4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol **118** in 20 mL abs. Diethylether, 0.20 mL (2.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.35 mL (4.4 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 wurde anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 340 mg (1.25 mmol, 66%) eines reinen, gelben Öls als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.36 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.08 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-6), 6.96 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 1H, H-3), 5.50–5.41 (m, 1H, H-7a), 5.40 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9a), 5.11–4.97 (m, 1H, H-7b), 5.01 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9b), 2.28 (s, 3H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 140.7 ppm.

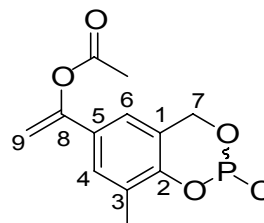


Synthese von 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-methylsaligenylchlorphosphit **122**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 415 mg (1.87 mmol) 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-methylsalicylalkohol **119** in 20 mL abs. Diethylether, 0.20 mL (2.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.35 mL (4.4 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 435 mg eines orangefarbenen Öls mit einer Reinheit von 85% (entspricht 370 mg reinem **122** (1.29 mmol, 69%)) als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.25–7.23 (m, 1H, H-6), 6.92–6.88 (m, 1H, H-4), 5.49–5.39 (m, 1H, H-7a), 5.37 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9a), 5.08–4.98 (m, 1H, H-7b), 4.98 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9b), 2.28 (s, 3H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.24 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 141.1 ppm.

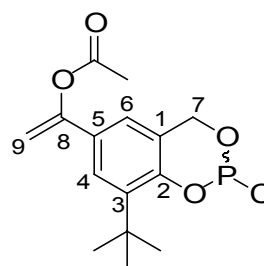


Synthese von 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **123**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 500 mg (1.89 mmol) 4-(1-Acetoxyvinyl)-6-*tert*-butylsalicylalkohol **120** in 20 mL abs. Diethylether, 0.20 mL (2.3 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.35 mL (4.4 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 543 mg eines orangefarbenen Öls mit einer Reinheit von 78% (entspricht 424 mg reinem **123** (1.29 mmol, 68%)) als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.40–7.37 (m, 1H, H-4), 6.92–6.90 (m, 1H, H-6), 5.43–5.37 (m, 1H, H-7a), 5.40 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9a), 5.06–4.98 (m, 1H, H-7b), 5.00 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9b), 2.28 (s, 3H, OC(O)CH₃), 1.39 (s, 3H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 139.3 ppm.



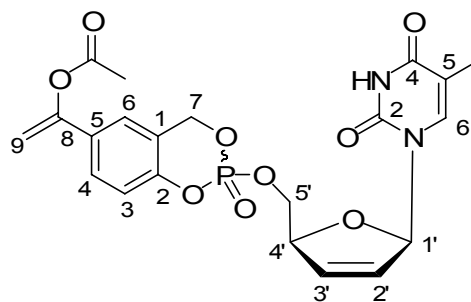
9.2.16. Synthese der 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Sal-d4T-monophosphate

Synthese von 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Sal-d4T-monophosphat **106**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 335 mg (1.23 mmol) 5-(1-Acetoxyvinyl)-saligenylchlorphosphit **121** in 5 mL abs. Acetonitril, 149 mg (0.665 mmol) d4T **2** gelöst in 15 mL abs. Acetonitril, 0.17 mL (0.98 mmol) DIPEA und 0.35 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (2.0 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 1.5 h. Oxidation: 30 min. Reaktionsabbruch: Phosphatpuffer (pH = 7.3). Reinigung: Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 61 mg (0.13 mmol, 19%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.6:1.0

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11.34 (s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.56–7.51 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.50–7.46 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.20 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.1 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.18 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.1 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.17–7.11 (m, 2 x 1H, 2 x H-3), 6.84–6.76 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.42 (ddd,



$^3J_{\text{H,H}}$ = 6.2 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.36 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.2 Hz,

$^3J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 1 x H-3'), 6.05–5.95 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.65–5.64 (m, 2 x 1H, 2 x H-9a), 5.58–5.35 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.03 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 2.3 \text{ Hz}$, 2 x 1H, 2 x H-9b), 4.99–4.93 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.38–4.25 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.26 (s, 2 x 3H, 2 x OC(O)CH₃), 1.68 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0 \text{ Hz}$, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.63 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0 \text{ Hz}$, 3H, 1 x Th-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 168.76$ (2 x OC(O)CH₃), 163.65 (2 x Th-C-4), 150.90 (2 x C-8), 150.66 (1 x Th-C-2), 150.64 (1 x Th-C-2), 149.77 (2 x C-2), 135.63 (2 x Th-C-6), 132.76 (1 x C-3'), 132.73 (1 x C-3'), 130.23 (2 x C-5), 127.32 (1 x C-2'), 127.29 (1 x C-2'), 126.19 (1 x C-4), 126.15 (1 x C-4), 124.96 (2 x C-1), 122.59 (2 x C-6), 118.42 (1 x C-3), 118.33 (1 x C-3), 109.63 (2 x Th-C-5), 102.97 (2 x C-9), 89.14 (2 x C-1'), 84.05 (1 x C-4'), 84.01 (1 x C-4'), 68.47 (2 x C-5'), 68.21 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.6 \text{ Hz}$, 1 x C-7), 68.09 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.6 \text{ Hz}$, 1 x C-7), 20.65 (2 x OC(O)CH₃), 11.86 (1 x Th-CH₃), 11.79 (1 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.46$, -9.49 ppm . HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 499.0882 [M+Na⁺], gef.: 499.0879. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 252. R_f-Wert = 0.17 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Analytische HPLC: *t*_R = 13.1 min (Methode I).

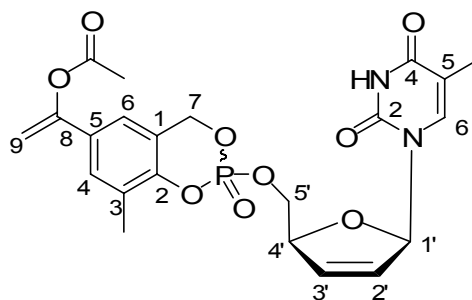
Synthese von 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-methyl-cycloSal-d4T-monophosphat 107

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 205 mg 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-methylsaligenylchlorphosphit **122** (Reinheit 85%, entspricht 174 mg reinem **122** (0.607 mmol)) in 5 mL abs. Acetonitril, 68 mg (0.30 mmol) d4T **2** gelöst in 6 mL abs. Acetonitril, 80 μL (0.45 mmol) DIPEA und 0.16 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (0.88 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 1.5 h. Oxidation: 30 min. Reaktionsabbruch: Wasser. Reinigung: Säulenfiltration (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v, Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).

Ausbeute: 28 mg (57 μmol , 19%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1.0:1.0

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.32$ (s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.47–7.43 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.30–7.27 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.21 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0 \text{ Hz}$, 1H, 1 x Th-H-6), 7.20 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, 1 x Th-H-6), 6.83–6.79 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.41 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, 1 x H-3'), 6.36 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, 1 x H-3'), 6.06–5.99 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.62 (d, $^2J_{\text{H,H}} =$

2.3 Hz, 2 x 1H, 2 x H-9a), 5.54–5.33 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.01 (d, $^2J_{H,H} = 2.3$ Hz, 2 x 1H, 2 x H-9b), 4.98–4.92 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.34–4.22 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.26 (s, 2 x 3H, 2 x OC(O)CH₃), 2.23 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 2.20 (s, 3H, 1 x Aryl-CH₃), 1.66



(d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.64 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.78 (2 x OC(O)CH₃), 163.65 (2 x Th-C-4), 151.07 (2 x C-8), 150.65 (2 x Th-C-2), 148.32 (d, $^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, 1 x C-2), 148.29 (d, $^2J_{C,P} = 7.3$ Hz, 1 x C-2), 135.64 (2 x Th-C-6), 132.78 (1 x C-3'), 132.73 (1 x C-3'), 129.69 (2 x C-5), 127.30 (2 x C-2'), 127.24 (2 x C-3), 127.19 (2 x C-4), 121.40 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, 1 x C-1), 121.31 (d, $^3J_{C,P} = 8.1$ Hz, 1 x C-1), 120.10 (2 x C-6), 109.68 (1 x Th-C-5), 109.66 (1 x Th-C-5), 102.75 (2 x C-9), 89.20 (1 x C-1'), 89.12 (1 x C-1'), 84.09 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, 1 x C-4'), 84.03 (d, $^3J_{C,P} = 8.1$ Hz, 1 x C-4'), 68.62 (d, $^2J_{C,P} = 5.9$ Hz, 1 x C-5'), 68.56 (d, $^2J_{C,P} = 5.9$ Hz, 1 x C-5'), 68.14 (d, $^2J_{C,P} = 7.3$ Hz, 1 x C-7), 68.07 (d, $^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, 1 x C-7), 20.69 (2 x OC(O)CH₃), 14.88 (1 x Aryl-CH₃), 14.74 (1 x Aryl-CH₃), 11.79 (1 x Th-CH₃), 11.73 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -8.98, -9.02 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 513.1033 [M+Na⁺], gef.: 513.1039. UV (HPLC): $\lambda_{\max}$ [nm]: 253. R_f-Wert = 0.53 (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 13.9 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R = 11.7 min (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).

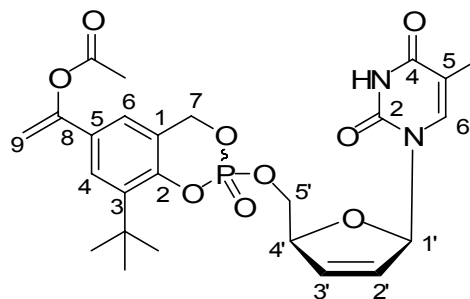
Synthese von 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat 108

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 534 mg 5-(1-Acetoxyvinyl)-3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit **123** (Reinheit 78%, entspricht 417 mg reinem **123** (1.27 mmol)) in 8 mL abs. Acetonitril, 145 mg (0.647 mmol) d4T **2** gelöst in 14 mL abs. Acetonitril, 0.17 mL (0.96 mmol) DIPEA und 0.34 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (1.9 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 1.5 h. Oxidation: 1.5 h. Reaktionsabbruch: Wasser. Reinigung: Säulenfiltration (Ethylacetat/Methanol 9:1 v/v), Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–3%)) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v (Isolierung des Diastereomerengemischs) bzw. Acetonitril/Wasser 2:3 v/v (Diastereomerentrennung)).

Ausbeute: 40 mg **108-mix**, 18 mg **108-fast** und 22 mg **108-slow** (insgesamt 80 mg (0.15 mmol, 23%)) als farblose Watten

*Daten zur Charakterisierung des Diastereomergemischs **108**:*

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.34 (s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.43–7.39 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.37–7.32 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.23 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.20 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.84–6.79 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.44–6.38 (m, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.06–6.00



(m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.67–5.63 (m, 2 x 1H, 2 x H-9a), 5.50–5.35 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.05–5.01 (m, 2 x 1H, 2 x H-9b), 5.00–4.94 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.39–4.28 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 2.26 (s, 2 x 3H, 2 x OC(O)CH₃), 1.61 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.59 (s, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.35 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.32 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.82 (2 x OC(O)CH₃), 163.75 (1 x Th-C-4), 163.71 (1 x Th-C-4), 151.24 (2 x C-8), 150.73 (1 x Th-C-2), 150.70 (1 x Th-C-2), 149.02 (1 x C-2), 148.95 (1 x C-2), 138.63 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 6.4 Hz, 2 x C-3), 135.74 (1 x Th-C-6), 135.68 (1 x Th-C-6), 132.86 (1 x C-3'), 132.75 (1 x C-3'), 129.64 (1 x C-5), 129.61 (1 x C-5), 127.38 (1 x C-2'), 127.34 (1 x C-2'), 123.34 (1 x C-4), 123.32 (1 x C-4), 123.26 (1 x C-1), 123.22 (1 x C-1), 120.95 (2 x C-6), 109.72 (1 x Th-C-5), 109.67 (1 x Th-C-5), 102.96 (2 x C-9), 89.22 (1 x C-1'), 89.06 (1 x C-1'), 84.16 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.3 Hz, 1 x C-4'), 84.08 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 9.2 Hz, 1 x C-4'), 69.00 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.4 Hz, 1 x C-5'), 68.95 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.4 Hz, 1 x C-5'), 68.13 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.4 Hz, 1 x C-7), 68.10 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 1 x C-7), 34.45 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.38 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 29.38 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.35 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.65 (2 x OC(O)CH₃), 11.78 (2 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = -8.80, -9.03 ppm. HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 555.1503 [M+Na⁺], gef.: 555.1506. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 254. R_f-Wert = 0.23 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Präparative HPLC: t_{R} = 18.0, 16.8 min (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v).

*Daten zur Charakterisierung von **108-fast**:*

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.35 (s, 1H, NH), 7.43–7.39 (m, 1H, H-4), 7.37–7.33 (m, 1H, H-6), 7.23 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 1H, Th-H-6), 6.84–6.80 (m, 1H, H-1'), 6.44–6.39 (m, 1H, H-3'), 6.05–6.00 (m, 1H, H-2'), 5.65 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-9a), 5.50–5.35 (m, 2H, H-7a, H-7b), 5.03 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1H, H-9b), 5.00–4.94 (m, 1H, H-4'),

4.35–4.29 (m, 2H, H-5'), 2.26 (s, 3H, OC(O)CH₃), 1.61 (d, ⁴J_{H,H} = 0.8 Hz, 3H, Th-CH₃), 1.32 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.78 (OC(O)CH₃), 163.73 (Th-C-4), 151.23 (C-8), 150.71 (Th-C-2), 149.01 (d, ²J_{C,P} = 8.1 Hz, C-2), 138.63 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, C-3), 135.71 (Th-C-6), 132.82 (C-3'), 129.61 (C-5), 127.33 (C-2'), 123.32 (C-4), 123.22 (C-1), 120.95 (C-6), 109.71 (Th-C-5), 102.92 (C-9), 89.06 (C-1'), 84.07 (d, ³J_{C,P} = 8.1 Hz, C-4'), 68.99 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-5'), 68.09 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-7), 34.37 (Aryl-*t*Bu-C), 29.34 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.63 (OC(O)CH₃), 11.75 (Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.03 ppm. Analytische HPLC: t_R = 16.0 min (Methode I), 31.3 min (Methode III). Präparative HPLC: t_R = 30.8 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Daten zur Charakterisierung von 108-slow:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.34 (s, 1H, NH), 7.44–7.38 (m, 1H, H-4), 7.37–7.31 (m, 1H, H-6), 7.20 (s, 1H, Th-H-6), 6.84–6.77 (m, 1H, H-1'), 6.44–6.36 (m, 1H, H-3'), 6.07–5.99 (m, 1H, H-2'), 5.65 (d, ²J_{H,H} = 1.5 Hz, 1H, H-9a), 5.51–5.34 (m, 2H, H-7a, H-7b), 5.03 (d, ²J_{H,H} = 1.5 Hz, 1H, H-9b), 5.00–4.93 (m, 1H, H-4'), 4.39–4.28 (m, 2H, H-5'), 2.26 (s, 3H, OC(O)CH₃), 1.59 (s, 3H, Th-CH₃), 1.35 (s, 9H, Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.78 (OC(O)CH₃), 163.69 (Th-C-4), 151.23 (C-8), 150.68 (Th-C-2), 148.97 (d, ²J_{C,P} = 8.1 Hz, C-2), 138.64 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, C-3), 135.65 (Th-C-6), 132.73 (C-3'), 129.64 (C-5), 127.37 (C-2'), 123.30 (C-4), 123.19 (C-1), 120.94 (C-6), 109.66 (Th-C-5), 102.93 (C-9), 89.22 (C-1'), 84.15 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, C-4'), 68.95 (d, ²J_{C,P} = 6.2 Hz, C-5'), 68.11 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-7), 34.42 (Aryl-*t*Bu-C), 29.37 (Aryl-*t*Bu-CH₃), 20.62 (OC(O)CH₃), 11.75 (Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -8.80 ppm. Analytische HPLC: t_R = 16.3 min (Methode I), 32.6 min (Methode III). Präparative HPLC: t_R = 34.0 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

9.2.17. Versuch der Synthese von 6-(1-Acetoxyvinyl)-4-methylsalicylalkohol 161

Synthese von 6-Acetyl-4-methylsalicylalkohol 164

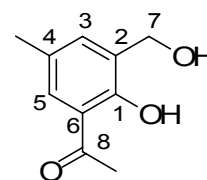
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Für die Chlormethylierung wurden 500 mg (3.33 mmol) 2-Hydroxy-5-methylacetophenon **162**, 2.5 mL konz. Salzsäure und 1.0 mL (14 mmol) einer 37%igen Formaldehydlösung verwendet. Abweichend von der AAV 2 wurde die Reaktionslösung für zwei Stunden bei 50 °C und anschließend zwei Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktion auf

Raumtemperatur wurden die Phasen durch Zugabe von Ethylacetat und Wasser getrennt und die wässrige Phase noch einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene rohe 3-Chlor-methyl-2-hydroxy-5-methylacetophenon **163** (680 mg, orangefarbenes Öl) wurde ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt.

Dazu wurde es in 5.2 mL wässrigem THF mit 514 mg (5.13 mmol) CaCO_3 und 2.1 mL dest. Wasser zum 6-Acetyl-4-methylsalicylalkohol **161** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Dichlormethan).

Ausbeute: 448 mg (2.49 mmol, 75% über 2 Stufen) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12.34 (s, 1H, Phenol-OH), 7.65–7.61 (m, 1H, H-5), 7.50–7.46 (m, 1H, H-3), 5.12 (s, 1H, Benzyl-OH), 4.50 (s, 2H, H-7), 2.64 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.30 (s, 3H, Aryl- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 205.74



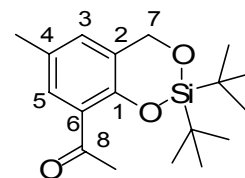
(C-8), 156.30 (C-1), 134.86 (C-3), 130.52 (C-2), 129.26 (C-5), 127.13 (C-4), 118.36 (C-6), 57.13 (C-7), 27.01 (Acetyl- CH_3), 20.22 (Aryl- CH_3) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 203.07 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, gef.: 202.94. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3293, 2918, 1636, 1445, 1370, 1330, 1253, 1230, 1124, 1061, 796. Smp.: 83–84 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 341, 258, 217. R_f -Wert = 0.13 (Dichlormethan).

Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-6-acetyl-4-methylsalicylalkohol **165**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 379 mg (2.10 mmol) 6-Acetyl-4-methylsalicylalkohol **164** in 30 mL abs. Dichlormethan, 0.75 mL (9.3 mmol) abs. Pyridin und 0.90 mL (2.7 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluormethansulfonat) eingesetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatografisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Nach zwei Stunden war das Edukt **164** vollständig umgesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatografisch (Petrol-ether_{30/40}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Ausbeute: 527 mg (1.64 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.53–7.48 (m, 1H, H-5), 6.95–6.91 (m, 1H, H-3), 4.99 (s, 2H, H-7), 2.68 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.27 (s, 3H, Aryl- CH_3), 1.06 (s, 18H, Si-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C



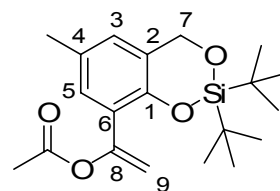
NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 199.44 (C-8), 152.22 (C-1), 131.49 (C-3), 130.13 (C-4), 129.84 (C-5), 128.64 (C-6), 127.34 (C-2), 65.40 (C-7), 32.34 (Acetyl- CH_3), 26.98 (Si-*t*Bu- CH_3), 21.52 (Si-*t*Bu-C), 20.49 (Aryl- CH_3) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 343.17 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 343.03. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2963, 2862, 1668, 1466, 1267, 1230, 1067, 862, 827, 790, 657. Smp.: 99–100 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 315, 251, 217. R_f -Wert = 0.37 (Petrolether_{30/40}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-6-(1-acetoxyvinyl)-4-methylsalicylalkohol **166**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 482 mg (1.50 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-6-acetyl-4-methylsalicylalkohol **165**, 13 mL Isopropenylacetat und 90 mg (0.47 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Petrolether_{30/40}/Dichlormethan 1:1 v/v).

