

Synthese und Hydrolyseverhalten von „lock-in“-modifizierten *cyclo*Sal-Pronukleotiden



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Manuel Ruppel

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der
Universität Hamburg

Hamburg, im Januar 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

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

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier am Institut für organische Chemie der Universität Hamburg in der Zeit von März 1999 bis Mai 2002 angefertigt.

Bei meinem „Doktorvater“, Herrn Prof. Dr. C. Meier, möchte ich mich für die Überlassung des sehr interessanten und abwechslungsreichen Themas bedanken. Daneben möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, eigenverantwortlich und selbständig Arbeiten und Experimentieren zu können, sowie für die hervorragenden, experimentellen Bedingungen, die Diskussionen und Anregungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Schwerpunkts-Praktikanten Daniel Klier, der mit seinem experimentellen Geschick zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinem Studienkollegen und guten Freund, Herrn Dipl.-Chem. Heiko Riehl, gilt ebenfalls mein ganz besonderer Dank, für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die stete Hilfsbereitschaft auch jenseits des chemischen Alltags.

Für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises recht herzlich bedanken.

Herrn Dr. V. Sinnwell und seinem Team vom Institut für organische Chemie der Universität Hamburg danke ich für die Messung der zahlreichen NMR-Spektren.

Frau Meiners vom Institut für organische Chemie der Universität Hamburg danke ich für die Messung der Massenspektren.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Freundin Joanna für die fortwährende Unterstützung in allen Phasen meiner Promotion bedanken.

Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	Absolut
ABC	Abacavir
Ac	Acetyl
ACV	Acyclovir
ADA	Adenosin-Desaminase
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin
BVDU	(<i>E</i>)-5-(Bromvinyl)-2'-desoxyuridin
BVU	(<i>E</i>)-5-(Bromvinyl)-uracil
CC ₅₀	cytotoxische Konzentration
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CEM	Lymphozyten-Zellstamm
CMV	Cytomegalie Virus
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett
DAD	Diode Array Detector
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undecen-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dd	Duplett von Dupletts
ddA	2',3'-Dideoxyadenosin
ddd	Duplett von Dupletts von Dupletts
ddl	2',3'-Dideoxyinosin
ddP	2',3'-Dideoxypurin
dG	2'-Desoxyguanosin
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin („Hünig Base“)
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

dP	2'-Desoxypurin
DP	Diphosphat
dT	2'-Desoxythymidin
dt	Duplett von Triplets
d4A	2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosin
d4T	2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin
EBV	Epstein-Barr Virus
E.C.	Enzyme Commission
EC ₅₀	effektive Konzentration
ESI	Elektrosprayionisierung
FAB	Fat Atom Bombardment
GCV	Ganciclovir
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSV	Herpes-Simplex Virus
IR	Infrarotspektroskopie
J	skalare Kern-Kern Kopplungskonstante (NMR)
konz.	konzentriert
m	Multiplett
M	Molar
MP	Monophosphat
MS	Massenspektroskopie
ν	Schwingungsfrequenz (IR)
NMP	Nukleosid-Monophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphate Brine Solution
PCV	Penciclovir
PI	Protease Inhibitor
Piv	Pivaloyl
PLE	Pig-Liver Esterase
POM	Pivaloyloxymethyl
POC	<i>iso</i> -Propyloxycarbonyloxymethyl
ppm	parts per million

Pr	Propanoyl
q	Quartett
R	Alkyl
R _f	Retentionsfaktor
RNS	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett
SATE	S-Acylthioethyl
Sdp.	Siedepunkt
sept	Septett
SI	Substrat-Index
t	Triplett
T	Thymin
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TFA	Trifluoressigsäure
td	Triplett von Dupletts
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidin-Kinase
TK ⁻	Thymidin-Kinase-defizient
TP	Triphosphat
t _R	Retentionszeit (HPLC)
U	Uracil
UV	Ultraviolett
VZV	Varicella-Zoster Virus
X	Substituent
ZE	Zellextrakt

1.	Einleitung	1
2.	Kenntnisstand	3
2.1.	HIV-Infektionszyklus	3
2.2.	HIV-Medikamente	4
2.2.1.	Entry-Inhibitoren	5
2.2.2.	Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI, NtRTI und NNRTI)	5
2.2.2.1.	Reverse Transkription	6
2.2.2.2.	Nicht-nukleosidanaloge RT-Inhibitoren (NNRTI)	7
2.2.3.	Protease-Inhibitoren	8
2.3.	Herpes-Infektionszyklus	9
2.4.	Das Pronukleotid-Konzept.....	12
2.4.1.	Das <i>cycloSal</i> -Konzept	16
2.4.2.	„lock-in“-modifizierte <i>cycloSal</i> -Pronukleotide.....	21
2.5.	Fluoreszierende Nukleosidanaloga	24
3.	Aufgabenstellung	28
4.	Resultate und Diskussion	31
4.1.	Synthese von Ester-substituierten Saligenylalkoholen	31
4.1.1.	Synthesestrategie zur Darstellung der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> - Pronukleotide.....	31
4.1.2.	Darstellung von Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionaten	33
4.1.3.	Darstellung der Alkyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionate	37
4.1.4.	Darstellung der 2-(2-Hydroxyphenyl)- und 2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl- alkanoate	38
4.1.5.	α -Hydroxymethylierung der unterschiedlichen Phenolderivate.....	42
4.2.	Synthese der fluoreszierenden Nukleoside	47
4.2.1.	Synthesestrategie zur Darstellung der fluoreszierenden Nukleoside 32 und 35	48
4.2.2.	Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68 nach Methode A	49

4.2.3.	Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68 nach Methode B	50
4.2.3.1.	Darstellung von 2- <i>N</i> ,3',5'- <i>O</i> -Tri- <i>iso</i> -butyryl-2'-desoxyguanosin 69	51
4.2.3.2.	Darstellung von 6-Thio-2- <i>N</i> ,3',5'- <i>O</i> -tri- <i>iso</i> -butyryl-2'-desoxyguanosin 70 ...	52
4.2.3.3.	Freisetzung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68	53
4.2.4.	Darstellung von 2-Amino-9- β -D-2'-desoxyribofuranosylpurin 32	54
4.2.5.	Synthesevorschlag für die Darstellung von 2-Amino-ddP 35	55
4.2.5.1.	Darstellung von 5'- <i>O</i> -Benzoyl-2'-desoxyguanosin 73	57
4.3.	Darstellung der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -NMPs	58
4.3.1.	Darstellung der Saligenylchlorphosphate 76a-o	58
4.3.2.	Darstellung der <i>cycloSal</i> -d4TMPs 77a-o	59
4.3.2.1.	Darstellung der 3- und 5-(2'-Carboxyethyl)- <i>cycloSal</i> -d4TMPs 27,41	61
4.3.3.	Darstellung der <i>cycloSal</i> -BVDUMPs 78a-l	62
4.3.3.1.	Darstellung der 3- und 5-(2'-Carboxyethyl)- <i>cycloSal</i> -BVDUMPs 39,43	64
4.3.3.2.	Darstellung von 5-(2'-Hydroxyethyl)- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 44	65
4.3.4.	Darstellung der <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMPs 79a-d	66
4.4.	Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -NMPs.....	68
4.4.1.	Hydrolyse in einer schwach basischen Phosphat-Pufferlösung.....	68
4.4.2.	Carboxyesterase (PLE) katalysierte Hydrolysestudien	76
4.4.3.	Hydrolysestudien in humanen Zellextrakten	95
4.4.4.	³¹ P-NMR-Hydrolysestudien	112
4.5.	Fluoreszenzuntersuchung der <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMP 79a-d	116
4.6.	Antivirale <i>in vitro</i> -Aktivität der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> - d4TMPs 77a-n , 27 und 41	118
5.	Zusammenfassung und Ausblick	123
5.1.	Zusammenfassung	123
5.2.	Summary.....	130
5.3.	Ausblick.....	131
6.	Experimenteller Teil	134
6.1.	Allgemeines	134

6.1.1.	Chromatographie.....	134
6.1.2.	Spektroskopie.....	135
6.1.3.	Geräte	136
6.1.4.	Lösungsmittel	136
6.1.5.	Verwendete Pufferlösungen	137
6.2.	Synthese der Saligenylalkohol-Derivate 58a-p und 62	138
6.2.1.	Darstellung von Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionaten 46a-c nach AAV-1	138
6.2.1.1.	Darstellung von Methyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46a	138
6.2.1.2.	Darstellung von Ethyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46b	139
6.2.1.3.	Darstellung von <i>iso</i> -Propyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46c	140
6.2.2.	Darstellung der Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionate 46d,e	140
6.2.2.1.	Versuch zur Darstellung von 3-[3-(2-Hydroxyphenyl)propanoyl]- 1,3-thiazolidin-2-thion 48	141
6.2.2.2.	Benzyl-Schätzung von 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure 47 zu 3-(2-Benzoyloxyphenyl)propionsäure 49	142
6.2.2.3.	Darstellung von 3-[3-(2-Benzoyloxyphenyl)propanoyl]-1,3-thiazolidin- 2-thion 50	143
6.2.2.4.	Darstellung von Benzyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46d	144
6.2.2.5.	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46e	145
6.2.3.	Synthesen der Alkyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionate 52a-d	146
6.2.3.1.	Darstellung von Methyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 52a	146
6.2.3.2.	Darstellung von Benzyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 52b	146
6.2.3.3.	Darstellung von <i>iso</i> -Propyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 52c	147
6.2.3.4.	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 52d	148
6.2.4.	Synthesen der 2-(2-Hydroxyphenyl)- und 2-(4-Hydroxyphenyl)- ethylalkanoate 55a-c nach AAV-2	149
6.2.4.1.	Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylacetat 55a	150
6.2.4.2.	Darstellung von 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylacetat 55b	151
6.2.4.3.	Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpropionat 55c	151
6.2.5.	Synthesen der 2-(2-Hydroxyphenyl)- und 2-(4-Hydroxyphenyl)- ethylpivalate 55d,e nach AAV-3	152
6.2.5.1.	Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpivalat 55d	153

6.2.5.2.	Darstellung von 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylpivalat 55e	154
6.2.6.	α -Hydroxymethylierung der Phenolderivate 46a-e , 52a-d , 55a-e , 59 und 60 nach AAV-4	155
6.2.6.1.	Darstellung von Methyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)- propionat 58a	157
6.2.6.2.	Darstellung von Ethyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)- propionat 58b	158
6.2.6.3.	Darstellung von <i>iso</i> -Propyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)- propionat 58c	160
6.2.6.4.	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)- propionat 58d	162
6.2.6.5.	Darstellung von Benzyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)- propionat 58e	163
6.2.6.6.	Darstellung von Methyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)- propionat 58f	165
6.2.6.7.	Darstellung von <i>iso</i> -Propyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)- propionat 58g	166
6.2.6.8.	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)- propionat 58h	168
6.2.6.9.	Darstellung von Benzyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)- propionat 58i	170
6.2.6.10.	Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)ethylacetat 58j	171
6.2.6.11.	Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)ethyl- propionat 58k	173
6.2.6.12.	Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)ethylpivalat 58l	175
6.2.6.13.	Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)ethylacetat 58m ..	176
6.2.6.14.	Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)ethylpivalat 58n ..	178
6.2.6.15.	Darstellung von 8-Hydroxymethyl-4-methylumbelliferon 58o	179
6.2.6.16.	Darstellung von 3-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)- propionsäure 58p	181
6.2.6.17.	Darstellung von 1-Hydroxymethylöstron 62	182
6.3.	Synthesen zu den fluoreszierenden Nucleosiden 32 und 35	184
6.3.1.	Synthese von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68 nach Methode A	184

6.3.2.	Synthese von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68 nach Methode B	185
6.3.2.1.	Darstellung von 2- <i>N</i> ,3',5'- <i>O</i> -Tri- <i>iso</i> -butyryl-2'-desoxyguanosin 69	185
6.3.2.2.	Darstellung von 6-Thio-2- <i>N</i> ,3',5'- <i>O</i> -tri- <i>iso</i> -butyryl-2'-desoxyguanosin 70 .	186
6.3.2.3.	Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68 durch Entschützung	187
6.3.3.	Darstellung von 2-Amino-9- β -D-2'-desoxyribofuranosylpurin 32	188
6.3.4.	Darstellung von 5'- <i>O</i> -Benzoyl-2'-desoxyguanosin 73	189
6.4.	Synthese der „lock-in“-modifizierten <i>cycloSal</i> -NMPs	190
6.4.1.	Synthesen der Saligenylchlorphosphate 76a-o nach AAV-5	190
6.4.2.	Synthesen der <i>cycloSal</i> -d4TMPs 77a-o nach AAV-6	192
6.4.2.1.	Darstellung von 3-MePr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77a	193
6.4.2.2.	Darstellung von 3-EtPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77b	194
6.4.2.3.	Darstellung von 3- <i>i</i> -PrPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77c	196
6.4.2.4.	Darstellung von 3- <i>t</i> -BuPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77d	197
6.4.2.5.	Darstellung von 3-BnPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77e	199
6.4.2.6.	Darstellung von 5-MePr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77f	200
6.4.2.7.	Darstellung von 5- <i>i</i> -PrPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77g	202
6.4.2.8.	Darstellung von 5- <i>t</i> -BuPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77h	203
6.4.2.9.	Darstellung von 5-BnPr- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77i	205
6.4.2.10.	Darstellung von 3-AcEt- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77j	206
6.4.2.11.	Darstellung von 3-PrEt- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77k	208
6.4.2.12.	Darstellung von 3-PivEt- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77l	209
6.4.2.13.	Darstellung von 5-AcEt- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77m	211
6.4.2.14.	Darstellung von 5-PivEt- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77n	212
6.4.2.15.	Darstellung von 8-Hydroxymethyl-4-methylumbelliferon- <i>cycloSal</i> -d4TMP 77o	214
6.4.3.	Synthesen der <i>cycloSal</i> -BVDUMPs 78a-l nach AAV-7	215
6.4.3.1.	Darstellung von 3-MePr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78a	216
6.4.3.2.	Darstellung von 3- <i>i</i> -PrPr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78b	218
6.4.3.3.	Darstellung von 3- <i>t</i> -BuPr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78c	219
6.4.3.4.	Darstellung von 3-BnPr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78d	221
6.4.3.5.	Darstellung von 5-MePr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78e	222
6.4.3.6.	Darstellung von 5- <i>i</i> -PrPr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78f	224
6.4.3.7.	Darstellung von 5- <i>t</i> -BuPr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78g	226

6.4.3.8.	Darstellung von 5-BnPr- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78h	227
6.4.3.9.	Darstellung von 3-AcEt- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78i	229
6.4.3.10.	Darstellung von 3-PivEt- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78j	230
6.4.3.11.	Darstellung von 5-AcEt- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78k	231
6.4.3.12.	Darstellung von 5-PivEt- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 78l	233
6.4.4.	Synthesen der <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMPs 79a-d nach AAV-8	234
6.4.4.1.	Darstellung von 3- <i>i</i> -PrPr- <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMP 79a	235
6.4.4.2.	Darstellung von 5-BnPr- <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMP 79b	237
6.4.4.3.	Darstellung von 3-PivEt- <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMP 79c	238
6.4.4.4.	Darstellung von 5-PivEt- <i>cycloSal</i> -2-Amino-dPMP 79d	240
6.4.5.	Hydrolyse der <i>tert</i> -Butylester 77d,h und 78c,g nach AAV-9	241
6.4.5.1.	Darstellung von 3-(2'-Carboxyethyl)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 27	242
6.4.5.2.	Darstellung von 5-(2'-Carboxyethyl)- <i>cycloSal</i> -d4TMP 41	243
6.4.5.3.	Darstellung von 3-(2'-Carboxyethyl)- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 39	245
6.4.5.4.	Darstellung von 5-(2'-Carboxyethyl)- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 43	246
6.4.6.	Darstellung von 5-(2'-Hydroxyethyl)- <i>cycloSal</i> -BVDUMP 44	248
6.5.	Hydrolyseexperimente	250
6.5.1.	Verwendete Puffer und Lösungen	250
6.5.2.	Bestimmung der chemischen Hydrolysehalbwertszeiten	250
6.5.3.	Carboxyesterase-Assay mittels PLE (EC 3.1.1.1).....	251
6.5.4.	Hydrolysekinetiken in humanen Zellextrakten.....	251
6.5.5.	³¹ P-NMR-Hydrolysestudien	252
6.6.	Gefahrstoffe	253
7.	Literaturverzeichnis	255
8.	Anhang.....	265
	Ausklapptafel 1	265
	Ausklapptafel 2	266
	Lebenslauf	267

1. Einleitung

Seit fast 20 Jahren wird intensiv zu HIV (Human Immunodeficiency Virus) geforscht. Allein im vergangenen Jahr wurden 300 Millionen Dollar in die Erforschung eines Impfstoffs gegen das Virus investiert. Warum gibt es aber immer noch keine Vakzine gegen das Virus? Die Antwort ist banal. HIV stellt Forscher vor nie gekannte Probleme.

Eine Schwierigkeit liegt darin, daß es zwei Arten des Virus – HIV-1 und HIV-2 – und von HIV-1 mindestens zehn Subspezies mit unterschiedlicher geographischer Verteilung gibt. Der Erreger scheint auch nahezu unerschöpflich in seiner Fähigkeit zu sein, wichtige Antigene zu ändern und so das Immunsystem „ins Leere“ laufen zu lassen. Daß hier mit konventionellen Impfstoffen, die darauf abzielen, Antikörper gegen fixe Antigene eines Erregers zu induzieren, nichts auszurichten ist, liegt auf der Hand.

Unbestritten ist mittlerweile, daß eine wirksame Vakzine gegen HIV sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunmechanismen aktivieren muß. Nur, welche Antikörper und welche Zellen die schlagkräftigste „Truppe“ darstellen, ist nach wie vor unbekannt. Das Problem vergrößert sich weiter, weil die derzeit eingesetzten Tiermodelle den Ablauf der Infektion im Menschen nur unzuverlässig widerspiegeln. Während Impfstudien an Affen mit dem Handicap belastet sind, daß die diversen Primaten sich besser gegen HIV als gegen den homologen Erreger SIV (der bei Affen ein AIDS-ähnliches Syndrom auslöst), immunisieren lassen, haben Versuche an Mäusen bislang meist falsche, hohe Erwartungen geweckt. Auch fehlt bis heute ein immunologischer Marker, an dem man die Schutzwirkung eines Impfstoffs mit einem simplen Test ablesen kann. Dies macht Impfstudien am Menschen schwierig, da der Wirksamkeitsnachweis bislang immer über quantitative Virusbestimmungen geführt werden muß, und das ist bekanntlich ein sehr aufwendiges Verfahren.

Vielversprechende Ansätze der Impfstoffentwicklung endeten bisher regelmäßig in einer Sackgasse. Da Menschen, die mit einem attenuierten HIV infiziert sind, viele Jahre kein AIDS entwickeln, hatte man lange Zeit Hoffnung auf eine abgeschwächte Lebendvakzine gesetzt. In der Tat schützten Virusvarianten, denen das nef-Gen fehlte (oder andere Genabschnitte, die für die Virusvermehrung notwendig sind), Affen in einem hohen Prozentsatz gegen HIV. Allerdings ist seit einigen Monaten klar, daß selbst Varianten, denen drei essentielle Genabschnitte fehlen, für die Geimpften

einer biologischen Zeitbombe gleichkommen: so belegten Ruth M. Ruprecht und ihre Kollegen vom Dana-Farber Cancer Institute in Boston, daß auch künstlich mutilierte HIV-Varianten Versuchstiere krankmachen und töten können¹. Die attenuierte Lebendvakzine ist damit wohl entgültig vom Tisch.

Auch die lange Zeit als vielversprechend angesehene gp120-DNS-Vakzine entpuppt sich mehr und mehr als zeitraubende Tüftelei, denn als Geniestreich. Die Baupläne von nicht weniger als 20000 Varianten des gp120-Moleküls will beispielsweise Michael Schreier vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenkrankheiten in Hamburg über einen DNS-Impfstoff in den Körper bugsieren¹. Andere Wissenschaftler wollen außer virusspezifischen Informationen die Gene für bestimmte Zytokine mit in die synthetische Vakzine einbauen. Die nahezu unbegrenzte Zahl von Komponenten solcher Vakzine verlangen entsprechend umfangreiche Untersuchungen zur Wirksamkeit in tierexperimentellen Studien und lassen die Einführung solcher Impfstoffe also in weite Ferne rücken.

Eine einzige Vakzine befindet sich derzeit in der Phase III und zwei Impfstoffe in Phase IIa oder b der klinischen Erprobung. Etwa 30 weitere Substanzen befinden sich zur Zeit in der „Forschungspipeline“. Das ist bei 15 Jahren HIV-Impfstoffforschung nicht gerade berauschend. Diese ganze Problematik macht deutlich, daß die Erwartung des früheren US-amerikanischen Präsidenten Bill Clinton, bis zum Jahre 2007 endlich einen Impfstoff gegen das HI-Virus einsatzbereit zu haben, unrealistisch ist und daß der Erforschung und Entwicklung neuer und besserer Therapeutika im Kampf gegen HIV weiterhin ein hoher Stellenwert eingeräumt werden muß.

Mittlerweile stehen mehr als ein Dutzend wirksamer Medikamente für die HIV-Therapie zur Verfügung. Allen Wirkstoffen ist gemein, daß sie versuchen, Schwachstellen auszunutzen, die vor allem bei der Replikation des HI-Virus zu finden sind. Im folgenden Kapitel soll deshalb genauer auf diesen Replikationsmechanismus, die möglichen Eingriffe und die dafür entwickelten Wirkstoffe eingegangen werden.

2. Kenntnisstand

2.1. HIV-Infektionszyklus

Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren, zu denen neben HIV auch einige Tumoviren zählen, d. h. die genetische Information liegt in Form von einzelsträngiger RNS vor.

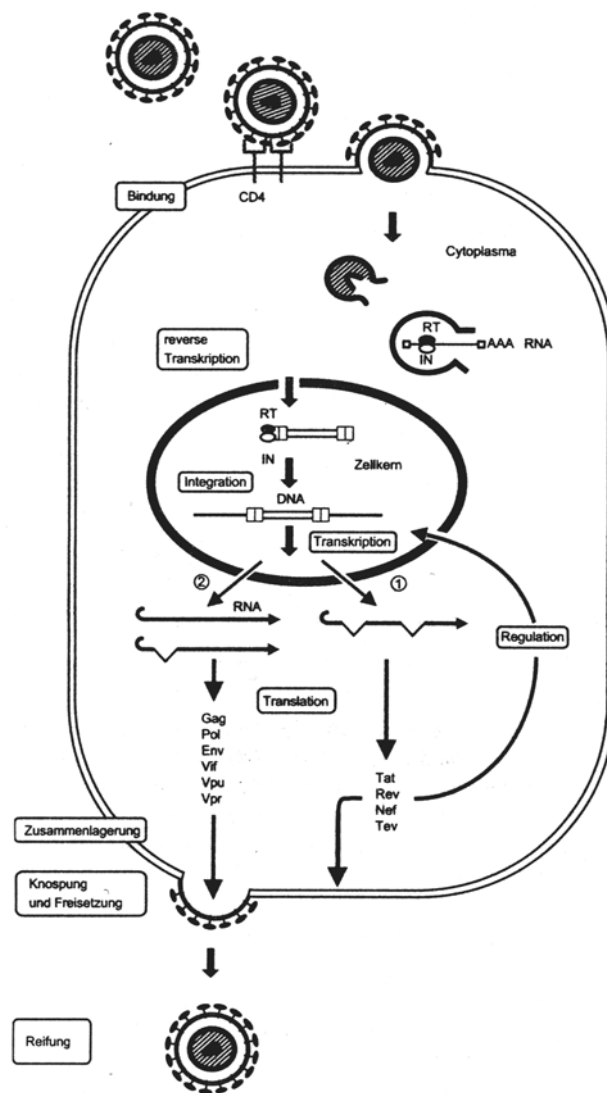


Abbildung 1 HIV-Infektionszyklus²

HIV infiziert menschliche Zellen (z. B. T-Helferzellen des Immunsystems), die an ihrer Oberfläche Proteine tragen, die CD4 genannt werden. HIV trägt seinerseits in seiner Hülle gp120 genannte Proteine und diese passen auf die CD4-Moleküle wie ein Schlüssel zum Schloß. Die CD4-Moleküle sind für HIV die wichtigste Andockstelle.

Bei der Infektion einer Zelle spielen jedoch weitere Proteine auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle; diese werden als Co-Rezeptoren oder Hilfsschlösser bezeichnet. Erst dieser intensive Kontakt zwischen Virus und Zelle führt dazu, daß das virale Genom (HIV-RNS) und drei virale Enzyme durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran in die Zelle eingeschleust werden (siehe Abbildung 1, S. 3). Um nun in die Zell-DNS integriert werden zu können, muß die virale Erbinformation in eine für die Zelle verständliche Sprache umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe eines der vom Virus mitgebrachten Enzyme, einem RNS-DNS-Übersetzungsprogramm, das als Reverse Transkriptase bezeichnet wird. Das virale Genom liegt daraufhin als einsträngige HIV-DNS vor. Es wird verdoppelt und – mit Hilfe eines weiteren viralen Enzyms, der Integrase – als sogenanntes Provirus ins Erbgut der Zelle eingespleißt. Diese, in das zelluläre Erbgut integrierte virale Erbinformation funktioniert nun wie Zell-Erbgut und steuert die zellulären Mechanismen zur eigenen Vermehrung: Die Zelle produziert einerseits HIV-RNS, virale Enzyme und andere Bestandteile, die an der Oberfläche der Zelle zu neuen Viren zusammengesetzt werden. Bei einem Teil dieser viralen Bestandteile handelt es sich zunächst um lange, funktionsuntüchtige Proteinfäden. Damit diese in die Hülle passen bzw. damit infektiöse Viren entstehen können, müssen sie von einer viralen Proteinschere (dem dritten Enzym, der HIV-Protease) in funktionierende Proteinstücke geschnitten werden. Man schätzt, daß eine infizierte Zelle etwa 200 Viren produziert und täglich etwa 10-100 Milliarden neue Viren entstehen.

2.2. HIV-Medikamente

Medikamente gegen HIV hemmen die Entwicklung des Virus in verschiedenen Phasen seines Infektionszyklus. Aufgrund der Phase, in der sie den Infektionszyklus unterbrechen, werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt und aufgrund der Art und Weise wie sie dies tun, lassen sie sich weiter unterscheiden. In klinischen Studien bzw. zur Behandlung zugelassen sind Medikamente der Klasse der Entry-Inhibitoren, Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RT-Hemmer) und die Protease-Inhibitoren (PI). Bei den Reverse-Transkriptase-Inhibitoren lassen sich Nukleosidanaloga (NRTI), Nukleotidanaloga (NtRTI) und Nicht-Nukleosidanaloga (NNRTI) unterscheiden.

2.2.1. Entry-Inhibitoren

Die Medikamente dieser Substanzklasse verhindern das Eindringen bzw. Verschmelzen von HIV mit den Wirtszellen. Dies bedeutet, daß Zellen, die bereits HIV-RNS oder den Provirus in sich tragen, durch eine Behandlung mit Entry-Inhibitoren nicht an der Produktion neuer Viren gehindert werden können. Entry-Inhibitoren unterscheiden sich aufgrund ihres Wirkmechanismus. Der zur Zeit bekannteste Entry-Inhibitor ist der Fusionsinhibitor Enfuvirtide (T-20/Ro 29-9800; Hersteller Trimeris/Roche). Enfuvirtide verhindert die Fusion von HIV mit der Targetzelle durch die Blockierung einer Konformationsänderung des Virus-Hüllenproteins gp41. Fusionsinhibitoren werden nur zusammen mit Substanzen der anderen Medikamentenklassen eingesetzt, da sich bei einer Monotherapie rasch Resistenzen entwickelten³.

2.2.2. Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI, NtRTI und NNRTI)

Von den möglichen Angriffspunkten ist vor allem die **R**reverse **T**ranskriptase (RT) von besonderem Interesse, weil dieses Enzym für Retroviren essentiell ist, für die Wirtszelle aber keinerlei Bedeutung hat. Durch die Hemmung der Transkription von RNS zu komplementärer DNS läßt sich verhindern, daß Viruserbmaterial in das Erbgut der Zelle eingebaut wird. Dies bedeutet, daß neue Zellen vor einer Infektion geschützt werden. Dies bedeutet aber auch, daß Zellen, die HIV bereits als Provirus in sich tragen, durch eine Behandlung mit RT-Hemmern nicht an der Produktion neuer Viren gehindert werden. Dennoch sind RT-Hemmer selektive Therapeutika, deren konzeptionelle Vorteile im nachfolgenden Kapitel 2.2.2.1. erläutert werden sollen.

Hemmstoffe der RT waren die ersten AIDS-Medikamente und sind bis heute am weitesten in der Entwicklung fortgeschritten. NRTIs, NtRTIs und NNRTIs unterscheiden sich voneinander durch die Art wie sie die RT an der Transkription hindern. NRTIs und NtRTIs lassen sich von natürlichen Nukleosiden, wie 2'-Desoxythymidin (dT) **1** ableiten, wie man in Abbildung 2 erkennen kann. Das älteste Präparat AZT **2** (3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin; Zidovudin, Retrovir[®]) kann als Prototyp der Medikamentengruppe bezeichnet werden⁴. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind ddl **3** (2',3'-Didesoxyinosin; Didanosin, Videx[®]), ddC **4** (2',3'-Didesoxycytidin; Zalcitabin, Hivid Roche[®]), 3TC **5** (L-2',3'-Didesoxy-3'-thiacytin; Lamivudin, Eпивir[®]), ABC **6** (Abacavir, Ziagen[®]) und d4T **7** (2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin; Stavudin, Zerit[®]), die alle als kompetitive Inhibitoren agieren.

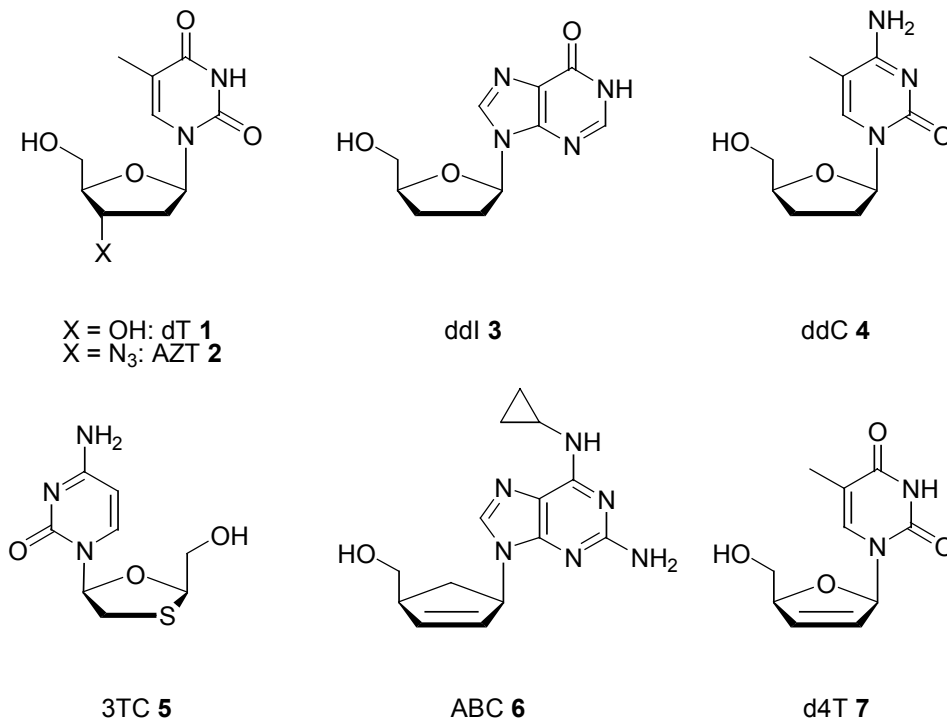


Abbildung 2 Beispiele für NRTIs und das natürliche Nucleosid dT **1**

Den genannten Präparaten ist gemein, daß die 3'-Hydroxylgruppe am 2'-Desoxyribose ring des Nucleosides entfernt (z. B. ddl **3**, ddC **4**, 3TC **5**, ABC **6** und d4T **7**), oder durch eine andere Gruppe (wie Azid bei AZT **2**) ersetzt wurde. Um die Auswirkungen dieser Modifizierung besser verstehen zu können, empfiehlt es sich, einen genaueren Blick auf die Reverse Transkription zu werfen.

2.2.2.1. Reverse Transkription

Wie schon unter 2.1. erwähnt wurde, muß das RNS-Erbmaterial des Retrovirus zur Reproduktion zuerst in eine DNS-Kopie übersetzt werden. Dafür steht dem Virus die Reverse Transkriptase zur Verfügung. Dieses Enzym benötigt einzelsträngige RNS als Matrize. An diese Vorlage synthetisiert sie, ausgehend von einer kurzen Startsequenz (Primer), den komplementären DNS-Strang und es entsteht ein RNS/DNS-Hybrid. Substrate der RT sind die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Bei jedem Schritt wird zunächst durch spezifische Basenpaarung das zur jeweiligen Base des Matrizenstranges komplementäre Nucleotid gebunden. Dann greift die 3'-Hydroxygruppe des zuletzt eingebauten Nucleotids nukleophil den α -Phosphatrest des nächsten Triphosphates an. Durch den anschließenden Austritt von Pyrophosphat kommt es zur Knüpfung einer neuen Phosphatdiesterbrücke (Abbildung 3). Nach Verschiebung des Enzyms zur nächsten Ba-

se auf der Matrizen-RNS wiederholen sich die Schritte. Die Reverse Transkriptase ist somit eine 5'→3'-Polymerase⁵.

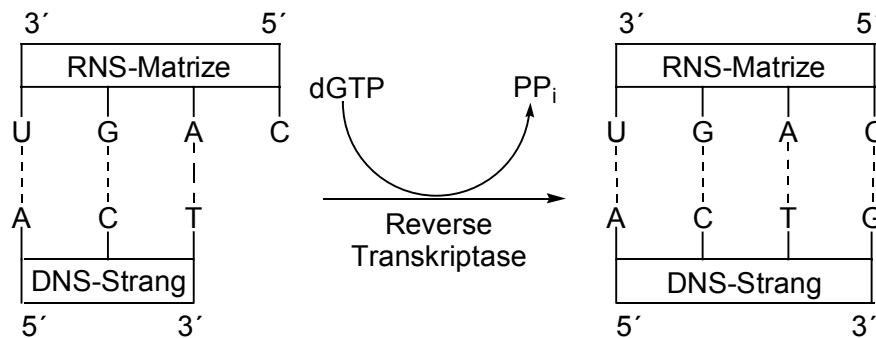


Abbildung 3 Bildung eines RNS/DNS-Hybrids durch RT

Wird jetzt eines der Nucleosidanaloga nach Aktivierung zum entsprechenden Triphosphat (z. B. d4TTP) von der RT nicht als Fremdkörper erkannt und in den entstehenden DNS-Strang eingebaut, kann durch die fehlende 3'-Hydroxygruppe keine weitere Elongation in 3'-Richtung mehr erfolgen.

Hinzu kommt, daß sich die RT keiner Korrekturlesefunktion bedient, wie sie die zelleigene DNS-Polymerase nutzt. Dadurch können irrtümlich eingebaute Bausteine nicht wieder herausgeschnitten werden⁶, so daß die Reverse Transkription unweigerlich abgebrochen wird⁷.

Der Replikationszyklus der gesunden Zellen wird also durch die Applikation der RT-Inhibitoren nicht beeinflusst und ermöglicht somit eine selektive, antiretrovirale Therapie.

2.2.2.2. Nicht-nucleosidanalogue RT-Inhibitoren (NNRTI)

Wie die NRTIs stören die NNRTIs die Funktion der Reversen Transkriptase⁸, werden aber nicht als falsche Bausteine in die Viruserbgut-Übersetzung eingebaut. Neue Zellen werden vor einer Infektion geschützt, infizierte Zellen jedoch nicht an der Produktion neuer Viren gehindert. Da sich unter einer alleinigen Behandlung mit einem NNRTI sehr schnell eine Resistenz ausbildet, können sie lediglich in einer Kombinationsbehandlung⁹ sinnvoll eingesetzt werden.

Zur Therapie der HIV-Infektion zugelassen sind Nevirapin (Viramune[®]) und Efavirenz **8** (Stocrin[®] oder Sustiva[®]), in den USA zusätzlich Delavirdin (Rescriptor[®]). In klinischer Prüfung befinden sich Substanzen wie Calanolide A, MKC-422 [Emivirin, Coactinon[®]], AG-1549 [Capravirin], DPC 963,083, PNU 24272, SJ-3366 und andere.

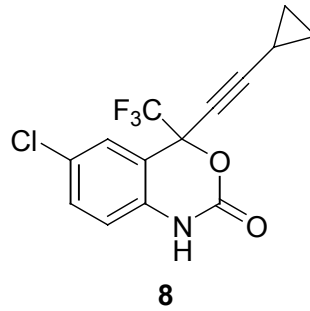


Abbildung 4 Ein NNRTI am Beispiel von Efavirenz **8**

2.2.3. Protease-Inhibitoren

Nach Vorschrift der genetischen Information von HIV produzieren infizierte, menschliche Zellen Proteine, deren Bestandteile zum Aufbau neuer Viren dienen. Medikamente der Klasse der Protease-Inhibitoren verhindern, daß HIV-Protein-Scheren diese Vorstufen in funktionierende Stücke schneiden. So entstehen zwar weiterhin Viren; diese können jedoch keine neuen Zellen infizieren. Sie wirken als Peptidmimetika im aktiven Zentrum des Enzyms. Innerhalb des HIV-Infektionszyklus setzen Protease-Hemmer nach den RT-Hemmern an. Zellen, die HIV bereits als Provirus in sich tragen, werden an der Produktion neuer Viren gehindert. Die Hemmung der Virusvermehrung ist bei den PI bisher zumindest *in vitro* am ausgeprägtesten.

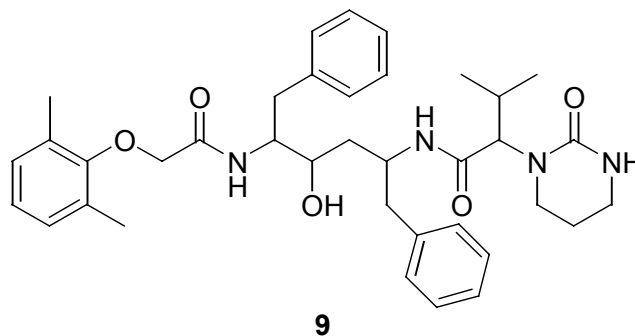


Abbildung 5 Ein Protease-Inhibitor am Beispiel von Liponavir **9**

Zur Behandlung der HIV-Infektion zugelassen sind: Amprenavir (Agenerase[®]), Indinavir (Crixivan[®]), Lopinavir **9** (Kaletra[®]), Nelfinavir (Viracept[®]), Ritonavir (Norvir[®]) und Saquinavir (Invirase[®] oder Fortovase[®]). In klinischer Prüfung befinden sich Substanzen wie Atazanavir (Zrivada[®], BMS-232632), Tipranavir (PNU 140690), PD-278390, DMP 450 und noch einige andere.

Die Behandlung mit einer Kombination von Protease- und RT-Hemmern senkt die Virusmenge und die CD4-Zellzahl steigt an. Studien^{9,10} zeigen eindrücklich, daß Kombinationstherapien, die einen Protease-Inhibitor enthalten, das Fortschreiten der Immunschwäche verzögern, das Auftreten von Aids-definierenden Infektion vermindern und so das Leben verlängern.

Die Tripeltherapie (HAART = **h**ighly **a**ctive **a**ntiretroviral **t**herapy) mit einem Protease-Inhibitor und zwei nukleosidischen RT-Inhibitoren stellt heute (wenn sie bezahlt werden kann) den Standard bei der Behandlung der HIV-Infektion dar. Mit einer geeigneten Kombination und der korrekten Einnahme der Medikamente läßt sich die Viruslast des Patienten unter die PCR-Nachweisgrenze¹¹ (ca. 200 Viren/ μ l) senken. Durch die verminderte Anzahl sich noch replizierender Viren ist die Selektion resistenter Virusstämme stark eingeschränkt. Durch diese Therapie wird erfolgreich die Resistenzentwicklung bei HIV-Infektion verzögert¹². Leider gibt es aber bis heute noch keine antivirale Therapie, die in der Lage wäre, HIV aus dem Körper zu eliminieren. Patienten mit HIV haben außerdem ein erhöhtes Risiko, ernsthafte Erkrankungen durch andere Viren, wie dem **V**aricella-**Z**oster-**V**irus (VZV; verursacht Windpocken und Gürtelrose) zu entwickeln. Obwohl die Erkrankung während der Kindheit mit einer gesunden Immunabwehr gewöhnlich gutartig und selbstlimitierend verläuft, können Zoster-Ausbrüche bei HIV-infizierten Patienten lebensbedrohend sein. Die Behandlung von VZV-Infektionen HIV-infizierter Patienten erfordert meistens die Verabreichung einer weiteren spezifischen antiviralen Chemotherapie¹³, die ähnlich wie bei der HIV-Behandlung die Replikation des Virus unterbinden soll.

2.3. Herpes-Infektionszyklus

Zur Familie der Herpes-Viren gehören neben dem Varicella-Zoster-Virus unter anderem das **H**erpes-**S**implex-**V**irus (HSV), das **E**pstein-**B**arr-**V**irus (EBV), das **H**epatitis-**B**-**V**irus (HBV) und das **C**ytomegalie-**V**irus (CMV). Sie rufen so unterschiedliche Krankheitsbilder wie den einfachen Lippenherpes, den Herpes genitalis, Herpes zoster, das Pfeiffersche Drüsenfieber oder Hepatitis B hervor. Im Gegensatz zu HIV handelt es sich bei den Herpes-Viren um sogenannte DNS-Viren, da sie ihre Erbinformation nicht in Form von RNS, sondern DNS in sich tragen. Daher unterscheidet sich auch ihr Replikationszyklus signifikant von dem des HIV (Abbildung 1, S. 3).

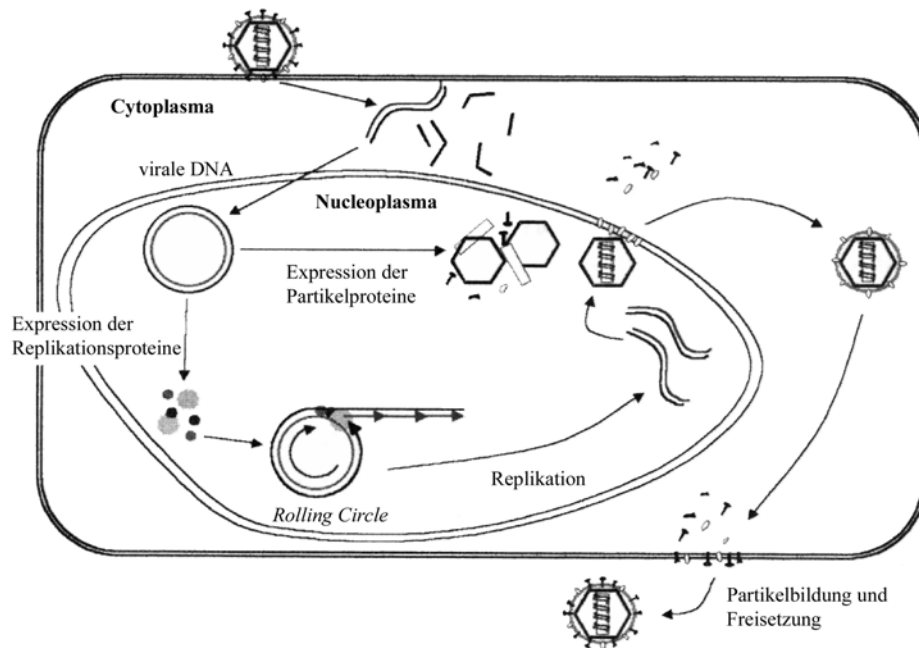


Abbildung 6 Replikationszyklus von Herpes-Viren

Durch Binden an einen Membranrezeptor und Eindringen in die Wirtszelle gelangt das virale Capsid in das Cytoplasma und schließlich zu einer Kernpore. Dort wird die virale DNS in das Nucleoplasma entlassen und zirkularisiert¹⁴. Nunmehr werden sowohl die viralen Partikel- als auch die Replikationsproteine durch den zelleigenen Transkriptions- und Translationsapparat exprimiert. Zu den Replikationsproteinen zählen unter anderem die virale DNS-Polymerase, eine Helicase und eine Primase. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt unter Beteiligung der drei genannten Proteine durch Abrollen eines fortlaufend synthetisierten neuen DNS-Stranges über die Matrize, einem zirkulären Einzelstrang des ursprünglichen Virus-Genoms (Prinzip des "rollenden Kreises"). Nach Vervollständigung zum Doppelstrang und dessen Teilung in die einzelnen Genom-Einheiten bilden diese zusammen mit den Partikelproteinen neue Virione, die durch Ausknospung an der Zellmembran als infektiöse Viren sezerniert werden. Darüber hinaus ist auch die Verbreitung der Viren durch Zell-Zell-Kontakte oder Zellfusion möglich¹⁵.

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

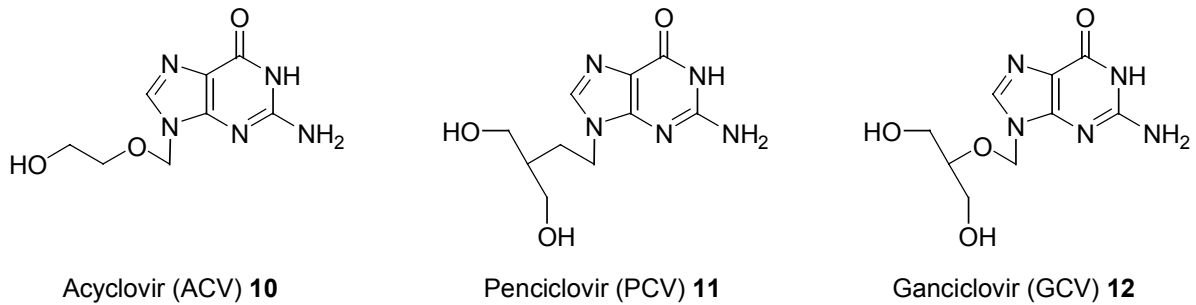


Abbildung 7 *Antiviral aktive azyklische Nucleosidanaloga*

Diese azyklischen Nucleosidanaloga sind aber zu polar für eine passive Membrandiffusion, weshalb anstelle von Acyclovir **10** dessen desoxygenierte Form Desciclovir **13** und anstelle von Penciclovir **11** das desoxygenierte und diacetylierte Derivat Famciclovir **14** oral appliziert wird^{16,17}.

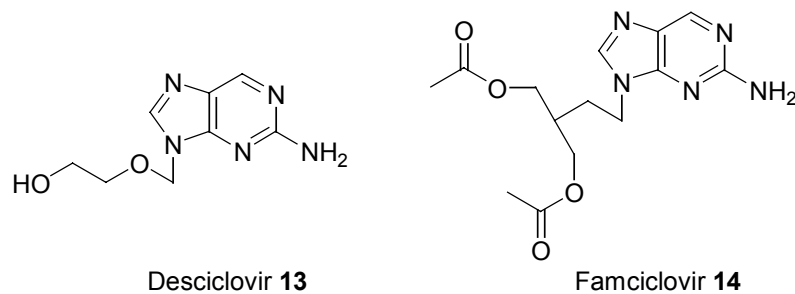


Abbildung 8 *Orale Darreichungsformen einiger azyklischer Nucleosidanaloga*

Ein neuartiges Herpes-Therapeutikum stellt das zyklische Nucleosidanalogen (*E*)-5-(2-**Bromv**inyl)-2'-**d**esoxyuridin **15** (BVDU) dar. Die Synthese der modifizierten Nucleobase (*E*)-5-(2-**Bromv**inyl)uracil **16** (BVU)¹⁸ sowie des entsprechenden Desoxyribonucleosides BVDU **15**¹⁹ gelang erstmals in den 1970er Jahren und folgte unmittelbar auf die von Fissekis *et al.* berichtete Darstellung von 5-Vinyluracil²⁰ (Abbildung 9). Nach der Entdeckung der guten antiviralen Eigenschaften von BVDU **15** im Jahre 1979 durch De Clercq *et al.*²¹ erfolgten weitere Untersuchungen, in deren Verlauf die Wirksamkeit von BVDU **15** gegenüber VZV, CMV sowie den beiden Subtypen von HSV nachgewiesen werden konnte^{22,23}. Als problematisch erwies sich jedoch die enzymatische Spaltung von BVDU **15** zu BVU **16** und 2'-Desoxyribose²⁴ im Blut. Die antivirale Wirkung von BVDU **15** beruht auf der kompetitiven Inhibierung der viralen DNS-Polymerase durch BVDU-Triphosphat, welches intrazellulär durch enzymatische Phosphorylierung von BVDU **15** gebildet werden muß. Kommt es zum Einbau in die DNS, so stört die Bromvinyl-Funktion unter anderem durch Ausbildung sogenannter

nannter "cross links" mit anderen DNS-Strängen die Ausbildung der nativen DNS-Struktur und behindert somit die Funktion der synthetisierten DNS.

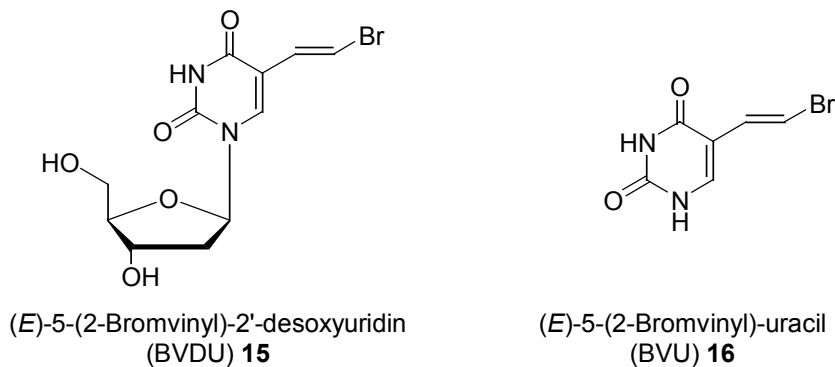


Abbildung 9 Das neuartige Herpes-Therapeutikum BVDU **15** und seine modifizierte Nukleobase BVU **16**

Gegenwärtig findet BVDU **15** unter dem Handelsnamen Brivudin[®] medizinische Anwendung als Virustatikum und lässt sich beispielsweise bei Herpes-Zoster-Erkrankungen deutlich niedriger dosieren als Famciclovir **14**²⁵.

2.4. Das Pronukleotid-Konzept

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, in welcher vielfältiger Weise NRTIs als antivirale Therapeutika zur Verfügung stehen. Natürliche endogene Nukleoside müssen zu den entsprechenden 5'-Triphosphaten (TP) phosphoryliert werden, um in einen intrazellulär entstehenden DNS-Strang integriert werden zu können (Kapitel 2.2.2.1., S. 6). Der erste Phosphorylierungsschritt, der zur Bildung von Nukleosid-5'-Monophosphat (MP) führt, wird durch eine Nukleosid-Kinase katalysiert. Dieses Enzym wird von der Wirtszelle oder durch ein Virus, welches die Zelle infiziert hat, kodiert²⁶, wie es z. B. bei der Metabolisierung von BVDU **15** der Fall ist. Die Umwandlung von Nukleosid-MPs zu den entsprechenden 5'-Diphosphaten (DP) und Triphosphaten werden schließlich von Nukleosid-, Nukleotidyl-, und Nukleosiddiphosphat-Kinasen ausgeführt. Deshalb spielen die zellulären Kinasen und die viral-kodierten Kinasen eine lebenswichtige Rolle bei der Metabolisierung und Replikation von Zellen und Viren.

Nukleosidanaloga, wie d4T **7**, konkurrieren demnach mit den natürlichen Nukleosiden um die Aktivierung zum Triphosphat, ohne die sie keine antivirale Wirkung ent-

fallen können. Deshalb bezeichnet man solch eine Wirkstoffvorstufe auch als Pro-drug.

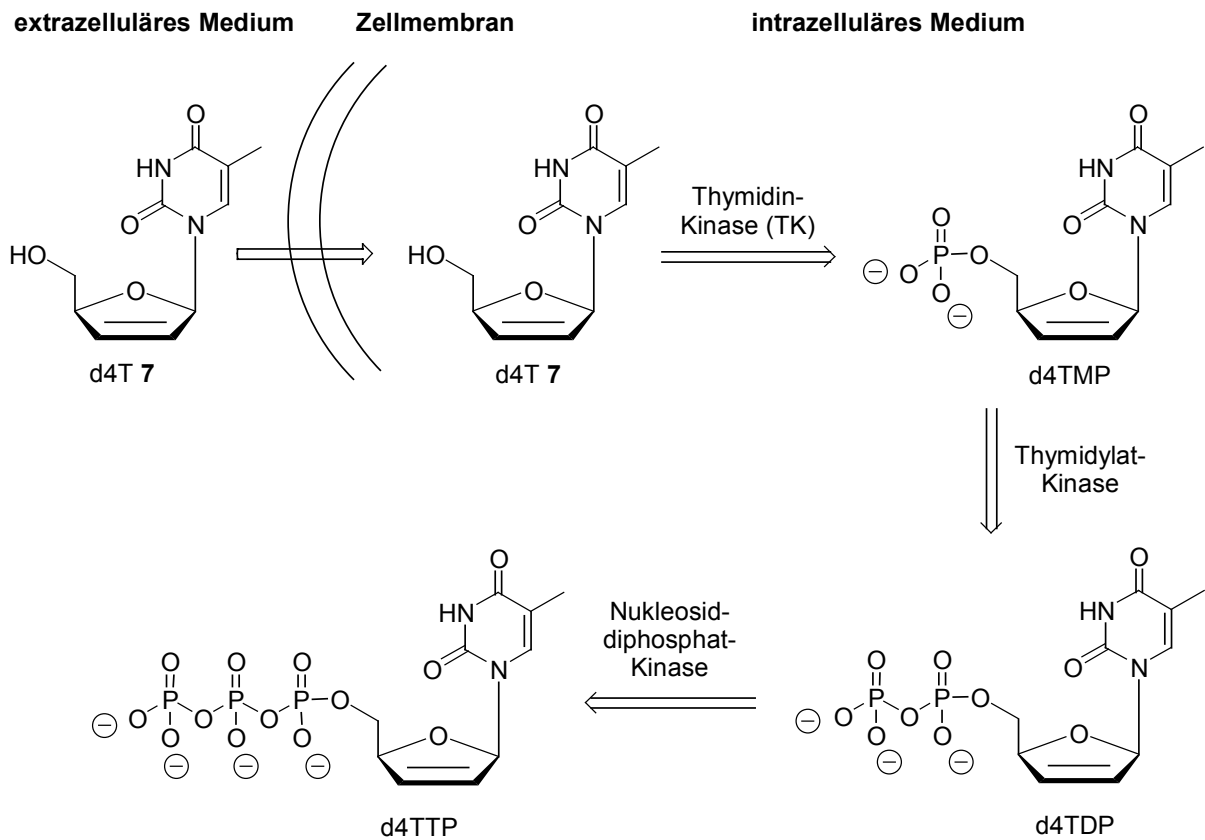


Abbildung 10 Metabolisierung von d4T 7

Nach dem Passieren der Zellmembran wird d4T 7 von der zellulären Thymidin-Kinase (TK), einem Enzym des "salvage pathways" für Thymidin, zunächst zum 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidylat (d4TMP) phosphoryliert. Dieses wird durch die Thymidylat-Kinase zum 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidindiphosphat (d4TDP) umgesetzt. Die Nukleosiddiphosphat-Kinase katalysiert schließlich die Reaktion von d4TDP zum biologisch aktiven 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidintriphosphat (d4TTP).

Langzeit-Therapien mit NRTIs wie AZT 2 haben gezeigt²⁷, daß es zu einer Verminderung der Aktivität der Thymidin-Kinase kommt, die schließlich eine Resistenz zur Folge hat. Hinzu kommt das Problem der Substratspezifität der beteiligten Kinasen, welche die Phosphorylierungsschritte für die Nukleosidanaloga hemmt²⁸.

Ein Beispiel für die Hinderung der ersten Phosphorylierung findet man bei dem Wirkstoff d4T 7. Die Thymidin-Kinase akzeptiert d4T 7 (Abbildung 10) nur unzureichend als Substrat und die Metabolisierung zu d4T-Monophosphat findet nur sehr langsam statt, weshalb die nachfolgenden Phosphorylierungsschritte ebenfalls kaum zu be-

obachten sind. Das läßt den Wirkstoff d4T **7** in der antiviralen Chemotherapie nur mäßig aktiv erscheinen, obwohl die nachfolgenden zwei Phosphorylierungsschritte gut katalysiert werden, und d4T-Triphosphat einen der potentesten HIV-Inhibitoren darstellt²⁹.

Eine ähnliche Limitierung findet man auch bei den antiviralen azyklischen Nucleosiden wie Acyclovir und Penciclovir, oder dem Nucleosidanalogen BVDU **15**. Ihre Wirksamkeit gegen die bekannten Herpes-Viren hängt ebenfalls von der Aktivierung zum Triphosphat ab. Für HSV und VZV, die ihre eigene Thymidin-Kinase³⁰ kodieren, ist dies unproblematisch. Bei Erregern ohne eigene Nucleosid-Kinase, wie z. B. dem Hepatitis B Virus, hingegen bleibt die antivirale Wirkung der Prodrugs aus. Im Prinzip sollte die direkte Applikation von 5'-Phosphaten (Nucleotiden) die Nachteile der Nucleosidanaloga-Therapie umgehen können. Dieser sogenannte TK-Bypass wird in der nächsten Abbildung am Beispiel von d4T **7** dargestellt.