Ausbeute: 421 mg (1.16 mmol, 77%) eines gelben Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.03–7.00 (m, 1H, H-5), 6.75–6.73 (m, 1H, H-3), 5.75 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 1H, H-9a), 5.18 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, H-9b), 4.94 (s, 2H, H-7), 2.25 (s, 3H, Aryl- CH_3), 2.24 (s, 3H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.05 (s, 18H, Si-*t*Bu- CH_3) ppm.



^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 169.28 ($\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 149.98 (C-8), 149.90 (C-1), 129.62 (C-4), 127.62 (C-2), 127.56 (C-5), 127.48 (C-3), 123.91 (C-6), 106.85 (C-9), 65.62 (C-7), 26.95 (Si-*t*Bu- CH_3), 21.47 (Si-*t*Bu-C), 21.25 (C-8), 20.81 ($\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm. MS (ESI^+ , m/z): ber.: 385.18 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 385.04. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2934, 2860, 1761, 1472, 1232, 1187, 881, 828, 789, 656. Smp.: 54–55 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 299, 248, 222. R_f -Wert = 0.44 (Petrolether_{30/40}/Dichlormethan 1:1 v/v).

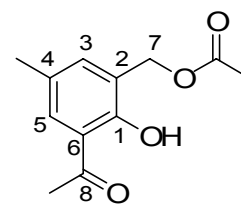
Versuch der Synthese von 6-(1-Acetoxyvinyl)-4-methylsalicylalkohol **161**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 330 mg (0.910 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-6-(1-acetoxyvinyl)-4-methylsalicylalkohol **166**, 33 mL THF und 0.46 mL (2.8 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid eingesetzt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron (Petrolether_{30/40}/Dichlormethan (35–100%)).

Ausbeute: 152 mg (0.684 mmol, 75%) eines gelben Feststoffs, bei dem es sich um 7-*O*-Acetyl-6-acetyl-4-methylsalicylalkohol **167** handelte.

Analytische Daten von 7-O-Acetyl-6-acetyl-4-methylsalicylalkohol **167:**

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 12.46 (s, 1H, Phenol-OH), 7.52–7.49 (m, 1H, H-5), 7.40–7.36 (m, 1H, H-3), 5.18 (s, 2H, H-7), 2.63 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.32 (s, 3H, Aryl- CH_3), 2.11 (s, 3H, OC(O)CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 204.67 (C-8), 171.10 (OC(O)CH_3), 158.77 (C-1), 137.88 (C-3), 130.84 (C-5), 127.72 (C-4), 124.84 (C-2), 119.40 (C-6), 61.08 (C-7), 26.94 (Acetyl- CH_3), 21.18 (OC(O)CH_3), 20.69 (Aryl- CH_3) ppm. MS (ESI $^+$, m/z): ber.: 245.08 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 245.01 [$\text{M}+\text{Na}^+$]. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 1746, 1637, 1450, 1361, 1234, 1124, 1058, 816, 791. Smp.: 65–66 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 340, 256, 220. R_f -Wert = 0.23 (Petrolether_{30/40}/Dichlormethan 1:1 v/v).



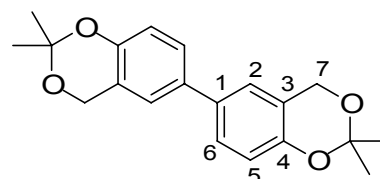
9.2.18. Synthese der 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol

Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **197**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 2.85 g (11.7 mmol) 4-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **44** in 25 mL abs. THF, 7.35 mL (11.8 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 4.57 g (12.9 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat in 10 mL abs. THF eingesetzt. Reaktionszeit: 16 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: 1.08 g (3.31 mmol, 47%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.38 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, 2H, H-6), 7.31 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, 2H, H-2), 6.83 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2H, H-5), 4.86 (s, 4H, H-7), 1.48 (s, 12H, Acetal- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 149.92 (C-4), 131.96 (C-1), 125.75 (C-6), 122.76 (C-2), 119.85 (C-3), 116.80 (C-5), 99.36 (Acetal-C), 60.16 (C-7), 24.57 (Acetal- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 326.2 [M], gef.: 326.2. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2993, 2939, 1615, 1585, 1492, 1375, 1280, 1257, 1123, 1057, 958, 896, 816. Smp.: 141–142 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 265, 210. R_f -Wert = 0.28 (Dichlormethan).



Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.1 g (4.5 mmol) 4-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **44** in 9.5 mL abs. THF, 2.8 mL (4.5 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 1.78 g (5.03 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat in 4 mL abs. THF eingesetzt. Reaktionszeit: 42 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: 558 mg (1.71 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffs

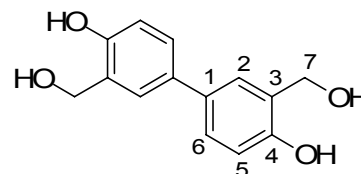
Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 253) angegebenen.

Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol **200**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 969 mg (2.97 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **197** in 90 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und zwanzig Tropfen rauchende Salzsäure eingesetzt. In Abweichung von der AAV 9 wurden zusätzlich 25 mL THF verwendet, um das Edukt **200** vollständig in Lösung zu bringen. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Ausbeute: 651 mg (2.64 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.32 (s, 2H, Phenol-OH), 7.51 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 2H, H-2), 7.24 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.3 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 2H, H-6), 6.80 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.3 Hz, 2H, H-5), 5.01 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.7 Hz, 2H, Benzyl-OH), 4.52 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.7 Hz, 4H, H-7) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 152.99 (C-4), 131.36 (C-1), 128.77 (C-3), 124.96 (C-2), 124.77 (C-6), 114.90 (C-5), 58.31 (C-7) ppm. MS (ESI $^+$, m/z): ber.: 269.1 [M+Na $^+$], gef.: 269.0. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm $^{-1}$] = 3159, 3021, 2953, 2896, 1614, 1501, 1426, 1267, 1133, 990, 896, 812. Smp.: 191–192 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 267, 215. R_f -Wert = 0.32 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

**Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **198****

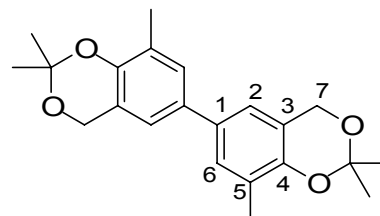
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 451 mg (1.75 mmol) 4-Brom-6-methylsalicylalkoholisopropylidenacetal **56** in 4 mL abs. THF, 1.1 mL

(1.8 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 686 mg (1.94 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat in 1.5 mL abs. THF eingesetzt. Reaktionszeit: 36 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: 120 mg (0.339 mmol, 37%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.20–7.18 (m, 2H, H-6), 6.97–6.94 (m, 2H, H-2), 4.88 (s, 4H, H-7), 2.22 (s, 6H, Aryl- CH_3), 1.57 (s, 12H, Acetal- CH_3) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 148.66 (C-4), 132.81 (C-1), 127.66 (C-6), 126.57 (C-5), 120.28 (C-2), 119.07 (C-3), 99.67 (Acetal-C), 61.27 (C-7), 25.07 (Acetal- CH_3), 15.67 (Aryl- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 354.2 [M], gef.: 354.2. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3003, 2983, 2945, 2919, 2840, 1473, 1372, 1241, 1131, 1061, 957, 869, 703. Smp.: 158–159 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 267, 211. R_f -Wert = 0.37 (Dichlormethan).



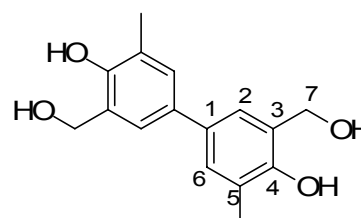
Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol 201

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 162 mg (0.457 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **198** in 20 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und fünf Tropfen rauchende Salzsäure (zwei Durchgänge) eingesetzt. In Abweichung von der AAV 9 wurden zusätzlich 5 mL THF verwendet, um das Edukt **198** vollständig in Lösung zu bringen. Die Reinigung erfolgte durch eine Säulenchromatografie (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Ausbeute: 115 mg (0.419 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.38 (s, 2H, Phenol-OH), 7.30 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 2H, H-2), 7.20 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 2H, H-6), 5.30 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.5 Hz, 2H, Benzyl-OH), 4.60 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.3 Hz, 4H, H-7), 2.21 (s, 6H, Aryl- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):

δ = 151.36 (C-4), 131.42 (C-1), 128.32 (C-3), 126.53 (C-6), 124.37 (C-5), 122.62 (C-2), 59.78 (C-7), 16.32 (Aryl- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 274.2 [M], gef.: 274.1. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3321, 3032, 2951, 2924, 2882, 1473, 1428, 1323, 1021, 1037, 1001,



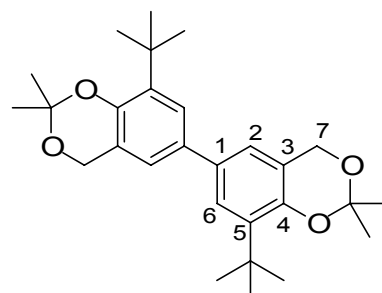
934, 862, 624. Smp.: 152–154 °C. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 267, 209. R_f -Wert = 0.34 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-di-*tert*-butyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **199**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.1 g (3.7 mmol) 4-Brom-6-*tert*-butylsalicylalkoholisopropylidenacetal **57** in 9.5 mL abs. THF, 2.3 mL (3.7 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 1.44 g (4.07 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat in 4 mL abs. THF eingesetzt. Reaktionszeit: 36 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: 593 mg (1.23 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.29 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 2H, H-6), 6.97–6.94 (m, 2H, H-2), 4.92 (s, 4H, H-7), 1.59 (s, 12H, Acetal- CH_3), 1.41 (s, 18H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 149.08 (C-4), 138.34 (C-5), 133.22 (C-1), 123.99 (C-6), 120.85 (C-2), 119.75 (C-3), 99.17 (Acetal-C), 61.60 (C-7), 34.94 (Aryl-*t*Bu-C), 29.76 (Aryl-*t*Bu- CH_3), 25.04 (Acetal- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 438.3 [M], gef.: 438.3. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2990, 2956, 2910, 2861, 1441, 1365, 1272, 1242, 1138, 1066, 956, 889, 854. Smp.: 149–151 °C. UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ [nm]: 267, 211. R_f -Wert = 0.54 (Dichlormethan).

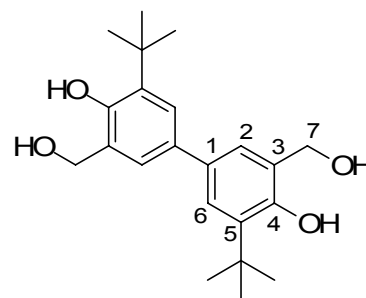


Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-di-*tert*-butyl-4,4'-diol **202**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 206 mg (0.407 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-di-*tert*-butyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **199** in 50 mL Acetonitril/Wasser (5:1 v/v) und 3.5 mL rauchende Salzsäure eingesetzt. In Abweichung von der AAV 9 wurden zusätzlich 5 mL THF verwendet, um das Edukt **199** in Lösung zu bringen. In Abweichung von der AAV 9 wurde die Reaktionslösung für drei Minuten zum Sieden gebracht. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Ausbeute: 120 mg (0.335 mmol, 71%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.67 (s, 2H, Phenol-OH), 7.25–7.22 (m, 2H, H-6), 7.22–7.19 (m, 2H, H-2), 5.84 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.2 Hz, 2H, Benzyl-OH), 4.69 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 4.8 Hz, 4H, H-7), 1.40 (s, 18H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 152.98 (C-4), 136.47 (C-5), 131.76 (C-1), 127.89 (C-3), 123.21 (C-6), 123.16 (C-2), 61.49 (C-7), 34.39 (Aryl-*t*Bu-C), 29.58 (Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 358.2 [M], gef.: 358.2. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3359, 3213, 2955, 2868, 1465, 1441, 1228, 1020, 1008, 997, 869, 618. Smp.: 168–171 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 268, 208. R_f -Wert = 0.47 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).



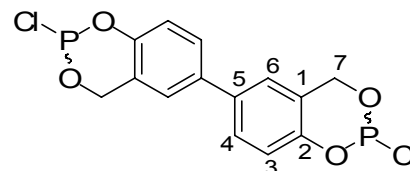
9.2.19. Synthese der 5,5'-Bis-(saligenylchlorphosphite)

Synthese von 5,5'-Bis-(saligenylchlorphosphit) **203**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante IV der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 105 mg (0.426 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol **200** in 22 mL abs. Diethylether/abs. THF (1:1 v/v, Abweichung von der AAV 11), 0.10 mL (1.1 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.17 mL (2.1 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 erfolgte die Zugabe der Reagenzien bei -40 °C.

Ausbeute: 130 mg eines gelben Öls mit einer Reinheit von 68% (entspricht 88 mg reinem **203** (0.24 mmol, 55%)) als Gemisch zweier Enantiomere und einer zu diesen diastereomorphen *meso*-Verbindung

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.41 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 2H, H-4), 7.12 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 2H, H-6), 7.05 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, 2H, H-3), 5.50 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.1 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 2.5 Hz, 2H, H-7a), 5.09 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.4 Hz, $^3J_{\text{H,P}}$ = 9.6 Hz, 2H, H-7b) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 140.6 ppm.



Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante IV der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 458 mg (1.86 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol **200** in 90 mL abs.

Diethylether/abs. THF (1:1 v/v, Abweichung von der AAV 11), 0.37 mL (4.2 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.67 mL (8.3 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 erfolgte die Zugabe der Reagenzien bei -40 °C.

Ausbeute: 682 mg eines farblosen Öls mit einer Reinheit von 89% (entspricht 607 mg reinem **203** (1.62 mmol, 87%)) als Gemisch zweier Enantiomere und einer zu diesen diastereomorphen *meso*-Verbindung

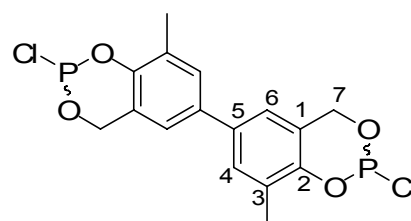
Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 257) angegebenen.

Synthese von 5,5'-Bis-(3-methylsaligenylchlorphosphit) **204**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante IV der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.33 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol **201** in 18 mL abs. Diethylether/abs. THF (1:1 v/v, Abweichung von der AAV 11), 70 µL (0.79 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.14 mL (1.7 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet. In Abweichung von der AAV 11 erfolgte die Zugabe der Reagenzien bei -40 °C.

Ausbeute: 125 mg eines farblosen Öls mit einer Reinheit von 59% (entspricht 74 mg reinem **204** (0.18 mmol, 54%)) als Gemisch zweier Enantiomere und einer zu diesen diastereomorphen *meso*-Verbindung

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.28–7.26 (m, 2H, H-6), 6.96–6.93 (m, 2H, H-4), 5.48 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 2.5$ Hz, 2H, H-7a), 5.06 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 9.4$ Hz, 2H, H-7b), 2.29 (s, 6H, Aryl- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 140.7 ppm.

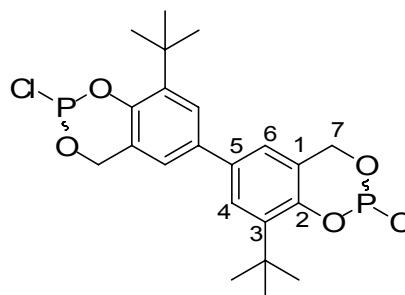


Synthese von 5,5'-Bis-(3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit) **205**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante V der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 170 mg (0.474 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-di-*tert*-butyl-4,4'-diol **202** in 36 mL abs. Diethylether, 0.10 mL (1.1 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.19 mL (2.4 mmol) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 3 h) verwendet.

Ausbeute: 206 mg eines farblosen Öls mit einer Reinheit von 62% (entspricht 128 mg reinem **205** (0.263 mmol, 55%)) als Gemisch zweier Enantiomere und einer zu diesen diastereomorphen *meso*-Verbindung

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.38–7.36 (m, 2H, H-6), 6.96–6.94 (m, 2H, H-4), 5.50–5.47 (m, 2H, H-7a), 5.13–5.05 (m, 2H, H-7b), 1.43 (s, 18H, Aryl-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 138.8 ppm.

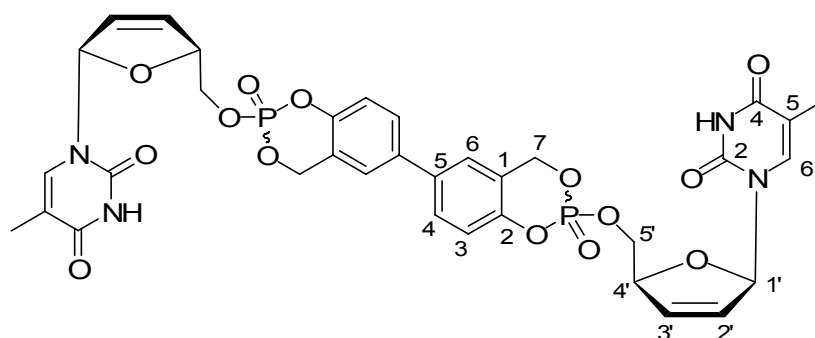


9.2.20. Synthese der 5,5'-Bis-(*cyclo*Sal-d4T-monophosphate)

Synthese von 5,5'-Bis-(*cyclo*Sal-d4T-monophosphat) **194**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 130 mg 5,5'-Bis-(saligenylchlorphosphit) **203** (Reinheit 68%, entspricht 88 mg reinem **203** (0.24 mmol)) in 4 mL abs. Acetonitril, 125 mg (0.557 mmol) d4T **2** gelöst in 13 mL abs. Acetonitril, 0.15 mL (0.86 mmol) DIPEA und 0.30 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (1.7 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 1.5 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: Wasser. Reinigung: Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v).