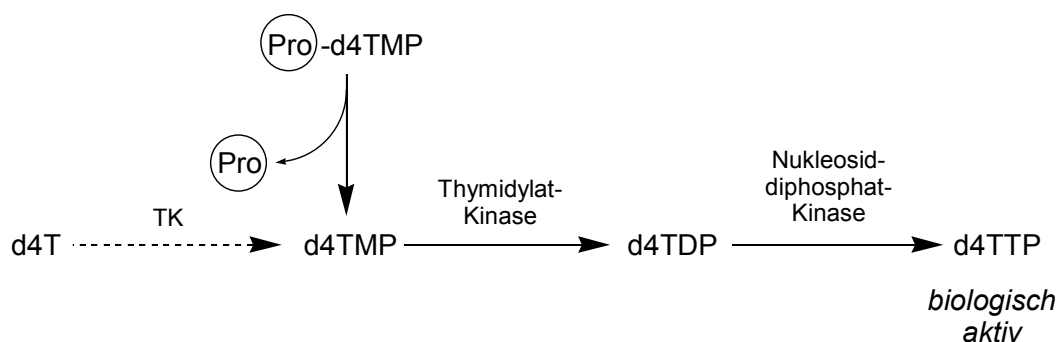


Abbildung 11 Schematische Darstellung des TK-Bypasses

Allerdings stellen phosphorylierte Nucleosidanaloga biochemisch höchst problematische Substanzen dar. Zum einen sind Nucleotide Säuren und liegen bei physiologischem pH-Wert (pH 7.4) zweifach negativ geladen vor. Deshalb sind sie für einen passiven Transport durch die lipidreiche Zellmembran zu hydrophil und ein aktiver Transportmechanismus ist bisher unbekannt. Darüber hinaus werden Nucleotide durch Phosphohydrolasen (saure und alkalische Phosphatasen, 5'-Nucleotidasen) im Blut und an Zelloberflächen schnell zu den entsprechenden Nucleosiden dephosphoryliert. Dies schränkt ihre Verfügbarkeit im Organismus stark ein.

Um das Problem der schlechten Zellmembranpenetration von Nucleotiden zu lösen, schlug Montgomery³¹ vor, Nucleotidester herzustellen, die die Zellmembran durchdringen können und anschließend wieder zum Nucleotid metabolisiert werden. Daraufhin wurden verschiedene Prodrugs (hier: Pronucleotide³²) entworfen, synthetisiert

und auf ihre Tauglichkeit hin überprüft³³. An ein Pronukleotid sollten generell vier Anforderungen gestellt werden:

- Es muß lipophil genug sein, um passiv durch die Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke diffundieren zu können.
- Es sollte eine ausreichende Stabilität im extrazellulären Medium aufweisen.
- Dagegen sollte sich das Nukleotid intrazellulär durch eine schnelle enzymatische oder hydrolytische Abspaltung der Schutzgruppe („Maske“) freisetzen lassen.
- Die abgespaltene Maske darf nicht toxisch sein.

Im Falle der Pronukleotide (z. B. d4TMP, Abbildung 12) gilt es, zwei negativ geladene Sauerstoffatome an der Phosphatgruppe zu neutralisieren, weshalb die Verwendung von zwei Masken notwendig erscheint.

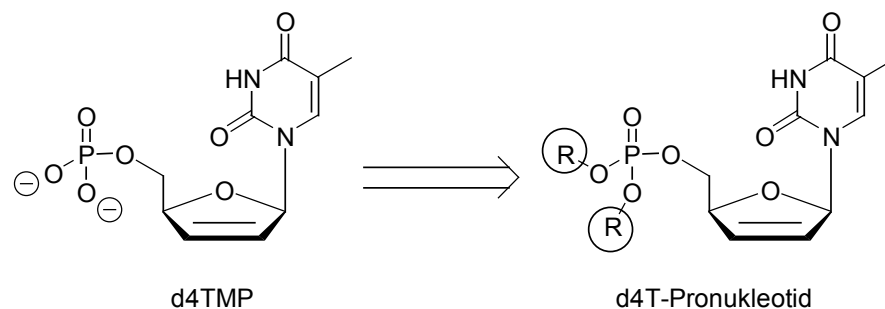


Abbildung 12 Vom Nukleotid zum Pronukleotid

Erste Versuche mit Dialkylphosphateestern³⁴ (zweiteiliges Prodrug-Konzept) zeigten, daß die Abspaltung einer Maske durch nukleophile Reaktion am Phosphorzentrum sehr wohl möglich ist. Die negative Ladung des entstehenden Phosphatdiesters verhinderte jedoch eine weitere Hydrolyse, so daß es nicht zur Freisetzung des Wirkstoffes kam. Neuere dreiteilige Ansätze gehen von Masken aus, die das Nukleotid durch eine Hydrolysenkaskade, ausgelöst von einer enzymatischen Reaktion der sich eine zweite enzymatische oder chemische Hydrolyse anschließt, in das Cytoplasma entlassen. Als Beispiele für Pronukleotid-Systeme, die am ehesten in der Lage sind, die gestellten Anforderungen zu erfüllen und das Nukleosid erfolgreich freizusetzen, seien folgende Konzepte genannt:

- Bis(POM)-Nukleotide [Bis(Pivaloyloxymethyl)-]^{35a-e}
- Bis(POC)-Nukleotide [Bis(*iso*-Propyloxycarbonyloxymethyl)-]³⁶

- Bis(SDTE)-Nukleotide [Bis(S-(2-Hydroxyethylsulfidyl)-2-thioethyl)-]³⁷
- Bis(SATE)-Nukleotide [Bis(S-Acyl-2-thioethyl)-]^{37,38a-c}
- Phosphoramidat-Nukleoside³⁹

Ein Pronukleotid, dem das Bis(POC)-Konzept zu Grunde liegt, hat sogar vor kurzem unter dem Handelsnamen Viread™ die klinische Zulassung erhalten. Es wird von Gilead Sciences vertrieben und ist ein Medikament, das zur Klasse der NtRTIs gehört.

Alle genannten Pronukleotid-Systeme benötigen Enzyme zur Freisetzung des Wirkstoffs, so daß sich ihre Wirksamkeit auf Zellen beschränkt, die das entsprechende Enzym bereitstellen. Ein optimales und effektives Prodrug-System sollte aber von solchen Einschränkungen befreit sein, um den Virus im Organismus schnell und vollständig eliminieren zu können und damit das Risiko der Resistenzbildung zu minimieren. C. Meier *et al.* haben neuartige, dreiteilige Pronukleotide entworfen und synthetisiert, die sich durch eine rein chemisch verlaufende Hydrolyse von den bisherigen Konzepten unterscheiden und deshalb unabhängig von Enzymen funktionieren können: Die cycloSaligenyl-Nukleosid-Monophosphate (*cycloSal-NMP*).

2.4.1. Das *cycloSal*-Konzept

Ein *cycloSal*-Pronukleotid^{40,41} besteht im Unterschied zu den anderen Pronukleotid-Systemen aus nur einer zyklischen, bidenten Maske (Saligenylalkohol) und dem entsprechenden Nukleotid. Das Verhältnis von Maske zu Wirkstoff wird dadurch auf 1:1 reduziert (sonst 2:1 oder höher). Dies ist ein entscheidender Vorteil, wenn man die mögliche Toxizität der abgespaltenen Masken berücksichtigt, die für die spätere Verträglichkeit der eingesetzten Pronukleotide mit verantwortlich ist.

Die Besonderheit der *cycloSal*-Pronukleotide besteht in der selektiv chemisch verlaufenden Hydrolyse. Diese Selektivität wird durch die unterschiedlichen Stabilitäten der Benzyl-⁴², Phenyl-⁴³ und Alkylphosphatester-Bindungen erreicht. Die untere Abbildung 14 auf der nächsten Seite gibt ein Reaktionsschema der möglichen Hydrolysewege eines *cycloSal*-Pronukleotids ohne weitere Saligenyl-Substituenten (*cycloSal-d4TMP 17*) wieder.

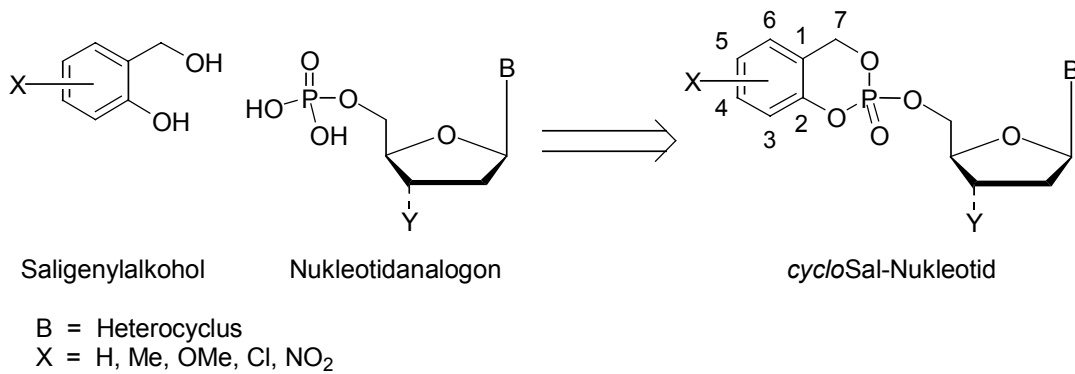


Abbildung 13 Aufbau eines *cycloSal*-Nucleotides mit Numerierung der Saligenyl-Kohlenstoffatome

Prinzipiell sollte im ersten Hydrolyseschritt die Phenylester-Bindung des *cycloSal*-NMPs gespalten werden. Diese stellt die labilste der drei Phosphatester-Bindungen dar, da aus der Spaltung dieser Bindung der mesomeriestabilisierte 2-Hydroxybenzyl-Phosphatdiester **18** resultiert (Schritt a, Abbildung 14).

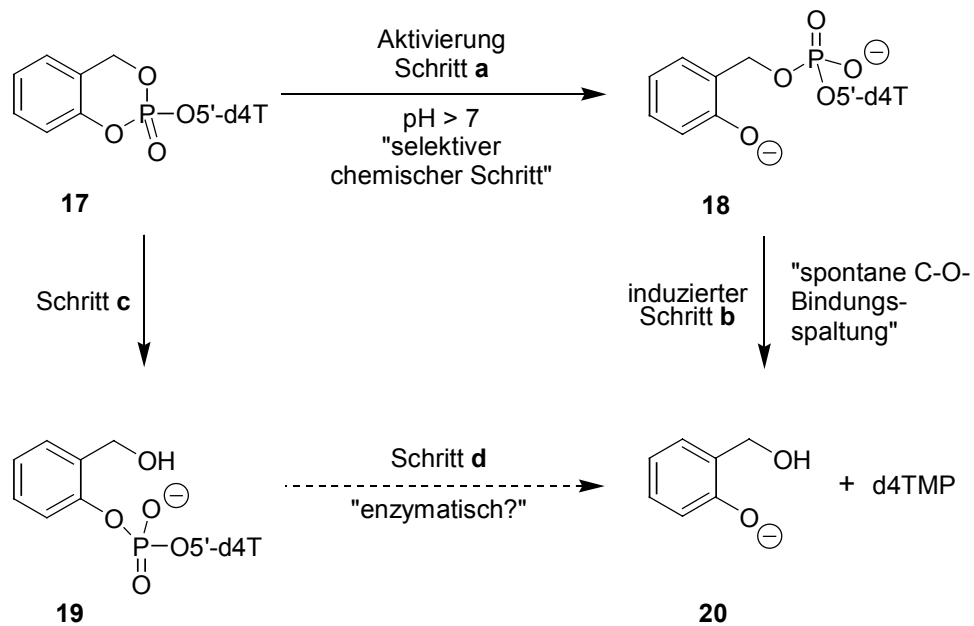


Abbildung 14 Reaktionsschema für die selektive, chemische Hydrolyse eines *cycloSal*-Pronucleotides am Beispiel von *cycloSal*-d4TMP **17**

Die alternativ denkbare Spaltung der Benzylester-Bindung von **17** würde hingegen zu einem 2-Hydroxymethylphenyl-Phosphatdiester **19** führen (Schritt c, Abbildung 14). Da jedoch die Phosphatgruppe als Akzeptor-Substituent in *ortho*-Position zum Benzylester dessen Hydrolyse stark verlangsamt⁴², kommt es normalerweise (Untersuchungen⁴⁴ mit Benzyl-funktionalisierten *cycloSal*-NMPs haben gezeigt, daß der Schritt c auch dominieren kann) nicht zu dieser Reaktion, und der Schritt a verläuft

als selektive, chemische Hydrolyse. Bedingung hierfür ist lediglich ein schwach alkalisches pH-Milieu, wie es in biologischen Medien vorliegt (physiologischer pH-Wert = 7.4). Durch diesen ersten Hydrolyseschritt wird aus dem Akzeptor-Substituenten (Phosphat) in der C2-Position der *cycloSal*-Maske ein Donor-Substituent (Hydroxylgruppe). Diese Umpolung des Substituenten induziert schließlich die spontane Spaltung des Benzyl-Phosphatdiesters **18** zum potentiellen Wirkstoff d4TMP und dem Saligenylalkohol **20** (Schritt **b**). Insgesamt liegt somit eine Tandem-Reaktion vor. Es sei angemerkt, daß der hypothetisch entstehende Phenyl-Phosphatdiester **19** aufgrund der negativen Ladung an der Phosphatgruppe gegen den erneuten nukleophilen Angriff eines Hydroxid-Anions auf das Phosphoratom inert wäre, so daß nur eine selektive, enzymatische Spaltung der Phenylester-Bindung in **19**, beispielsweise durch eine Phosphodiesterase, zur Bildung von d4TMP und **20** führen würde (Schritt **d**).

Der Hydrolysemechanismus konnte durch die Verwendung multinuklearer NMR-Spektroskopie (^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -NMR) und Massenspektroskopie bestätigt werden. Die chemische Hydrolyse von *cycloSal*-d4TMP- (TK-Bypass)⁴⁵ oder *cycloSal*-ddAMP-Derivaten⁴⁶ zeigte den ausschließlichen Abbau zum Nukleotid und die Bildung des entsprechenden Salicylalkohols. Bei diesen Experimenten in verschiedenen wäßrigen Pufferlösungen und in RPMI-1640 Kulturmedium mit 10 % wärme-inaktiviertem, fötalem Kälberserum, wurde auch die zu erwartende pH-Abhängigkeit der Nukleotid-Freisetzung, wie sie für die chemische Hydrolyse typisch ist, deutlich. Die Einflüsse von Substituenten am Salicylalkohol und die damit verbundenen elektronischen Eigenschaften zeigten eine deutliche Korrelation zu den Hydrolysehalbwertszeiten der Phosphortriester. Es konnten keine Beweise für einen enzymatisch bedingten Abbau in Gegenwart des RPMI-1640 Mediums mit 10 % FCS beobachtet werden.

Die Effizienz der *cycloSal*-Pronukleotide wurde mittels antiviraler *in vitro*-Zelltests demonstriert. Für die *cycloSal*-d4TMPs wurde eine Verbindung zwischen ihrer Struktur und der biologischen Aktivität gefunden: Je stärker die Elektronendonorfähigkeiten eines Saligenyl-Substituenten ist, desto besser ist auch die antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 in CEM/0-Zellen. So wiesen die 3- oder 5-Methylgenauso wie die 3,5-Dimethyl-*cycloSal*-d4TMPs sogar eine höhere antivirale Wirksamkeit (0.09 μM) als d4T **7** (0.18 μM) selbst auf. Der überzeugendste Beweis für die Effizienz des TK-Bypasses ist die Beibehaltung der biologischen Aktivität der meisten Verbindungen in Thymidin-Kinase-defizienten (TK⁻) CEM-Zellen. Nur das

sehr hydrolyselabile 5-Nitro-*cycloSal*-d4TMP zeigte einen Verlust der antiviralen Aktivität. Trotzdem bestärken die Ergebnisse die Theorie der selektiven intrazellulären Freisetzung von d4TMP.

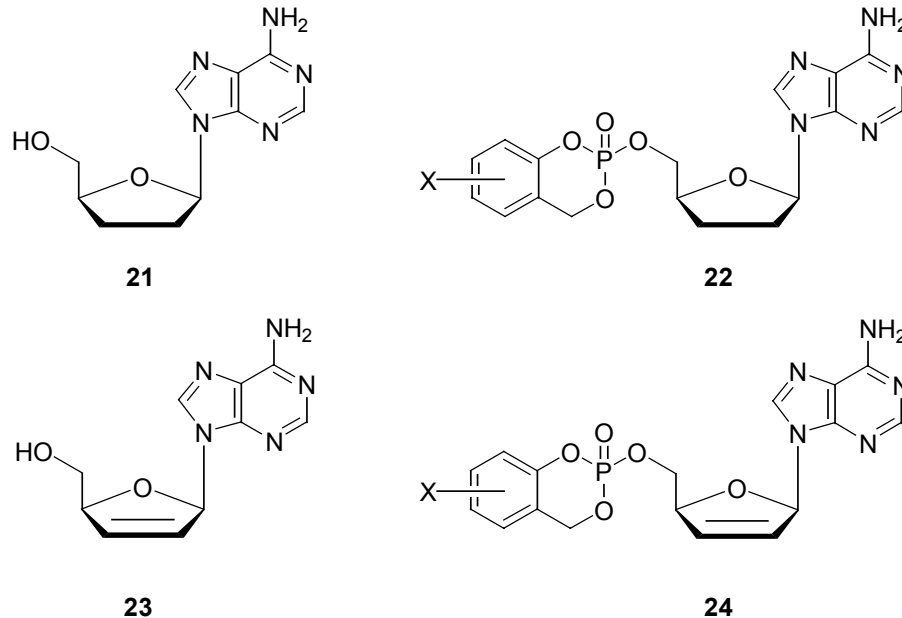


Abbildung 15 Strukturformeln von ddA **21**, *cycloSal*-ddAMP **22**, d4A **23** und *cycloSal*-d4A **24**

Das *cycloSal*-Konzept wurde auch erfolgreich zur Prävention der ADA-Desaminierung von ddA **21** angewendet. Die *cycloSal*-ddAMPs **22** besitzen eine sehr hohe antivirale Aktivität in CEM/0-Zellen (0.03 μM); das ist eine Steigerung um das 100-fache verglichen mit ddA **21** (3.17 μM)⁴⁶. Neben der hohen Wirksamkeit konnte eine Steigerung des Selektivitätsindex um das 15-fache festgestellt werden. Wieder sind die Ergebnisse ein Beweis für die effiziente Bereitstellung von ddAMP. Es sollte erwähnt werden, daß sowohl das intakte *cycloSal*-ddAMP **22**, als auch das *cycloSal*-d4AMP **24** vollkommen stabil gegen die enzymatische Desaminierung durch die Adenosin-Desaminase (ADA) oder die Adenosin-Monophosphatdesaminase (AMP-DA) sind⁴⁷, so daß die biologische Aktivität nicht durch die Freisetzung von ddIMP herrühren konnte.

Neben den Dideoxy-Nukleosidanaloga d4T **7** und ddA **21**, wurde das *cycloSal*-System auch auf AZT **2** angewendet⁴⁸. Erstaunlicherweise verloren die entsprechenden *cycloSal*-AZTMP-Derivate beinahe ihre gesamte antivirale Aktivität in mutierten CEM/TK⁻ Zellen, obwohl die *in vitro*-Aktivität in den Wildtyp-CEM-Zelllinien

identisch mit der von AZT **2** war. Anscheinend gibt es eine besondere metabolische Limitierung, die gegen die Beibehaltung der Aktivität in TK⁻ Zellen agiert⁴⁹.

Auch auf das Nukleosidanalogen BVDU **15** wurde das Konzept bereits erfolgreich angewendet^{50,51}. Hierbei wurden vor allem die Auswirkungen von strukturellen Modifikationen am Glycon der *cycloSal*-BVDUMPs (Veresterung der 3'-Hydroxylfunktion mit Carbon- und Aminosäuren) und deren Eigenschaften untersucht. Außerdem gelang durch Anwendung des *cycloSal*-Konzeptes die erstmalige Darstellung anti-EBV-aktiver BVDU-Derivate.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das *cycloSal*-Konzept das erste Beispiel für ein erfolgreiches Nukleotid-freisetzendes Pronukleotid ist, welches nicht enzymatisch gestartet werden muß, sondern durch einfache chemische Hydrolyse mittels einer Tandem-Reaktion aktiv wird. Die Vorteile des *cycloSal*-Konzeptes liegen in der vergleichsweise einfachen synthetischen Verfügbarkeit und in der befriedigenden Löslichkeit der Verbindungen im wäßrigen Medium. Die potentiell toxische Maske wird bei den *cycloSal*-NMPs im günstigen Verhältnis 1:1 Wirkstoff/Maske abgegeben.

Die höhere Lipophilie der *cycloSal*-NMPs sollte sich merklich auf ihre antivirale Aktivität auswirken. Dennoch ist bis heute kein Zusammenhang zwischen der Lipophilie und der biologischen Aktivität der *cycloSal*-Verbindungen beobachtet worden, obwohl eine höhere Lipophilie das Passieren der Zellmembran erleichtern sollte. Berücksichtigt man die Hydrolysehalbwertszeiten von 7-35 Stunden ist aber vorstellbar, daß durch die Erhöhung der Lipophilie nicht nur die Diffusionen in die Zelle verbessert, sondern auch der Wiederaustritt erleichtert wird. So lange nämlich die *cycloSal*-Maske nicht abgespalten und das polare Nukleotid freigesetzt wird, kann das Pronukleotid die Zellmembranbarriere in beide Richtungen überwinden. Die Richtung des passiven Membrantransportes wird dabei nur durch den Konzentrationsunterschied auf beiden Seiten der Membran bestimmt. Da aber auch außerhalb der Zelle ein hydrolytischer Abbau der *cycloSal*-Pronukleotide zu erwarten ist, verliert man durch die langsame, chemische Hydrolyse der *cycloSal*-Maske im Cytoplasma einen Teil des Wirkstoffs, der sogar schon an seinem Bestimmungsort angelangt war (Abbildung 16, S. 21). Dieses Problem kann aber nicht durch hydrolysebeschleunigende Elektronenakzeptor-Substituenten (z. B. Cl, NO₂) an der Saligenyl-Maske gelöst werden, weil eine gewisse Stabilität Voraussetzung für den erfolg-

reichen Transport zu den Zellen ist. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Carboxyesterasen außerhalb und innerhalb der Zellen, die bei *in vitro*-Untersuchungen der Bis(SDTE)- und Bis(SATE)-Systemen von J.-L. Imbach³⁷ bestätigt werden konnten, sollten eine extrazellulär/intrazelluläre Differenzierung durch einen Ester-Substituenten an der *cycloSal*-Maske ermöglichen, wie es in Abbildung 16 skizziert wird. Die erstmalige Synthese solcher „lock-in“-modifizierter *cycloSal*-Pronukleotide war die Aufgabe meiner Diplomarbeit⁵², deren Ergebnisse im folgenden Kapitel kurz erläutert werden sollen.

2.4.2. „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-Pronukleotide

Durch den Einschluß (engl. lock-in) soll verhindert werden, daß das *cycloSal*-Pronukleotid nach der passiven Diffusion in das Cytoplasma, dieses auf dem gleichen Weg wieder verlassen kann. Der „lock-in“ soll in diesem Fall durch einen Ester-Substituenten an der Saligenyl-Maske ermöglicht werden. Das Funktionsprinzip wird in der nächsten Abbildung am Beispiel des 3-(Methyl-3'-propionyl)-*cycloSal*-d4TMPs **77a** erklärt.

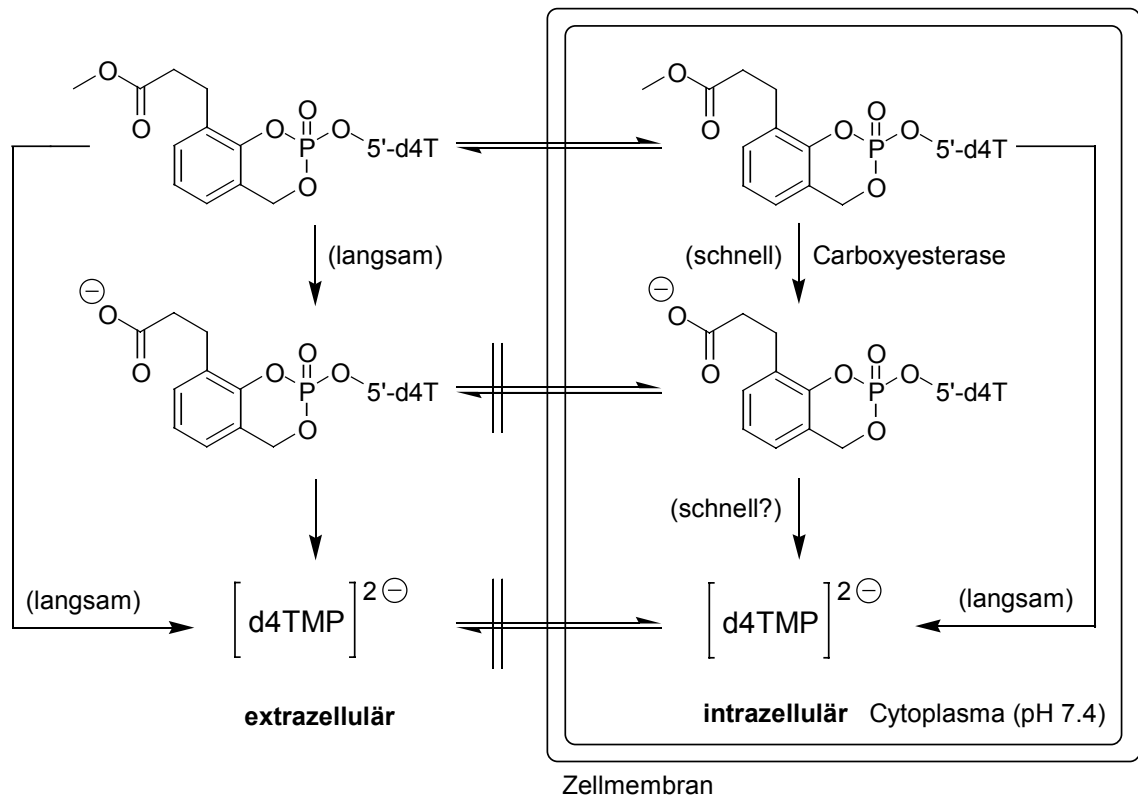


Abbildung 16 Theorie des „lock-in“-Effektes am Beispiel von 3-(Methyl-3'-propionyl)-*cycloSal*-d4TMP **77a**

Die intrazellulär vermehrt vorhandenen Carboxyesterasen werden den Carbonsäureester schnell hydrolysieren und infolgedessen die freie Carbonsäure entstehen lassen. Nach dieser ersten, enzymatischen Hydrolyse kann das *cycloSal*-Pronukleotid die Zelle nicht mehr verlassen, da für den passiven Efflux aus der Zelle, ebenso wie für den Influx, eine hohe Lipophilie Voraussetzung ist. Die an der Saligenylmaske verbleibende Carbonsäure wird zudem bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 als negativ geladenes Carboxylat vorliegen und als solches eine deutliche Verminderung der Lipophilie hervorrufen. Dadurch wäre der Efflux ausgeschlossen. Die Verwendung von „umgedrehten“ Estern, bei denen nach der enzymatischen Hydrolyse ein Hydroxylrest an der *cycloSal*-Maske zurückbliebe, ist auch denkbar. Ob eine Alkoholgruppe eine ausreichende Verminderung der Lipophilie bewirken kann, muß aber erst noch untersucht werden.

Während meiner Diplomarbeit gelang die Darstellung von insgesamt vier „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Pronukleotiden (**77a** und **25a-c**), die alle durch den gleichen 3-(Methyl-3'-propionyl)-Substituenten „lock-in“-funktionalisiert waren, und nachfolgend zusammengestellt sind.

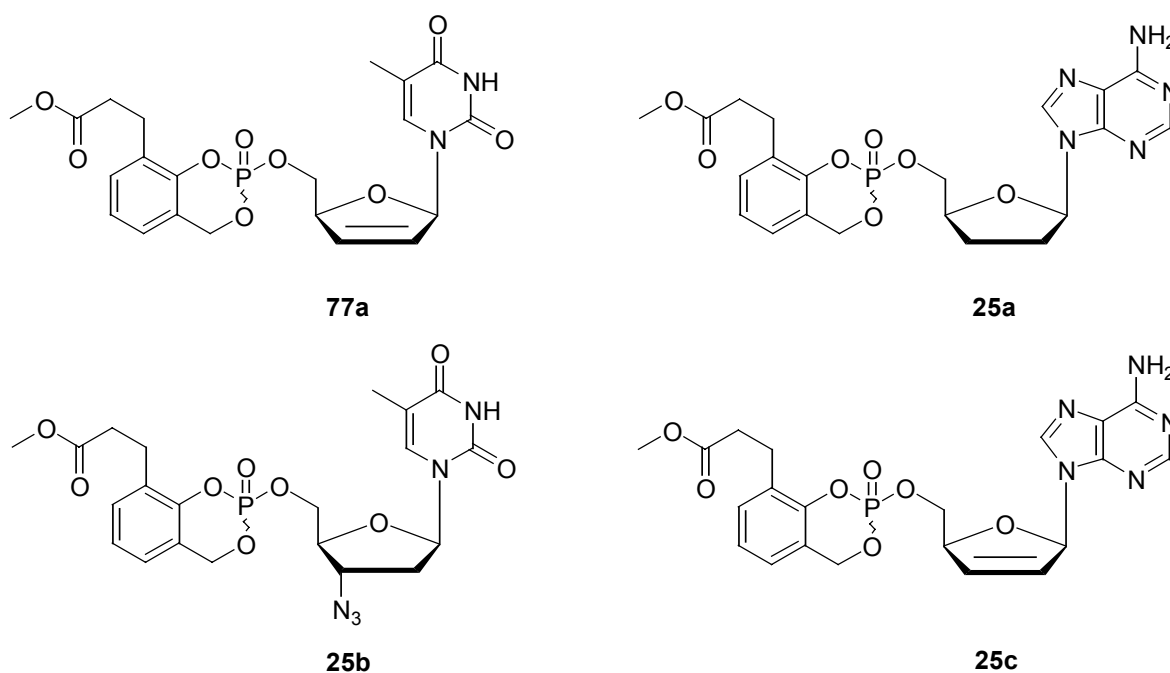


Abbildung 17 „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-Pronukleotide **77a** und **25a-c**

Diese Verbindungen setzen sich formal aus dem Saligenylalkohol Methyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionat **58a**, einer Phosphat-Gruppe und dem jeweiligen Nucleosid (d4T **7**, AZT **2**, ddA **21** oder d4A **23**) zusammen. Der Syntheseweg

dieser Verbindungen umfaßte sechs Synthesestufen, wobei zwei Stufen als „Eintopf“-Reaktion durchführbar waren.

Hydrolysestudien (exemplarisch mit dem *cycloSal*-d4TMP-Derivat **77a** durchgeführt) in isotonischen Phosphatpuffern bei pH 7.32 und pH 6.82 ergaben, daß die zusätzliche Esterfunktion in der Seitenkette sich ähnlich wie ein einfacher Alkyl-Substituent auf die chemische Hydrolysehalbwertszeit auswirkt. Für eines der beiden Diastereomere der d4T-Verbindung **77a** wurde bei pH 7.32 eine Halbwertszeit ermittelt, die mit 9.44 h zwischen den Werten des unsubstituierten *cycloSal*-d4TMPs **17** (4.62 h, pH 7.29) und des 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMPs **26** (15.70 h, pH 7.29) lag. Damit war der elektronenziehende Effekt der Esterfunktion, der zu einer Verkürzung der Halbwertszeit geführt hätte, genügend vom aromatischen Ring abgeschirmt.

Mit Hilfe eines Carboxyesterase-Assays sollte anschließend die Stabilität des Methylesters des Saligenyl-Substituenten überprüft werden. Dabei hatte der Methylester des freien Salicylalkohols **58a** in Anwesenheit der Carboxyesterase (PLE) nur eine Halbwertszeit von < 0.1 h. Ob dieser Wert in der gebundenen Form des *cycloSal*-d4TMPs **77a** ähnlich niedrig ist, konnte aber nicht überprüft werden, da das Hydrolyseprodukt 3-(2'-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4TMP **27** HPLC-analytisch nicht nachzuweisen war. So blieb nur festzustellen, daß der Abbau des Triesters **77a** durch die Zugabe von Carboxyesterase um das 2.5-fache beschleunigt wurde.

Vor allem die unbefriedigenden Ergebnisse des Carboxyesterase-Assays machen weitere Untersuchungen unumgänglich, ohne die keine abschließende Aussage über die Funktionsfähigkeit des „lock-in“-Konzeptes gemacht werden kann. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse reichen bei weitem noch nicht aus, den Verlauf der Esterase-beschleunigten Freisetzung des Nukleotides nachzuvollziehen. Bei dieser Arbeit sollen deshalb folgende Fragen im Vordergrund stehen:

- Wird der Methylester überhaupt hydrolysiert oder wurde die beobachtete Beschleunigung der enzymatischen Hydrolyse nur durch die doppelt so hohe Konzentration an PBS-Puffer bewirkt?
- Warum wurde das Hydrolyseprodukt 3-(2'-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4TMP **27** nicht beobachtet? Ist vielleicht sogar eine enzymatische Hydrolyse des Phosphortriesters beobachtet worden?

Daß eine Esterase-katalysierte Hydrolyse des Phosphortriesters von *cycloSal*-Verbindungen nicht auszuschließen ist, zeigt eine Untersuchungen⁵³ von J. Balzarini *et al.* mit Tritium-markiertem *cycloSal*-d4TMP, bei der bereits innerhalb von 2 Stun-

den eine sehr hohe intrazelluläre Konzentration von d4TMP beobachtet wurde. Dieses Phänomen läßt sich nicht befriedigend erklären, wenn man von einer chemischen Hydrolyse des Triesters und der damit verbundenen Halbwertszeit (< 15 h) ausgeht, wie sie während des Hydrolyse-Assays abläuft. Vielmehr zeigt sich hier eine deutliche Abweichung von den Bedingungen des Modellsystems, die eine Analytik nahelegt, mit der die verborgenen Vorgänge an der Oberfläche der Zellmembran bis hinein in das Zellinnere unter *in vitro*-Bedingungen untersucht werden kann. Solch eine analytische Studie stellt aber sehr hohe Anforderungen an das Detektionssystem. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit stellt die Fluoreszenzanalytik bei biochemischen Untersuchungen, die meist mit sehr geringen Mengen durchgeführt werden, das Detektionssystem der Wahl dar. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie können Informationen über die Kinetik makromolekularer Interaktionen, struktureller Veränderungen sowie enzymatischer Reaktionen gewonnen werden⁵⁴. Wie Nucleoside der Fluoreszenzspektroskopie zugänglich gemacht werden können, soll deshalb im nächsten Kapitel gezeigt werden.

2.5. Fluoreszierende Nucleosidanaloga

Um Verbindungen, die selbst nicht fluoreszieren, der Fluoreszenzspektroskopie zugänglich zu machen, werden diese mit fluoreszierenden Gruppen (Fluoreszenzmarkern) gekoppelt. Die Kopplung ist in den meisten Fällen unproblematisch und erfolgt nach den bekannten Standardmethoden⁵⁵. Als Fluoreszenzmarker kommen unter anderem Lanthanoide zum Einsatz, die durch chelatbildende Liganden oder Mizellen stabilisiert sind. Die Mizellen oder Chelate stabilisieren den angeregten Zustand des Lanthanoids und bewirken einen verspäteten Übergang in den Grundzustand. Diese Verzögerung hat den Vorteil, daß sich Anregung und Emission nicht überschneiden und so eine hintergrundfreie Detektion des Fluoreszenzsignals möglich ist. Für Eu^{3+} z. B. werden Relaxationszeiten von 600-1000 μs beobachtet, während normale Fluorophore Relaxationszeiten von 5-100 ns aufweisen.

Fluorescein-, Resorufin- und Rhodaminderivate gehören zu den wichtigsten Fluoreszenzmarkern von Biomolekülen. Sie können prinzipiell an alle Klassen der Biomoleküle kovalent gebunden werden. Man muß dafür nur eines der Derivate auswählen und mit einer der vorhandenen Hydroxy-, Säure- oder Aminogruppen des entspre-

chenden Moleküls verknüpfen. Bei Nucleosiden mit Purinbasen bietet sich z. B. die exozyklische Aminogruppe als Kopplungsstelle an. Unter milden Reaktionsbedingungen reagieren Aminogruppen mit **N-Hydroxysuccinimidestern** (NHS-Ester), sowie 5(6)Carboxyfluorescein-NHS-Estern und *N*-(Resorufin-4-carbonyl)-piperidin-4-carbonsäure-NHS-Estern. In Abbildung 18 sind die aus den beiden NHS-Estern entstandenen Produkte 5(6)Carboxyfluorescein-dG **28** und *N*-(Resorufin-4-carbonyl)-piperidin-4-carbonsäure-dG **29** gezeigt. Die beiden fluoreszenzmarkierten 2'-Desoxyguanosine besitzen augenscheinlich eine große, räumliche Ausdehnung und ein bis zu dreimal größeres Molekulargewicht als 2'-Desoxyguanosin **63** selbst. Außerdem kommen durch die Fluoreszenzmarker viele neue funktionelle Gruppen hinzu, wie Hydroxy-, Ether-, Keto-, Säure- und Estergruppen, die als solche ungewünschte Reaktionen und Wechselwirkungen eingehen können.

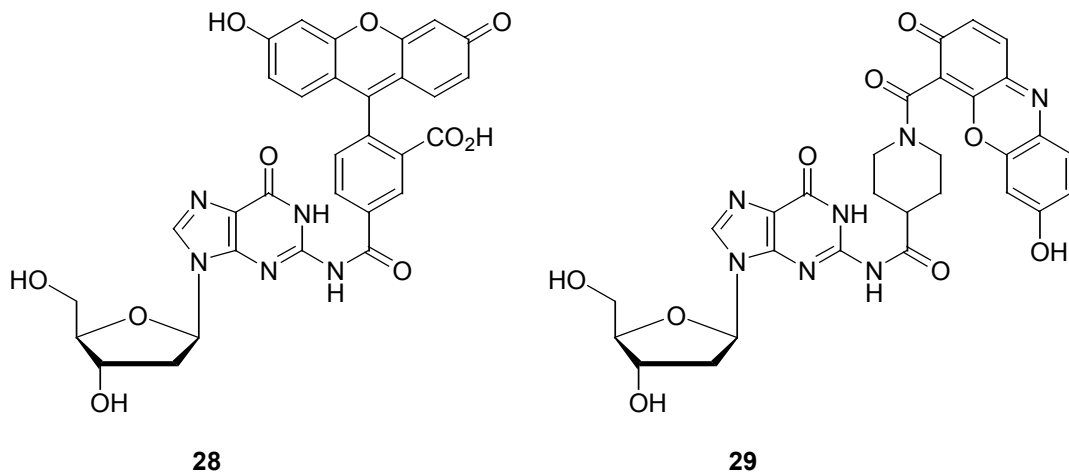


Abbildung 18 Beispiele für fluoreszenzmarkierte 2'-Desoxyguanosine

Es liegt auf der Hand, daß sich solche fluoreszenzmarkierten Desoxyguanosine, sowie andere nach dieser Methode fluoreszenzmarkierte Nucleosidanaloga, nicht ohne weiteres mit den unmodifizierten Nucleosiden vergleichen lassen. Ihre Metabolisierung in die bioaktiven Triphosphate kann durch die mangelnde Substratspezifität zum aktiven Zentrum der entsprechenden Enzyme gestört sein. Nicht zu unterschätzen sind auch unerwartete Metabolisierungen bis hin zu einer erhöhten Cytotoxizität. Letztendlich stellen fluoreszenzmarkierte Nucleosidanaloga durch die stark geänderten physikalisch-chemischen Eigenschaften nur sehr begrenzt einsetzbare biochemische Sonden dar.

Um unverfälschte Erkenntnisse gewinnen zu können, sollte die Fluoreszenz durch möglichst wenige Veränderungen am Nucleosid erreicht werden. Aus der Literatur

sind einige Beispiele bekannt, bei denen der Purinheterozyklus durch wenige Modifikationen in eine fluorophore Gruppe verwandelt werden konnte (Abbildung 19).

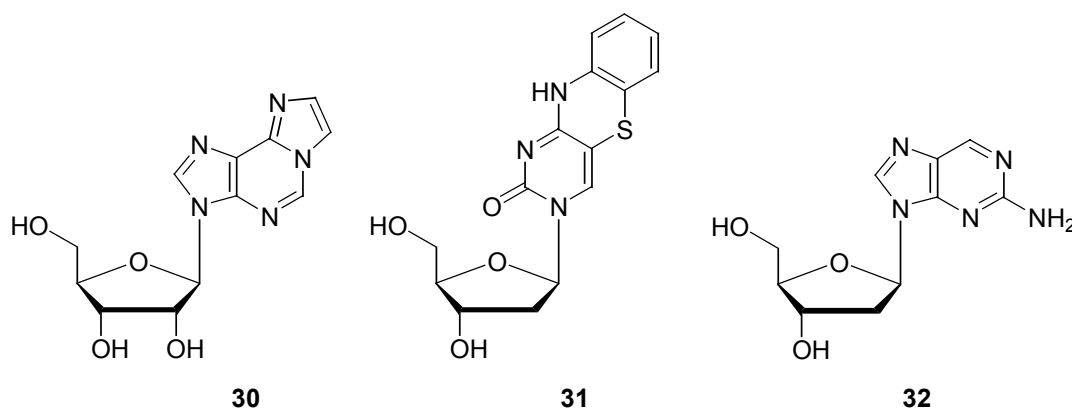


Abbildung 19 Fluoreszierende Nukleosidanaloga

Auf den ersten Blick erkennt man, daß diese fluoreszierenden Nukleosidanaloga weitaus eher den gestellten Anforderungen einer neutralen Sonde entsprechen. 3-(β-D-Ribofuranosyl)-imidazo[2,1-i]purin **30** (1,N⁶-Ethenoadenosin, ε-Adenosin) findet als fluoreszierendes, trizyklisches Nukleosidanalogen bei der Detektion von ATP in biologischen Systemen Anwendung^{56,57}. 3-β-D-2'-Desoxyribofuranosyl-3,5-diaza-4-oxo-pheothiazin **31**, dessen hervorragende Fluoreszenzeigenschaften erst kürzlich entdeckt wurden, hat sich als sehr effektives Cytosinanalogen herausgestellt, das sogar eine stabile Basenpaarbindung mit Guanin eingehen kann⁵⁸. Das trizyklische Ringsystem stabilisiert DNS-Helices und selektiert exakt zwischen Adenin und Guanin⁵⁹. Außerdem wird durch den Einbau von **31** die Schmelztemperatur der DNS erhöht und die Fluoreszenzeigenschaften des freien Nukleosides bleiben im Oligonukleotid erhalten⁶⁰. 2-Amino-9-β-D-2'-desoxyribofuranosylpurin **32** (2-Aminopurin) besitzt aufgrund seiner stark ausgeprägten Fluoreszenz die optimalen Voraussetzungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in extrem geringen Konzentrationen⁶¹. 2-Aminopurin **32** bildet stabile Basenpaare mit Thymin und Cytosin und kann so Adenin und Guanin in einem DNS-Doppelstrang ersetzen⁶². Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt in freier Form 68 %, wird aber durch Einbau in Oligonukleotide deutlich gemindert⁵⁸. Unter physiologischen pH-Werten ist die Fluoreszenz optimal und toleriert einen breiten pH-Bereich. Da dieses Nukleosidanalogen elektromagnetische Wellen bei größeren Wellenlängen als die natürlichen vorkommenden Nucleoside absorbiert, kann es auch bei einem großen Überschuß natürlicher Basen durch selektive Anregung sichtbar gemacht werden. Eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen laufen mit

2-Aminopurin **32** in gleicher Weise ab, wie mit ihren natürlichen Vertretern⁶³. Die in der Literatur beschriebene Synthese von 2-Aminopurin **32** wurde nur im Mikromaßstab ausgehend von 2'-Desoxyguanosin **63** durchgeführt. Vor dem Einsatz in der *cycloSal*-Synthese muß deshalb zunächst ein Transfer der Synthese des fluoreszierende Nucleosides **32** in den Grammaßstab gelingen, da ein alternativer Syntheseweg bisher noch nicht vorgeschlagen wurde.

3. Aufgabenstellung

Synthese und Hydrolyseverhalten von „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Pronukleotide

Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung neuer „lock-in“-modifizierter *cycloSal*-Nukleosid-Monophosphate. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Synthesen während meiner Diplomarbeit⁵², soll dabei weniger die Variation des Nukleosides im Vordergrund stehen, sondern die Erweiterung der Auswahl an „lock-in“-funktionalisierenden Estern des Saligenyl-Substituenten. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus den anschließenden Untersuchungen zur enzymkatalysierten Hydrolyse dieser Ester. Der bisherige Syntheseweg erlaubt keine weitere Variation der Estergruppe. Es ist weder möglich, andere Alkohole mit dem 2'-Carboxyethyl-Substituenten zu verestern, noch sind die geplanten „umgedrehten“ Ester (Abbildung 22, S. 29) zugänglich. Infolgedessen stehen als Substrate für die Carboxyesterase nur die 3-(Methyl-3'-propionyl)-*cycloSal*-NMPs **77a** und **25a-c** (Abbildung 17, S. 22) zur Verfügung. Es ist aber durchaus möglich, daß der Methyl ester überhaupt kein Substrat für dieses Enzym ist. Vielleicht war deshalb auch das Hydrolyseprodukt 3-(2'-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4TMP **27** (Abbildung 20) bei den durchgeführten HPLC-Untersuchungen nicht nachzuweisen⁵². Unabhängig von der Enzymhydrolyse sollen die Verbindungen **27** und **38-40** hergestellt werden, um deren Eigenschaften zu untersuchen und diese anschließend als Referenz einsetzen zu können.

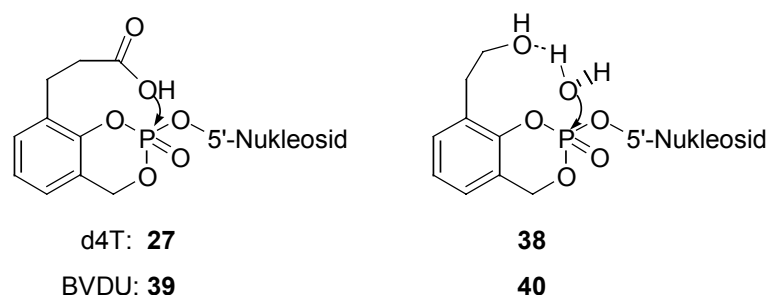


Abbildung 20 Hydrolyseprodukte der 3-Ester-Substituenten und erwarteter assistierender Effekt bei der Phosphattriesterhydrolyse

Die 3-Position der Ester-Substituenten wurde gewählt, um zusätzlich die Auswirkungen der freigesetzten Carbonsäure- oder Alkoholfunktion auf die Hydrolyse des Phosphattriesters untersuchen zu können. Im Idealfall könnte die jeweils entstehende polare Gruppe, durch einen assistierenden Effekt die chemische Hydrolyse und

damit die Freisetzung des Nukleotides beschleunigen (Abbildung 20 und Abbildung 66, S. 72). Um diesen Effekt nachweisen zu können, sollen zusätzlich die regioisomeren, 5-substituierten *cycloSal*-Pronukleotide hergestellt werden. Ohne einen assistierenden Effekt sollten sich die Halbwertszeiten der Hydrolyseprodukte **41-44** nur wenig von denen der 3-Isomere **27, 38-40** unterscheiden. Eine deutliche höhere Halbwertszeit der 5-Isomere wäre ein erster, guter Beweis für die Existenz dieser Wechselwirkung.

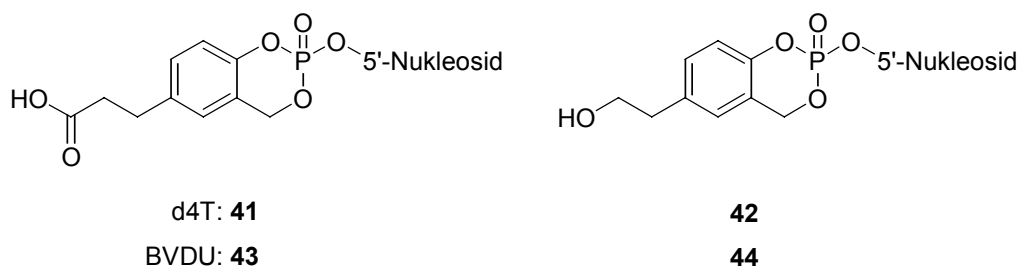
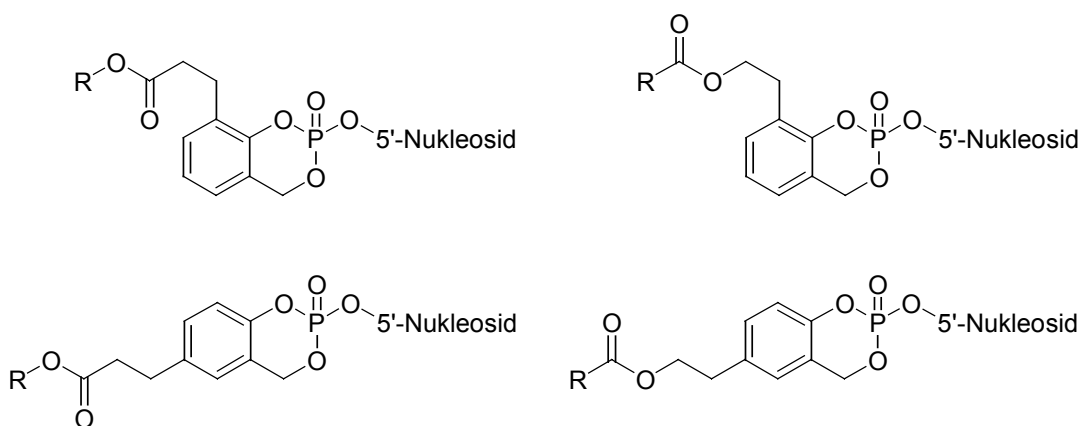


Abbildung 21 Hydrolyseprodukte der 5-substituierten *cycloSal*-NMPs

Um alle Verbindungen zugänglich zu machen, muß der Syntheseweg so modifiziert werden, daß keine Einschränkung bei der Synthese der geplanten *cycloSal*-NMPs mehr hingenommen werden muß, wobei der Schwerpunkt sicherlich auf die Hydroxymethylierung der Phenolderivate zu setzen ist. Schließlich war dieser Schritt bisher für die starke Limitierung verantwortlich.



Nukleosid: d4T **7**, BVDU **15**, 2-Amino-dP **32**, 2-Amino-ddP **35**; **R:** z.B. Methyl, *tert*-Butyl

Abbildung 22 Geplante „lock-in“-modifizierte Zielverbindungen

Die „lock-in“-modifizierten Saligenyl-Masken können dann mit den beiden Nukleosidanaloga d4T **7** und BVDU **15** in die entsprechenden *cycloSal*-NMPs überführt werden. Zunächst sollen die Hydrolysestabilitäten der Phosphattriester in isotonischem Phosphatpuffer bei pH 7.3 bestimmt werden. Danach soll das intrazelluläre Verhal-

ten der Verbindungen, insbesondere der Carbonsäureester, in einem Carboxyesterase-Assay mit Schweineleberesterase (engl. pig-liver esterase, PLE) simuliert und untersucht werden. Anschließend soll das Verhalten der Carbonsäureester durch eine weitere Hydrolyseuntersuchung in den entsprechenden Zellhydrolysaten humaner CEM/0-Zellen (d4T-Verbindungen) bzw. P3HR-1-Zellen (BVDU-Verbindungen) aufgeklärt und mit den Ergebnissen des Carboxyesterase-Assays verglichen werden. Ziel der PLE- und Zellextrakt-Kinetiken ist in erster Linie nicht die Bestimmung der intrazellulären Stabilitäten, sondern der Nachweis der Hydrolyseprodukte **27** und **38-44**, die in Gegenwart der verschiedenen Carboxyesterasen entstehen sollten. Dadurch wäre der Beweis für die Funktionsfähigkeit des „lock-in“-Konzeptes erbracht.

Für Fluoreszenz-analytische Studien sollen einige ausgewählte „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-NMPs mit dem fluoreszierenden Nukleosidanalogen 2-Amino-dP **32** hergestellt werden. Das Nukleosidanalogen **32** muß dafür erst einmal durch einen neuen Syntheseweg im größeren Maßstab zugänglich gemacht werden, so daß eine ausreichende Menge für die *cycloSal*-Synthese zur Verfügung steht. Mit Hilfe der Fluoreszenzanalytik könnten diese neuartigen *cycloSal*-Derivate es ermöglichen, bisher unbekannte Aspekte des *cycloSal*-Konzeptes (insbesondere des „lock-in“-Mechanismuses) aufzuklären.

Abschließend stellt sich die sehr interessante Frage, ob die „lock-in“-Funktionalisierung der *cycloSal*-Pronukleotide auch deren antivirale Wirkung beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Frage sollen die antiviralen Aktivitäten und Cytotoxizitäten mit Hilfe von *in vitro*-Zelltests in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Rega-Institut Leuven, Belgien bestimmt werden.

4. Resultate und Diskussion

4.1. Synthese von Ester-substituierten Saligenylalkoholen

4.1.1. Synthesestrategie zur Darstellung der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Pronukleotide

Zur Darstellung der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs kann ausgehend von den unterschiedlich substituierten Saligenylalkoholen auf eine bewährte Methode zurückgegriffen werden, die in unserem Arbeitskreis entwickelt wurde⁶⁴.

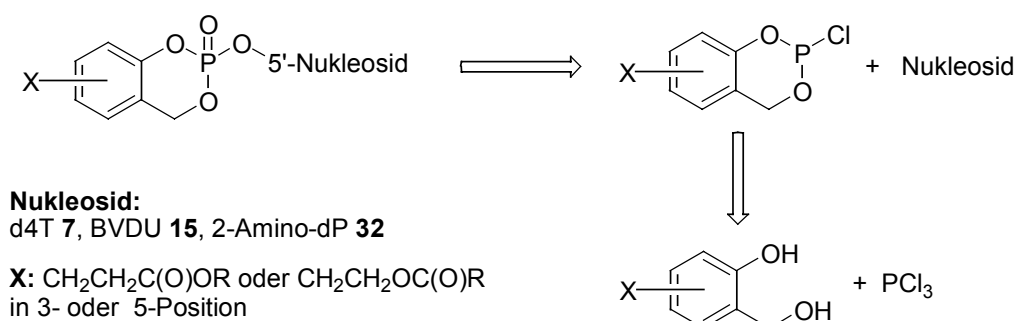


Abbildung 23 Retrosyntheschema zur Darstellung der Zielverbindungen

Dabei erreicht man den Einbau der Phosphatgruppe über das Saligenylalkohol-Derivat, so daß es möglich ist, die drei unterschiedlichen Nucleoside d4T **7**, BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** mit den zyklischen Saligenylchlorphosphanen zu den entsprechenden Phosphiten umzusetzen, welche anschließend noch zum gewünschten Phosphatriester oxidiert werden müssen (Abbildung 23). Die Saligenylchlorphosphane sind trotz der zusätzlich vorhandenen Estergruppe aus den entsprechenden Saligenolen darstellbar, was schon während meiner Diplomarbeit gezeigt werden konnte. Wie aus den Abbildung 20 und 21 zu erkennen ist, müssen deshalb zunächst einmal vier Grundtypen von Saligenylderivaten hergestellt werden, die in Abbildung 24 nochmals zusammengefaßt sind.

An die Saligenylalkohole werden folgende konstitutionelle Anforderungen gestellt: In 3- oder 5-Position sollen sie einen Ethylen-Substituenten besitzen, an den sich entweder ein veresterter Carbonsäure- oder Alkoholrest anschließt. Dieser Ethylen-„Spacer“ soll den Einfluß der elektronenziehenden Esterfunktionen auf den aromatischen Ring unterbinden, der sonst die Hydrolysestabilität der *cycloSal*-Maske erheblich verringern würde⁶⁵.

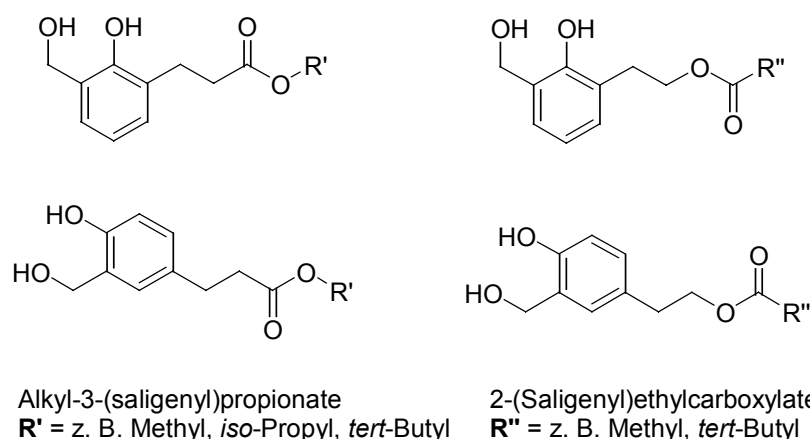


Abbildung 24 In 3- und 5-Position Ester-substituierte Saligenylalkohole

Als gemeinsame Synthesestrategie der Saligenylalkohole bieten sich Phenolderivate an, die in *ortho*- oder *para*-Position entweder einen 2-Carboxyethyl- oder einen 2-Hydroxyethyl-Substituenten tragen, und so die Möglichkeit bieten, die unterschiedlichen Ester einzuführen. Abschließend muß in *ortho*-Position zur phenolischen Hydroxylgruppe ein Hydroxymethyl-Substituent eingeführt werden, wobei auf Bedingungen zu achten ist, die von allen Esterfunktionen toleriert werden.

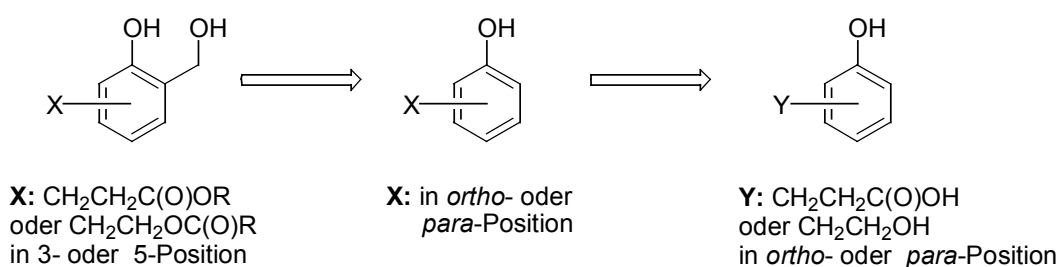


Abbildung 25 Retrosynthese der substituierten Saligenylalkohole

Diese Strategie hatte sich während meiner Diplomarbeit als günstiger herausgestellt, als das umgekehrte Vorgehen, bei dem zuerst der Salicylalkohol aufgebaut wurde, und dann der Versuch mißlang, die Estergruppe einzuführen. Eine Begründung dafür ist die Empfindlichkeit von Salicylalkoholen gegenüber Spuren von Säure sowie Wärme, die Nebenreaktionen fördern, wie sie in Arbeiten von A. Blade-Font *et al.* beschrieben werden⁶⁶. Im Vergleich dazu erscheint die Esterfunktion weitaus weniger problematisch und damit auch die Hydroxymethylierung in Anwesenheit einer solchen Gruppe. In den folgenden Kapiteln wird daher zunächst die Darstellung der verschiedenen *ortho*- und *para*-substituierten Phenolderivate beschrieben.