Ausbeute: 51 mg (65 μmol , 28%) einer farblosen Wasse als Gemisch dreier Diastereomere



Daten zur Charakterisierung des Diastereomergemischs 194:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.36–11.32 (m, 6 x 1H, 6 x NH), 7.67–7.59 (m, 6 x 1H, 6 x H-4), 7.59–7.54 (m, 6 x 1H, 6 x H-6), 7.26–7.17 (m, 12 x 1H, 6 x H-3, 6 x Th-H-6), 6.84–6.77 (m, 6 x 1H, 6 x H-1'), 6.46–6.36 (m, 6 x 1H, 6 x H-3'), 6.06–6.00 (m, 6 x 1H, 6 x H-2'), 5.61–5.41 (m, 12 x 1H, 6 x H-7a, 6 x H-7b), 4.98–4.95 (m, 6 x 1H, 6 x H-4'), 4.40–4.26 (m, 6 x 2H, 6 x H-5'), 1.69 (s, 9H, 3 x Th-CH₃), 1.63 (s, 9H, 3 x Th-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.74 (6 x Th-C-4), 150.73 (3 x Th-C-2), 150.70 (3 x Th-C-2), 149.13 (6 x C-2), 135.73 (3 x Th-C-6), 135.71 (3 x Th-C-6), 135.11 (3 x C-5), 135.07 (3 x C-5), 132.86 (3 x C-3'), 132.79 (3 x C-3'), 127.97 (3 x C-4), 127.89 (3 x C-4), 127.35 (3 x C-2'), 127.32 (3 x C-2'), 124.42 (3 x C-6), 124.40 (3 x C-6), 121.64 (6 x C-1), 118.69 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.3 Hz, 6 x C-3), 109.68 (6 x Th-C-5), 89.22 (6 x C-1'), 84.11 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.3 Hz, 6 x C-4'), 68.51–68.37 (m, 6 x C-5', 6 x C-7), 11.94 (3 x Th-CH₃), 11.86 (3 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ = -9.48, -9.52 ppm. HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 805.1282 [M+Na⁺], gef.: 805.1312. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 259. R_f -Wert = 0.27 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 12.7 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R = 18.6, 17.4 min (Acetonitril/Wasser 1:2 v/v).

Im Rahmen eines hier nicht dokumentierten Ansatzes konnte eine teilweise Trennung der Diastereomere von **194** mittels präparativer RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:5 v/v) erreicht werden.

Daten zur Charakterisierung von 194-fast (2 Diastereomere):

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.32 (s, 4 x 1H, 4 x NH), 7.64–7.59 (m, 4 x 1H, 4 x H-4), 7.59–7.57 (m, 4 x 1H, 4 x H-6), 7.26–7.17 (m, 8 x 1H, 4 x H-3, 4 x Th-H-6), 6.84–6.77 (m, 4 x 1H, 4 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 3 x 1H, 3 x H-3'), 6.37 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.06–6.00 (m, 4 x 1H, 4 x H-2'), 5.61–5.41 (m, 8 x 1H, 4 x H-7a, 4 x H-7b), 4.99–4.94 (m, 4 x 1H, 4 x H-4'), 4.40–4.25 (m, 4 x 2H, 4 x H-5'), 1.69 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 0.7 Hz, 9H, 3 x Th-CH₃), 1.63 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.3 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.74 (3 x Th-C-4), 163.73 (1 x Th-C-4), 150.73 (3 x Th-C-2), 150.70 (1 x Th-C-2), 149.18 (3 x C-2), 149.12 (1 x C-2), 135.73 (3 x Th-C-6), 135.71 (1 x Th-C-6), 135.09 (1 x C-5), 135.06 (3 x C-5), 132.86 (3 x C-3'), 132.79 (1 x C-3'),

127.97 (3 x C-4), 127.88 (1 x C-4), 127.35 (3 x C-2'), 127.32 (1 x C-2'), 124.42 (1 x C-6), 124.40 (3 x C-6), 121.66 (4 x C-1), 118.70 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, 4 x C-3), 109.68 (4 x Th-C-5), 89.22 (4 x C-1'), 84.11 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, 4 x C-4'), 68.51–68.37 (m, 4 x C-5', 4 x C-7), 11.94 (3 x Th-CH₃), 11.86 (1 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.48, -9.52$ ppm. Analytische HPLC: $t_R = 12.7$ min (Methode I). Präparative HPLC: $t_R = 35.8$ min (Acetonitril/Wasser 2:5 v/v).

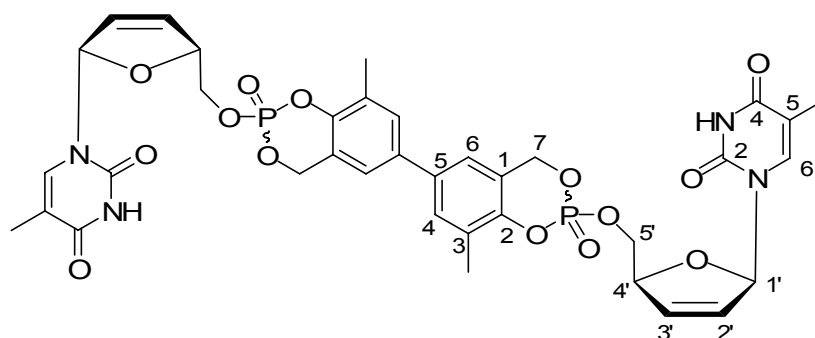
*Daten zur Charakterisierung von **194**-slow (1 Diastereomer):*

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.33$ (s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.64–7.59 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.59–7.54 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.22–7.17 (m, 4 x 1H, 2 x H-3, 2 x Th-H-6), 6.80–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.38 (ddd, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.8$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.8$ Hz, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.04–6.00 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.61–5.50 (m, 2 x 1H, 2 x H-7a), 5.50–5.41 (m, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.98–4.95 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.41–4.25 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.63 (d, $^4J_{H,H} = 1.3$ Hz, 6H, 2 x Th-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 163.73$ (2 x Th-C-4), 150.71 (2 x Th-C-2), 149.10 (2 x C-2), 135.73 (2 x Th-C-6), 135.12 (2 x C-5), 132.82 (2 x C-3'), 127.91 (2 x C-4), 127.34 (2 x C-2'), 124.42 (2 x C-6), 121.68 (d, $^3J_{C,P} = 9.2$ Hz, 2 x C-1), 118.71 (d, $^3J_{C,P} = 8.4$ Hz, 2 x C-3), 109.69 (2 x Th-C-5), 89.23 (2 x C-1'), 84.12 (d, $^3J_{C,P} = 7.6$ Hz, 2 x C-4'), 68.45–68.40 (m, 2 x C-5', 2 x C-7), 11.89 (2 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -9.52$ ppm. Analytische HPLC: $t_R = 12.7$ min (Methode I). Präparative HPLC: $t_R = 38.1$ min (Acetonitril/Wasser 2:5 v/v).

Synthese von 5,5'-Bis-(3-methyl-cycloSal-d4T-monophosphat) **195**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 122 mg 5,5'-Bis-(3-methylsaligenylchlorphosphit) **204** (Reinheit 59%, entspricht 72 mg reinem **203** (0.18 mmol)) in 4 mL abs. Acetonitril (in Abweichung von der AAV 12 wurden zur Lösung von **203** zusätzlich 0.8 mL abs. THF zugegeben), 96 mg (0.43 mmol) d4T **2** gelöst in 9 mL abs. Acetonitril, 0.14 mL (0.82 mmol) DIPEA und 0.23 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (1.3 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 1 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: Wasser. Reinigung: Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Ausbeute: 43 mg (53 μmol , 30%) einer farblosen Watte als Gemisch dreier Diastereomere



^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.33 (s, 6 x 1H, 6 x NH), 7.56–7.52 (m, 6 x 1H, 6 x H-4), 7.41–7.37 (m, 6 x 1H, 6 x H-6), 7.23–7.18 (m, 6 x 1H, 6 x Th-H-6), 6.83–6.79 (m, 6 x 1H, 6 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 3 x 1H, 3 x H-3'), 6.38 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, 3 x 1H, 3 x H-3'), 6.06–6.00 (m, 6 x 1H, 6 x H-2'), 5.56–5.47 (m, 6 x 1H, 3 x H-7a, 3 x H-7b), 5.45–5.36 (m, 6 x 1H, 3 x H-7a, 3 x H-7b), 5.00–4.95 (m, 6 x 1H, 6 x H-4'), 4.37–4.23 (m, 6 x 2H, 6 x H-5'), 2.28 (s, 3 x 3H, 3 x Aryl- CH_3), 2.25 (s, 3 x 3H, 3 x Aryl- CH_3), 1.66 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 0.8 Hz, 3 x 3H, 3 x Th- CH_3), 1.63 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.0 Hz, 3 x 3H, 3 x Th- CH_3) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 163.65 (6 x Th-C-4), 150.68 (3 x Th-C-2), 150.66 (3 x Th-C-2), 147.59 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 3 x C-2), 147.58 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 3 x C-2), 135.68 (3 x Th-C-6), 135.65 (3 x Th-C-6), 134.61 (3 x C-5), 134.59 (3 x C-5), 132.81 (3 x C-3'), 132.73 (3 x C-3'), 129.01 (6 x C-4), 127.36 (6 x C-3), 127.30 (6 x C-2'), 121.73 (6 x C-6), 121.57 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 9.5 Hz, 3 x C-1), 121.51 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8.8 Hz, 3 x C-1), 109.68 (3 x Th-C-5), 109.62 (3 x Th-C-5), 89.23 (3 x C-1'), 89.18 (3 x C-1'), 84.11 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 6 x C-4'), 68.52 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 5.9 Hz, 6 x C-5'), 68.26 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.8 Hz, 3 x C-7), 68.19 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 7.3 Hz, 3 x C-7), 14.98 (3 x Aryl- CH_3), 14.86 (3 x Aryl- CH_3), 11.81 (3 x Th- CH_3), 11.73 (3 x Th- CH_3) ppm.

^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = -8.75, -8.88 ppm.

HRMS (ESI^+ , m/z): ber.: 833.1595 [$\text{M}+\text{Na}^+$], gef.: 833.1603.

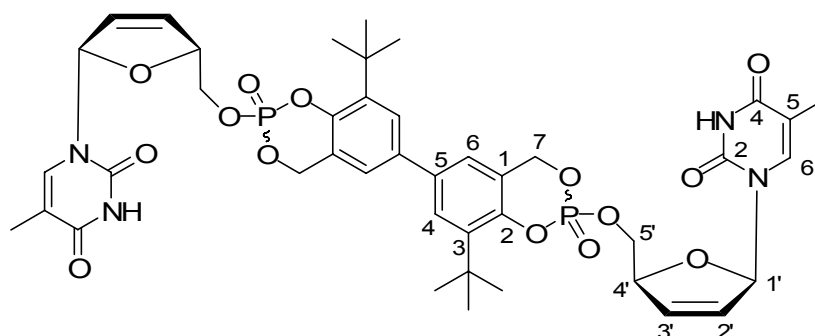
UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 259. R_f -Wert = 0.32 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Analytische HPLC: t_R = 13.6 min (Methode I). Präparative HPLC: t_R = 14.0 min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Synthese von 5,5'-Bis-(3-*tert*-butyl-cycloSal-d4T-monophosphat) **196**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 96 mg 5,5'-Bis-(3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit) **205** (Reinheit 62%, entspricht 59 mg reinem **205** (0.12 mmol)) in 4 mL abs. Acetonitril, 70 mg (0.31 mmol) d4T **2** gelöst in 7 mL abs. Acetonitril, 84 μ L (49 μ mol) DIPEA. Reaktionszeit: 1 h. Abweichend von der AAV 12 erfolgte die Oxidation mit Oxone[®]. Dazu wurde die Reaktionslösung auf -20 °C gekühlt und mit 0.32 g (0.52 mmol) Oxone[®] in 1.5 mL kaltem, destilliertem Wasser versetzt. Nach erfolgter Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und für zehn Minuten gerührt. Die Reaktion wurde dann sofort zweimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abkondensiert. Reinigung: Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 4:5 v/v).

Ausbeute: 33 mg (37 μ mol, 30%) einer farblosen Watte als Gemisch dreier Diastereomere



Daten zur Charakterisierung des Diastereomerengemischs **196**:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.34 (s, 6 x 1H, 6 x NH), 7.50–7.44 (m, 12 x 1H, 6 x H-4, 6 x H-6), 7.24 (d, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 3H, 3 x Th-H-6), 7.21 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, 3 x Th-H-6), 6.85–6.79 (m, 6 x 1H, 6 x H-1'), 6.46–6.39 (m, 6H, 6 x H-3'), 6.07–6.01 (m, 6 x 1H, 6 x H-2'), 5.56–5.38 (m, 12 x 1H, 6 x H-7a, 6 x H-7b), 5.01–4.96 (m, 6 x 1H, 6 x H-4'), 4.41–4.28 (m, 6 x 2H, 6 x H-5'), 1.63–1.59 (m, 6 x 3H, 6 x Th-CH₃), 1.39 (s, 3 x 9H, 3 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.36 (s, 3 x 9H, 3 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 163.73 (3 x Th-C-4), 163.68 (3 x Th-C-4), 150.72 (3 x Th-C-2), 150.69 (3 x Th-C-2), 148.31 (d, ²J_{C,P} = 7.3 Hz, 3 x C-2), 148.27 (d, ²J_{C,P} = 7.3 Hz, 3 x C-2), 138.85 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, 6 x C-3), 135.73 (3 x Th-C-6), 135.68 (3 x Th-C-6), 135.28 (6 x C-5), 132.86 (3 x C-3'), 132.78 (3 x C-3'), 127.35 (3 x C-2'), 127.32

(3 x C-2'), 125.71 (3 x C-4), 125.68 (3 x C-4), 123.49 (d, $^3J_{C,P} = 8.8$ Hz, 3 x C-1), 123.45 (d, $^3J_{C,P} = 8.8$ Hz, 3 x C-1), 122.91 (6 x C-6), 109.71 (3 x Th-C-5), 109.61 (3 x Th-C-5), 89.23 (3 x C-1'), 89.09 (3 x C-1'), 84.17 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, 3 x C-4'), 84.13 (d, $^3J_{C,P} = 6.6$ Hz, 3 x C-4'), 68.99–68.80 (m, 6 x C-5'), 68.33–68.09 (m, 6 x C-7), 34.50 (3 x Aryl-*t*Bu-C), 34.44 (3 x Aryl-*t*Bu-C), 29.51 (3 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.48 (3 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.77 (6 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -8.59$, -8.84 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 917.2534 [M+Na⁺], gef.: 917.2558. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 260. R_F-Wert = 0.38 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Präparative HPLC: *t*_R = 32.0, 28.2, 25.4 min (Acetonitril/Wasser 4:5 v/v).

Weitere Synthese:

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 110 mg 5,5'-Bis-(3-*tert*-butylsaligenylchlorphosphit) **205** (Reinheit 62%, entspricht 68 mg reinem **205** (0.14 mmol)) in 4 mL abs. Acetonitril, 70 mg (0.31 mmol) d4T **2** gelöst in 7 mL abs. Acetonitril, 84 μL (49 μmol) DIPEA und 0.17 mL einer 5.5 M Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Nonan (0.94 mmol *tert*-Butylhydroperoxid) verwendet. Reaktionszeit: 1 h. Oxidation: 1 h. Reaktionsabbruch: Wasser. Reinigung: Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) und präparative RP-HPLC (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v). Hier konnte eine Trennung aller drei Diastereomere erzielt werden.

Ausbeute: 9 mg **196-fast**, 25 mg **196-middle** und 12 mg **196-slow** (insgesamt 46 mg (51 μmol , 37%)) als farblose Watten

Daten zur Charakterisierung von **196-fast**:

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.36$ (s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.47 (s, 4 x 1H, 2 x H-4, 2 x H-6), 7.24 (d, $^4J_{H,H} = 1.3$ Hz, 2 x 1H, 2 x Th-H-6), 6.84–6.80 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.8$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.5$ Hz, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.05–6.01 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.55–5.39 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.03–4.95 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.40–4.28 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.61 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 2 x 3H, 2 x Th-CH₃), 1.36 (s, 2 x 9H, 2 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 163.73$ (2 x Th-C-4), 150.72 (2 x Th-C-2), 148.31 (d, $^2J_{C,P} = 7.3$ Hz, 2 x C-2), 138.84 (d, $^3J_{C,P} = 6.6$ Hz, 2 x C-3), 135.74 (2 x Th-C-6), 135.26 (2 x C-5), 132.86 (2 x C-3'), 127.32 (2 x C-2'), 125.68 (2 x C-4), 123.45 (d, $^3J_{C,P} = 8.8$ Hz, 2 x C-1), 122.91 (2 x C-6), 109.70 (2 x Th-C-5), 89.09 (2 x C-1'), 84.12 (d, $^3J_{C,P} = 8.1$ Hz, 2 x C-4'), 68.95 (d,

$^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, 2 x C-5'), 68.21 (d, $^2J_{C,P} = 5.1$ Hz, 2 x C-7), 34.44 (2 x Aryl-*t*Bu-C), 29.48 (2 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.76 (2 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -8.83$ ppm. Analytische HPLC: $t_R = 16.5$ min (Methode I). Präparative HPLC: $t_R = 45.4$ min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Daten zur Charakterisierung von 196-middle:

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.37\text{--}11.32$ (m, 2 x 1H, 2 x NH), 7.50–7.44 (m, 4 x 1H, 2 x H-4, 2 x H-6), 7.24 (d, $^4J_{H,H} = 1.3$ Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.21 (d, $^4J_{H,H} = 1.3$ Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 6.84–6.80 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.8$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.5$ Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.42 (ddd, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.8$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.5$ Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.07–6.02 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.55–5.39 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.01–4.96 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.40–4.28 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.61 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.60 (d, $^4J_{H,H} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.39 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 1.36 (s, 9H, 1 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 163.70$ (1 x Th-C-4), 163.66 (1 x Th-C-4), 150.70 (1 x Th-C-2), 150.68 (1 x Th-C-2), 148.29 (d, $^2J_{C,P} = 8.1$ Hz, 1 x C-2), 148.25 (d, $^2J_{C,P} = 7.3$ Hz, 1 x C-2), 138.84 (d, $^3J_{C,P} = 6.5$ Hz, 2 x C-3), 135.71 (1 x Th-C-6), 135.66 (1 x Th-C-6), 135.27 (2 x C-5), 132.83 (1 x C-3'), 132.76 (1 x C-3'), 127.34 (1 x C-2'), 127.31 (1 x C-2'), 125.69 (1 x C-4), 125.65 (1 x C-4), 123.46 (d, $^3J_{C,P} = 8.8$ Hz, 1 x C-1), 123.43 (d, $^3J_{C,P} = 8.8$ Hz, 1 x C-1), 122.89 (2 x C-6), 109.69 (1 x Th-C-5), 109.60 (1 x Th-C-5), 89.23 (1 x C-1'), 89.09 (1 x C-1'), 84.16 (d, $^3J_{C,P} = 7.3$ Hz, 1 x C-4'), 84.11 (d, $^3J_{C,P} = 8.1$ Hz, 1 x C-4'), 68.94 (d, $^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, 1 x C-5'), 68.84 (d, $^2J_{C,P} = 5.9$ Hz, 1 x C-5'), 68.24 (d, $^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, 1 x C-7), 68.21 (d, $^2J_{C,P} = 6.6$ Hz, 1 x C-7), 34.48 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 34.42 (1 x Aryl-*t*Bu-C), 29.50 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 29.47 (1 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.75 (1 x Th-CH₃), 11.73 (1 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -8.59, -8.84$ ppm. Analytische HPLC: $t_R = 16.7$ min (Methode I). Präparative HPLC: $t_R = 51.1$ min (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

Daten zur Charakterisierung von 196-slow:

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.33$ (s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.49–7.46 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.46–7.44 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.21 (d, $^4J_{H,H} = 1.3$ Hz, 2 x 1H, 2 x Th-H-6), 6.83–6.79 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.42 (ddd, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 1.8$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.5$ Hz, 2 x 1H, 2 x H-3'), 6.07–6.03 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.55–5.38 (m, 4 x 1H, 2 x H-7a, 2 x H-7b), 5.01–4.96 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.41–4.29 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.60 (d,

$^4J_{\text{H,H}} = 1.0 \text{ Hz}$, 2 x 3H, 2 x Th-CH₃), 1.39 (s, 2 x 9H, 2 x Aryl-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 163.68$ (2 x Th-C-4), 150.69 (2 x Th-C-2), 148.25 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 8.1 \text{ Hz}$, 2 x C-2), 138.85 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.6 \text{ Hz}$, 2 x C-3), 135.67 (2 x Th-C-6), 135.29 (2 x C-5), 132.78 (2 x C-3'), 127.35 (2 x C-2'), 125.67 (2 x C-4), 123.43 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.8 \text{ Hz}$, 2 x C-1), 122.89 (2 x C-6), 109.61 (2 x Th-C-5), 89.23 (2 x C-1'), 84.17 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3 \text{ Hz}$, 2 x C-4'), 68.85 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.9 \text{ Hz}$, 2 x C-5'), 68.25 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.6 \text{ Hz}$, 2 x C-7), 34.49 (2 x Aryl-*t*Bu-C), 29.51 (2 x Aryl-*t*Bu-CH₃), 11.76 (2 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -8.59 \text{ ppm}$. Analytische HPLC: $t_{\text{R}} = 17.0 \text{ min}$ (Methode I). Präparative HPLC: $t_{\text{R}} = 59.8 \text{ min}$ (Acetonitril/Wasser 2:3 v/v).

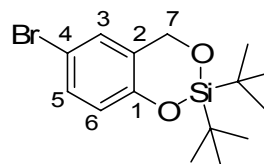
9.2.21. Synthese der Referenzverbindung 206

Synthese von Di-*tert*-butylsilyl-4-bromsalicylalkohol 210

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 3.06 g (15.1 mmol) 4-Bromsalicylalkohol **43** in 100 mL abs. Dichlormethan, 5.3 mL (66 mmol) abs. Pyridin und 6.4 mL (20 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluormethansulfonat) eingesetzt. Die dünnschichtchromatografische Kontrolle (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v) zeigte nach 2.5 Stunden einen kompletten Umsatz des Edukts **43**. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenfiltration (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 5:1 v/v).

Ausbeute: 4.15 g (12.1 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.26$ (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 7.07 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 6.80 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 4.95 (s, 2H, H-7), 1.03 (s, 18H, Si-*t*Bu-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃): $\delta =$



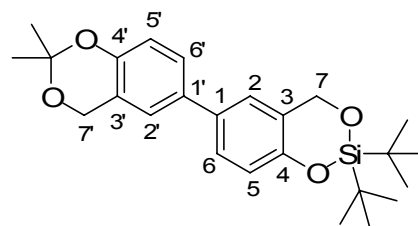
153.53 (C-1), 131.61 (C-5), 128.89 (C-3), 121.16 (C-6), 112.73 (C-4), 64.99 (C-7), 27.01 (Si-*t*Bu-CH₃), 21.53 (Si-*t*Bu-C) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 342.1 [M], gef.: 342.1. IR: $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2966, 2935, 2854, 1483, 1470, 1258, 1077, 902, 827, 813, 656$. Smp.: 61–62 °C. UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$: 283, 229, 207. R_{F} -Wert = 0.50 (Petrolether_{50/70}/Dichlormethan 5:1 v/v).

Synthese von 4,7-*O*-Di-*tert*-butylsilyl-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-4',7'-*O*-isopropylidenacetal **212**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Allerdings wurden 1.28 g (5.27 mmol) 4-Bromsalicylalkoholisopropylidenacetal **44** und 1.81 g (5.27 mmol) Di-*tert*-butylsilyl-4-bromsalicylalkohol **210** als äquimolares Gemisch in 25 mL abs. THF eingesetzt. Außerdem wurden 6.6 mL (11 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung und 4.15 g (11.8 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat in 10 mL abs. THF verwendet. Reaktionszeit: 60 h. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatografie (Dichlormethan).

Ausbeute: Es wurden 701 mg (1.64 mmol, 31%; farbloser Feststoff) des gewünschten Heterokupplungsprodukts **212** sowie die beiden Homokupplungsprodukte **211** (642 mg (1.22 mmol, 46%); farbloser Feststoff) und **197** (267 mg (0.818 mmol, 31%); farbloser Feststoff) isoliert.

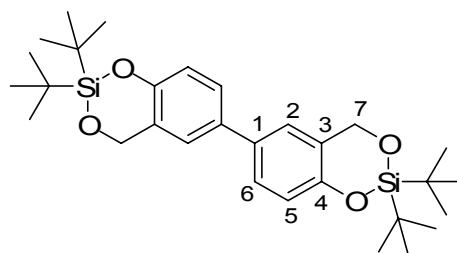
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.38–7.30 (m, 2H, H-6, H-6'), 7.15–7.12 (m, 1H, H-2'), 7.09 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 1H, H-2), 6.96 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.86 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, 1H, H-5'), 5.05 (s, 2H, H-7), 4.89 (s, 2H, H-7'), 1.57 (s, 6H, Acetal- CH_3),



1.06 (s, 18H, Si-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 153.58 (C-4), 150.51 (C-4'), 133.46 (C-1'), 133.29 (C-1), 127.06 (C-3), 127.02 (C-6), 126.62 (C-6'), 124.36 (C-2), 122.90 (C-2'), 119.69 (C-3'), 119.65 (C-5), 117.49 (C-5'), 99.78 (Acetal-C), 65.74 (C-7), 61.18 (C-7'), 27.11 (Si-*t*Bu- CH_3), 24.92 (Acetal- CH_3), 21.59 (Si-*t*Bu-C) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 426.2 [M], gef.: 426.4. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2951, 2933, 2855, 1485, 1274, 1257, 1239, 1118, 1083, 901, 815, 788, 655, 434. Smp.: 123 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 265, 207. R_f -Wert = 0.54 (Dichlormethan).

Analytische Daten von Bis-di-*tert*-butylsilyl-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol **211**:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.34 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.2 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 2H, H-6), 7.10 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, 2H, H-2), 6.95 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.2 Hz, 2H, H-5), 5.05 (s, 4H, H-7), 1.06 (s, 36H, Si-*t*Bu- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz,



CDCl_3): δ = 153.54 (C-4), 133.46 (C-1), 127.03 (C-6), 124.37 (C-2), 119.62 (C-5), 65.76 (C-7), 27.11 (Si-*t*Bu-CH₃), 21.58 (Si-*t*Bu-C) ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 526.3 [M], gef.: 526.4. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2960, 2932, 2858, 1485, 1468, 1254, 1124, 1035, 904, 824, 779, 653. Smp.: 165 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 270, 208. R_f -Wert = 0.77 (Dichlormethan).

Die analytischen Daten von **197** entsprachen den oben (S. 253) angegebenen.

Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol **200** durch Entschützung von **211**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 610 mg (1.15 mmol) Bis-di-*tert*-butylsilyl-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol **211**, 50 mL THF und 1.1 mL (6.5 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid eingesetzt. Reaktionszeit: 20 Minuten. In Abweichung zur AAV 10 wurde Ethylacetat zur Extraktion verwendet. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).

Ausbeute: 250 mg (1.01 mmol, 88%) eines leicht gelben Feststoffs

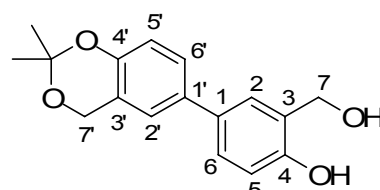
Die analytischen Daten entsprachen den oben (S. 254) angegebenen.

Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-4',7'-O-isopropylidenacetal **209**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 0.35 g (0.82 mmol) 4,7-O-Di-*tert*-butylsilyl-3,3'-bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-4',7'-O-isopropylidenacetal **212**, 20 mL THF und 0.38 mL (2.3 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid eingesetzt. Reaktionszeit: 10 Minuten. In Abweichung zur AAV 10 wurde Ethylacetat zur Extraktion verwendet. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol (0–7%)).

Ausbeute: 226 mg (0.789 mmol, 96%) eines leicht gelben Feststoffs

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.41 (s, 1H, Phenol-OH), 7.52 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-2'), 7.35 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.7 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-6), 7.27 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.1 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-6'), 7.26 (d,



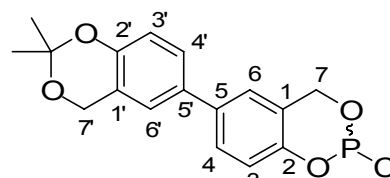
$^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-2), 6.82 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.81 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 5.00 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 1H, Benzyl-OH), 4.87 (s, 2H, H-7'), 4.52 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 2H, H-7), 1.48 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 153.40$ (C-4), 149.55 (C-4'), 132.86 (C-1'), 130.45 (C-1), 128.87 (C-3), 125.54 (C-6), 125.16 (C-2'), 125.01 (C-6'), 122.40 (C-2), 119.81 (C-3'), 116.75 (C-5'), 114.95 (C-5), 99.29 (Acetal-C), 60.21 (C-7'), 58.26 (C-7), 24.60 (Acetal-CH₃) ppm. MS (FAB, *m/z*): ber.: 286.1 [M], gef.: 286.1. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3167, 2953, 2887, 2203, 1750, 1562, 1488, 1376, 1208, 1137, 987, 930, 877, 810, 760. Smp.: 137 °C. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 265, 206. *R*_f-Wert = 0.43 (Dichlormethan/Methanol 13:1 v/v).

Synthese von 5-(Isopropylidensaligen-5'-yl)-saligenylchlorphosphit **208**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 188 mg (0.657 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-4,4'-diol-4',7'-O-isopropylidenacetal **209** in 10 mL abs. Diethylether, 69 μL (0.79 mmol) Phosphor(III)-chlorid und 0.10 mL (1.3 mmol (1.9 Äquivalente; Abweichung von der AAV 11)) abs. Pyridin (Zugabezeitraum: 1.5 h) verwendet.

Ausbeute: 192 mg (0.547 mmol, 83%) eines reinen, farblosen Öls als Gemisch zweier Enantiomere

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.41$ (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 7.32 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.14–7.12 (m, 1H, H-2), 7.12–7.10 (m, 1H, H-2'), 7.02 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1H, H-5), 6.88 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 1H, H-5'), 5.53–5.47 (m, 1H, H-7a), 5.12–5.03 (m, 1H, H-7b), 4.90 (s, 2H, H-7'), 1.57 (s, 6H, Acetal-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl₃): $\delta = 140.4$ ppm.



Synthese von 5-(Isopropylidensaligen-5'-yl)-cyc/oSal-d4T-monophosphat **207**

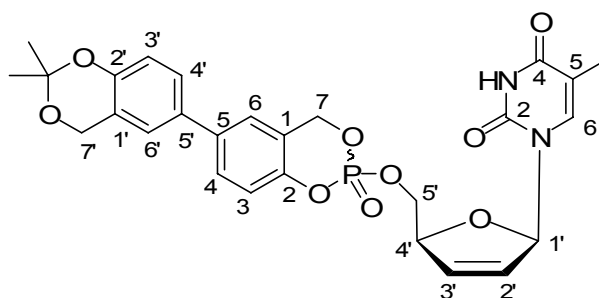
Die Reaktion wurde gemäß der Variante II der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 129 mg (0.369 mmol) 5-(Isopropylidensaligen-5'-yl)-saligenylchlorphosphit **208** in 3 mL abs. Acetonitril, 101 mg (0.446 mmol) d4T **2** gelöst in 14 mL abs. Acetonitril und 0.13 mL (0.75 mmol) DIPEA verwendet. Reaktionszeit: 1 h. Abweichend von der AAV 12 erfolgte die Oxidation mit Oxone[®]. Dazu wurde die Reaktionslösung auf -10 °C gekühlt und mit 1.1 g (1.8 mmol) Oxone[®] in 5 mL kaltem, destilliertem Wasser

versetzt. Nach erfolgter Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und für zehn Minuten gerührt. Die Reaktion wurde dann sofort zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abkondensiert. Reinigung: Säulenfiltration (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) und Chromatotron (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: 93 mg (0.17 mmol, 45%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =

11.36 (s, 1H, 1 x NH), 11.35 (s, 1H, 1 x NH), 7.62–7.55 (m, 2 x 1H, 2 x H-4), 7.54–7.52 (m, 2 x 1H, 2 x H-6), 7.46–7.42 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H-4'), 7.38–7.35 (m, 2 x 1H, 2 x Aryl-H-6'), 7.22 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, 1 x Th-H-



6), 7.19 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.18 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 1H, 1 x H-3), 7.15 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 1H, 1 x H-3), 6.87 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 2 x 1H, 2 x Aryl-H-3'), 6.83–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.37 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.05–5.99 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.56 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 5.3$ Hz, 1H, 1 x H-7a), 5.52 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 5.3$ Hz, 1H, 1 x H-7a), 5.44 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 10.5$ Hz, 2 x 1H, 2 x H-7b), 4.99–4.95 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.88 (s, 2 x 2H, 2 x H-7'), 4.42–4.25 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.69 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.63 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.49 (s, 4 x 3H, 4 x Acetal-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.69 (1 x Th-C-4), 163.67 (1 x Th-C-4), 150.69 (1 x Th-C-2), 150.66 (1 x Th-C-2), 150.58 (2 x Aryl-C-2'), 148.51 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.6$ Hz, 1 x C-2), 148.48 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 1 x C-2), 136.14 (2 x Aryl-C-5'), 135.66 (1 x Th-C-6), 135.65 (1 x Th-C-6), 132.82 (1 x C-3'), 132.75 (1 x C-3'), 130.80 (1 x C-5), 130.78 (1 x C-5), 127.39 (2 x C-4), 127.32 (1 x C-2'), 127.29 (1 x C-2'), 126.19 (2 x Aryl-C-4'), 123.82 (2 x C-6), 123.26 (2 x Aryl-C-6'), 121.50 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.8$ Hz, 1 x C-1), 121.41 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 9.5$ Hz, 1 x C-1), 120.00 (2 x Aryl-C-1'), 118.47 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 8.0$ Hz, 2 x C-3), 116.94 (2 x Aryl-C-3'), 109.66 (1 x Th-C-5), 109.64 (1 x Th-C-5), 99.51 (2 x Acetal-C), 89.18 (2 x C-1'), 84.09 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 7.3$ Hz, 2 x C-4'), 68.45–68.31 (m, 2 x C-5', 2 x C-7), 60.10

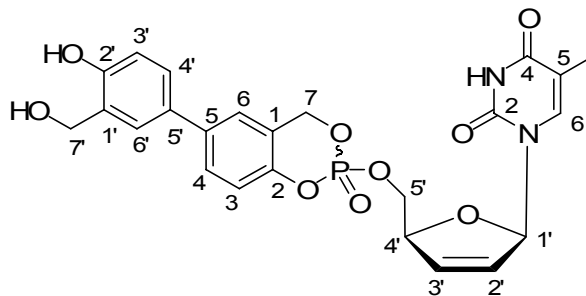
(2 x C-7'), 24.56 (2 x Acetal-CH₃), 11.89 (1 x Th-CH₃), 11.81 (1 x Th-CH₃) ppm. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.37 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 577.1341 [M+Na⁺], gef.: 577.1345. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 263. R_F-Wert = 0.31 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Analytische HPLC: t_R = 16.9 min (Methode I).

Synthese von 5-(Saligen-5'-yl)-cycloSal-d4T-monophosphat **206**

Die Reaktion wurde gemäß der Variante I der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 35 mg (63 μ mol) 5-(Isopropylidensaligen-5'-yl)-cycloSal-d4T-monophosphat **207** in 20 mL Acetonitril/Wasser (7:3 v/v) und fünfzehn Tropfen rauchende Salzsäure eingesetzt. In Abweichung zur AAV 9 wurden die vereinigten organischen Phasen noch zweimal mit Wasser gewaschen. Der nach der Abkondensation des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wurde gefriergetrocknet (Acetonitril/Wasser 1:1 v/v). Das so isolierte Produkt war bereits so rein, dass auf eine Chromatografie verzichtet werden konnte.

Ausbeute: 28 mg (53 μ mol, 85%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1.0:1.0

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.37 (s, 2 x 1H, 2 x NH), 9.58 (s, 2 x 1H, 2 x Phenol-OH), 7.60–7.47 (m, 6 x 1H, 2 x H-4, 2 x H-6, 2 x Aryl-H-6'), 7.33 (dd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 2 x 1H, 2 x Aryl-H-4'), 7.22 (d, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6),



7.19 (d, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, 1 x Th-H-6), 7.17 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, 1 x H-3), 7.14 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, 1 x H-3), 6.84 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 2 x 1H, 2 x Aryl-H-3'), 6.83–6.77 (m, 2 x 1H, 2 x H-1'), 6.43 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.38 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.05–5.99 (m, 2 x 1H, 2 x H-2'), 5.58 (dd, ²J_{H,H} = 14.6 Hz, ³J_{H,P} = 6.0 Hz, 1H, H-7a), 5.53 (dd, ²J_{H,H} = 14.6 Hz, ³J_{H,P} = 6.0 Hz, 1H, H-7a), 5.45 (dd, ²J_{H,H} = 14.6 Hz, ³J_{H,P} = 10.5 Hz, 2 x 1H, 2 x H-7b), 5.04 (t, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 2 x 1H, Benzyl-OH), 4.99–4.94 (m, 2 x 1H, 2 x H-4'), 4.52 (d, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 2 x 2H, 2 x H-7'), 4.38–4.26 (m, 2 x 2H, 2 x H-5'), 1.69 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃), 1.63 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, 1 x Th-CH₃) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 163.74 (1 x Th-C-4), 163.73 (1 x Th-C-4),

154.10 (2 x Aryl-C-2'), 150.73 (1 x Th-C-2), 150.71 (1 x Th-C-2), 148.21 (d, $^2J_{C,P}$ = 7.3 Hz, 1 x C-2), 148.18 (d, $^2J_{C,P}$ = 7.3 Hz, 1 x C-2), 137.03 (2 x Aryl-C-5'), 135.71 (2 x Th-C-6), 132.88 (1 x C-3'), 132.83 (1 x C-3'), 129.29 (1 x Aryl-C-1'), 129.28 (1 x Aryl-C-1'), 129.10 (2 x C-5), 127.35 (1 x C-2'), 127.32 (1 x C-2'), 127.13 (1 x C-4), 127.06 (1 x C-4), 125.49 (2 x Aryl-C-4', 2 x Aryl-C-6'), 123.48 (2 x C-6), 121.42 (d, $^3J_{C,P}$ = 9.5 Hz, 2 x C-1), 118.45 (d, $^3J_{C,P}$ = 9.5 Hz, 2 x C-3), 115.04 (2 x Aryl-C-3'), 109.71 (1 x Th-C-5), 109.69 (1 x Th-C-5), 89.17 (2 x C-1'), 84.14 (d, $^3J_{C,P}$ = 7.3 Hz, 1 x C-4'), 84.11 (d, $^3J_{C,P}$ = 7.3 Hz, 1 x C-4'), 68.55–68.39 (m, 2 x C-5', 2 x C-7), 58.17 (2 x C-7'), 11.94 (1 x Th-CH₃), 11.85 (1 x Th-CH₃) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -9.24, -9.29 ppm. HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 537.1033 [M+Na⁺], gef.: 537.1036. UV (HPLC): λ_{max} [nm]: 263. R_F-Wert = 0.13 (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Analytische HPLC: *t*_R = 11.7 min (Methode I).