4.1.2. Darstellung von Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionaten

Zur Veresterung der 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** sollten folgende Alkohole zum Einsatz kommen: Methanol, Ethanol, 2-Propanol, Benzylalkohol und *tert*-Butanol. Zunächst wurde versucht, die Produkte durch Umesterung von Dihydrocumarin **45** mit den entsprechenden Alkoholen unter Säurekatalyse zu erhalten. Umesterungen gehören zu den Gleichgewichtsreaktionen und müssen deshalb auf die Seite des gewünschten Produktes gezogen werden. Im Idealfall lässt sich dies durch die destillative Entfernung des Alkohols mit dem niedrigeren Siedepunkt erreichen, sofern man den Ester des höher siedenden Alkohols erhalten möchte. Hier war dies aus zwei Gründen nicht möglich: Es handelt sich bei der Abgangsgruppe um einen Phenylalkohol, der zudem noch an das Produktmolekül gebunden bleibt.

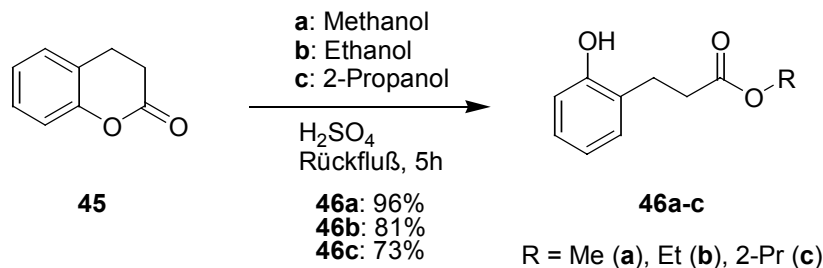


Abbildung 26 Umesterung von Dihydrocumarin **45**

Um dennoch möglichst hohe Ausbeuten zu erreichen, wurden die Reaktionen zu **46a-c** in einem großen Überschuß an Alkohol durchgeführt, indem dieser auch als Lösungsmittel verwendet wurde. Die guten Ausbeuten zeigen, daß sich hier die Theorie gut in die Praxis umsetzen ließ. Das Methyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46a** konnte beinahe quantitativ erhalten werden. Die Ausbeuten des Ethyl-**46b** und des 2-Propylesters **46c** fallen aufgrund der zunehmenden, sterischen Hinderung der Alkohole beim nukleophilen Angriff auf die Esterfunktion von Dihydrocumarin **45** in dem zu erwartenden Maß ab.

Der Versuch, auf diese Weise den Benzyl- und *tert*-Butylester herzustellen, gelang jedoch nicht. Die Veresterung der 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** mit den beiden Alkoholen führte, wie zu erwarteten war, zum bevorzugten Dihydrocumarin **45**. Wegen der Problematik der intramolekular begünstigten Lactonisierung wurde bei den vorangegangenen Synthesen Dihydrocumarin **45** selbst umgeestert. Um dennoch alle geplanten Ester zu erhalten, mußte ein Weg gefunden werden, die Carbonsäuregruppe so zu aktivieren, daß der angreifende Benzyl- oder *tert*-Butylalkohol bevor-

zugt verestert wird. Eine aus der Peptidsynthese bekannte Methode ist die Aktivierung mit 1,3-Thiazolidin-2-thion⁶⁷. Es entsteht ein „twisted“-Amid, welches ohne weitere Basen- oder Säurekatalyse selektiv den nukleophileren Reaktionspartner wählt. Das wäre dann der Benzyl- oder *tert*-Butylalkohol. Zuerst wurde versucht das Amid **48** ohne weitere Modifikation herzustellen. Eine ähnlich Synthese wurde von I.S. Blagbrough *et al.* für Zimtsäure-Derivate beschrieben⁶⁸, die in *meta*- und *para*-Position am Aromaten eine freie phenolische Hydroxylgruppe trugen und bei denen deshalb nicht die Möglichkeit der Lactonisierung bestand.

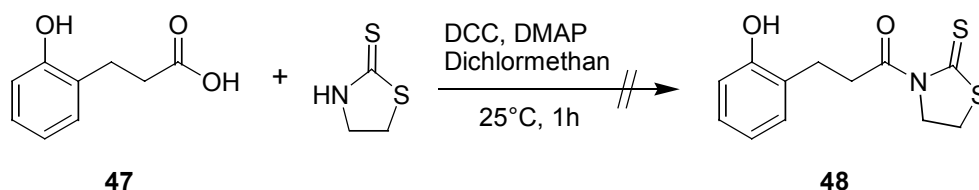


Abbildung 27 Versuch zur Darstellung von 3-[3-(2-Hydroxyphenyl)propanoyl]-1,3-thiazolidin-2-thion **48**

Und so war es weniger überraschend, als erneut Dihydrocumarin **45** mit einer Ausbeute von 69 % isoliert wurde. Offensichtlich hatte wieder die flexible Struktur des Propionsäure-Substituenten, verbunden mit der *ortho*-Position des Alkohols, die Reaktivität dominiert. Diese Problematik ließ die Einführung einer Hydroxy-Schutzgruppe als unumgänglich erscheinen.

In der Literatur⁶⁷ wird bei Synthesen mit Tyrosin, einer Aminosäure die ebenfalls eine phenolische Hydroxylgruppe trägt, diese meistens geschützt in Form eines Benzylethers eingesetzt. Analog zur literaturbekannten Umsetzung mit *para*-Hydroxycimtsäure⁶⁹, konnte diese Schutzgruppe auch hier erfolgreich eingeführt werden.

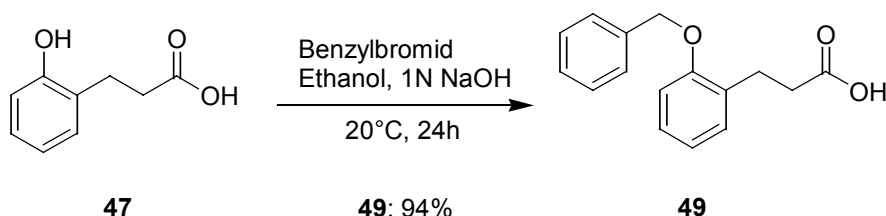


Abbildung 28 Einführung einer Benzyl-Schutzgruppe

Nachdem durch die Schutzgruppe eine Lactonbildung ausgeschlossen war, sollte nun versucht werden, die 3-(2-Benzyloxyphenyl)propionsäure **49** in das aktivierte Amid **50** (Abbildung 29) zu überführen. Natürlich hätte man jetzt auch versuchen können, den Benzylester direkt durch eine säurekatalysierte Veresterung mit Benzyl-

alkohol zu erhalten. Durch die Synthese des „twisted“-Amids **50** sollte aber überprüft werden, ob das Versagen der vorherigen Veresterung wirklich mit der Anwesenheit der phenolischen Alkoholgruppe begründet werden kann.

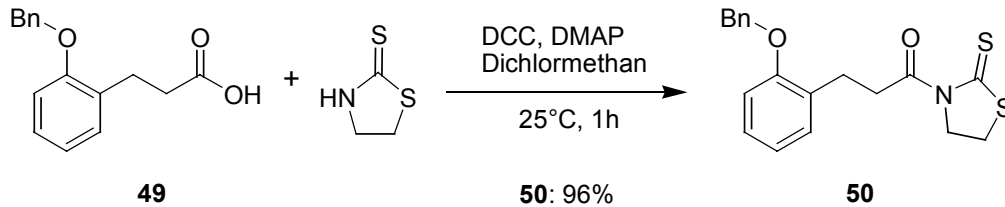


Abbildung 29 Darstellung von 3-[3-(2-Benzyloxyphenyl)propanoyl]-1,3-thiazolidin-2-thion **50**

Das Produkt **50** konnte mit einer erstaunlich hohen Ausbeute von 96 % als gelber Feststoff gewonnen werden. Der Farbton ist für diese Amide charakteristisch und dessen Änderung bei einer Folgereaktion kann als Indiz für das Fortschreiten der Umsetzung dienen. Damit wurde gezeigt, daß das „twisted“-Amid **48** durch den freien phenolischen Alkohol entweder gar nicht erst entstehen konnte, oder nach der Bildung sofort weiter zu Dihydrocumarin **45** reagierte.

Bei Recherchen, die helfen sollten, ein selektives, mildes Reagenz zu finden, das nach der anschließenden Veresterung des Amids **50** eine Entschützung neben der Esterfunktion erlauben würde, wurde eine Vorschrift für die Synthese von Benzyl-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)propionat **84** gefunden. Die Esterfunktion wurde dabei durch eine nukleophile Substitution an Benzylbromid⁷⁰, in einer guten Ausbeute von immerhin 65 % erhalten.

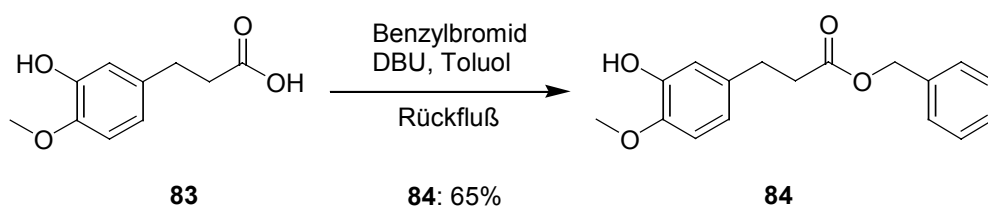


Abbildung 30 Literatursynthese von Benzyl-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)propionat **84**

Das Problem zweier nukleophiler Gruppen wird dabei durch eine selektive Deprotonierung der acideren Carbonsäure mit nur einem Äquivalent DBU zu deren Gunsten entschieden. Obwohl der Phenylalkohol nicht in der problematischen *ortho*-Position zum 2-Carboxyethyl-Substituenten steht, muß bei einem Transfer der Reaktionsbedingungen für die Synthese von Benzyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46d** nicht un-

bedingt wieder mit der Lactonisierung gerechnet werden. Schließlich stellt ein deprotoniertes Carboxylat-Anion einen äußerst schlechten Angriffspunkt für einen nukleophilen Alkohol dar, sondern ist selbst ein gutes Nukleophil, wie mit der erfolgreichen Synthese des Benzylesters **46d** bewiesen werden konnte.

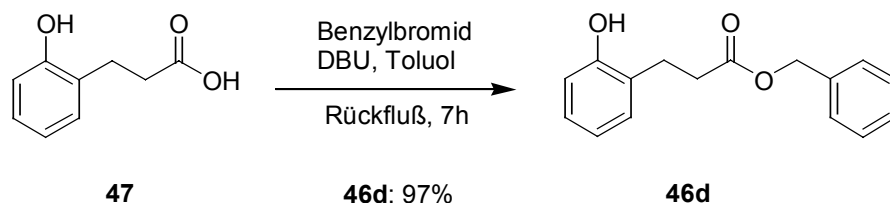


Abbildung 31 Darstellung von Benzyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46d**

Der Benzylester **46d** wurde mit einer hervorragenden Ausbeute von 97 % gewonnen. Der Versuch, den *tert*-Butylester **46e** durch die analoge Umsetzung mit *tert*-Butylbromid zu erhalten, wurde nicht in Erwägung gezogen. Zum einen hätte der niedrigere Siedepunkt von *tert*-Butylbromid nur eine geringe Reaktionstemperatur zugelassen und zum anderen mußten als Nebenreaktion Friedel-Crafts-Alkylierungen befürchtet werden.

Das *tert*-Butyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46e** konnte schließlich durch die Veresterung des Propionsäurederivates **47** mit *tert*-Butanol unter Vermittlung von *N,N*-Dimethylformamid(DMF)-Dineopentylacetal⁷¹ mit guter Ausbeute verestert werden. Durch die sauren Bedingungen wird einer der acetalisierten Neopentylalkohole in einem vorgelagerten Gleichgewichtsschritt durch *tert*-Butanol substituiert. Das gemischte Acetal-Derivat überträgt dann ein *tert*-Butyl-Kation auf die deprotonierte Carboxylatfunktion.

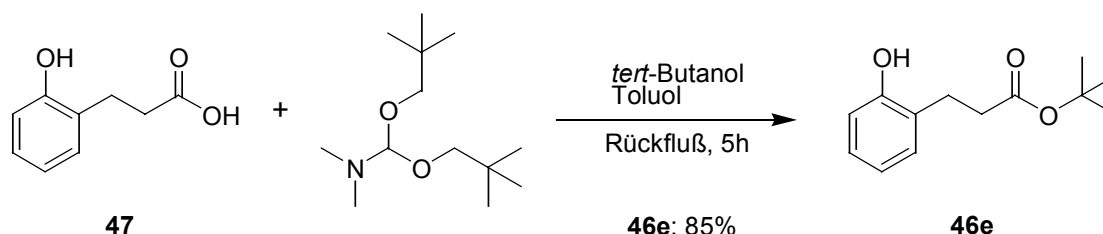


Abbildung 32 Darstellung von *tert*-Butyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46e**

Damit waren alle gewünschten Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionate in guten Ausbeuten hergestellt. Der zuvor beschriebene Umweg, mit Hilfe der Einführung einer Benzyl-Schutzgruppe und der anschließenden Aktivierung zum „twisted“-Amid die

gewünschten Ester zu erhalten, war nun nicht mehr sinnvoll. Deshalb wurde dieser Syntheseweg verworfen und nicht weiter verfolgt.

4.1.3. Darstellung der Alkyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionate

Bei der Synthese der *para*-substituierten Phenolderivate wurde zunächst versucht, die 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **51** unter Standardbedingungen säurekatalysiert zu verestern. Dies gelang in hohen Ausbeuten mit Methanol und Benzylalkohol, wobei der Benzylester **52b** nach einer Literaturvorschrift⁷² synthetisiert wurde (Lit.-Ausbeute: 91 %).

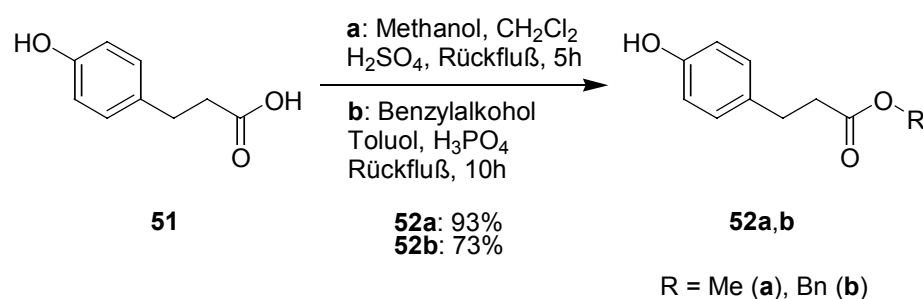


Abbildung 33 Darstellung von Methyl- und Benzyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52a,b**

Für die Veresterung von weniger reaktiven Alkoholen, wie 2-Propanol, ist es notwendig, mit einem Lösungsmittel zu arbeiten, welches eine azeotrope Entfernung des entstehenden Reaktionswassers erlaubt. Bei der Auswahl mußte unter anderem der Siedepunkt von 2-Propanol (Sdp. 82°C) beachtet werden, weshalb das zuvor verwendete Lösungsmittel Toluol (Sdp. 111°C) nicht mehr in Frage kam. So fiel die Entscheidung bei dieser Veresterung auf Chloroform (Sdp. 62°C). Mit Hilfe der dünn-schichtchromatographischen Reaktionsverfolgung konnte auch die erwartete Edukt-abnahme festgestellt werden. Um so erstaunlicher war die NMR-spektroskopische Auswertung des isolierten Produktes, bei der sich herausstellte, daß zwar der *iso*-Propylester **52c** entstanden war, aber die Probe größtenteils aus dem Ethylester-Derivat bestand. Da dieses Produktgemisch durch keinen der denkbaren Reaktionsmechanismen entstanden sein konnte, mußte eine Verunreinigung der Edukte angenommen werden. Bei genauer Überprüfung der möglichen Quellen stellte sich heraus, daß Chloroform zur Stabilisierung immer mit Ethanol versetzt in den Handel kommt. Da eine Trennung des Gemisches (sowohl des Lösungsmittel- als auch des

erhaltenen Produktgemisches) unter Verwendung der gängigen Methoden unmöglich war, wurde der *iso*-Propylester **52c** schließlich nach einer literaturbekannten Vorschrift⁷³ hergestellt. Die beinahe quantitative Ausbeute der Literatur von 98 % konnte nicht erreicht werden.

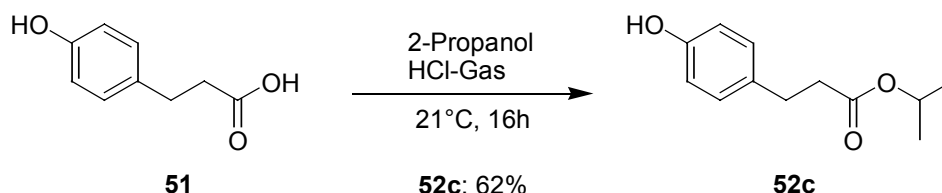


Abbildung 34 Darstellung von *iso*-Propyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52c**

Um den *tert*-Butylesters **52d** zu erhalten, wurde wieder analog der zuvor durchgeführten Synthese des *ortho*-Isomers **46e** vorgegangen. Die Ausbeute fiel aber mit 73 % etwas geringer aus.

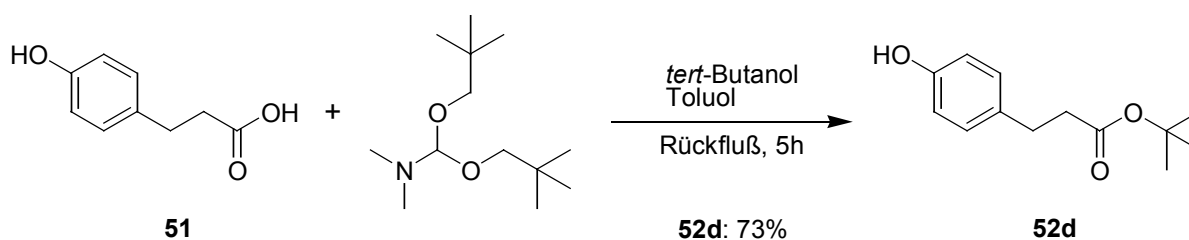


Abbildung 35 Darstellung von *tert*-Butyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52d**

4.1.4. Darstellung der 2-(2-Hydroxyphenyl)- und 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethylalkanoate

Nachdem nun alle gewünschten Propionate zugänglich waren, konnte mit der Syntheseplanung der „umgedrehten“ Ester begonnen werden. Im Gegensatz zu den 3-(Hydroxyphenyl)propionsäure-Isomeren **47** und **51** mußten für die Veresterungen der beiden regioisomeren Edukte 2-(2-Hydroxyphenyl)- **53** und 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol **54** keine unterschiedlichen Reaktionsbedingungen gefunden werden. Bei dem Versuch der selektiven Veresterung solcher Diole steht man aber dennoch vor einigen Problemen. Die meisten Carbonsäuren oder deren Derivate differenzieren wenig zwischen beiden Alkoholen und würden nicht selektiv den primären Alkylalkohol als Angriffspunkt wählen. Infolgedessen erhält man Produktgemische, die sich aus unterschiedlichen Anteilen der beiden Monoester und dem Diester zusammen-

setzen. Selbst wenn es möglich sein sollte, dieses Gemisch zu trennen, erhält man die gewünschten Produkte in schlechten Ausbeuten. In diesem Fall sollten Essigsäure-, Propionsäure- und Pivalinsäureester hergestellt werden, wobei Pivalinsäure aufgrund der drei Methylgruppen ((+)-I-Effekt) in α -Position zur Carboxylgruppe eine deutlich geringere Reaktivität für einen nukleophilen Angriff der Alkohole besitzen sollte. Alle genannten Fakten zeigen, daß für die geplanten Veresterungen nur sehr selektive Reaktionen in Frage kommen. Erstaunlicherweise gab es für die beiden Diole **53** und **54** schon eine literaturbekannte Acylierungsreaktion⁷⁴, bei der Ethylacetat zu beiden gewünschten Acetaten **55a,b** umgeestert wurde.

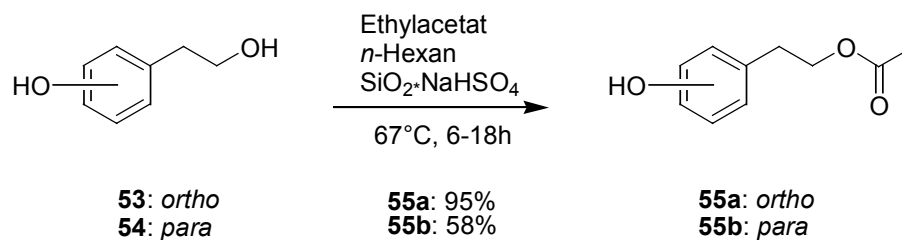


Abbildung 36 Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)- **55a** und 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylacetat **55b**

Der $\text{SiO}_2 \cdot \text{NaHSO}_4$ -Katalysator läßt sich durch einfaches Einrühren von Silicagel (chromatographische Qualität, 60 Å, 200-400 mesh) in eine wäßrige Natriumhydrogensulfat-Lösung herstellen, die anschließend noch 48 Stunden bei 120°C getrocknet werden muß. In dieser Form kann der Katalysator, bei trockener Lagerung, über Monate hinweg verwendet werden. Der größte Vorteil dieser Reaktion ist das raffinierte Reaktionsprinzip in Verbindung mit der milden Reaktionstemperatur, die zusammen einen kontrollierten Reaktionsverlauf ermöglichen. Der heterogene Katalysator wird in einem unpolaren Lösungsmittel von den Reaktanten (Ester und Diol) umgeben. Der Ester wiederum dient dabei gleichzeitig auch als Cosolvens. Unter diesen Bedingungen werden die sterisch weniger gehinderten primären Alkohole bevorzugt verestert. Ist die erste Hydroxylgruppe acetyliert, erhält man ein Produkt, dessen Polarität soweit herabgesetzt ist, daß eine Diffusion in das unpolare Lösungsmittel erfolgt und die zweite Acetylierung des phenolischen Alkohols kann ohne den Katalysator nahezu ausgeschlossen werden. So mußten bei der Aufreinigung auch nur das Edukt, welches danach wieder eingesetzt werden konnte, und Spuren (< 5 %) des Diesters abgetrennt werden.

Zur Veresterung der Propionsäure lag es nahe, die Acylierungsreaktion so zu ändern, daß Ethylacetat durch Ethylpropionat ersetzt wurde, welches unter diesen Reaktionsbedingungen eine beinahe identische Reaktivität besitzen sollte. Natürlich änderte sich dadurch die Polarität des Lösungsmittelgemisches. Offensichtlich war das aber weniger problematisch, denn das Propionat **55c** wurde auf diese Weise in einer guten Ausbeute von 85 % gewonnen.

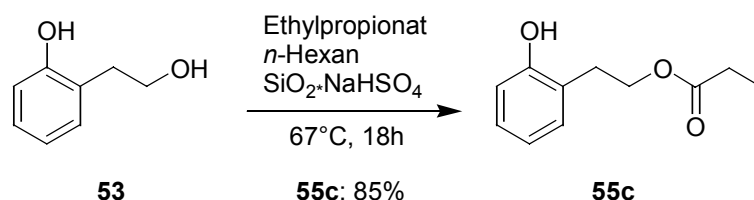


Abbildung 37 Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpropionat **55c**

Um die Synthesemöglichkeiten dieser Reaktion noch mehr zu erweitern, wurde nun versucht, auch Ethylpivalat und -benzoat umzuestern. Beide Ethylester waren aber nicht geeignet, um unter diesen milden Bedingungen zu den entsprechenden Produkten zu führen. Neben der geringeren Reaktivität dieser Ester könnte das diesmal tatsächlich an der geänderten Lösungsmittelpolarität liegen.

Neben der Variation des Esters ließe sich die Reaktion auch zur selektiven Einführung von Hydroxyl-Schutzgruppen verwenden. So verlangen viele Reaktionen mit 2'-Desoxynukleosiden häufig eine selektive Schützung der 5'-Hydroxylgruppe, wobei zwischen einem primären und sekundären Alkohol unterschieden werden muß. Diese Aufgabe stellte sich auch bei der 3'-Desoxygenierung von 2-Amino-dP **32**, um 2-Amino-ddP **35** zu erhalten, deren Synthese später versucht werden sollte (4.2.5.1., S. 57). Es bot sich der Versuch an, dieses Problem mit der Methode von G.W. Breton zu lösen. Als Modellreaktion wurde 2'-Desoxyguanosin **63** 24 Stunden bei 50°C in einer 30 %-igen Lösung von Ethylacetat in *n*-Hexan umgesetzt.

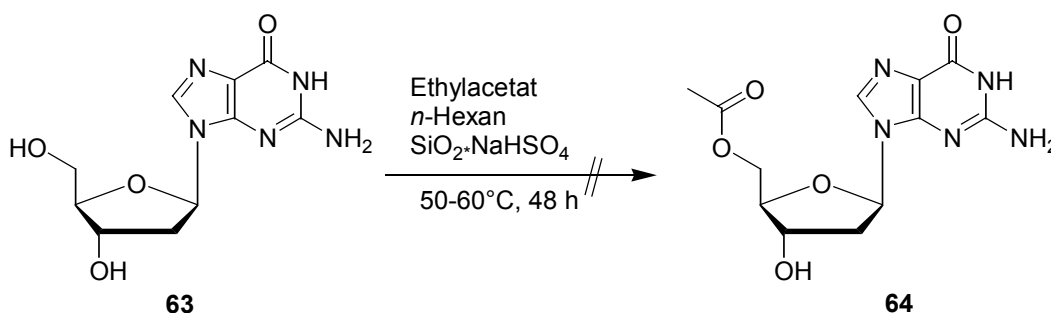


Abbildung 38 Versuch der Darstellung von 5'-O-Acetyl-2'-desoxyguanosin **64**

Da keine Produktbildung beobachtet werden konnte, wurde die Temperatur auf 60°C erhöht. Auch nach diesem Schritt zeigte sich keine Veränderung, was auf die schlechte Löslichkeit von 2'-Desoxyguanosin **63** zurückgeführt wurde. Deshalb wurde die Polarität der Lösung durch die weitere Zugabe von Ethylacetat und schließlich auch die Menge des Katalysators erhöht. Diese Maßnahmen bewirkten aber nur die Bildung von unerwünschten Produkten, weshalb die Reaktion nach 24 Stunden abgebrochen wurde. Die weitere Verminderung des Anteils an unpolarem *n*-Hexan oder gar die Substitution des selben, würde das Funktionsprinzip des heterogenen Katalysators außer Kraft setzen und die Selektivität ginge verloren. Daher wurde keine Möglichkeit gesehen, in diesem Fall zum Erfolg zu kommen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die Ethylester verschiedener Carbonsäuren selektiv mit primären Alkoholen umestern lassen, wohingegen weniger reaktive Ethylester von in α -Position verzweigten Carbonsäuren nicht zu einem Erfolg führen. Ein weiterer Nachteil dieser ansonsten synthetisch wertvollen Reaktion ist die eingeschränkte Löslichkeit von Diolen in einem Gemisch aus dem entsprechenden Ethylester und dem unpolaren *n*-Hexan, wodurch leider viele interessante Einsatzmöglichkeiten ausgeschlossen sind.

Für die Darstellung der Pivalate **55d,e** konnte schließlich eine andere selektive Veresterung⁷⁵ gefunden werden, die sich als optimale Ergänzung der zuvor beschriebenen Reaktion herausstellte. Ähnlich wie bei der Silicagel-unterstützten Umesterung von Ethylacetat bedient man sich hier wieder eines Carbonsäure-Derivates, wobei die unreaktivere Pivalinsäure eine besondere Aktivierung notwendig macht.

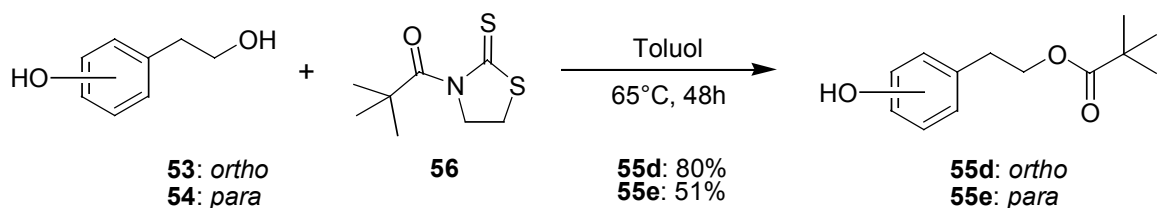


Abbildung 39 Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)- **55d** und 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylpivalat **55e**

Würde man zu den naheliegenden Carbonsäurehalogeniden oder -anhydriden greifen, wäre das mit sauren oder basischen Bedingungen verbunden, die eine ungewollte Selektivität der phenolischen Hydroxylgruppe bewirken würden. Die in Abbildung 27 (S. 34) vorgestellten „twisted“-Amide hingegen, lassen sich unter neu-

tralen Bedingungen verestern und bringen dadurch alle Voraussetzungen mit, hier zum Erfolg zu führen.