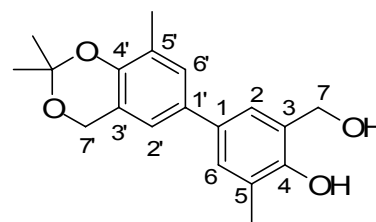
Synthese von 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol-4',7'-O-isopropylidenacetal **213**

Da in der dünnschichtchromatografische Kontrolle der bereits oben (S. 255) beschriebenen Entschützung von **198** zu **201** deutlich eine anteilige einfache Entschützung detektiert werden konnte, wurde hier, im Hinblick auf die Synthese weiterer potenzieller Referenzverbindungen, versucht, diese einfach geschützte Zwischenverbindung **213** gezielt herzustellen.

Dazu wurden 115 mg (0.324 mmol) 3,3'-Bis-(hydroxymethyl)-biphenyl-5,5'-dimethyl-4,4'-diol-bis-isopropylidenacetal **198** in 24 mL Acetonitril/Wasser (5:1 v/v) aufgenommen und durch vorsichtiges Erwärmen mit dem Heißluftfön gelöst. Zu der warmen Lösung wurden zwei Tropfen rauchende Salzsäure gegeben und noch einmal bis zum Sieden erhitzt. Nach 20 Minuten wurde mit destilliertem Wasser verdünnt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels einer Säulenchromatografie (Dichlormethan/Methanol (0–5%)).

Ausbeute: Es wurden 44 mg (0.14 mmol, 43%) **213** als farbloser Feststoff sowie 23 mg (65 μmol , 20%) **198** und 31 mg (0.12 mmol, 37%) **201** isoliert.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.50 (s, 1H, Phenol-OH), 7.24 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.17–7.15 (m, 1H, H-6'), 6.99 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.0 Hz, 1H, H-2), 6.92 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 4.86 (s, 2H, H-7), 4.85 (s, 2H, H-7'), 2.54 (s, 1H, Benzyl-OH), 2.30 (s, 3H, Aryl- CH_3), 2.22 (s, 3H, Aryl- CH_3'), 1.57 (s, 6H, Acetal- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 153.63 (C-4), 148.57 (C-4'), 132.65 (C-1, C-1'), 129.13 (C-6), 127.60 (C-6'), 126.56 (C-5'), 125.79 (C-5), 124.26 (C-3), 123.69 (C-2), 120.02 (C-2'), 119.02 (C-3'), 99.69 (Acetal-C), 65.14 (C-7), 61.21 (C-7'), 25.03 (Acetal- CH_3), 15.92 (Aryl- CH_3), 15.65 (Aryl- CH_3') ppm. MS (FAB, m/z): ber.: 314.2 [M], gef.: 314.2. IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3358, 2991, 2918, 2858, 1471, 1263, 1230, 1199, 1133, 878, 861. UV (Methanol): λ_{max} [nm]: 267, 210. R_f -Wert = 0.60 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v).



Die analytischen Daten von **198** und **201** entsprechenden den oben (S. 255) angegebenen.

9.3. Hydrolyseexperimente

Verwendete Puffer und Lösungen

50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen:

Es wurden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat in 100 mL Wasser (Milli-Q) gelöst. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls mittels verdünnter Phosphorsäure oder 1 M Natronlauge auf den benötigten Wert (pH = 6.8, pH = 7.3, pH = 7.6) eingestellt.

Interner Standard (AZT-Lösung):

Es wurden 5 mg AZT **1** in 500 μL Wasser (Milli-Q) gelöst.

pH-Wert abhängige chemische Hydrolyse

Die Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse wurden bei pH 7.3 und pH 7.6 ermittelt. Dazu wurde zunächst von jedem *cycloSal*-Nucleotid eine 50 mM Stammlösung in DMSO angesetzt. Von dieser Lösung wurden 11.4 μL (5.7 μL bei Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden)) mit 288.6 μL (294.3 μL bei Bis-(*cycloSal*-Nucleotiden)) Wasser (Milli-Q) versetzt, um so 1.9 mM (0.95 mM) Hydrolysestammlösungen zu erhalten. Bei sehr lipophilen Verbindungen wurde das Wasser durch DMSO ersetzt.

Nach Zugabe von 5 µL einer AZT-Lösung (als internem Standard) wurden zum Start der Hydrolyse 300 µL des 50 mM Phosphatpuffers hinzugegeben. Durch kurzes Durchmischen (Vortex) wurde die Hydrolyse gestartet und die Probe mit Hilfe des Thermomixers auf 37 °C temperiert. Beim Hydrolysestart und nach variierenden Zeiträumen wurden Aliquote (je 60 µL) aus dieser Lösung entnommen. Säureunempfindliche Proben wurden mit zwei Tropfen konzentrierter Essigsäure versetzt. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Säureempfindliche Proben wurden einzeln aufgetaut und sofort HPLC-analytisch untersucht. Von jeder Probe wurden 40 µL in die analytische RP-HPLC injiziert (von stark absorbierenden Verbindungen wurden nur 15-25 µL injiziert). Die Hydrolysestudien bei pH 7.3 wurden jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Auswertung der Kinetiken wurde für jede Probe der Quotient aus den Peakflächen des Prodrugs und des internen Standards gebildet und gegen die Hydrolysedauer (in Stunden) grafisch aufgetragen. Durch die experimentell bestimmten Messpunkte wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms exponentielle Ausgleichskurven gelegt, so dass sich Werte für die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k der Hydrolyse ergaben. Aus den so erhaltenen Werten für k konnten gemäß der Formel

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

die Hydrolyse-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet werden, da es sich auf Grund des großen Wasserüberschusses um Kinetiken *pseudo*-erster-Ordnung handelt. Dieser Verlauf wurde für alle *cycloSal*-Nucleotide angenommen.

Hydrolysen in humanem Zellextrakt

Es wurden 15 µL der 50 mM DMSO-Stammlösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids mit 235 µL DMSO auf eine Konzentration von 3.0 mM verdünnt. Für diastereomerenreine Verbindungen wurden die Untersuchungen auch mit 6.0 mM Lösungen (30 µL 50 mM Stammlösung + 220 µL DMSO) durchgeführt. Im Folgenden wurden 100 µL Zellextrakt (CEM/0, pH = 6.8) mit 20 µL einer 70 mM Magnesiumchlorid versetzt. Die Hydrolyse wurde dann durch Zugabe von 20 µL der jeweiligen Probenlösung und kurzes Durchmischen (Vortex) gestartet. Für jeden Messwert wurde eine separate Lösung angesetzt und bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Nach dem jeweils gewählten Hydrolysezeitraum wurde die Hydrolyse durch Zugabe

von 300 μL Methanol (bei säurestabilen Proben essigsaurer Methanol; 1 mL konz. Essigsäure pro 20 mL Methanol) gestoppt und die Probe für fünf Minuten bei 0 °C gelagert. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (Einmal-Filter; Schleicher & Schüll Spartan 13/30, 0.2 μM) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden mittels der analytischen RP-HPLC untersucht (Injektion: 90 μL). Zur Auswertung wurde für jede Probe der Quotient aus der Peakfläche des Prodrugs bei der jeweiligen Inkubationszeit und der Peakfläche des Prodrugs zum Start der Hydrolyse gebildet und gegen die Hydrolysedauer (in Stunden) grafisch aufgetragen. Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte wie bereits oben (S. 274) für die chemischen Hydrolysen beschrieben.

Hydrolysen in humanem Blutplasma

Die Hydrolysen in humanem Blutplasma erfolgten analog derer in humanem Zellextrakt. Anstelle des Zellextrakts wurde verdünntes Blutserum (5% in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6.8)) verwendet.

Hydrolysen im Kulturmedium

Die Hydrolysen im Kulturmedium erfolgten analog derer in humanem Zellextrakt. Anstelle des Zellextrakts wurde das Kulturmedium (RPMI-1640 (Firma Gibco, Produktnummer 21875)) mit 10% hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum verwendet.

³¹P-NMR-Hydrolysestudien

Es wurden ca. 7 μmol des jeweiligen *cyc/o*Sal-Nucleotids in 500 μL DMSO-*d*₆ gelöst und mit 500 μL eines 50 mM Imidazol/Salzsäure-Puffers (pH 7.3) versetzt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert und regelmäßig ³¹P-NMR-spektroskopisch untersucht.

9.4. Aufnahme der CD-Spektren

Zur Aufnahme der CD-Spektren wurde ca. 1 μmol des jeweiligen *cyc/oSal*-Nucleotids in 3 mL Methanol gelöst und diese Lösung bei Bedarf weiter verdünnt. Für unterschiedliche Diastereomere derselben Verbindung wurden immer gleiche Probenkonzentrationen verwendet.

9.5. Butyrylcholinesterase-Inhibitions-Assay

9.5.1. Eingesetzte Reagenzien

Das für diesen Assay verwendete humane Blutserum stammte für alle durchgeführten Messungen vom selben Einzelspender (Messungen mit humanem Blutserum aus einem Pool von fünf Patienten zeigten vergleichbare Werte). Es wurde sofort nach Erhalt aliquotiert (je 230 μL) und bei -80°C eingefroren. Für die Messungen wurden jeweils nur die gerade benötigten Mengen frisch aufgetaut.

Die für diesen Assay benötigten Lösungen konnten ursprünglich in einem Cholinesterase-Inhibitionstest-Kit der Firma Sigma (Produktnummer 420-MC) kommerziell erworben werden. Dieses Kit ist seit einigen Jahren nicht mehr am Markt erhältlich, sodass die verwendeten Lösungen selbst hergestellt werden mussten.

Natriumchlorid-Lösung (0.15 M + 0.2% Chloroform):

Es wurden 1.75 g Natriumchlorid in 200 mL Wasser (Milli-Q) gelöst und 0.4 mL Chloroform zugegeben.

m-Nitrophenol-Lösung in Phosphatpuffer (pH 7.8), 0.75 g/L:

Der 50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen (vgl. S. 273) wurde mit 1 M Natronlauge auf pH 7.8 eingestellt. Es wurden 150 mg *m*-Nitrophenol in 200 mL dieses Puffers gelöst.

Acetylcholinchlorid-Lösung:

Acetylcholinchlorid wurde von der Firma Sigma (Produktnummer: A2661) bezogen. Die für den Assay verwendete Lösung wurde durch das Lösen von 750 mg Acetylcholinchlorid in 5 mL Wasser (Milli-Q) hergestellt.

Alle Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und erst kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Die Acetylcholinchlorid-Lösung wurde unter diesen Bedingungen maximal zwei Wochen verwendet. Das feste Acetylcholinchlorid wurde im Tiefkühler gelagert.

Die verwendeten DMSO-Lösungen des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids wurden durch Verdünnen der auch für die HPLC-Analytik verwendeten 50 mM DMSO-Stammlösung und den daraus resultierenden weniger konzentrierten Lösungen nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt:

gewünschte Konzentration <i>cycloSal</i> -Nucleotid	Anteil Stammlösung (Konzentration)	Anteil DMSO	resultierende Inhibitor- konzentration
12.5 mM	8 µL (50 mM)	24 µL	250 µM
10.0 mM	6 µL (50 mM)	24 µL	200 µM
7.5 mM	8 µL (10 mM)	24 µL	150 µM
5.0 mM	3 µL (50 mM)	27 µL	100 µM
2.5 mM	5 µL (50 mM)	95 µL	50 µM
1.5 mM	30 µL (2.5 mM)	20 µL	30 µM
1.0 mM	20 µL (2.5 mM)	30 µL	20 µM
500 µM	10 µL (2.5 mM)	40 µL	10 µM
250 µM	5 µL (2.5 mM)	45 µL	5 µM
50 µM	10 µL (250 µM)	40 µL	1 µM
25 µM	5 µL (250 µM)	45 µL	0.5 µM
5 µM	1 µL (250 µM)	49 µL	0.1 µM

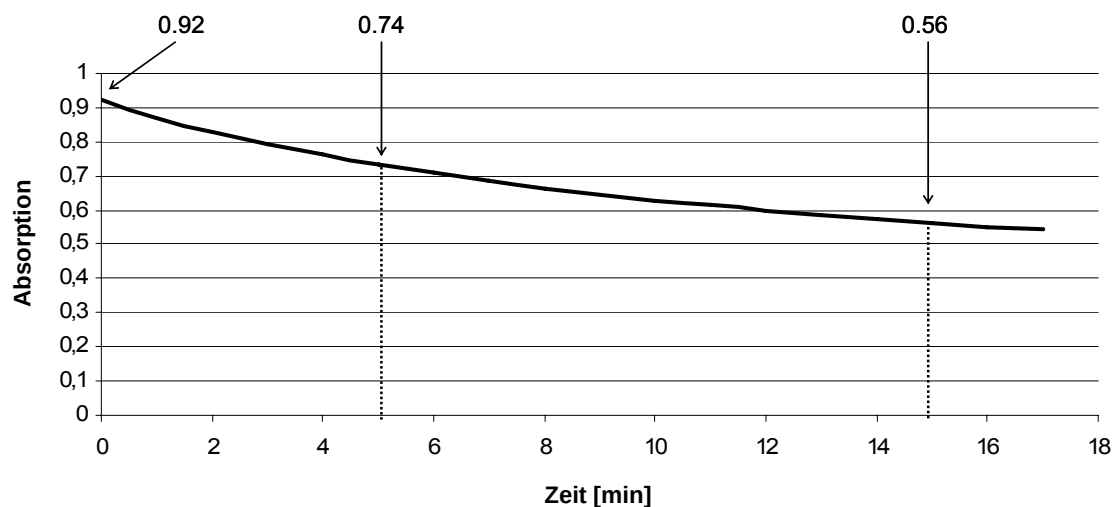
9.5.2. Durchführung und Auswertung

Es wurden 40 µL Natriumchlorid-Lösung, 370 µL *m*-Nitrophenol-Lösung, 40 µL Acetylcholinchlorid-Lösung, 20 µL einer Lösung des jeweiligen *cycloSal*-Nucleotids in DMSO sowie 430 µL Wasser (Milli-Q) in eine Quarzküvette pipettiert. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 µL des humanen Blutserums (als BChE-Quelle) und Durchmischen gestartet. Die Küvetten wurden sofort in das zuvor auf 25 °C temperierte UV-Spektrometer gestellt und die Extinktion bei 420 nm (Zweistrahlmodus, gegen Wasser als Referenz) in Abständen von einer Minute über einen Zeitraum von maximal 17 Minuten gemessen. Eine Messung mit reinem DMSO (täglich neu bestimmt) lieferte als Referenzwerte eine Abnahme der

Extinktion von etwa 0.19 nach fünf Minuten und von etwa 0.36 nach 15 Minuten Reaktionszeit.

Stellte die getestete Substanz einen Cholinesterase-Inhibitor dar, so wurde zur Auswertung die Abnahme der Extinktion bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration nach fünf bzw. 15 Minuten ermittelt. Diese Werte wurden grafisch gegen die Inhibitor-konzentration aufgetragen. Die so erhaltenen Kurven zeigten einen pseudolinearen Bereich, in dem mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes eine lineare Regression erfolgte. Aus den so erhaltenen Regressionsgeraden ließ sich der entsprechende IC_{50} -Wert, repräsentiert durch eine Extinktionsabnahme von etwa 0.095 nach fünf Minuten bzw. etwa 0.18 nach 15 Minuten, berechnen.

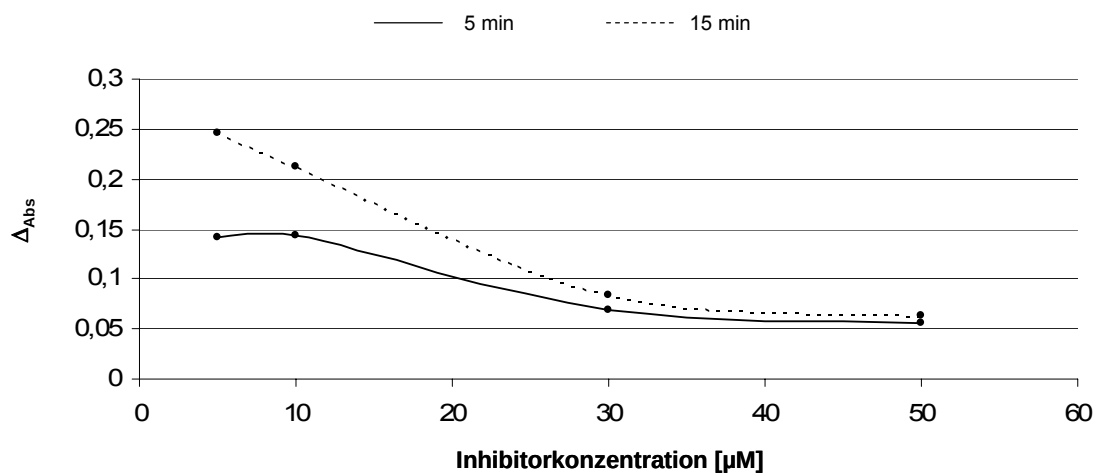
Das Vorgehen zur Berechnung wird im Folgenden beispielhaft an der Bestimmung des IC_{50} -Werts von **10-fast** gezeigt. Im nachfolgenden Diagramm ist der Verlauf der UV-Verfolgung der enzymatischen Reaktion ohne Inhibitor gezeigt (Referenzwert).



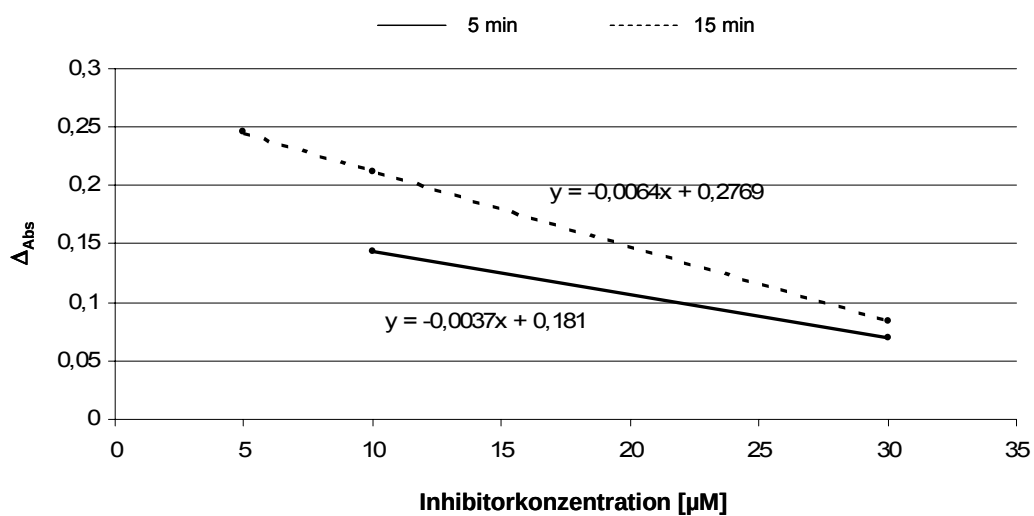
Wie zu erkennen ist, hat die Absorption in der nicht inhibierten Reaktion hier nach fünf Minuten um 0.18 und nach 15 Minuten um 0.36 abgenommen. Die Inhibitor-Konzentration würde also genau dann dem IC_{50} -Wert entsprechen, wenn die untersuchte Reaktion bei fünf Minuten eine Absorptionsabnahme von 0.09 bzw. von 0.18 nach 15 Minuten zeigt, die Reaktion also zu 50% inhibiert wird. Die experimentell ermittelten Absorptionsabnahmen bei unterschiedlichen Konzentrationen von **10-fast** sind in der Tabelle auf der nächsten Seite zusammengefasst. Diese wurden, wie oben für den Referenzwert gezeigt, aus der für jede Konzentration erhaltenen Kurve bestimmt.

Inhibitorkonzentration [μM]	Δ_{Abs} (5 min)	Δ_{Abs} (15 min)
50	0.055836	0.063879
30	0.069488	0.08381
10	0.1438	0.211588
5	0.141546	0.245434

Die Werte für Δ_{Abs} wurden dann grafisch gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Für beide Zeiten ist klar ein pseudolinerarer Bereich zu erkennen.



Durch die Messpunkte dieser Bereiche wurden dann lineare Ausgleichsgeraden gelegt und aus den resultierenden Geradengleichungen die jeweiligen IC_{50} -Werte berechnet.



Für y wurde dabei der jeweilige aus der Referenzmessung mit reinem DMSO bestimmte Wert, der einer Inhibition der enzymatischen Reaktion von 50% entspricht ($y = \Delta_{\text{Abs}}(\text{Referenz}) \cdot 0.5$), eingesetzt.

10. Literaturverzeichnis

- ¹ S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**², 390-393.
- ² F. Barre-Sinoussi, J. C. Cherman, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, T. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezin-Brun, C. Routioux, W. Rosenbaum, L. Montagnier, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient with risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* **1983**, 220, 868-871.
- ³ R. C. Gallo, P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, M. Popovic, Isolation of human T-cell leukaemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* **1983**, 220, 865-867.
- ⁴ F. Clavel, D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux and *et al.*, Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science* **1986**, 233, 343-346.
- ⁵ I. Sarkar, I. Hauber, J. Hauber, F. Buchholz, HIV-1 Proviral DNA Excision Using an Evolved Recombinase, *Science* **2007**, 316, 1912-1915.
- ⁶ S. Haggerty, M. Stevenson, Predominance of distinct viral genotypes in brain and lymph node compartments of HIV-1-infected individuals, *Viral Immunol.* **1991**, 4, 123-131.
- ⁷ <http://www.hiv.net/2010/buch/nw.htm> (Letzter Zugriff: 11.07.2008)
- ⁸ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organisation (WHO) 2007.
- ⁹ R. J. Pomerantz, D. L. Horn, Twenty years of therapy for HIV-1 infection, *Nature Medicine* **2003**, 9, 867-873.
- ¹⁰ <http://www.hiv.net/2010/haart/klassen.htm> (Letzter Zugriff: 12.07.2008)
- ¹¹ <http://www.hiv.net/2010/haart/womit.htm> (Letzter Zugriff: 12.07.2008)
- ¹² J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, Differential Patterns of intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent Anti-human Immunodeficiency Virus Compounds, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 6127-6133.
- ¹³ L. Stryer, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1999**⁴, 91-95.

- ¹⁴ J. P. Horwitz, J. Chua, M. A. Da Rooge, M. Noel, I. L. Klundt, The formation of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel β -elimination reaction, *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 205-211.
- ¹⁵ T.-S. Lin, R. F. Schinazi, W. H. Prusoff, Potent and selective in vitro activity of 3'-deoxythymidine-2'-ene (3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus, *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 2713-2718.
- ¹⁶ M. Baba, R. Pauwels, P. Herdewijn, E. De Clercq, J. Desmyter, M. Vandeputte, Both 2',3'-dideoxythymidine and its 2',3'-unsaturated derivative (2',3'-dideoxythymidine) are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 142, 128-134.
- ¹⁷ Y. Hamamoto, H. Nakashima, T. Matsui, A. Matsuda, T. Ueda, N. Yamamoto, Inhibitory effect of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides on infectivity, cytopathic effects, and replication of human immunodeficiency virus, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, 31, 907-910.
- ¹⁸ <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00486.html> (Letzter Zugriff: 30.07.2008)
- ¹⁹ 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.
- ²⁰ S. Freeman, K. C. Ross, Prodrug design for phosphates and phosphonates, *Progress Med. Chem.* **1997**, 34, 111-147.
- ²¹ C. Meier, Pro-Nucleotides – Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates, *Synlett* **1998**, 233-242.
- ²² D. Farquhar, D. N. Srivastava, N. J. Kattesch, P. P. Saunders, Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups, *J. Pharm. Sci.* **1983**, 72, 324-325.
- ²³ A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Khan, D. Furquhar, Decomposition Pathways of the Mono-(Pivaloyloxymethyl) and Bis-(Pivaloyloxymethyl) Esters of Azidothymidine-5'-monophosphate in Cell Extract and in Tissue-Culture Medium - An Application of the Online Isrp-Cleaning HPLC Technique, *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, 5, 91-98.
- ²⁴ M. N. Arimilli, C. U. Kim, J. Dougherty, A. Mulato, R. Oliyai, J. P. Shaw, K. C. Kundy, N. Bischofberger, Synthesis, in vitro biological evaluation and oral

- bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMEA) prodrugs, *Antiviral Chem. Chemother.* **1997**, *8*, 557-564.
- ²⁵ A. Fridland, L. Robbins, R. V. Srinivas, M. Arimilli, C. Kim, N. Bischofberger, Antiretroviral Activity and Metabolism of bis(POC)PMPA, An Oral Bioavailable Prodrug of PMPA, *Antiviral Res.* **1997**, *34*, A49.
- ²⁶ C. Perigaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Minireview: From the Pronucleotide Concept to the SATE Phosphate Protecting Groups, *Curr. Top. Med. Chem.* **1997**, *2*, 15-29.
- ²⁷ S. Peyrottes, D. Egron, I. Lefebvre, G. Gosselin, J.-L. Imbach, C. Perigaud, SATE pronucleotides approaches: an overview, *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.
- ²⁸ A. D. Briggs, M. Camplo, S. Freeman, J. Lundström, B. G. Pring, Acyloxymethyl and 4-acyloxybenzyl diester prodrugs of phosphonoformate, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14937-14950.
- ²⁹ S. Spruance, M. McKeough, I. Yanachkov, G. Wright, E. Kern, R. Sidwell, D. Smee, M. Yanachkova, A. Glazier, The Design, Chemistry, and Antiviral Activity of a Novel Group of Anti-Herpesvirus Prodrugs, *Antiviral Res.* **1996**, *30*, A44.
- ³⁰ 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.
- ³¹ 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.
- ³² M. D. Erion, K. R. Reddy, S. H. Boyer, M. C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R. H. Lemus, B. G. Ugarkar, T. J. Colby, J. Schanzer, P. D. van Poelje, Design, Synthesis, and Characterization of a Series of Cytochrome P₄₅₀ 3A-Activated Prodrugs (HepDirect Prodrugs) Useful for Targeting Phosph(on)ate-Based Drugs to the Liver, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.
- ³³ 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.

- ³⁴ C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, ADA-Bypass by lipophilic *cycloSal*-ddAMP Pro-Nucleotides A second Example of the Efficiency of the *cycloSal*-Concept, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **1997**, 7, 1577-1582.
- ³⁵ C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T) – A New Pro-Nucleotide Approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 99-104.
- ³⁶ C. Meier, *cycloSal* Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery – Chemistry Meets Biology, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.
- ³⁷ C. Ducho, *Dissertation* **2005**, Universität Hamburg.
- ³⁸ C. Meier, J. Renze, C. Ducho, J. Balzarini, *CycloSal*-d4TMP Pronucleotides - Structural Variations, Mechanistic Insights and Antiviral Activity, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 1109-1119.
- ³⁹ C. Meier, J. T. Renze, J. Balzarini, E. De Clercq, D4TMP delivery from 7-substituted *cycloSal*-d4TMPs, *Nucleosides Nucleotides* **2003**, 22, 825-827.
- ⁴⁰ C. Glöckler, *Diplomarbeit* **2005**, Universität Hamburg.
- ⁴¹ C. Ducho, S. Wendicke, U. Görbig, J. Balzarini, C. Meier, 3,5-Di-(*tert*-butyl)-6-fluoro-*cycloSal*-d4TMP - a pronucleotide with a considerably improved masking group, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4786-4791.
- ⁴² C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, *cycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1417-1427.
- ⁴³ C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, *cycloSal*-BVDUMP Pronucleotides - from an Antivirally Inactive Nucleoside Analogue to a Potential anti-EBV Active Drug, *ChemBioChem* **2001**, 2, 283-285.
- ⁴⁴ C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, *CycloSal*-BVDUMP pronucleotides: how to convert an antiviral-inactive nucleoside analogue into a bioactive compound against EBV, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5157-5172.
- ⁴⁵ C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini, *cycloSal*-Pro-Nucleotides (*cycloSal*-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.

- ⁴⁶ C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, E. De Clercq, J. Balzarini, *cycloSal-Pro-Nucleotides* of 2'-fluoro-*ara*- and 2'-fluoro-*ribo*-2',3'-dideoxyadenosine (F-*ara*- and F-*ribo*-ddA) as a strategy to bypass a metabolic blockade, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1615-1624.
- ⁴⁷ J. Balzarini, F. Haller-Meier, E. De Clercq, C. Meier, Antiviral activity of *cycloSal*igenyl prodrugs of acyclovir, carbovir and abacavir, *Antiviral Chem. Chemother.* **2001**, 12, 301-306.
- ⁴⁸ C. Meier, L. Habel, F. Haller-Meier, A. Lomp, M. Herderich, R. Klöcking, A. Meerbach, P. Wutzler, Chemistry and anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Evaluation of *cycloSal*-Nucleotides of acyclic Nucleoside Analogues, *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, 9, 389-402.
- ⁴⁹ T. Satoh, M. Hosokawa, The Mammalian Carboxylesterases: From Molecules to Functions, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1988**, 38, 257-288.
- ⁵⁰ C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinović, J. Balzarini, Second Generation of *cycloSal*-Pronucleotides with Esterase-Cleavable Sites: The „Lock-in“-Concept, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, 23, 89-115.
- ⁵¹ C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinović, J. Balzarini, „Lock-in“-*cycloSal*-pronucleotides - a new generation of chemical Trojan horses?, *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, 4, 383-394.
- ⁵² D. Vukadinović-Tenter, J. Balzarini, C. Meier, New Developments of the „Lock-in“ Modified *cycloSal*-d4TMPs, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2007**, 26, 1325-1328.
- ⁵³ C. Meier, C. Ducho, H. Jessen, D. Vukadinović-Tenter, J. Balzarini, Second-Generation *cycloSal*-d4TMP Pronucleotides Bearing Esterase-Cleavable Sites – The „Trapping“ Concept, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 197-206.
- ⁵⁴ H. J. Jessen, *Dissertation* **2008**, Universität Hamburg.
- ⁵⁵ N. Gisch, *Diplomarbeit* **2005**, Universität Hamburg.
- ⁵⁶ T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York **1999**³, 306-307.
- ⁵⁷ C. Ducho, U. Görbig, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Bis-*cycloSal*-d4T-monophosphates: Drugs That Deliver Two Molecules of Bioactive Nucleotides, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1335-1346.
- ⁵⁸ FDA, FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, *Chirality* **1992**, 4, 338-340.

- ⁵⁹ S. Lagnière, Current Regulatory Guidelines of Stereoisomeric Drugs: North American, European, and Japanese Point of View. In: H. Y. Aboul-Enein, I. W. Wainer (Ed.): *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Wiley-Interscience, New York, **1997**, 545-564.
- ⁶⁰ J. T. Renze, *Dissertation* **2002**, Universität Hamburg.
- ⁶¹ J. O. Thomann, *Dissertation* **2008**, Universität Hamburg.
- ⁶² S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1500-1502.
- ⁶³ N. U. Hofsløkken, L. Skattebøl, Convenient Method for the *ortho*-Formylation of Phenols, *Acta Chem. Scand.* **1999**, 53, 258-262.
- ⁶⁴ M. Cavazzini, A. Manfredi, F. Montanari, S. Quici, G. Pozzi, Asymmetric Epoxidation of Alkenes in Fluorinated Media, Catalyzed by Second-Generation Fluorous Chiral (Salen)manganese Complexes, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4639-4649.
- ⁶⁵ P. K. Chouhury, J. Almena, F. Foubelo, M. Yus, New homologation of 2-hydroxy and 2-mercapto benzylic alcohols, *Tetrahedron* **1997**, 53, 17373-17382.
- ⁶⁶ N. A. Saccomano, F. J. Vinick, B. K. Koe, J. A. Nielsen, W. M. Whalen, M. Meltz, D. Phillips, P. F. Thaddeo, S. Jung, D. S. Chapin, L. A. Lebel, L. L. Russo, D. A. Helweg, J. L. Johnson (Jr.), J. L. Ives, I. H. Williams, Calcium-Independent Phosphodiesterase Inhibitors as Putative Antidepressants: [3-(Bicycloalkoxy)-4-methoxyphenyl]-2-imidazolidinones, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 291-298.
- ⁶⁷ K. S. Kochhar, B. S. Bal, R. P. Deshpande, S. N. Rajadhyaksha, H. W. Pinnick, Conversion of Aldehydes into Geminal Diacetates, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1765-1767.
- ⁶⁸ G. Smitha, Ch. S. Reddy, A facile and efficient ZrCl₄ catalyzed conversion of aldehydes to geminal-diacetates and dipivalates and their cleavage, *Tetrahedron* **2003**, 59, 9571-9576.
- ⁶⁹ R. S. Cahn, Sir C. Ingold, V. Prelog, Spezifikation der molekularen Chiralität, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 413-447.
- ⁷⁰ C. Meier, cycloSal-Pronucleotides – Design of Chemical Trojan Horses, *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 219-234.
- ⁷¹ H. García, R. Martínez-Utrilla, M. A. Miranda, Photocyclization of enol acetates of o-acetoxyacetophenones to chromones, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1749-1750.

- ⁷² J. Eames, G. S. Coumbarides, M. J. Suggate, N. Weerasooriya, Investigations into the Regioselective C-Deuteration of Acyclic and Exocyclic Enolates, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 634-641.
- ⁷³ J. Goswami, N. Borthakur, A. Goswami, A water based method for hydroxymethylation of phenols and phenolic ketones, *J. Chem. Research (S)* **2003**, 200-203.
- ⁷⁴ D. J. Buchanan, D. J. Dixon, B. E. Looker, A Short Stereoselective Synthesis of (*R*)-Salmeterol, *Synlett* **2005**, 12, 1948-1950.
- ⁷⁵ T. Yanagi, K. Kikuchi, H. Takeuchi, T. Ishikawa, T. Nishimura, I. Yamamoto, The Practical Synthesis of a Uterine Relaxant, Bis(2-((2*S*)-2-((2*R*)-2-hydroxy-[4-hydroxy-3-(2-hydroxyethyl)-phenyl]ethyl)amino)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-7-yl]oxy)*N,N*-dimethylacetamide) Sulfate (KUR-1246), *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 1018-1023.
- ⁷⁶ R. C. Borthakur, N. Borthakur, R. C. Rastogi, Synthesis & Insecticidal Activity of Some New 3-Substituted 4-Hydroxyacetophenons, *Indian J. Chem.* **1984**, 23B, 244-248.
- ⁷⁷ I. Wender, H. Greenfield, S. Metlin, M. Orchin, Chemistry of the Oxo and Related Reactions. VI. Experiments with Meta- and Para-Substituted Benzyl Alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 4079-4083.
- ⁷⁸ D. T. Witiak, J. T. Loper, S. Ananthan, A. M. Almerico, V. L. Verhoef, J. A. Filppi, Mono and Bis(bioreductive) Alkylating Agents: Synthesis and Antitumor Activities in a B16 Melanoma Model, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1636-1642.
- ⁷⁹ US Pat. Appl. (**2006**), 2006058370.
- ⁸⁰ L. A. Woźniak, W. J. Stec, Oxidation in Organophosphorus Chemistry: Potassium Peroxymonosulphate, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2637-2640.
- ⁸¹ A. Murata, T. Wada, A novel linker for solid-phase synthesis cleavable under neutral conditions, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2147-2150.
- ⁸² W. T. Markiewicz, Tetraisopropyldisiloxane-1,3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'-and 5'-Hydroxy Functions of Nucleosides, *J. Chem. Research (S)* **1979**, 24-25.
- ⁸³ Y. Kita, Y. Takeda, K. Iio, K. Yokogawa, K. Takahashi, S. Akai, An Efficient Preparation of *peri*-Hydroxy Dihydroquinone Derivatives through a Pummerer-type Rearrangement of Silylene-protected *peri*-Hydroxy Aromatic Sulfoxides, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7545-7548.

- ⁸⁴ Y.-Q. Long, X.-H. Jiang, R. Dayam, T. Sanchez, R. Shoemaker, S. Sei, N. Neamati, Rational Design and Synthesis of Novel Dimeric Diketoacid-Containing Inhibitors of HIV-1 Integrase: Implication for Binding to Two Metal Ions on the Active Site of Integrase, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2561-2573.
- ⁸⁵ C. Meier, *cycloSal*-Pronucleotides – Design of the concept, chemistry, and antiviral activity. In: E. De Clercq (Ed.): *Advances in Antiviral Drug Design*, Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, **2004**, 147-213.
- ⁸⁶ T. Knispel, *Dissertation* **2001**, Universität Hamburg.
- ⁸⁷ C. Meier, C. Ducho, U. Görbig, R. Esnouf, J. Balzarini, Interaction of *cycloSal*-Pronucleotides with Cholinesterases from Different Origins. A Structur – Activity Relationship, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2839-2852.
- ⁸⁸ P. G. Layer, Cholinesterases during development of the avian nervous system, *Cell. Mol. Neurobiol.* **1991**, 11, 7-33.
- ⁸⁹ S. Darvesh, D. A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of Butyrylcholinesterase, *Nature Neuroscience* **2003**, 4, 131-138.
- ⁹⁰ N. H. Greig, T. Utsuki, Q. Yu, X. Zhu, H. W. Holloway, T. Perry, B. Lee, D. K. Ingram, D. K. Lahiri, A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase, *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, 17, 159-165.
- ⁹¹ C. Ducho, Diplomarbeit **2001**, Universität Hamburg.
- ⁹² F. Rappaport, J. Fischl, N. Pinto, An Improved Method for the Estimation of Cholinesterase Activity in Serum, *Clin. Chim. Acta* **1959**, 4, 227-230.
- ⁹³ P. Camps, X. Formosa, C. Galdeano, T. Gómez, D. Muñoz-Torrero, M. Scarpellini, E. Viayna, A. Badia, M. V. Clos, A. Camins, M. Pallàs, M. Bartolini, F. Mancini, V. Adrisano, J. Estelrich, M. Lizondo, A. Bidon-Chanal, F. J. Luque, Novel Donepezil-Based Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase-Induced β -Amyloid Aggregation, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3588-3598.
- ⁹⁴ Sicherheitsdatenblatt zum Produkt Sigma-1503.
- ⁹⁵ M. Lorey, Dissertation **1999**, Universität Würzburg.
- ⁹⁶ D. Vukadinović-Tenter, C. Meier, *unveröffentlichte Ergebnisse*.
- ⁹⁷ H. J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier, Synthesis and Properties of Fluorescent *cycloSal* Nucleotides Based on the Pyrimidine Nucleoside m⁵k and Its 2',3'-Dideoxy Analog dm⁵K, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 924-931.