Die erstaunliche Reaktivität der „twisted“-Amide unter diesen milden Bedingungen wird übrigens als Modellsystem für die enzymatische Aktivierung während der Peptidbindungshydrolyse gesehen, die bekanntlich rein chemisch nur unter weitaus extremeren Bedingungen zu erreichen ist.

Das Auxiliar **56** läßt sich durch basenkatalysierte Umsetzung von 1,3-Thiazolidin-2-thion mit Pivaloylchlorid herstellen. Nach dem Umkristallisieren erhält man das Produkt in Form von blaßgelben Plättchen, wobei die Farbe – wie weiter oben schon einmal erwähnt – charakteristisch für die „twisted“-Amide ist.

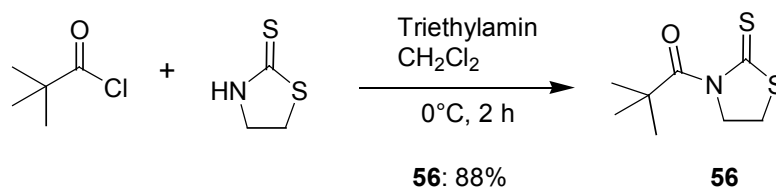


Abbildung 40 Darstellung von 3-Pivaloyl-1,3-thiazolidin-2-thion **56**

Durch den Einsatz der jeweils geeigneten Methode der beiden beschriebenen Veresterungen sollte es möglich sein, alle denkbaren Carbonsäuren mit den Diolen **53** und **54** selektiv zu verestern. In α -Position unverzweigte Carbonsäuren (verzweigte waren unreaktiv, s. o.) können nach der Überführung in den entsprechenden Ethylester mit dem $\text{SiO}_2 \cdot \text{NaHSO}_4$ -Katalysator nach G.W. Breton umgeestert werden. Die verzweigten Carbonsäuren (eine Verzweigung ist hierbei unbedingt notwendig, da sonst keine aktivierende Torsion der Amidgruppe erzwungen wird) hingegen müssen in die entsprechenden „twisted“-Amide überführt werden und stehen danach ebenfalls für eine selektive Veresterung zur Verfügung.

Nach der Darstellung aller geplanten Estervarianten mußte nun ein Syntheseweg zu den entsprechenden Saligenylalkoholen gefunden werden, der als entscheidender Schritt zu den neuen „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs bezeichnet werden kann.

4.1.5. α -Hydroxymethylierung der unterschiedlichen Phenolderivate

Eine Möglichkeit, Phenole in Saligenylalkohole zu überführen, ist der Umweg über die Salicylaldehyde. Nach der *ortho*-selektiven Formylierung und der anschließenden Reduktion erhält man so die gewünschten Salicylalkohole. Hierfür stehen z. B. die

Reaktionen nach Gattermann-Koch, Vilsmeier-Haack⁷⁶, Rieche⁷⁷ und Casiraghi⁷⁸ zur Verfügung. Wie aus der Literatur hervorgeht, weisen die Formylierungen nach Gattermann, Vilsmeier und Rieche größtenteils schlechte Ausbeuten und eine schlechte *ortho*-Selektivität auf. Durch die Erfahrungen bei früheren Arbeiten in unserem Arbeitskreis kam nur die Variante nach Casiraghi⁷⁸ in Betracht, zumal man die Hydrolyseempfindlichkeit der Estergruppe im Substituenten nicht übersehen darf. Aber auch diese relativ milden Reaktionsbedingungen wurden von der Esterfunktion nicht toleriert. Das als Nebenprodukt gebildete Methanol führte zu unbrauchbaren Umesterungsgemischen, die nur durch die Beschränkung auf den Methyl-ester zu vermeiden waren, weshalb während meiner Diplomarbeit⁵² nur 3-(Methyl-3'-propionyl)-*cycloSal*-NMPs hergestellt werden konnten. Diese Einschränkung galt es nun zu überwinden. Eine anderer – eigentlich naheliegender – Weg zu Saligenylalkoholen ist die direkte α -Hydroxymethylierung mit Formaldehyd, wie sie W. Nagata *et al.* für verschiedene Phenolderivate durchführte⁷⁹. Dabei wird das entsprechende Phenol mit Phenylboronsäure und *para*-Formaldehyd unter Propionsäure-Katalyse zur Bildung eines Saligenylboronats gebracht, das sich anschließend oxidativ oder schonender durch die Umesterung mit 1,3-Propanediol zum Salicylalkohol hydrolysieren läßt.

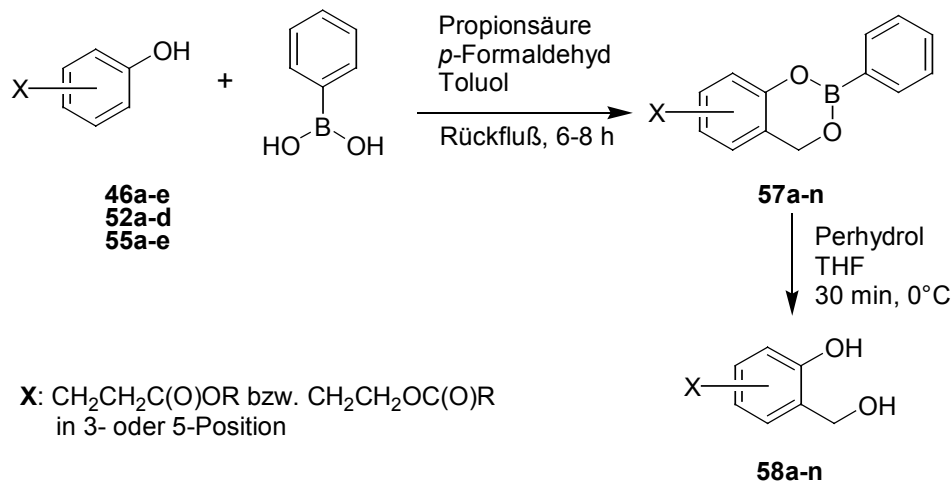


Abbildung 41 α -Hydroxymethylierung der hergestellten Phenolderivate **46a-e**, **52a-d** und **55a-e**

Die Reaktionsbedingungen erwiesen sich als geradezu ideal für die notwendige α -Hydroxymethylierung der substituierten Phenole **46a-e**, **52a-d** und **55a-e**. Selbst die Umsetzung der freien 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** gelang mit einer Ausbeute von immerhin 36 %. Erst die Verwendung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethanol **53** zeigte, wie erwartet, die Grenzen dieser Reaktion. Die Alkoholgruppe in der Seiten-

kette greift, nach Kondensation des Phenols mit einer der Phenylboronsäuregruppen, intramolekular am Boratom an und verhindert somit die Addition des Formaldehyd-Moleküls. Wie die untere Tabelle 1 zeigt, konnten die Salicylalkohole über beide Reaktionsschritte hinweg mit einer durchschnittlich guten Ausbeute von ca. 60 % erhalten werden.

Ein weiterer, interessanter Aspekt dieser Reaktion ist die Möglichkeit der Überführung anderer, multifunktionaler Phenole zu den entsprechenden Salicylalkoholen, wodurch nicht nur „lock-in“-modifizierte Phenole als *cycloSal*-Masken zugänglich gemacht werden können. Voraussetzung für das Gelingen der Reaktion ist eine ausreichende Löslichkeit des Phenolderivates in Toluol, da das Lösungsmittel nicht substituiert werden darf. Außerdem verschlechtern Akzeptor-Substituenten die Nukleophilie des Phenols und damit auch die Bildung des Boronats, weshalb solche Phenole nur schlecht hydroxymethyliert werden.

Tabelle 1 Ausbeuten bei der α -Hydroxymethylierung der Phenolderivate

Edukt	Substituent X in		Boronat	Saligenol	Gesamt-Ausbeute
	3-Position	5-Position	57a-p	58a-p	
46a	C ₂ H ₄ (CO)OMe	H	65 %	77 %	50 %
46b	C ₂ H ₄ (CO)OEt	H	80 %	88 %	70 %
46c	C ₂ H ₄ (CO)O <i>i</i> -Pr	H	66 %	79 %	52 %
46e	C ₂ H ₄ (CO)O <i>t</i> -Bu	H	66 %	86 %	57 %
46d	C ₂ H ₄ (CO)OBn	H	60 %	33 %	20 %
52a	H	C ₂ H ₄ (CO)OMe	80 %	80 %	64 %
52c	H	C ₂ H ₄ (CO)O <i>i</i> -Pr	93 %	93 %	86 %
52d	H	C ₂ H ₄ (CO)O <i>t</i> -Bu	77 %	87 %	67 %
52b	H	C ₂ H ₄ (CO)OBn	92 %	72 %	66 %
55a	C ₂ H ₄ O(CO)Me	H	68 %	86 %	58 %
55c	C ₂ H ₄ O(CO)Et	H	32 %	98 %	31 %
55d	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	H	86 %	86 %	74 %
55b	H	C ₂ H ₄ O(CO)Me	82 %	95 %	78 %
55e	H	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	88 %	72 %	63 %
59:	4-Methylumbelliferon		65 %	69 %	45 %
47	C ₂ H ₄ COOH	H	36 %	n. s.*	—

*n. s.: nicht synthetisiert

So gelang es, durch die α -Hydroxymethylierung von 4-Methylumbelliferon **59** (Umbelliferon selbst war kaum in Toluol löslich) die erste fluoreszierende Saligenylmaske herzustellen, die zusammen mit den fluoreszierenden Nucleosiden **32** und **35** ebenfalls zur Aufklärung des Hydrolysewegs der *cycloSal*-Pronucleotide in der Zelle beitragen kann. Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung, die bei dieser Reaktion gemacht wurde, ist die unerwartete Regioselektivität, die nur eines der beiden möglichen Regioisomere entstehen ließ, wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist.

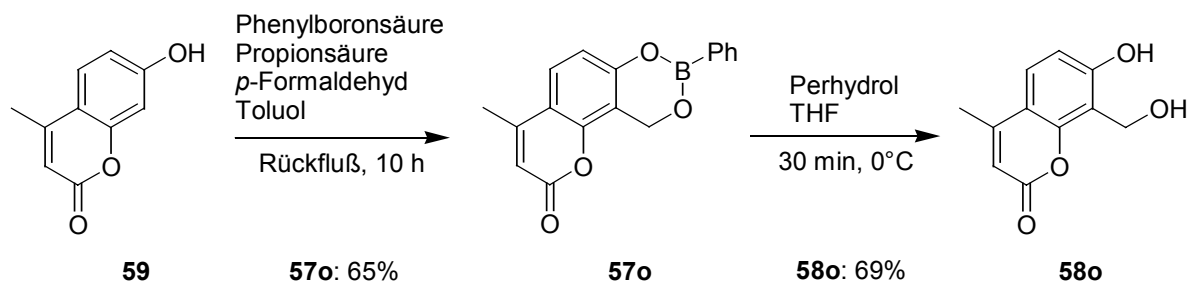


Abbildung 42 Regioselektivität bei der α -Hydroxymethylierung von 4-Methylumbelliferon **59**

Eine andere interessante Möglichkeit, die sich ebenfalls durch diese Reaktion eröffnet hat, ist die Synthese von Saligenylmasken, die *cycloSal*-Nucleotide in die Lage versetzen, aktive Transportmechanismen für das Passieren der Zellmembran zu nutzen. Dadurch könnten sogar synergistische Effekte erreicht werden. Daß so etwas tatsächlich möglich ist, konnte durch Nucleotid-Steroid-Konjugate gezeigt werden, wie sie C.I. Hong *et al.* hergestellt haben⁸⁰. Die Verbindungen konnten nachweislich die Blut-Hirn-Schranke überwinden, lieferten aber nicht das freie Nucleotid. Steroide die sich auf diesem Wege in *cycloSal*-Masken verwandeln lassen sind z. B. Östron **60** und Östradiol, da sie den notwendigen phenolischen Aromaten beinhalten. Die Umsetzung von Östron **60** verlief ähnlich gut, wie bei den zuvor eingesetzten Phenol-Derivaten.

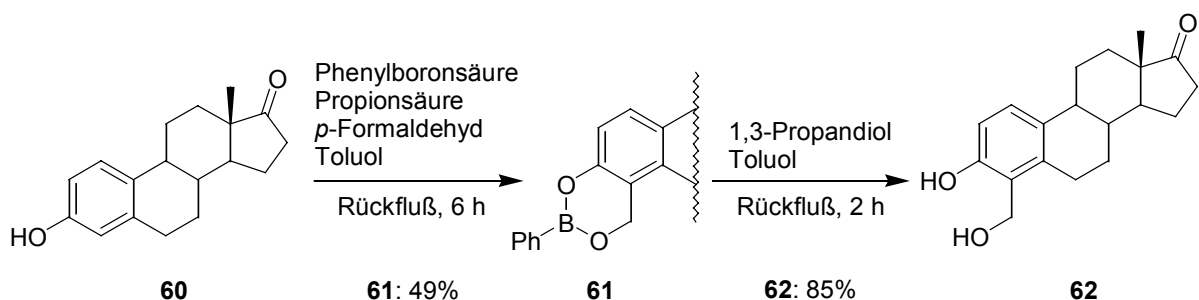


Abbildung 43 α -Hydroxymethylierung von Östron **60**

Nach dieser Methode gelang auch erstmals die Darstellung von 3-Phenylsalicylalkohol **67**, der als Edukt für die Synthese der entsprechenden *cycloSal*-Verbindung von Interesse war. Bei Untersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit⁸¹ durchgeführt wurden, sollte u. a. das 3-Phenyl-*cycloSal*-d4TMP auf dessen inhibitorische Wirkung gegenüber humaner Acetyl- und Butyrylcholinesterase untersucht und mit den 3-**26** und 5-Methyl-*cycloSal*-Verbindungen verglichen werden. Vorab durchgeführte *Molecular Modeling*-Untersuchungen von R. Esnouf legten den Schluß nahe, daß die Größe eines Phenylsubstituenten ausreicht, um eine Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum der Enzyme ausschließen zu können.

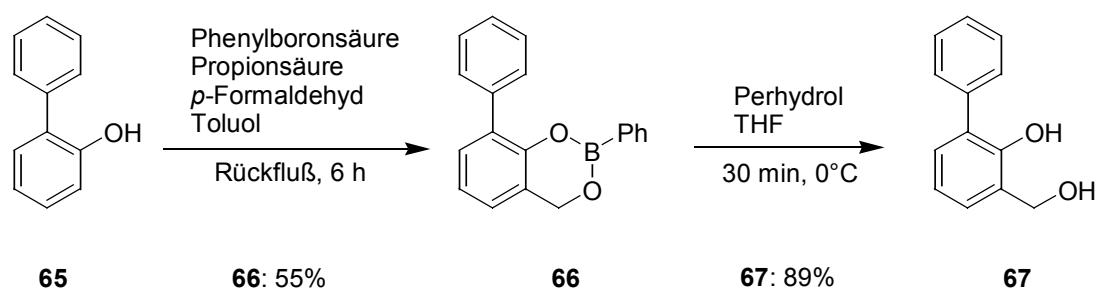


Abbildung 44 Darstellung von 3-Phenylsalicylalkohol **67**

Alle beschriebenen Reaktionen sind ein hervorragender Beleg für die vielfältigen Möglichkeiten, die mit dem Einsatz der Saligenol-Synthese nach W. Nagata für die Darstellung der Saligenylmasken eröffnet wurden. Viele Probleme die sich in der Vergangenheit bei diversen Arbeiten in unserem Arbeitskreis aufgrund der schlechten Zugänglichkeit der Saligenole ergaben, konnten und können mit ihr beseitigt werden. Neue – vorher undenkbare – *cycloSal*-Verbindungen lassen sich nun realisieren und stehen somit für die *in vitro*-Untersuchung zur Verfügung. Einige dieser Ideen wurden bereits in diesem Kapitel dargelegt und die ersten Synthesestufen auf dem Weg zu den Endverbindungen beschriftet.

4.2. Synthese der fluoreszierenden Nucleoside

Aufgrund seiner Struktur läßt sich 2-Aminopurin **32** gut zur Untersuchung der Metabolisierungswege der natürlichen Nucleoside Guanin und Adenin einsetzen. Das sich von 2-Aminopurin **32** ableitende 2',3'-Dideoxy-Derivat hingegen sollte eine geeignete Sonde für das Verhalten der antiviral-aktiven Nucleosidanaloga sein. **2-Amino-9-β-D-2',3'-dideoxyribofuranosylpurin 35** (2-Amino-ddP; X = H, Y = NH₂, Abbildung 45) wurde ungeachtet seiner Fluoreszenzeigenschaft neben anderen ddP-Derivaten, insbesondere 6-Halo-ddPs, erstmals 1990 dargestellt. Die Synthese gelang durch enzymatische Katalyse, wobei *E. Coli* als Wirtsbakterium die nötigen Enzyme bereitstellte⁸². Als Folge der hohen Lipophilie der 6-Halo-ddP-Derivate erhoffte man sich eine effektive Diffusion in die Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS). Dies ist von besonderem Interesse, da man annimmt, daß sich das HI-Virus in Nervenzellen stärker vermehrt, was durch eine Reihe von Nervenfehlfunktionen nach einer HIV-Infektion begründet wird. Das ZNS könnte eine Art Reservoir für die Viren darstellen, in das viele Wirkstoffe nicht eindringen können⁸³.

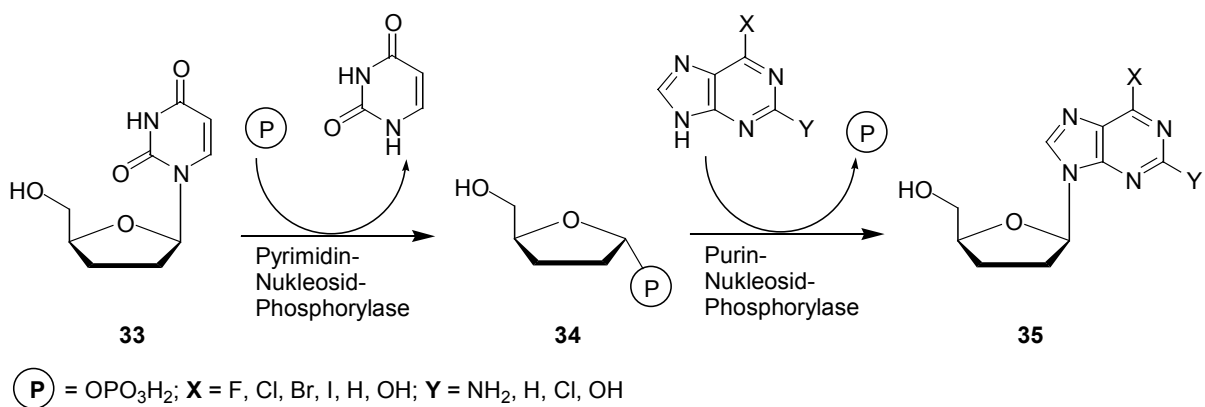


Abbildung 45 Enzymatische Synthese von ddP-Derivaten

Die durch Nucleosid-Phosphorylasen katalysierte Synthese erfolgt durch eine Transglykosylierung zwischen 2',3'-Dideoxyuridin **33** und dem entsprechenden Purinderivat. Zu den Vorteilen dieser Synthesestrategie zählt der kostengünstige Bezug des Edukts 2',3'-Dideoxyuridin **33** im Handel und der saubere Verlauf der Reaktion ohne die Bildung von Nebenprodukten oder Isomerisierungen. Als Nachteil sind in erster Linie die mäßigen Ausbeuten (40-20 %) zu nennen.

Leider stellte sich das desoxygenierte 2-Amino-ddP **35** als inaktiv gegen HIV-1 heraus. Die Aktivität gegen HIV-2 wurde aber genauso wenig untersucht, wie die sicher-

lich problematische Aktivierung zum Triphosphat, die auch hier für die fehlende Wirksamkeit verantwortlich sein könnte. Durch die Metabolisierung mittels ADA ließe sich eine Umwandlung in das anti-HIV-aktive 2',3'-**D**idesoxyguanosin **36** (ddG) erreichen. Im Gegensatz zu den 6-Halo-ddP-Verbindungen **37a-d**, die sich durch diesen Metabolisierungsweg als anti-HIV-aktiv erwiesen, war 2-Amino-ddP **35** kein Substrat für die ADA und blieb somit inaktiv (untere Abbildung). Das ist aber ein entscheidender Vorteil im Hinblick auf die Verwendung als Sonde, deren Fluoreszenz andernfalls verloren ginge. Die Cytotoxizität von 2-Amino-ddP **35** war bei diesen Untersuchungen vergleichbar mit der von AZT **2**.

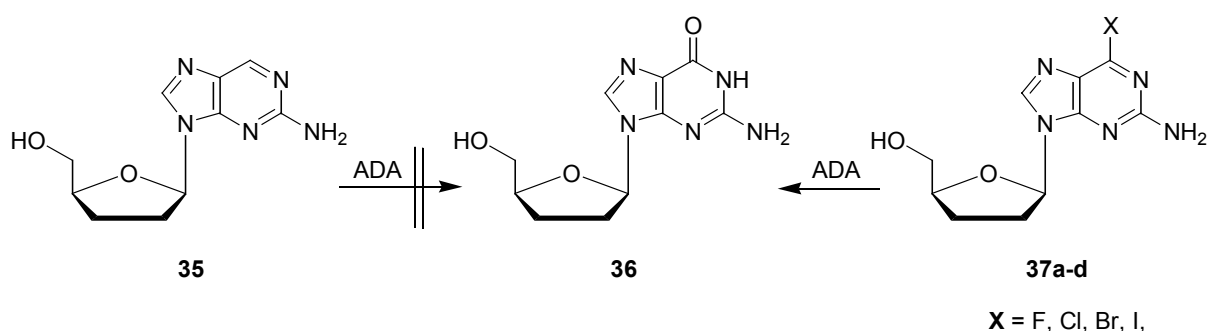


Abbildung 46 *Metabolismus verschiedener Nucleosidanaloga*

Alle genannten Eigenschaften machen die Nucleoside **32** und **35** zu hervorragenden Kandidaten für die Umsetzung zu fluoreszierenden *cycloSal*-Verbindungen. Je nach analytischer Fragestellung kann eines der beiden Nucleoside ausgewählt werden. Durch die Kombination mit der fluoreszierenden *cycloSal*-Maske **58o**, deren Synthese in Abbildung 42 (S. 45) beschrieben wurde, stünde ein Baukastensystem mit großartigen analytischen Möglichkeiten zur Verfügung. So könnten Maske und Nucleosid nebeneinander zu jeder Zeit der *in vitro*-Metabolisierung nachgewiesen und deren anschließender Verbleib verfolgt werden.

4.2.1. **Synthesestrategie zur Darstellung der fluoreszierenden Nucleoside 32 und 35**

Ausgangspunkt für die Darstellung der fluoreszierenden Nucleoside ist 2'-Desoxyguanosin **63**. Nach einer literaturbekannten⁸⁴ zweistufigen Synthese sollte das erste fluoreszierende Nucleosid **32** zugänglich sein, welches dann durch eine 3'-Desoxygenierung in das zweite Nucleosid **35** überführt werden könnte.

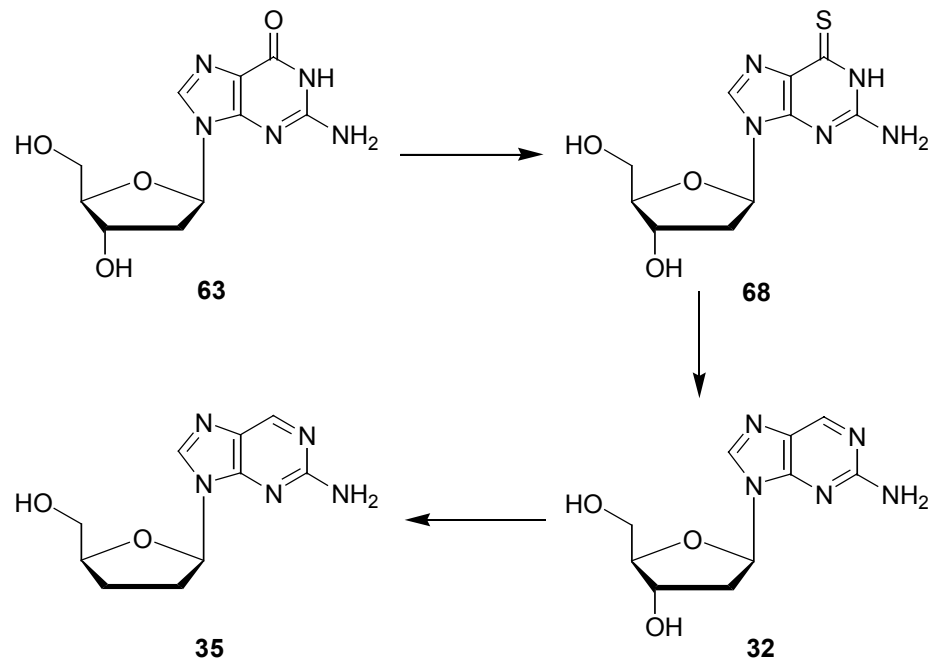


Abbildung 47 Syntheschema zur Darstellung der Nucleoside **32** und **35**

In der Literatur wird die Synthese von 2-Amino-dP **32** für eine Menge von ca. 200 mg beschrieben. Die Aufreinigung der einzelnen Stufe erfolgte durch HPLC-Methoden. Um genügend Edukt für die anschließende *cycloSal*-Synthese und die 3'-Desoxygenierungsversuche zu haben, mußte das Nucleosid **32** aber in deutlich größerer Menge hergestellt werden. So wurde zunächst einmal versucht, diese Vorschrift in den Grammaßstab zu transferieren. Dieser Syntheseweg wird als Methode **A** bezeichnet und im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.2.2. Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** nach Methode **A**

Die erste Synthese der Vorschrift⁸⁴ hat die Substitution des Carbonylsauerstoffs am Purinheterozyklus durch ein Schwefelatom zum Ziel. Als Zwischenprodukt erhält man also 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68**. Als Schwefelquelle dient Natriumhydrogensulfid, das den Carbonylkohlenstoff nukleophil angreifen muß, und schließlich den Sauerstoff ersetzen soll. Dafür wird der Sauerstoff vorab mit Trifluoressigsäure in Pyridin verestert und durch einen Pyridiniumrest ausgetauscht, welcher anschließend wiederum durch das angreifende Hydrogensulfid-Anion verdrängt werden kann und nach der Tautomerisierung das 6-Thio-derivat **68b** liefert. Durch den Transfer der Reaktionsbedingungen in den Grammaßstab konnte das Produkt **68** nur noch

mit einer mäßigen Ausbeute von 25 % erhalten werden. Dieses schlechte Ergebnis ist vor allem mit der problematischen Aufreinigung zu begründen.

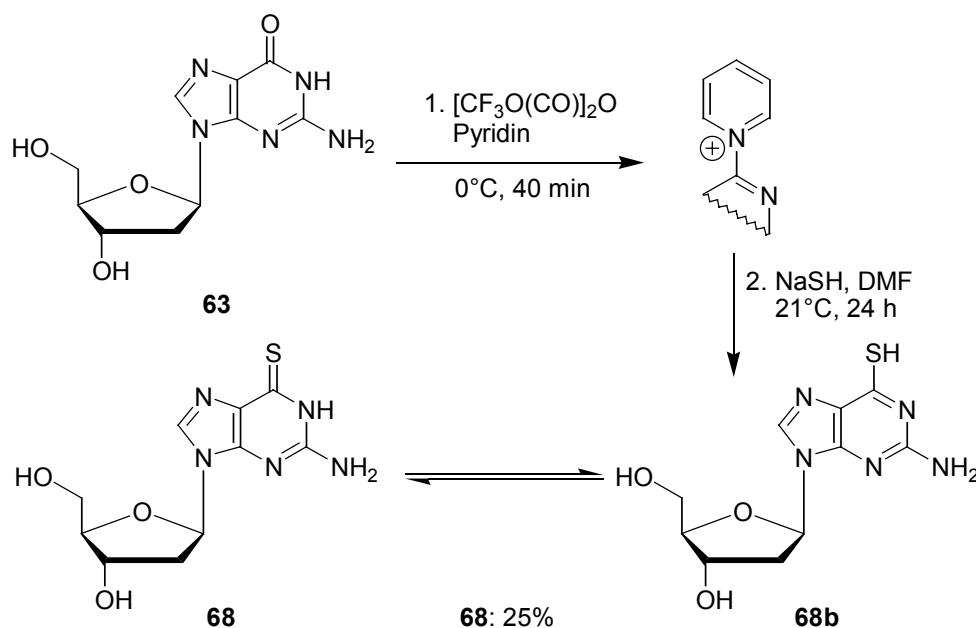


Abbildung 48 Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** mittels NaSH

Der große Überschuss an zugesetztem Natriumhydrogensulfid erschwerte die spätere Aufreinigung erheblich. Nach einer ersten säulenchromatographischen Trennung war das Produkt noch immer stark verunreinigt. Der Versuch das Produkt auszukristallisieren gelang nur, nachdem das Lösungsmittel DMF vollständig entfernt war. Die destillative Entfernung des Lösungsmittels nahm, wegen des hohen Siedepunkts (153°C), sehr viel Zeit in Anspruch. Die vorgeschlagene Aufreinigung des Rohprodukts mittels HPLC scheint das einzig sinnvolle Verfahren bei dieser Synthese zu sein. Diese Chromatographie schließt wiederum eine effektive Darstellung (u. a. wegen des enormen Verbrauchs an teuren HPLC-Lösungsmitteln) von größeren Mengen aus.