- ⁹⁸ A. Rauk, L. C. Allen, K. Mislow, Pyrimidale Inversion, *Angew. Chem.* **1970**, 82, 453-488.
- ⁹⁹ D. Klomp, K. Djanashvili, N. C. Svennum, N. Chantapariyavat, C.-S. Wong, F. Vilela, T. Maschmeyer, J. A. Peters, U. Hanefeld, Combined epimerisation and acylation: Meerwein–Ponndorf–Verley–Oppenauer catalysts in action, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 483-489.
- ¹⁰⁰ J. Balzarini, C. McGuigan, Bicyclic pyrimidine nucleoside analogues (BCNAs) as highly selective and potent inhibitors of varicella-zoster virus replication, *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50, 5-9.

Anhang

Anhang I: Einkristallstrukturdaten der Verbindung (**R_P**)-63

Formel	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₈ P
M _r	476.41
Messtemperatur	153 (2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Strahlung	Mo Kα
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	P2 ₁
Zellparameter	a = 8.3061 (11) Å, α = 90° b = 15.864 (2) Å, β = 110.580 (2)° c = 9.0212 (12) Å, γ = 90°
Volumen	1112.8 (3) Å ³
Z	2
Berechnete Dichte	1.422 g/cm ³
Absorptionskoeffizient	0.176 mm ⁻¹
F(000)	500
Kristallgröße	0.3 mm x 0.2 mm x 0.2 mm
Kristallbeschreibung	farbloser Block
Theta range	1.2°-27°
Indices	h = -10→10, k = -20→20, l = -11→11
Zahl der Reflexe, gesamt [ω scan mode]	13064
Zahl der Reflexe, unabhängig	4914
Zahl der Reflexe, signifikant [I > 2σ (I)]	3458 [R (int) = 0.112]
Absorptionskorrektur	keine
Programm zur Strukturlösung	SHELXS-97
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F ²
Programm zur Verfeinerung	SHELXL-97
Zahl der verfeinerten Parameter	304
Goodness-of-fit F ²	0.92
Final R indices [I > 2σ (I)]	R ₁ = 0.053, ω R ₂ = 0.0977
R indices (all data)	R ₁ = 0.115, ω R ₂ = 0.1145
Flack Parameter	-0.29 (11)
Restelektronendichte	0.41 und -0.28 e Å ⁻³

Atomkoordinaten und isotrope bzw. äquivalente isotrope Auslenkparameter ($\text{\AA}^2$) aller Nicht-H-Atome (zusätzlich aufgeführt, da mit verfeinert: NH (H2O, in Wasserstoffbrückenbindung involviert))

<i>Atom</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U_{eq}/U_{iso}*</i>
P1	0.48996 (10)	0.40836 (5)	-0.11028 (9)	0.03061 (19)
O1	0.9471 (3)	0.26151 (18)	0.7262 (3)	0.0558 (7)
O2	0.4923 (3)	0.32896 (13)	-0.0010 (2)	0.0290 (5)
O3	0.6685 (3)	0.45251 (14)	-0.0280 (2)	0.0367 (5)
O4	0.4447 (3)	0.37936 (15)	-0.2723 (2)	0.0408 (6)
O5	0.3681 (2)	0.47646 (14)	-0.0828 (2)	0.0330 (5)
O6	0.1113 (2)	0.52530 (13)	0.0409 (2)	0.0325 (5)
O7	0.2084 (2)	0.49027 (15)	0.3962 (2)	0.0386 (5)
O8	0.7917 (3)	0.46974 (15)	0.5979 (2)	0.0369 (5)
N1	0.3616 (3)	0.55796 (16)	0.2641 (2)	0.0254 (5)
N2	0.5012 (3)	0.47782 (17)	0.4888 (3)	0.0292 (6)
H2O	0.4950	0.4434	0.5631	0.020 (8)*
C1	0.7728 (4)	0.35258 (19)	0.1875 (3)	0.0281 (7)
C2	0.6073 (4)	0.32056 (17)	0.1559 (3)	0.0248 (6)
C3	0.5546 (4)	0.27734 (19)	0.2660 (3)	0.0268 (6)
C4	0.6812 (4)	0.26839 (19)	0.4162 (3)	0.0308 (7)
C5	0.8483 (4)	0.2994 (2)	0.4525 (3)	0.0328 (7)
C6	0.8935 (4)	0.34195 (19)	0.3390 (4)	0.0317 (7)
C7	0.8127 (4)	0.3984 (2)	0.0578 (4)	0.0342 (7)
C8	0.9750 (5)	0.2902 (2)	0.6140 (4)	0.0443 (9)
C9	0.3730 (4)	0.2403 (2)	0.2246 (4)	0.0290 (7)
C10	0.3487 (5)	0.2024 (3)	0.3716 (4)	0.0547 (11)
C11	0.3454 (4)	0.1697 (2)	0.1017 (4)	0.0492 (10)
C12	0.2333 (4)	0.3072 (2)	0.1590 (4)	0.0431 (9)
C13	0.1985 (4)	0.59034 (19)	0.1469 (3)	0.0292 (7)
C14	0.2261 (4)	0.6580 (2)	0.0430 (4)	0.0298 (7)
C15	0.1732 (4)	0.6326 (2)	-0.1035 (4)	0.0323 (7)
C16	0.0993 (4)	0.5460 (2)	-0.1182 (3)	0.0322 (7)
C17	0.1849 (4)	0.4785 (2)	-0.1826 (3)	0.0344 (7)
C18	0.3466 (4)	0.50750 (19)	0.3834 (3)	0.0294 (7)
C19	0.6655 (4)	0.4965 (2)	0.4901 (3)	0.0284 (7)
C20	0.6701 (4)	0.54834 (19)	0.3593 (3)	0.0265 (7)
C21	0.5203 (3)	0.5748 (2)	0.2533 (3)	0.0262 (6)
C22	0.8417 (4)	0.5733 (2)	0.3527 (4)	0.0388 (8)

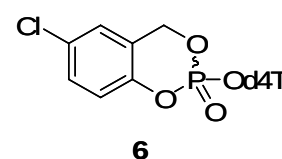
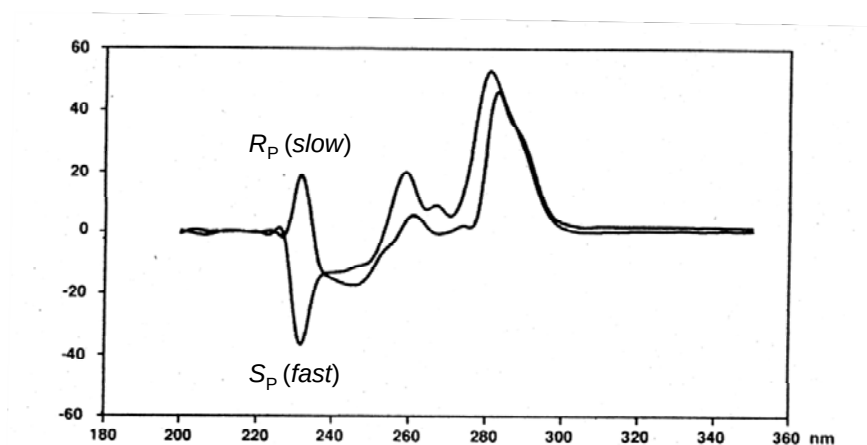
Die Kristallisation erfolgte mittels der Diffusionsmethode. Dazu wurden in einem Präparateglas 3 mg (6 mmol) (***R_P***)-**63** in 0.5 mL Ethylacetat gelöst und dieses in ein mit 5 mL Petrolether_{50/70} befülltes Rollrandglas (V = 50 mL) gestellt. Das Rollrandglas wurde dann fest verschlossen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stunden hatten sich farblose Kristalle gebildet.

Das „Crystal Information File“ (*.cif) der Verbindung (***R_P***)-**63** kann kostenfrei unter Bezugnahme auf die CCDC-Nummer 692174 im Internet unter <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/request/> angefordert werden.

Anhang II: CD-Spektren diastereomerenreiner *cyc/o*Sal-d4T-monophosphate

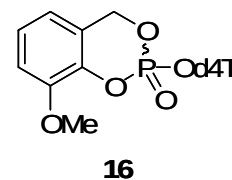
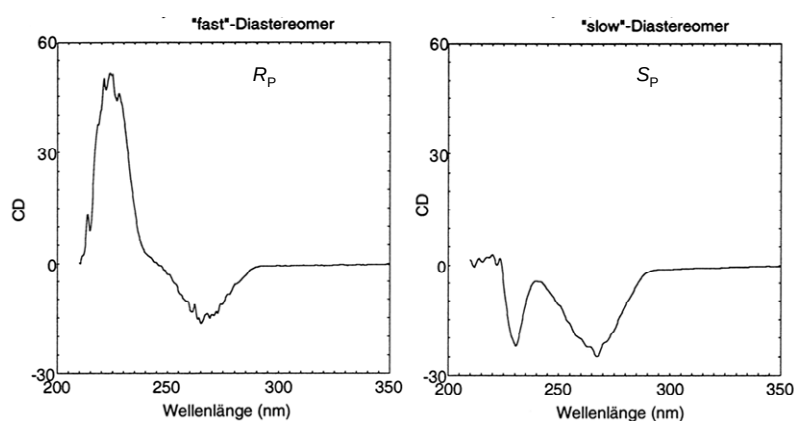
(Angegebene absolute Konfigurationen gemäß der in dieser Arbeit neu erfolgten Zuordnung (vgl. Tab. 19, S. 121))

CD-Spektren der Verbindung 6



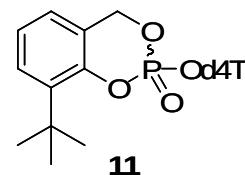
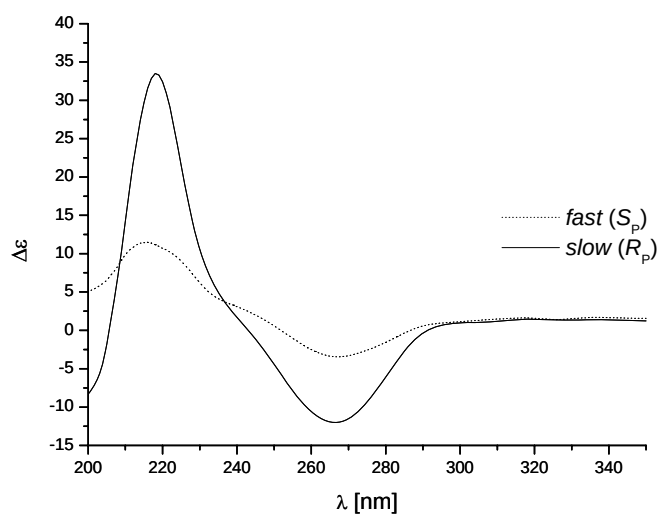
(verändert nach Referenz 85: Zuordnung der absoluten Konfiguration getauscht)

CD-Spektren der Verbindung 16

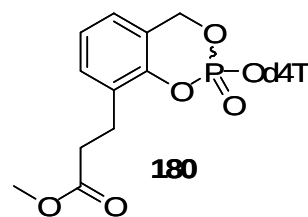
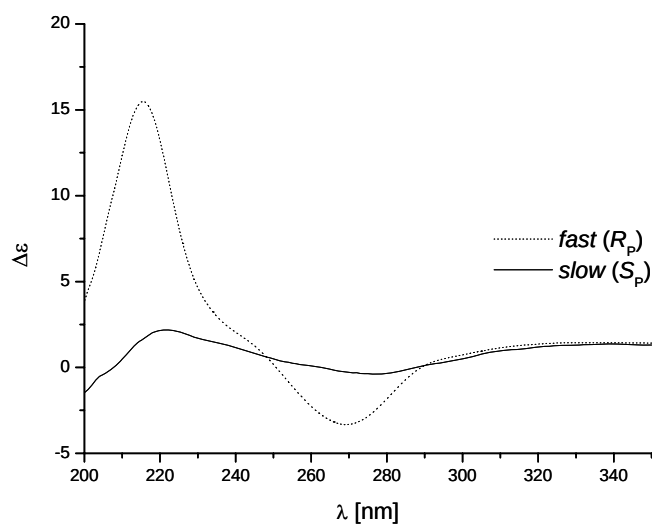


(verändert nach Referenz 95: veränderte Zuordnung der absoluten Konfiguration eingefügt)

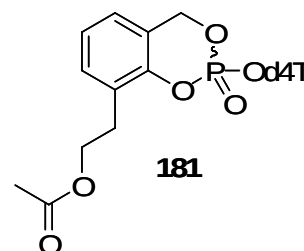
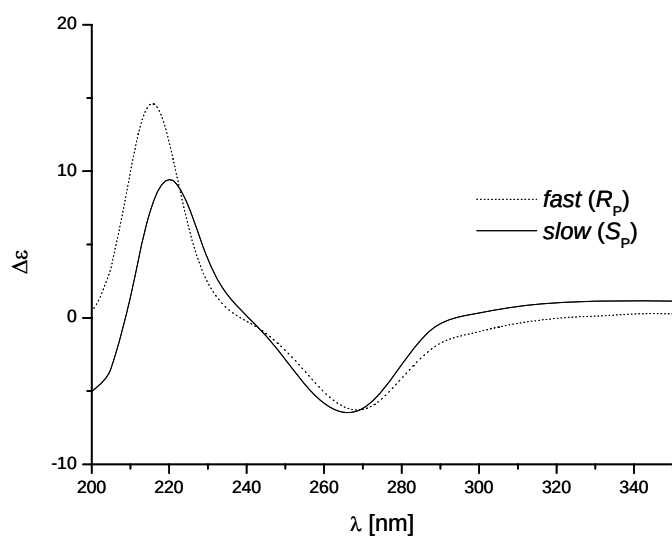
CD-Spektren der Verbindung 11



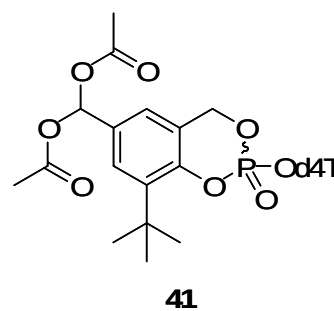
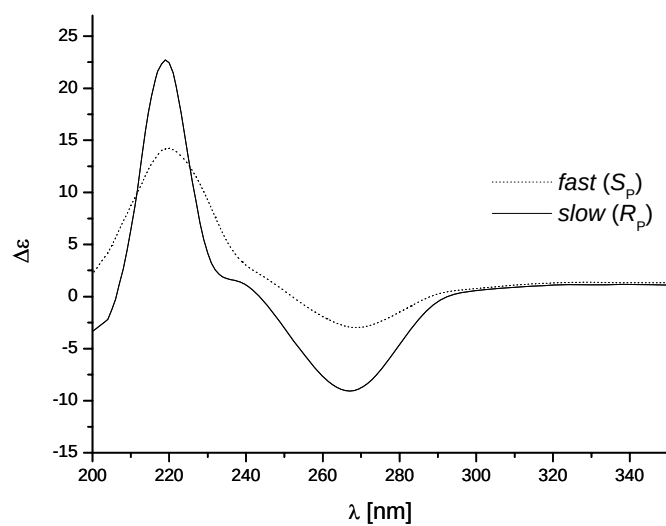
CD-Spektren der Verbindung 180



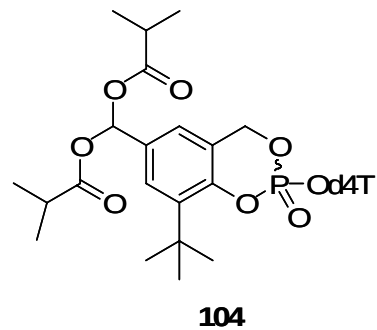
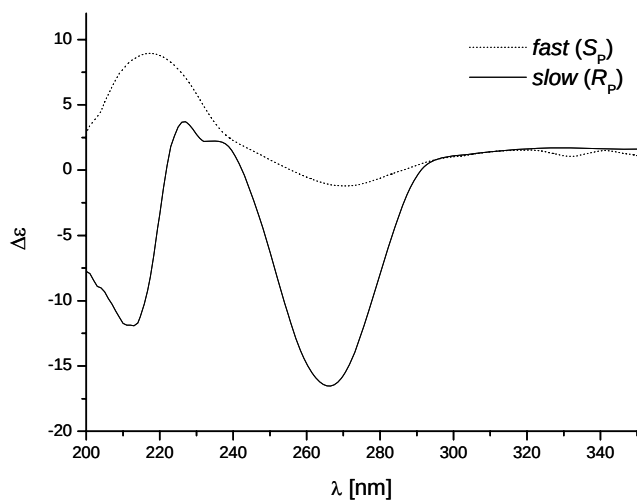
(in Acetonitril aufgenommen)

CD-Spektren der Verbindung 181

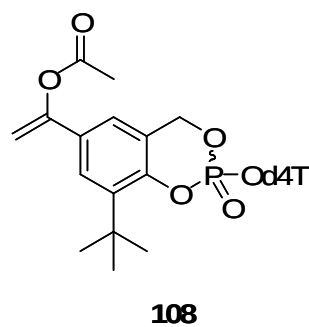
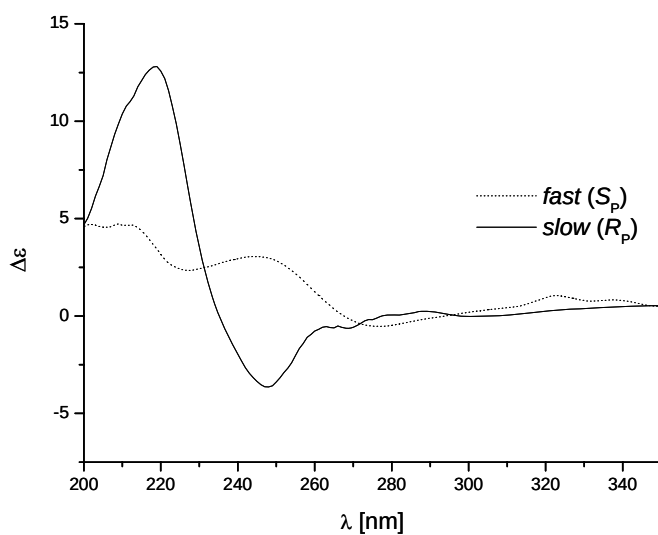
(in Acetonitril aufgenommen)

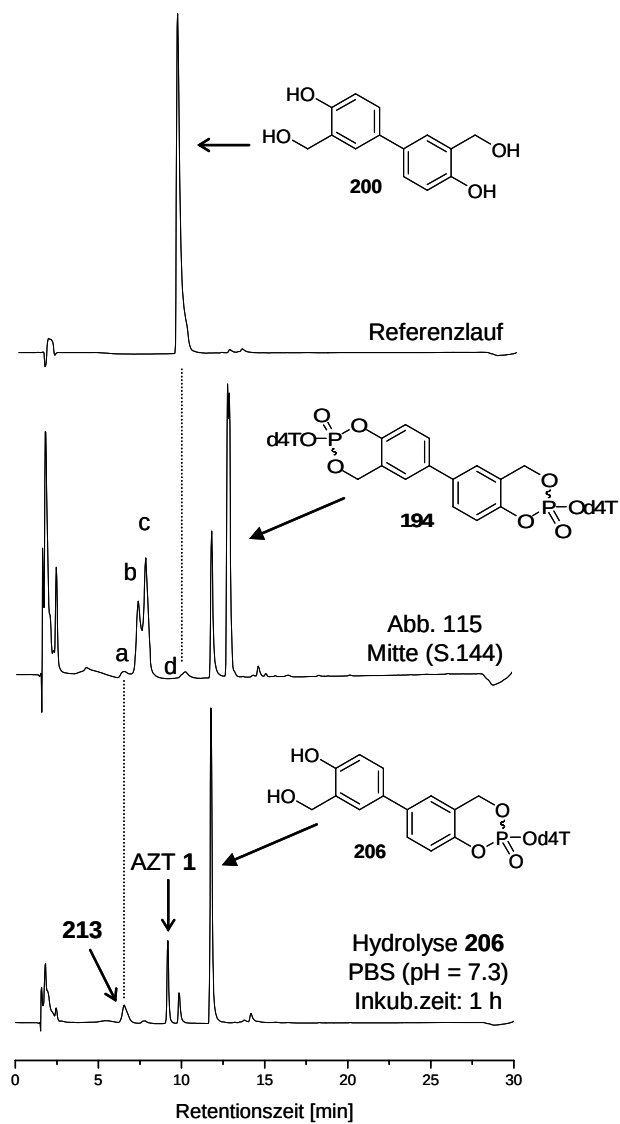
CD-Spektren der Verbindung 41

CD-Spektren der Verbindung 104



CD-Spektren der Verbindung 108



Anhang III: Ergänzende HPL-Chromatogramme zur Aufklärung des Hydrolysewegs von **194**

(Methode I (oben und Mitte ohne AZT 1))

Gefahrstoffliste

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.

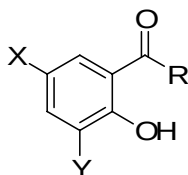
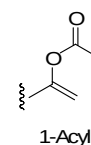
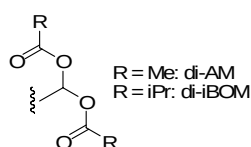
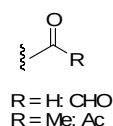
Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	Xi, F	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	Xn, F	11-20/21/22-36	16-36/37
Acetophenon	Xn	22-36	26
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	9-16-26-45
Acetylcholinchlorid	Xi	36/37/38	26-36/37
Aluminium(III)-chlorid	C	34	28-45-7/8
Benzaldehyd	Xn	22	24
Benzophenon	Xi, N	36/37/38-50/53	26-36-60-61
Brom	T+, C, N	26-35-50	26-45-61-7/9
<i>ortho</i> -Bromphenol	Xn, Xi	10-22-36/37/38	16-36/37/39
5-Bromsalicylaldehyd	Xi	36/37/38	26-36
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (5.5 M in <i>n</i> -Nonan)	C, O	7-10-20/21/22-34-53-65-67	14-3/7
<i>n</i> -Butyllithium (1.6 M in Hexan)	F, C, N	11-15-17-34-48/20-51/53-62-65-67	16-26-36/37/39-43.11-45-61-62
2- <i>tert</i> -Butylphenol	T	21/22-23-34	26-36/37/39-45
3- <i>tert</i> -Butylsalicylaldehyd	Xi	36/37/38	26-36
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Di- <i>tert</i> -butylsilylditriplat	C	34	26-36/37/39
2'-Desoxythymidin	–	–	22-24/25
Dichlormethan	Xn	40	23-24/25-36/37
Diethylether	Xn, F+	12-19-22-66-67	9-16-29-33
2,2-Dimethoxypropan	F, Xi	11-36	26

Substanz	Gefahren- symbole	R-Sätze	S-Sätze
DIPEA	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39- 45-60
<i>N,N</i> -Dimethylacetamid	T	61-20/21	53-45
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40- 66	9-16-36/37-46
DMAP	T	25-27-36/37/38	26-28.2-36/37/39- 45
DMF	T	61-20/21-36	53.1-45
Eisen(III)-acetylacetonat	Xn, Xi	22-36	26
Eisen(III)-chlorid	Xn	22-38-41	26-39
Essigsäure	C	10-35	26-36/37/39-45
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
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
<i>para</i> -Formaldehyd	C	20/22-34-40-43	26-36/37/39-45
4-Hydroxyacetophenon	Xn	22	22-24/25
Imidazol	C	22-34	26-36/37/39-45
Iod	Xn, N	20/21-50	23-25-61
Isobuttersäureanhydrid	C	34	26-36/37/39-45
Isopropenylacetat	F	11	7/9-16
Kalium	F, C	14/15-34	8-43-45
Kieselgel	–	–	22-24/25
Lithiumaluminiumhydrid	F	15	24/25-43.12-7/8
Magnesiumchlorid	–	–	22-24/35
Methanol	T, F	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
3-Methylsalicylsäure	Xn, Xi	22-37/38-41	26-36/39
Natrium	F, C	14/15-34	8-43.12-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natronlauge (1 M)	C	34	26-37/39-45
<i>m</i> -Nitrophenol	Xn, Xi	22-38-41	26-36/37
Oxone®	O, C	8-34	26-36/37/39-45

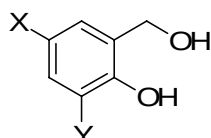
Substanz	Gefahren- symbole	R-Sätze	S-Sätze
Petrolether _{30/40}	F, Xn, N	11-38-48/20- 51/53-62-65-67	16-33-36/37-60- 62
Petrolether _{50/70}	Xn, F+	12-65	9-16-29-33-62
Phenylboronsäure	Xn	22	22-24/25
Phosphor(III)-chlorid	T+, C	14-26/28-29-35- 48/20	26-36/37/39-45- 7/8
Pyridin	Xn, F	11-20/21/22	26/28
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure	C	35	26-30-45
TBAF (1 M in THF)	F, C	11-19-34	16-26-36/37/39- 45
TBDMS-Cl	F, C	11-35-37	16-26-36/37/39- 45
TBDPS-Cl	C	14-34-37	26-36/37/39-45
THF	Xi, F	11-19-36/37	16-29-33
TIPDS-Cl	C	34	26-27-28- 36/37/39-45
Toluol	Xn, F	11-20	16-25-29-33
<i>para</i> -Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29- 36/37/39-45
Triethylamin-Trihydrofluorid	T+, C	26/27/28-35	7/9-26-36/37/39- 45
Wasserstoffperoxid (30%)	C	34	28.1-36/39-45
Zirkonium(IV)-chlorid	C	14-22-34	8-26-36/37/39-45

Verbindungsliste I

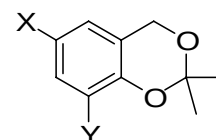
Substituenten:



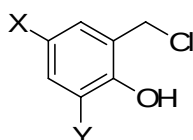
X = Br, Y = H, R = H: **42**
X = H, Y = Me, R = OH: **50**
X = H, Y = Me, R = OMe: **51**
X = Br, Y = Me, R = OMe: **52**
X = H, Y = *t*Bu, R = H: **54**
X = Br, Y = *t*Bu, R = H: **55**
X = Me, Y = H, R = OH: **89**
X = Me, Y = H, R = OMe: **90**
X = Me, Y = Br, R = OMe: **91**
X = *t*Bu, Y = H, R = H: **93**
X = *t*Bu, Y = Br, R = H: **94**



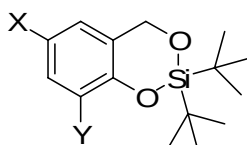
X = Br, Y = H: **43**
X = CHO, Y = H: **46**
X = Br, Y = Me: **48**
X = Br, Y = *t*Bu: **49**
X = CHO, Y = Me: **60**
X = CHO, Y = *t*Bu: **61**
X = H, Y = Br: **78**
X = Me, Y = Br: **79**
X = *t*Bu, Y = Br: **80**
X = H, Y = CHO: **81**
X = Me, Y = CHO: **82**
X = *t*Bu, Y = CHO: **83**
X = Ac, Y = H: **112**
X = Ac, Y = Me: **113**
X = Ac, Y = *t*Bu: **114**
X = 1-Acyl, Y = H: **118**
X = 1-Acyl, Y = Me: **119**
X = 1-Acyl, Y = *t*Bu: **120**
X = H, Y = *t*Bu: **148**
X = Me, Y = Ac: **164**



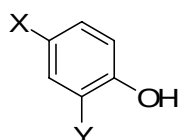
X = Br, Y = H: **44**
X = CHO, Y = H: **45**
X = Br, Y = Me: **56**
X = Br, Y = *t*Bu: **57**
X = CHO, Y = Me: **58**
X = CHO, Y = *t*Bu: **59**
X = H, Y = Br: **95**
X = Me, Y = Br: **96**
X = *t*Bu, Y = Br: **97**
X = H, Y = CHO: **98**
X = Me, Y = CHO: **99**
X = *t*Bu, Y = CHO: **100**



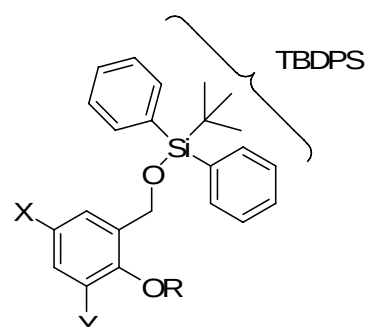
X = Ac, Y = H: **133**
X = Ac, Y = Me: **136**
X = Ac, Y = *t*Bu: **137**
X = Me, Y = Ac: **163**



X = H, Y = *t*Bu: **152**
X = Ac, Y = *t*Bu: **153**
X = Br, Y = *t*Bu: **154**
X = Ac, Y = Me: **155**
X = 1-Acyl, Y = Me: **158**
X = 1-Acyl, Y = *t*Bu: **159**
X = Me, Y = Ac: **165**
X = Me, Y = 1-Acyl: **166**
X = Br, Y = H: **210**



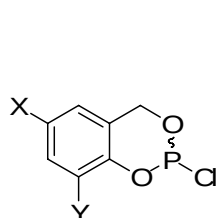
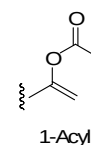
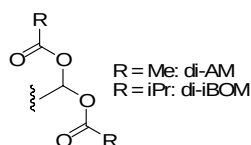
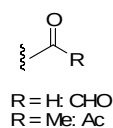
X = H, Y = *t*Bu: **53**
X = H, Y = Br: **87**
X = *t*Bu, Y = H: **92**
X = Ac, Y = H: **130**
X = Ac, Y = Me: **134**
X = Ac, Y = *t*Bu: **135**
X = Me, Y = Ac: **162**



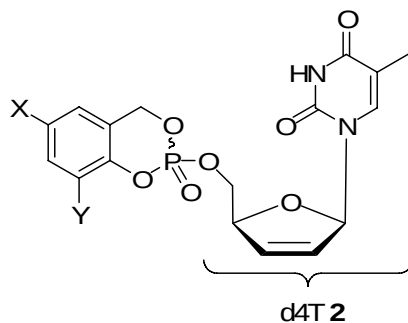
X = CHO, Y = H, R = TBDPS: **68**
X = di-iBOM, Y = H, R = TBDPS: **69**
X = Ac, Y = H, R = TBDPS: **141**
X = Ac, Y = Me, R = TBDPS: **142**
X = Ac, Y = *t*Bu, R = H: **144a**
X = 1-Acyl, Y = H, R = TBDPS: **156**
X = 1-Acyl, Y = Me, R = TBDPS: **157**

Verbindungsliste II

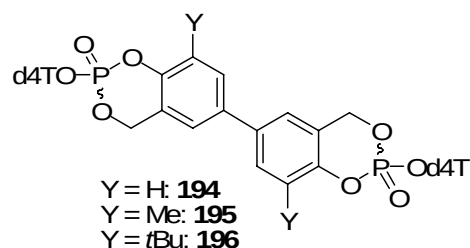
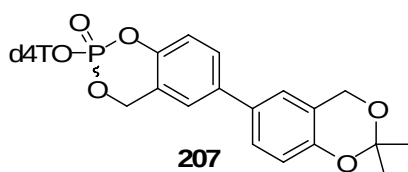
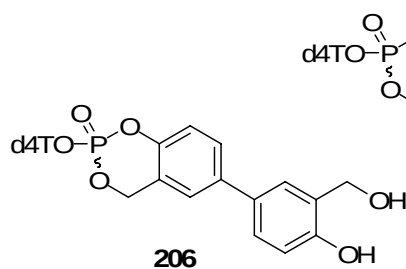
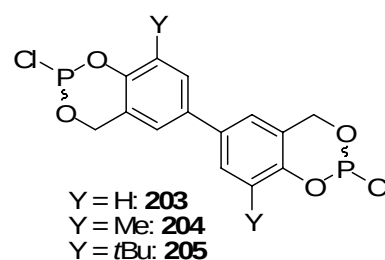
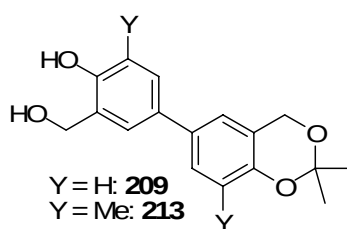
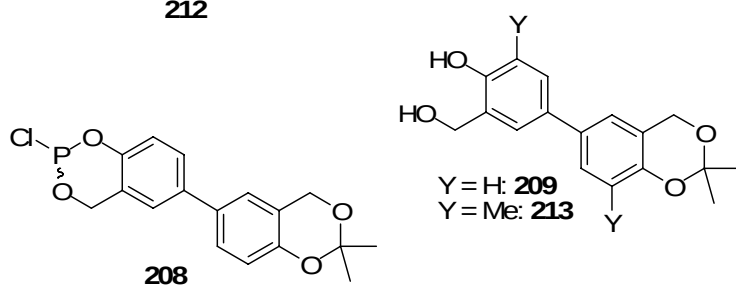
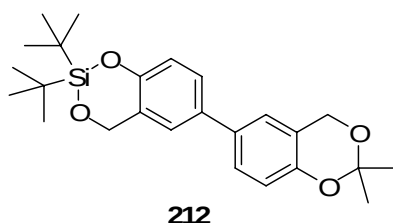
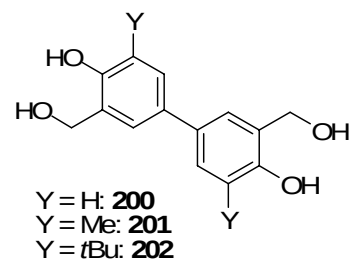
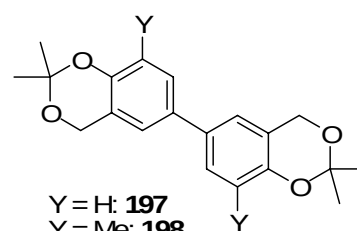
Substituenten:



X = CHO, Y = H: **47**
X = CHO, Y = Me: **64**
X = CHO, Y = *t*Bu: **65**
X = H, Y = CHO: **84**
X = Me, Y = CHO: **85**
X = *t*Bu, Y = CHO: **86**
X = Ac, Y = H: **115**
X = Ac, Y = Me: **116**
X = Ac, Y = *t*Bu: **117**
X = 1-Acyl, Y = H: **121**
X = 1-Acyl, Y = Me: **122**
X = 1-Acyl, Y = *t*Bu: **123**



X = di-AM, Y = H: **33**
X = CHO, Y = H: **34**
X = di-AM, Y = Me: **40**
X = di-AM, Y = *t*Bu: **41**
X = CHO, Y = Me: **62**
X = CHO, Y = *t*Bu: **63**
X = Me, Y = di-AM: **73**
X = *t*Bu, Y = di-AM: **74**
X = Me, Y = CHO: **76**
X = *t*Bu, Y = CHO: **77**
X = di-iBOM, Y = Me: **103**
X = di-iBOM, Y = *t*Bu: **104**
X = 1-Acyl, Y = H: **106**
X = 1-Acyl, Y = Me: **107**
X = 1-Acyl, Y = *t*Bu: **108**
X = Ac, Y = H: **109**
X = Ac, Y = Me: **110**
X = Ac, Y = *t*Bu: **111**



Lebenslauf

Dipl.-Chem. Nicolas Gisch

geboren am 16. April 1980 in Hamburg

verheiratet, ein Kind

Schulischer Werdegang

1986 - 1990 Grundschule Islandstraße, Hamburg

1990 - 1999 Gymnasium Meiendorf, Hamburg

06/1999 Abitur (Durchschnittsnote: 1.8)

Grundwehrdienst

09/1999 - 06/2000 Panzergrenadierbataillon 72, Hamburg-Fischbek

Studium

10/2000 - 07/2002 Grundstudium der Chemie, Universität Hamburg

07/2002 Vordiplom in Chemie (Gesamtnote: „sehr gut“)

07/2002 - 06/2005 Hauptstudium der Chemie, Universität Hamburg

12/2004 - 06/2005 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Meier,
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
Titel: „Enzymatisch aktivierbare *cyclo*Sal-Pronucleotide“

06/2005 Diplom in Chemie (Gesamtnote: „sehr gut“)

seit 07/2005 Doktorand in Organischer Chemie in der Arbeitsgruppe
von Prof. Dr. C. Meier, Universität Hamburg

Lehrerfahrung

seit 07/2005 Betreuung des „Grundpraktikums der Organischen
Chemie“ für Studierende des Hauptfaches Chemie oder
Lebensmittelchemie

Publikationsliste

- C. Ducho, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Novel *cycloSal* Nucleotides with Reduced Inhibitory Potency towards Human Butyrylcholinesterase, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2005**, 24, 519-522.
- N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Enzymatically Activated *cycloSal*-Pronucleotides, *Antiviral Res.* **2006**, 70, A60.
- N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, 5-Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMP – A Prototyp of Enzymatically Activated *cycloSal*-Pronucleotides, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **2007**, 26, 861-864.
- C. Ducho, U. Görbig, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Bis-*cycloSal*-d4T-monophosphates: Drugs That Deliver Two Molecules of Bioactive Nucleotides, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1335-1346.
- N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Enzymatically Activated *cycloSal*-d4T-monophosphates: The Third Generation of *cycloSal*-Pronucleotides, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1658-1667.
- N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Studies on Enzyme-Cleavable Dialkoxymethyl-*cycloSal*igenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphates, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6752-6760.
- N. Gisch, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*igenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphates, a Second Type of New, Enzymatically Activated *cycloSal*igenyl Pronucleotides, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 8115-8123.

Posterbeiträge

- N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, New Enzymatically Activated *cycloSal*-Pronucleotides, 19th International Conference on Antiviral Research, San Juan, Puerto Rico, 7-11 May 2006.
- N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Diacetoxymethyl-*cycloSal*-d4TMPs – Enzymatically activated *cycloSal*-Pronucleotides, 17th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland, 3-7 September 2006.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Synthese und Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung enzymatisch aktivierbarer *cycloSal*-Pronucleotide“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)