4.2.3. Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** nach Methode B

Die ursprüngliche zweistufige Methode **A** war offensichtlich nicht geeignet, um einen effizienten Syntheseweg zu den beiden fluoreszierenden Nukleosiden **32** und **35** zu gewährleisten. Mit dieser Methode konnten nur schlechte Ausbeuten bei gleichzeitig hohem Arbeits- und Zeitaufwand erzielt werden. Deshalb mußte ein anderer Syntheseweg zu 2-Thio-2'-desoxyguanosin **68** gefunden werden. Dabei ist die schlechte

Löslichkeit von 2'-Desoxyguanosin **63** in unpolaren, organischen Lösungsmitteln ein stark limitierender Faktor, durch den die Verwendung von Natriumhydrogensulfid sowie DMF kaum umgangen werden kann. Es gibt aber eine literaturbekannte Thiierung von *iso*-Butyryl-geschütztem 2'-Desoxyguanosin **69** mit Hilfe von Thioessigsäure, die mit einer hohen Ausbeute zwischen 90-86 % gelang⁸⁵.

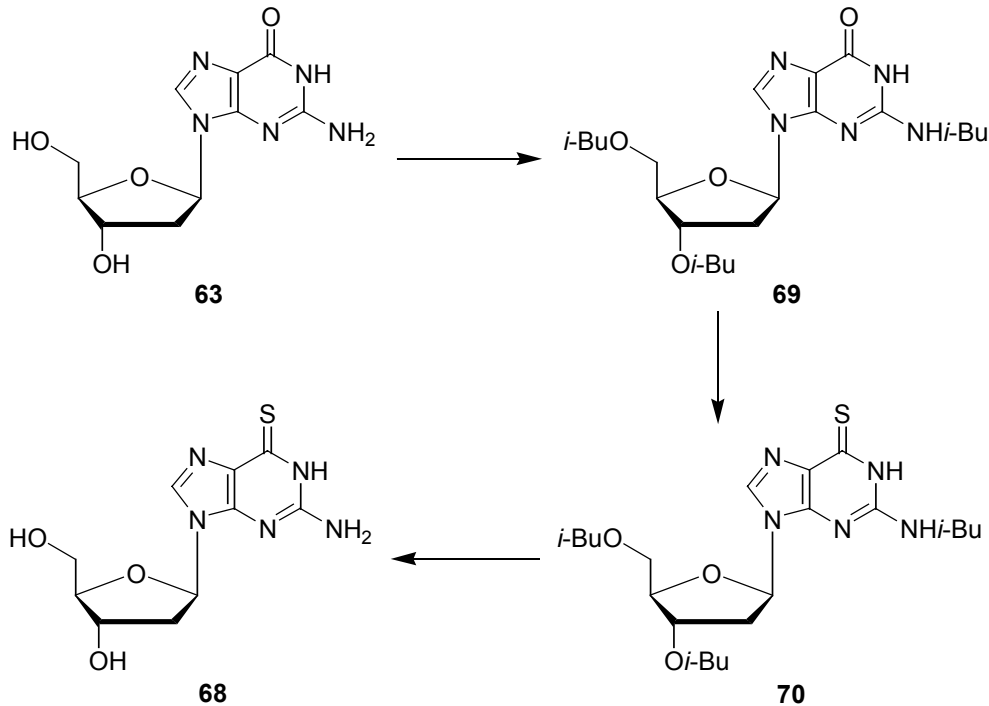


Abbildung 49 Methode **B** zur Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68**

Bei dieser als Methode **B** bezeichneten Syntheseweg müssen aber zwei zusätzliche Stufen in Kauf genommen werden, die insgesamt die Zahl der Syntheseschritte zum ersten fluoreszierenden Nukleosid **32** verdoppeln. Daß sich diese Schutzgruppenstrategie dennoch lohnt, soll im nächsten Kapitel gezeigt werden.

4.2.3.1. Darstellung von 2-*N*,3',5'-*O*-Tri-*iso*-butyryl-2'-desoxyguanosin **69**

Für die *iso*-Butyryl-Schätzung von 2'-Desoxyguanosin **63** gibt es verschiedene Vorschriften^{86,87}, die alle dem gleichen Prinzip folgen. Das Nukleosid **63** wird in Pyridin suspendiert und unter Kühlung wird *iso*-Butyrylchlorid zugegeben. Die Kühlung sollte dabei unter 10°C gehalten werden, um Nebenreaktionen, wie eine zweifache Umsetzung der exozyklischen Aminogruppe, zu vermeiden. Diese Reaktion empfiehlt sich übrigens auch, wenn man nur das einfach geschützte *N*-2-*iso*-Butyryl-2'-desoxyguanosin erhalten möchte, daß sich danach durch eine selektive Hydrolyse der beiden *iso*-Butyratgruppen darstellen läßt⁸⁷.

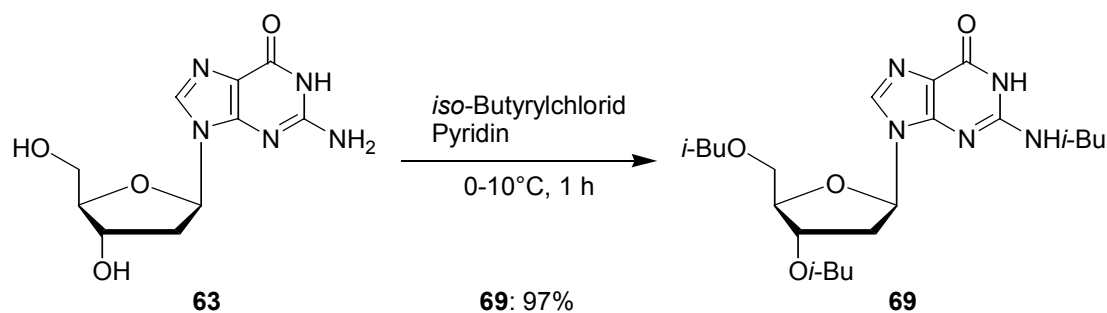


Abbildung 50 *iso-Butrylschützung von 2'-Desoxyguanosin 63*

Die Isolierung und Aufreinigung war einfach. Nach der Hydrolyse des überschüssigen Säurechlorids durch Zugabe einer wäßrigen Lösung von Natriumhydrogencarbonat konnte das Produkt **69** direkt auskristallisiert werden, während das Pyridiniumchlorid gelöst blieb.

4.2.3.2. Darstellung von 6-Thio-2-*N*,3',5'-*O*-tri-*iso*-butyryl-2'-desoxyguanosin **70**

Um Pyrimidin-Nukleoside in ihre Thioanaloge zu überführen, verwendet man normalerweise Phosphorpentasulfid oder Lawesson's Reagenz. In diesem Fall waren diese Reagenzien ungeeignet, da sie sich nicht mit säurelabilen und wärmeempfindlichen Nukleosiden vereinbaren lassen. Purin-Nukleoside wie die 2'-Desoxyguanosin-Derivate würden unter diesen Bedingungen depurinieren werden.

Durch die eingeführten Schutzgruppen ist das Guanosin-Derivat **69** gut in Dichlormethan löslich und kann nach einer Literaturvorschrift schonender umgesetzt werden⁸⁵. Dafür wurden nacheinander Triethylamin, Dimethylaminopyridin (DMAP) und Mesitylensulfonylchlorid zusammen gegeben. Der Reaktionsverlauf konnte dabei gut durch DC-Kontrolle verfolgt werden. Nach Bildung des 6-*O*-Mesitylensulfonyl-Derivates aus der tautomeren Form der Amidgruppe der Purinbase wurde mit der Zugabe von *N*-Methylpyrrolidin fortgefahren. Nachdem – wieder durch DC-Kontrolle – der Austausch der Mesitylensulfonylgruppe durch *N*-Methylpyrrolidin sichergestellt war, konnte mit dem Zutropfen der Thioessigsäure begonnen werden. Zum Beenden der Reaktion wurde die organische Phase mit einer gesättigten wäßrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und damit die überschüssigen Reagenzien entfernt. Die Ausbeute lag mit 71 % unter der Literaturangabe von 90-86 %, aber immerhin fast dreimal so hoch als bei der zuvor durchgeführten Thiierung unter Kapitel 4.2.2. (S. 50). Die einzelnen Teilschritte dieser Reaktion sind in Abbildung 51 zusammengefaßt.

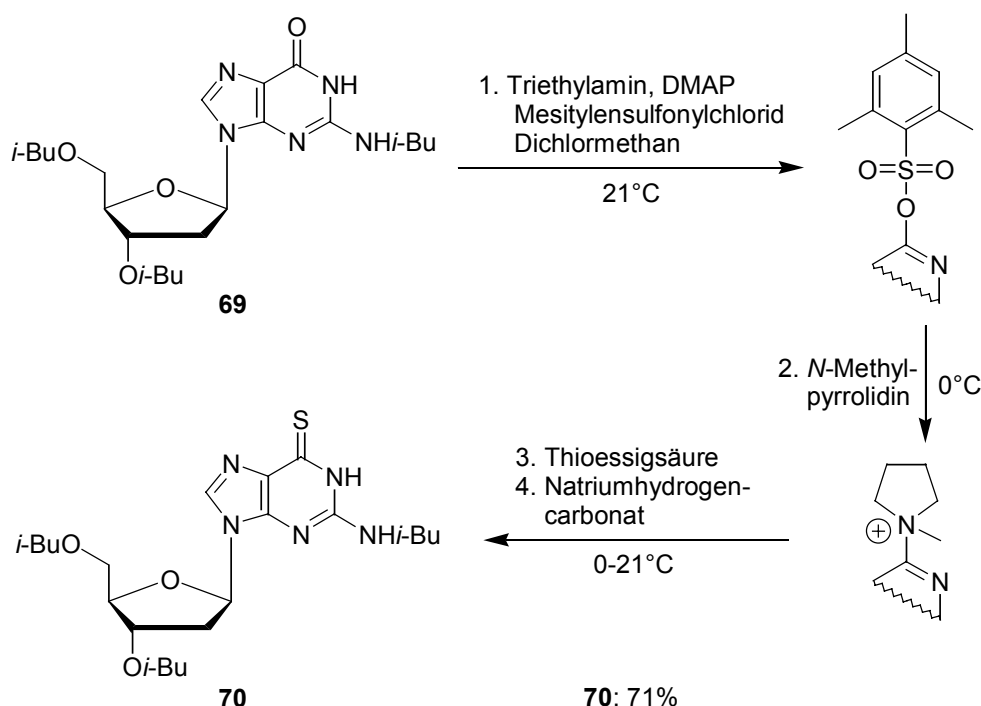


Abbildung 51 Thierung von 2-N,3',5'-O-Tri-iso-butyl-2'-desoxyguanosin **69**

Die hier verwendete Thiierung hat zwei entscheidende Vorteile gegenüber den Reaktionen mittels Phosphorpentasulfid, Lawesson's Reagenz und der weiter oben beschriebenen Synthese mit Natriumhydrogensulfid: die Reaktion läuft bei Raumtemperatur mit einer im Vergleich zu Methode **A** deutlich besseren Ausbeute ab; und nach Beendigung der Reaktion wird die Thioessigsäure in ein Acetat-Anion umgewandelt, das gut zu entfernen ist. Außerdem können alle Zwischenprodukte sehr gut dünnschichtchromatographisch detektiert und deren Bildung verfolgt werden, was einen kontrollierten Reaktionsverlauf gewährleistet.

4.2.3.3. Freisetzung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68**

Die Entschützung⁸⁵ wurde unter alkalischen Bedingungen (basenkatalysierte Ester- und Amidhydrolyse) durchgeführt. Für das Entfernen aller Schutzgruppen mußte die Reaktionszeit mindestens 10 Stunden betragen, um sicherstellen zu können, daß nach den Esterhydrolysen auch die stabilere Amid-Schutzgruppe gespalten wurde. Sobald die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden konnte, wurde die Hydrolyse abgebrochen. Zur Isolierung wurde das Reaktionsgemisch neutralisiert und bis zur Trockene eingedampft. Das reine 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** konnte nach dem Umkristallisieren des Rohproduktes aus Wasser mit einer Ausbeute von 67 % erhalten werden, was einer Menge von etwa 2 Gramm entsprach.

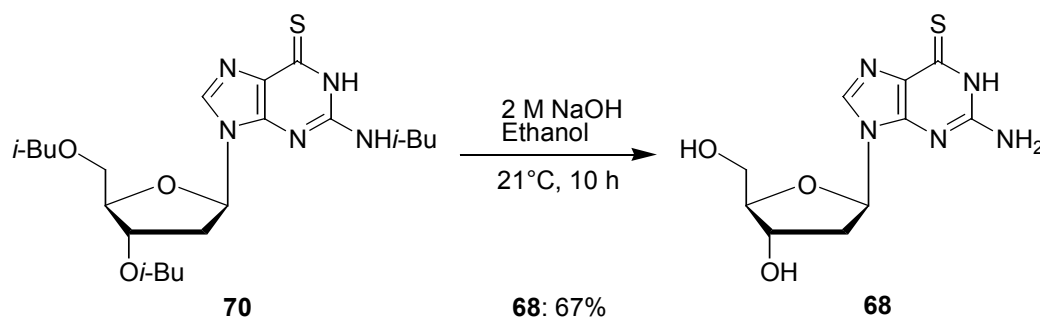


Abbildung 52 Entschützung von 6-Thio-2-N,3',5'-O-tri-iso-butryl-2'-desoxyguanosin **70**

Vergleicht man nun die beide Methoden **A** und **B** miteinander, die beide das Produkt **68** zum Ziel hatten, so läßt sich feststellen, daß durch die Schutzgruppenstrategie beinahe eine Verdoppelung der Ausbeute (**A**: 25 %, **B**: 47 %) erreicht wurde. Dieses Ergebnis alleine wäre schon ein ausreichender Beweis für die Überlegenheit des neuen 5-stufigen Synthesewegs **B**, der durch die unproblematischere Durchführbarkeit aller Synthesen und die besseren Aufreinigungsmöglichkeiten noch untermauert wird und deshalb den Vorzug erhalten sollte.

4.2.4. Darstellung von 2-Amino-9- β -D-2'-desoxyribofuranosylpurin **32**

Nachdem das Zwischenprodukt **68** der zweistufigen Methode **A** zu 2-Amino-dP **32** durch die Methode **B** in den benötigten Mengen hergestellt werden konnte, sollte nun mit dem zweiten Teil dieser Vorschrift⁸⁴ fortgefahren werden.

Das 6-Thionukleosid **68** kann im Gegensatz zu 2'-Desoxyguanosin **63** durch eine Raney-Nickel katalysierten Reduktion erfolgreich umgewandelt werden⁸⁸. Die Reduktion gelang nur unter einer reinen Wasserstoffatmosphäre, die mit Hilfe einer Hydrierungsapparatur erzeugt wurde. Eine Wasserstoffmenge von etwa 2 Litern war dabei ausreichend. Der Versuch mit einem einfachen Wasserstoffreservoir (Ballon) schlug hingegen fehl, was die Vermutung nahelegt, daß ein erhöhter Druck über der Reaktionslösung herrschen muß. Durch die Reaktionszeit von über 20 Stunden bei 50°C, sollte aber unbedingt auf die Dichtigkeit der Apparatur geachtet werden.

Bei der Umsetzung konnten nahezu keine Nebenreaktionen beobachtet werden. Die Isolierung erfolgte, indem man das Reaktionsgemisch zunächst durch Celite filtrierte und das Lösungsmittel (Wasser) mit Hilfe einer Gefriertrocknung entfernte. Der erhaltene Feststoff mußte anschließend noch chromatographisch von Verunreinigungen befreit werden.

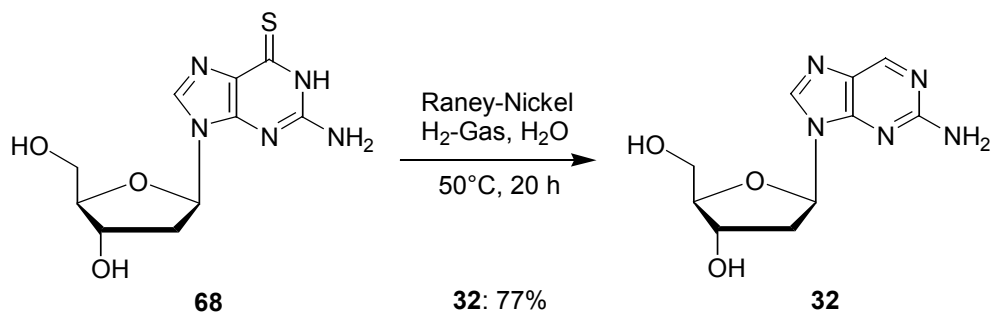


Abbildung 53 Reduktive Darstellung von 2-Amino-dP **32**

Damit war das erste Ziel auf dem Weg zu den fluoreszierenden *cycloSal*-Verbindungen erreicht. Der insgesamt sechsstufige Syntheseweg verwandelt 2'-Desoxyguanosin **63** mit einer Ausbeute von immerhin 36 % in das fluorophore Nukleosid **32**. Das ist ein gutes Ergebnis, nicht zuletzt im Hinblick auf die weiteren Synthesen, die das zweite fluoreszierende Nukleosid 2-Amino-ddP **35** zugänglich machen sollen.

4.2.5. Synthesevorschlag für die Darstellung von 2-Amino-ddP **35**

Die übliche Methode⁸⁹ für die Synthese von 2',3'-Didesoxynukleosiden ausgehend von ihren 2'-Desoxyanaloga ist eine modifizierte Desoxygenierung der 3'-Hydroxylgruppe nach D.H.R. Barton⁹⁰. Dafür muß vorher aber die 5'-Hydroxylgruppe der 2'-Desoxynukleoside selektiv geschützt werden.

In der Literatur⁹¹ werden 2'-Desoxyguanosin und -adenosin für diese selektive Schützung nur mit schon vorhandener Benzoyl- oder *iso*-Butyrylschutzgruppe an der exozyklischen Aminogruppe eingesetzt. Aufgrund dieser Vergleiche läßt sich diese Maßnahme bei der geplanten Umsetzung von 2-Amino-dP **32** sicherlich nicht vermeiden. Eine Methode, chemo- und regioselektiv die 2-Amino- und 5'-Hydroxygruppe in einem Schritt zu schützen, ist wegen der geringen Reaktivitätsunterschiede zur 3'-Hydroxyfunktion ausgeschlossen. Eine praktikable Lösung wäre die progressive Einführung der Schutzgruppen, angefangen mit der Aminofunktion gefolgt von der Alkoholgruppe. In Abschnitt 4.2.3.1. (S. 51) wurde ein Beispiel für die selektive N-*iso*-Butyrylierung von 2'-Desoxyguanosin **63** gegeben.

Unter Berücksichtigung dieser Methode läßt sich nun der folgende Weg zu dem fluoreszierendem Nukleosid **35** ausgehend von **32** aufstellen:

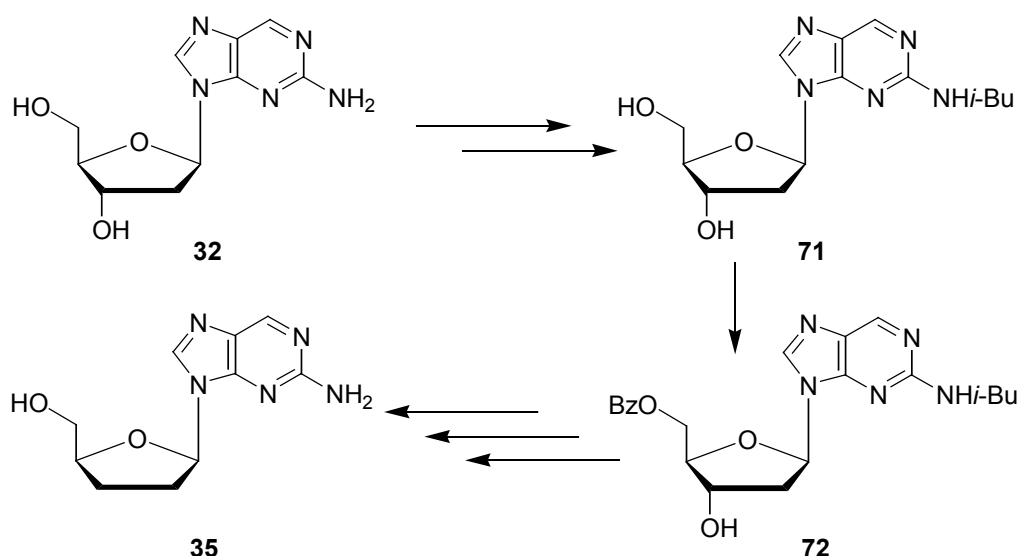


Abbildung 54 Synthesepfad von Nucleosid **35** ausgehend von **32**

Es müssen also nochmals sechs Stufen von 2-Amino-dP **32** zu 2-Amino-ddP **35** beschriftet werden, was den Syntheseweg insgesamt auf zwölf Stufen anwachsen lässt. Alternativ dazu, könnte eine Reduzierung auf nur sechs Stufen erreicht werden, wenn man die Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte wie folgt durchführt.

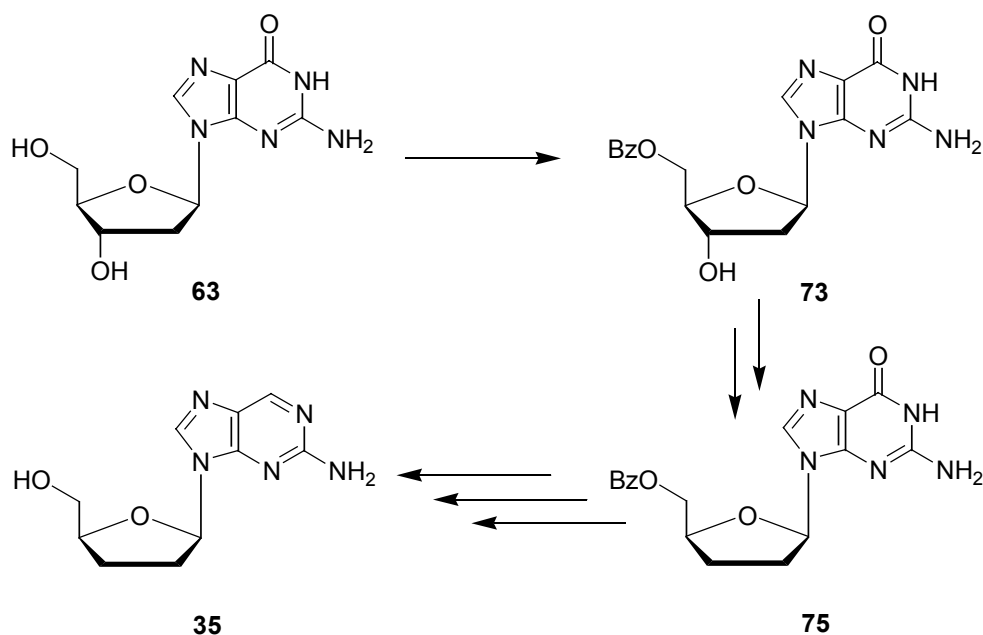


Abbildung 55 Synthesepfad von Nucleosid **35** ausgehend von dG **63**

Neben dem verkürzten Syntheseweg gibt es noch weitere Vorteile, die für diesen Vorschlag sprechen. So sind die ersten drei Schritte literaturbekannt^{91,89} Reaktionen. Die Erfahrungen, die bei der Darstellung von Nucleosid **32** gemacht wurden, könnten bei den analogen Umsetzungen von Zwischenprodukt **75** zu **35** hilfreich sein

und genutzt werden. All das läßt den zweiten Synthesepfad als sinnvoller und effektiver erscheinen.

4.2.5.1. Darstellung von 5'-O-Benzoyl-2'-desoxyguanosin **73**

Wie weiter oben erwähnt, werden die Purinbasen bei dieser Reaktion meistens mit einer Schutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktion eingesetzt⁹¹. Wegen Erfahrungen die bei der analogen Synthese von ddA **21** gemacht wurden⁹², sollte auch hier eine Umsetzung ohne weitere Schutzgruppen ausprobiert werden.

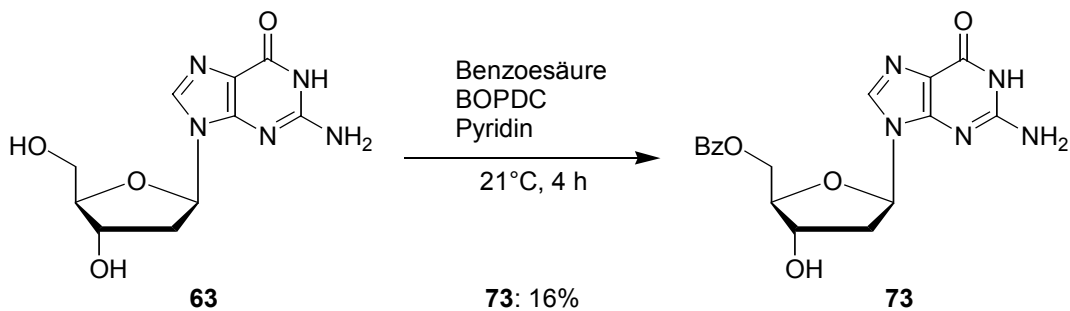


Abbildung 56 Darstellung von 5'-O-Benzoyl-2'-desoxyguanosin **73**

Das *N,N*-Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorsäurediamidchlorid (BOPDC) bildet mit der Benzoessäure ein gemischtes Anhydrid, das aufgrund der sterischen Abschirmung bevorzugt mit dem 5'-Alkohol reagiert. Das Edukt **63** wurde in Pyridin gelöst und mit Benzoessäure und BOPDC 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit war zwar immer noch Edukt vorhanden, aber die Zunahme an Nebenprodukten erzwang den Abbruch der Reaktion durch die Zugabe einer wäßrigen Kaliumcarbonat-Lösung. Durch den unvollständigen Umsatz des Edukts fiel, wie zu erwarten war, die Ausbeute leider sehr gering aus. Ein reaktiveres Benzoylierungsreagenz ginge aber auf Kosten der Selektivität. Da auch der in Abbildung 38 (S. 40) gezeigte Versuch, eine 5'-Acetylschutzgruppe anzubringen, fehlschlug, blieben als Alternativen noch folgende Möglichkeiten: Die Veresterung mit Pivalinsäureanhydrid mit einer katalytischen Menge an DMAP in DMSO, wie sie in der Literatur⁸⁹ für die Barton-Desoxygenierung erwähnt wurde (Ausbeute: 34 %); oder das vorherige Einführen einer Aminoschutzgruppe mit der laut Literatur⁹¹ immerhin eine Ausbeute von 67 % möglich gewesen wäre, aber den Syntheseweg zu Nucleosid **35** auf acht Stufen ansteigen ließ.

Die weitere Verfolgung der Synthese von 2-Amino-ddP **35** war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

4.3. Darstellung der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs

Die weiteren Syntheseschritte zu den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs sollten nun nach der Vorschrift erfolgen, die schon während meiner Diplomarbeit⁵² zur erfolgreichen Darstellung dieser neuartigen Verbindungsklasse geführt hatte. Dafür müssen zunächst einmal alle hergestellten Salicylalkohole **58a-o** mit Phosphortrichlorid in reaktive, zyklische 2-Chlor-4*H*-benzo[1.3.2]dioxaphosphorin-Derivate **76a-o** (Saligenylchlorphosphane) überführt werden, welche dann als Koppelungsreagenzien verwendet werden können. Durch die Verknüpfung der Saligenylchlorphosphane **76a-o** mit den drei Nucleosiden d4T **7**, BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** in Gegenwart der Hünig-Base Di-iso-propylethylamin (DIPEA) gelangt man zu den *cycloSal*-Nucleosidphosphiten, die direkt mit *tert*-Butylhydroperoxid zu den entsprechenden *cycloSal*-Nucleosid-Monophosphaten („lock-in“-modifizierte *cycloSal*-NMPs) oxidiert werden. Die einzelnen Schritte wurden schon einmal im Retrosyntheschema der Abbildung 23 (S. 31) dargestellt. Wegen der strukturellen Unterschiede der einzelnen Nucleoside konnte die für d4T **7** etablierte Vorschrift⁵² nicht ohne weiteres auf BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** übertragen werden, sondern mußte besonders verifiziert werden, weshalb jedem Nucleosid ein eigener Abschnitt gewidmet ist.

4.3.1. Darstellung der Saligenylchlorphosphane **76a-o**

Die Synthesen der Saligenylchlorphosphane **76a-o** mußten, wegen der Wasserempfindlichkeit von Phosphor(III)-Verbindungen, generell unter Schutzgasbedingungen durchgeführt werden.

Die Saligenylalkohole **58a-o** wurden zunächst in trockenem Diethylether vorgelegt. Die Menge des Lösungsmittels hängt dabei ausschließlich von der Löslichkeit des verwendeten Salicylalkohols ab, der aber unbedingt vollständig gelöst werden muß.

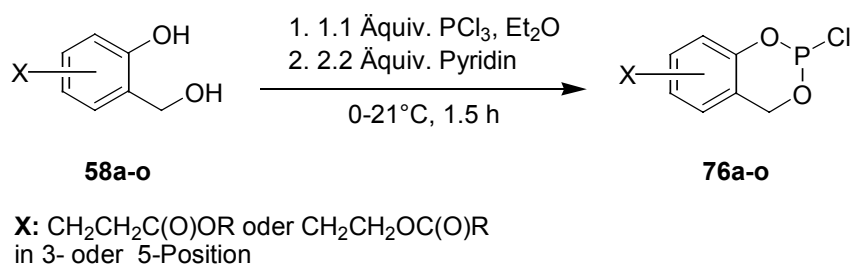


Abbildung 57 Darstellung der Saligenylchlorphosphane **76a-o**

Anschließend wurden 1.1 Äquivalente Phosphortrichlorid zügig zu der Lösung getropft. Nach dem Abkühlen auf 0°C muß der entstehende Chlorwasserstoff durch die Zugabe von 2.2 Äquivalenten Pyridin, gelöst in etwas Diethylether, langsam abgefangen werden. Dabei fällt Pyridiniumchlorid als farbloser Feststoff aus. Bei Versuchen, die ohne diese Basen-Neutralisierung analog durchgeführt wurden, konnte kein Produkt isoliert werden. Zur Vervollständigung der Fällung wurde das Reaktionsgemisch mehrere Stunden (am besten über Nacht) bei -4°C gelagert. Trotzdem gelang es nicht, daß Pyridiniumchlorid durch die anschließende Filtration quantitativ abzutrennen. Andere Aufreinigungsmöglichkeiten wie Chromatographie oder Destillation standen wegen der Hydrolyseempfindlichkeit von Phosphor(III)-Verbindungen und der thermischen Labilität der Esterfunktion nicht zur Verfügung. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnten die gewünschten Produkte **76a-o**, die alle als blaßgelbe Öle anfielen, durch ³¹P-NMR-Spektroskopie der Rohprodukte identifiziert werden. Trotz der Pyridiniumchlorid-Verunreinigung haben die Saligenylchlorphosphate **76a-o** eine ausreichende Qualität, um mit den drei Nucleosidanaloga d4T **7**, BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** verknüpft werden zu können.

4.3.2. Darstellung der *cycloSal*-d4TMPs **77a-o**

Die „Eintopf“-Synthese umfaßt zwei Schritte, die Verknüpfung des Saligenylchlorphosphans mit dem Nucleosid d4T **7** zu einem *cycloSal*-Nucleosidphosphit als instabilem Zwischenprodukt, gefolgt von der Oxidation des Phosphits mit Hilfe von *tert*-Butylhydroperoxid zur Zielverbindung.

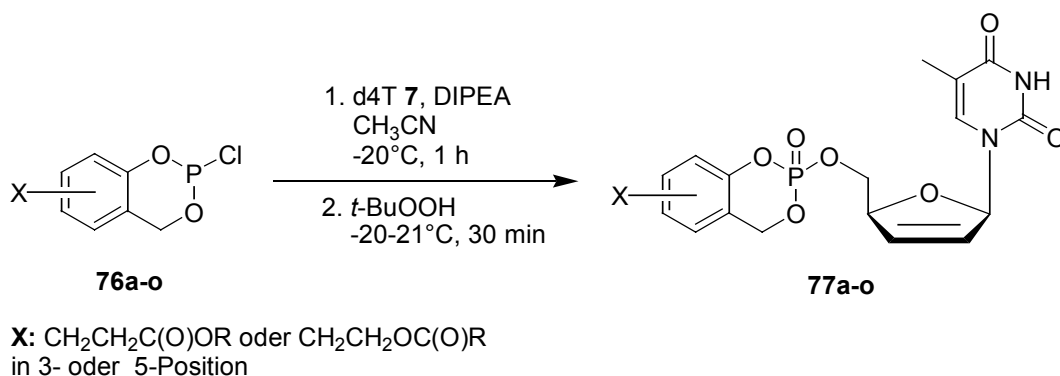


Abbildung 58 Darstellung der *cycloSal*-d4TMPs **77a-o**

Zu Beginn wurde d4T **7** mit Pyridin koevaporiert (um Spuren von Wasser ausschließen zu können) und anschließend sofort unter Inertgasatmosphäre in Acetonitril ge-

löst. Nach Zugabe von 2 Äquivalenten DIPEA wurde das Gemisch auf -20°C gekühlt. Zu dieser Lösung konnte dann das entsprechende Saligenylchlorphosphan zuge-
tropft werden. Nach etwa einer Stunde wurde das Fortschreiten der Reaktion durch
DC-Kontrolle überprüft. War noch Nucleosid nachzuweisen, wurde erneut Salige-
nylchlorphosphan zugegeben, um die Umsetzung zum *cycloSal*-Nucleosidphosphit
möglichst zu vervollständigen.

Im zweiten Schritt wurden schließlich die *cycloSal*-Nucleosidphosphite mittels *tert*-
Butylhydroperoxid in die *cycloSal*-Nucleotide **77a-o** überführt. Wie schon bei der er-
sten Stufe wurde der Reaktionsverlauf wieder durch DC-Kontrolle überprüft. Die Oxi-
dation war nach etwa 30 Minuten beendet und das Lösungsmittel konnte entfernt
werden. Der zurückbleibende, harzige Rückstand wurde durch zweimalige Chroma-
tographie aufreinigt.

Tabelle 2 Namenskürzel und Ausbeuten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-
d4TMPs **77a-o**

77a-o	Substituent X in		Namenskürzel vor	Ausbeute
	3-Position	5-Position	_ <i>cycloSal</i> -d4TMP	
a	C ₂ H ₄ (CO)OMe	H	3-MePr	32 %
b	C ₂ H ₄ (CO)OEt	H	3-EtPr	35 %
c	C ₂ H ₄ (CO)O <i>i</i> -Pr	H	3- <i>i</i> -PrPr	54 %
d	C ₂ H ₄ (CO)O <i>t</i> -Bu	H	3- <i>t</i> -BuPr	73 %
e	C ₂ H ₄ (CO)OBn	H	3-BnPr	43 %
f	H	C ₂ H ₄ (CO)OMe	5-MePr	39 %
g	H	C ₂ H ₄ (CO)O <i>i</i> -Pr	5- <i>i</i> -PrPr	33 %
h	H	C ₂ H ₄ (CO)O <i>t</i> -Bu	5- <i>t</i> -BuPr	44 %
i	H	C ₂ H ₄ (CO)OBn	5-BnPr	59 %
j	C ₂ H ₄ O(CO)Me	H	3-AcEt	31 %
k	C ₂ H ₄ O(CO)Et	H	3-PrEt	28 %
l	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	H	3-PivEt	52 %
m	H	C ₂ H ₄ O(CO)Me	5-AcEt	41 %
n	H	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	5-PivEt	39 %
o	8-Hydroxymethyl-4-MeU*		n. n. **	26 %

*Methylumbelliferon; **nicht nötig

Die *cycloSal*-d4TMPs **77a-o** wurden alle als Diastereomerengemische erhalten, da die verwendete Oxidationsmethode des Phosphits keine stereochemische Bevorzugung für eines der beiden Phosphat-Enantiomere (R_P und S_P) ermöglichen sollte. Bei den späteren ^{31}P -NMR-Messungen wurden dennoch manchmal Abweichungen von diesem idealen 1:1-Verhältnis gemessen. Dieses Phänomen läßt sich durch Veränderungen bei der chromatographischen Aufreinigung begründen, die durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Diastereomere verursacht werden können. Während der Chromatographie war aber keine nachvollziehbare Trennung der Diastereomere zu erkennen.

Insgesamt gelangen die Synthesen mit mäßigen bis guten Ausbeuten, wie eine Blick auf Tabelle 2 deutlich macht. Sowohl das Saligenylchlorphosphan (bei hypothetischer Betrachtung der Rohprodukte **76a-o** als Reinsubstanzen) als auch die Base DIPEA mußten bei allen Synthesen mindestens im zweifachen Überschuß zugegeben. Erst durch dieses Vorgehen war kein d4T **7** mehr in der Reaktionslösung nachzuweisen. Somit konnte auch ein Unterschuß an Phosphitylierungsreagenz ausgeschlossen werden. Da bei der Einwaage immer ein gewisser Anteil an Pyridiniumchlorid mit eingewogen wurde, wäre das aufgrund dieser Verunreinigung sonst durchaus zu befürchten gewesen.

Außerdem wurden in Tabelle 2 Namens Kürzel für die „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-Verbindungen **77a-o** eingeführt, die in den nun folgenden Abschnitten ausschließlich Verwendung finden sollen. Die Systematik dieser Buchstaben Kürzel soll an zwei Beispielen verdeutlicht werden:

Beispiel 1: **3-(Methyl-3'-propionyl)-cycloSaligenyl-d4T-monophosphat **77a** =**

3-MePr-*cycloSal*-d4TMP **77a**

Beispiel 2: **5-(Acetoxy-2'-ethyl)-cycloSaligenyl-d4T-monophosphat **77m** =**

5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m**

4.3.2.1. Darstellung der 3- und 5-(2'-Carboxyethyl)-*cycloSal*-d4TMPs **27**, **41**

Die 3- und 5-*t*-BuPr-*cycloSal*-d4TMPs **77d,h** wurden vor allem wegen ihrer Eigenschaft, in saurer Lösung leicht hydrolysierbar zu sein, hergestellt. In erster Linie sind sie also Zwischenprodukte auf dem Weg zu den beiden Regioisomeren *cycloSal*-d4TMPs **27** und **41** mit dem freien Säure-Substituenten am Saligenylaromaten.

Die Bedingungen für solch eine *tert*-Butylester-Hydrolyse sind im Vergleich mit den Standardverfahren zur Spaltung von Estern relativ mild. Es gilt zu bedenken, daß der Phosphattriester selbst hydrolyseempfindlich ist. Deshalb kam nur eine säurekatalysierte Hydrolysemethode in Frage, bei der die Phosphattriester prinzipiell stabiler sind als im basischen Medium. Hierfür wurden die *tert*-Butylester **77d,h** bei Raumtemperatur in Dichlormethan vorgelegt, und die Lösung durch die zügige Zugabe von Trifluoressigsäure (engl. Abk.: TFA) angesäuert.

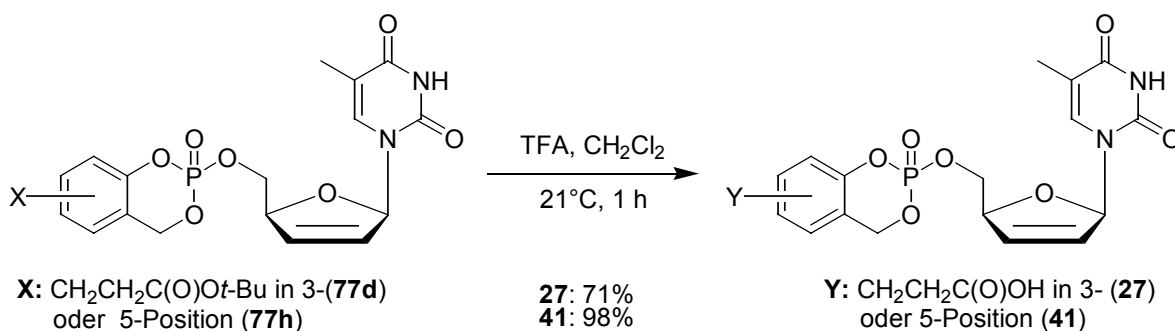


Abbildung 59 Darstellung von 3- und 5-(2'-Carboxyethyl)-cycloSal-d4TMP **27**, **41**

Nach einer Stunde war kein Edukt mehr nachzuweisen und die Reaktionslösung wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde anschließend durch eine chromatographische Trennung aufgereinigt, obwohl die Dünnschichtchromatogramme der jeweiligen Rohprodukte keine erkennbaren Verunreinigungen zeigten. Die etwas geringere Ausbeute von **27** läßt sich am ehesten durch Verluste bei der Chromatographie erklären.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten der hergestellten cycloSal-NMPs soll für den 2'-Carboxyethyl-Substituenten ausschließlich folgendes Synonym verwendet werden:

Beispiel: **3-(2'-Carboxyethyl)-cycloSaligenyl-d4T-monophosphat 27** =

3-Säure-cycloSal-d4TMP **27**

4.3.3. Darstellung der cycloSal-BVDUMPs **78a-l**

Die Synthese der cycloSal-BVDUMPs **78a-l** konnte bis auf wenige Modifikationen ebenso durchgeführt werden, wie die zuvor beschriebene Darstellung der d4T-Derivate. Wegen der schlechteren Löslichkeit von BVDU **15** in Acetonitril, wurde zu-

nächst auf das Lösungsmittelgemisch DMF und THF (2:1 v/v) zurückgegriffen, das sich schon bei den ersten Synthesen von *cycloSal*-BVDUMP-Derivaten bewährt hatte⁵⁰.

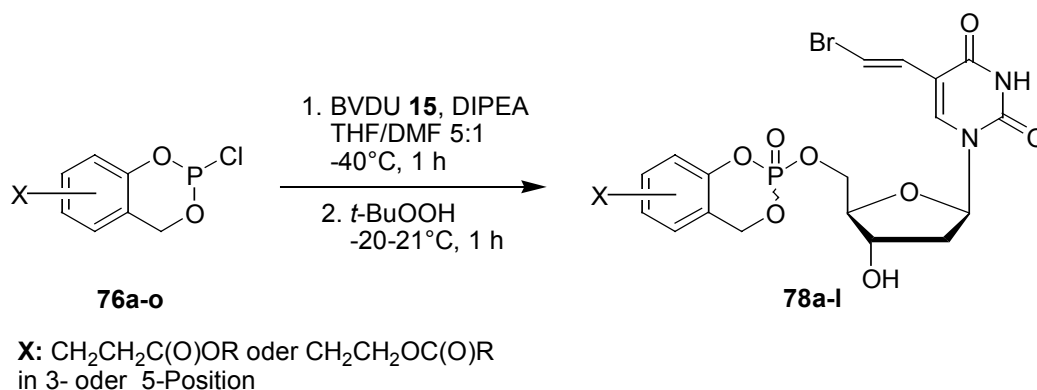


Abbildung 60 Darstellung der *cycloSal*-BVDUMPs **78a-I**

Ein Nachteil dieser Mischung ist der hohe Anteil an DMF, das hygroskopisch ist und zudem einen sehr hohen Siedepunkt besitzt. Dadurch wird die spätere Entfernung des Lösungsmittelgemisches deutlich erschwert und verlangsamt. Es stellte sich heraus, daß BVDU **15** auch ausreichend in einem Mischungsverhältnis von 5:1 v/v THF/DMF gelöst werden kann. Nach der Zugabe von DIPEA wurde das Reaktionsgemisch auf -40°C abgekühlt. Die noch niedrigere Temperatur, im Vergleich zu d4T **7**, sollte eine Reaktion der 3'-Hydroxylgruppe von BVDU **15** mit dem Saligenylchlorphosphan unterbinden. Aus dem gleichen Grund wurde auch die Menge an Saligenylchlorphosphan auf 1.5 Äquivalente (bei hypothetischer Betrachtung der Rohprodukte **76a-o** als Reinsubstanzen) reduziert. Nachdem die erfolgreiche Bildung des *cycloSal*igenylphosphites überprüft war (DC-Kontrolle), konnte dieses wiederum mit *tert*-Butylhydroperoxid innerhalb von ca. 30 Minuten zum Monophosphat oxidiert werden. Zur Aufreinigung wurde zunächst das Lösungsmittelgemisch im Ölpumpenvakuum entfernt und aus dem harzigen Rückstand der jeweilige Triester nach zwei chromatographischen Trennungen isoliert.

Die erzielten Ausbeuten der *cycloSal*-BVDUMPs **78a-I** fielen mit durchschnittlich 39 % etwas schlechter aus als für die d4T-Verbindungen **77a-o** (Ø: 42 %). Es sollte aber erwähnt werden, daß in diesem Fall auf die weitere Zugabe von Saligenylchlorphosphan verzichtet wurde. Ein Überschuß hätte zu keiner Ausbeutenverbesserung beigetragen, sondern nur die Bildung von 3',5'-diphosphoryliertem Nebenprodukt begünstigt. So mußte bei der Aufreinigung immer nicht umgesetztes BVDU **15** reisolieren werden. Unter Berücksichtigung dieser Problematik lassen sich die Aus-

beuten für die BVDU-Verbindungen **78a-l** sogar als besser – da effizienter – einstufen. Das neue Lösungsmittelverhältnis von 5:1 THF/DMF überzeugte nicht nur durch eine deutliche Verkürzung der Aufreinigungszeiten, sondern lieferte im Vergleich mit den anfänglich durchgeführten Synthesen mit dem 2:1 Gemisch auch höhere Ausbeuten.

Tabelle 3 Namenskürzel und Ausbeuten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-BVDUMPs **78a-l**

78a-l	Substituent X in		Namenskürzel vor _ <i>cycloSal</i> -BVDUMP	Ausbeute
	3-Position	5-Position		
a	C ₂ H ₄ (CO)OMe	H	3-MePr	31 %
b	C ₂ H ₄ (CO) <i>Oi</i> -Pr	H	3- <i>i</i> -PrPr	54 %
c	C ₂ H ₄ (CO) <i>Ot</i> -Bu	H	3- <i>t</i> -BuPr	51 %
d	C ₂ H ₄ (CO)OBn	H	3-BnPr	35 %
e	H	C ₂ H ₄ (CO)OMe	5-MePr	33 %
f	H	C ₂ H ₄ (CO) <i>Oi</i> -Pr	5- <i>i</i> -PrPr	41 %
g	H	C ₂ H ₄ (CO) <i>Ot</i> -Bu	5- <i>t</i> -BuPr	31 %
h	H	C ₂ H ₄ (CO)OBn	5-BnPr	44 %
i	C ₂ H ₄ O(CO)Me	H	3-AcEt	42 %
j	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	H	3-PivEt	41 %
k	H	C ₂ H ₄ O(CO)Me	5-AcEt	40 %
l	H	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	5-PivEt	27 %

4.3.3.1. Darstellung der 3- und 5-(2'-Carboxyethyl)-*cycloSal*-BVDUMPs **39, 43**

Nach der erfolgreichen Hydrolyse der *tert*-Butylester der *cycloSal*-d4TMPs **77d,h** sollten auch die entsprechenden BVDU-Verbindungen **78c,g** bei Raumtemperatur in einer TFA angesäuerten Dichlormethan-Lösung hydrolysiert werden können. Als problematisch mußte dabei die geringere Hydrolysestabilität von BVDU-Triester im Vergleich mit ihren analogen d4T-Verbindungen (siehe 4.4.1., S. 68) gesehen werden, die zu Ausbeuteverlusten hätte führen können. Überraschenderweise lagen aber die Ausbeuten in der gleichen Größenordnung, wie bei den vorangegangenen Hy-

drolysen, wobei auch hier wieder das 3-substituierte *cycloSal*-BVDUMP **39** mit einer geringeren Ausbeute gewonnen wurde.

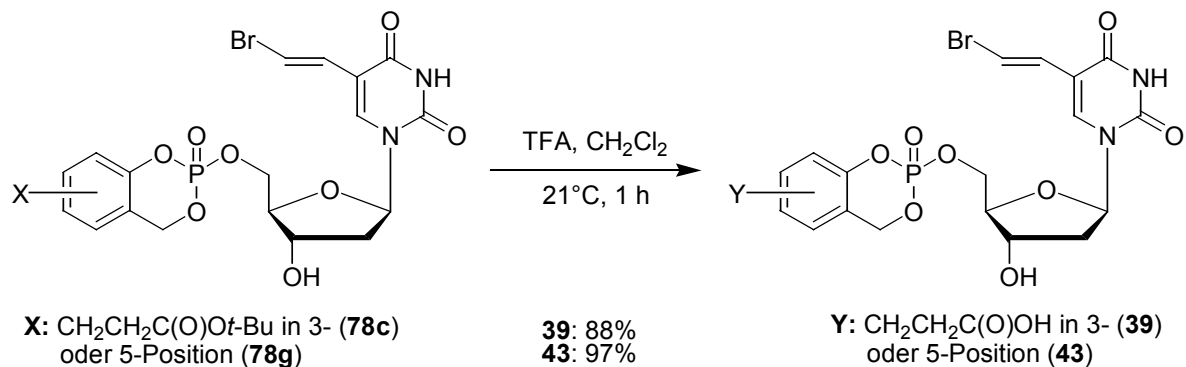


Abbildung 61 Darstellung von 3- und 5-(2'-Carboxyethyl)-*cycloSal*-BVDUMP **39** und **43**

Es läßt sich also festhalten, daß die Hydrolyse des *tert*-Butylesters auch bei den BVDU-Verbindungen sehr viel schneller verläuft, als die Hydrolyse des Phosphatryl-esters.

4.3.3.2. Darstellung von 5-(2'-Hydroxyethyl)-*cycloSal*-BVDUMP **44**

Um bei den anschließenden HPLC-Hydrolysestudien alle möglichen Hydrolyseprodukte der Ester als Coinjektionsstandard zugeben zu können, sollten auch die vier *cycloSal*-Nukleotide **38**, **40**, **42** und **44** mit dem freien Ethylalkohol-Substituenten hergestellt werden. Es zeigte sich aber schnell, daß keine der synthetisierten Esterverbindungen **78i-l** so schonend hydrolysiert werden kann, daß nicht zugleich auch der Phosphatryl-ester mit zersetzt würde, da eine Hydrolyse im sauren Milieu ausgeschlossen war. Glücklicherweise stellte sich bei den Carboxyesterase-Untersuchungen heraus, daß das Pivalat **78i** ein sehr gutes Substrat für die PLE (EC 3.1.1.1) ist. Leider war die Esterase so spezifisch, daß sie weder das Regioisomer **78j** noch die Hydrolyse eines anderen Esters katalysierte, weshalb 5-(2'-Hydroxyethyl)-*cycloSal*-BVDUMP **44** als einzige der vier Referenzverbindungen isoliert werden konnte.

Die Reaktionsbedingungen wurden vom Mikromaßstab des Carboxyesterase-Assays übernommen. Die Menge des Enzyms wurde auf 22 Units pro μmol Ester gesenkt, genau so wie die Konzentration des Esters in der Lösung. Dadurch konnte auch die DMSO-Menge verringert werden, die sonst Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung bereitet hätte. Die Hydrolyse verlief ohne erkennbare Nebenreaktionen (HPLC-Kon-

trolle) und wurde durch die Zugabe von Dichlormethan beendet, in dem das Produkt der wäßrigen Phase entzogen und gleichzeitig das Enzym deaktiviert wurde. Die Wahl des organischen Lösungsmittels erwies sich aber als äußerst ungünstig, da nach dem Ausschütteln keine vollständige Phasentrennung mehr zu beobachten war. So fiel die Ausbeute etwas geringer aus, als man es aufgrund des HPLC-Chromatogrammes erwartet hätte, wobei dies ausschließlich auf die problematische Phasentrennung zurückzuführen ist.

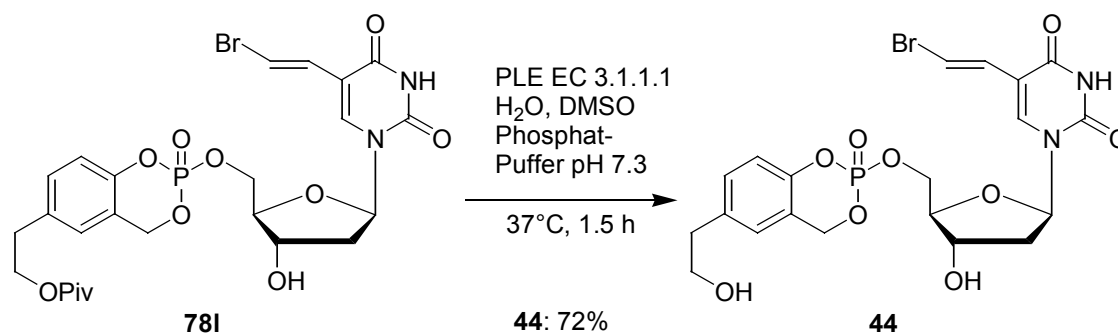


Abbildung 62 Darstellung von 5-(2'-Hydroxyethyl)-cycloSal-BVDUMP **44**

Bei den nachfolgenden Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten der hergestellten cycloSal-NMPs soll für den 2'-Hydroxyethyl-Substituenten ausschließlich folgendes Namenskürzel Verwendung finden:

Beispiel: **5-(2'-Hydroxyethyl)-cycloSaligenyl-BVDU-monophosphat 44** =

5-OHEt-cycloSal-BVDUMP **44**

4.3.4. Darstellung der cycloSal-2-Amino-dPMPs 79a-d

Zum Abschluß der synthetischen Arbeiten sollten noch ausgewählte fluoreszierende cycloSal-2-Amino-dPMPs hergestellt werden. Bei der Durchführung kam zu den gerade beschriebenen Problemen mit BVDU **15** noch ein weiteres hinzu. 2-Amino-dP **32** verfügt über einen potentiellen dritten Angriffspunkt für die Saligenylchlorphosphate. Trotzdem sollte weiterhin die 5'-Hydroxylgruppe bevorzugt angegriffen werden. Deshalb wurde zunächst einmal analog der cycloSal-BVDUMP-Synthesen vorgegangen. Aufgrund der höheren Polarität von 2-Amino-dP **32** gab es aber schon Probleme bei der Solvatisierung. Um nicht den Anteil an DMF erhöhen zu müssen, wurde die Menge des Lösungsmittels einfach verdoppelt, wodurch sich das gesamte 2-Amino-dP **32** auflösen ließ. Die Saligenylchlorphosphate **76c,i,l,n** wurden in einem Über-

schuß von 1.5 Äquivalenten zugegeben. Somit war wieder keine vollständige Umsetzung des Nucleosides **32** zu erwarten.

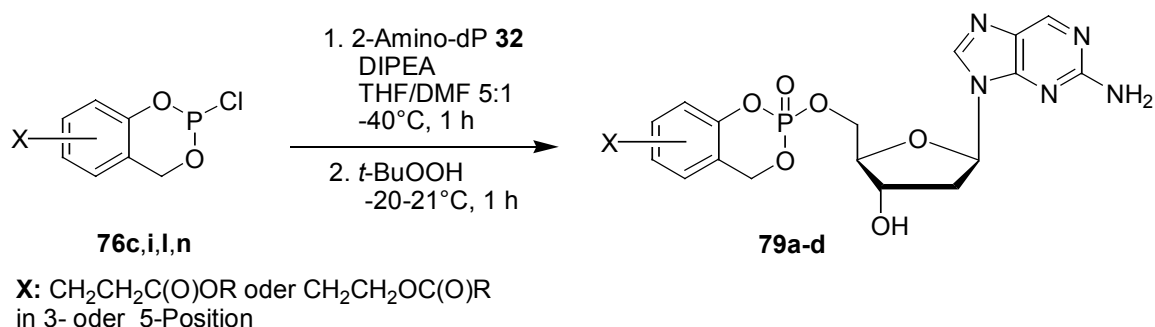


Abbildung 63 Darstellung der cycloSal-2-Amino-dPMPs **79a-d**

Interessanterweise konnte eine Ausbeuteverbesserung beobachtet werden, nachdem die Base DIPEA im Überschuß von 2 Äquivalenten zugegeben wurde. Eine Begründung dafür wurde aber nicht gefunden. Dennoch setzt sich die Ausbeute von **79d**, bei deren Synthese nur 1.5 Äquivalente DIPEA verwendet wurden, deutlich von den Übrigen ab.

Tabelle 4 Namenskürzel und Ausbeuten der „lock-in“-modifizierten cycloSal-2-Amino-dPMPs **79a-d**

79a-d	Substituent X in		Namenskürzel vor _-cycloSal-2-Amino-dPMP	Ausbeute
	3-Position	5-Position		
a	C ₂ H ₄ (CO)O <i>i</i> -Pr	H	3- <i>i</i> -PrPr	32 %
b	H	C ₂ H ₄ (CO)OBn	5-BnPr	23 %
c	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	H	3-PivEt	24 %
d	H	C ₂ H ₄ O(CO) <i>t</i> -Bu	5-PivEt	7 %

Wie zu erwarten, waren die Ausbeuten insgesamt schlechter als bei den zuvor durchgeführten Synthesen. Um die entstandenen Nebenprodukte zu entfernen, mußten alle Rohprodukte auch mindestens dreimal chromatographiert werden. Ob die alternative Darstellung der cycloSal-2-Amino-dPMPs **79a-d** mit Hilfe einer Schutzgruppenstrategie weitaus effektiver verlaufen würde, bleibt bei den damit verbundenen Problemen und Nachteilen (Abspaltung der Schutzgruppen in Gegenwart eines Phosphatriesters, größerer Syntheseaufwand) fraglich.

4.4. Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs

4.4.1. Hydrolyse in einer schwach basischen Phosphat-Pufferlösung

Alle hergestellten *cycloSal*-Nukleotide wurden zunächst in einer schwach basischen, isotonischen Phosphat-Pufferlösung (PBS, pH 7.3) bei 37°C hydrolysiert. Die gewählten Bedingungen dienen zur Simulation des physiologisch-chemischen Milieus, wie es bei einer späteren *in vivo*-Anwendung herrschen würde. Die dabei gewonnenen Hydrolysehalbwertszeiten sollen zeigen, daß die synthetisierten Pronukleotide eine ausreichende Stabilität für den unerläßlichen Transport in das Cytoplasma besitzen.

Vor Beginn der Hydrolysestudien wurde von jeder Verbindung eine 50 mM DMSO-Stammlösung hergestellt. Für die chemische Hydrolyse wurde dann eine Kinetiklösung vorgelegt, indem man 300 µl 50 mM PBS, 100 µl Wasser und 188.6 µl DMSO zusammengab, mit einem internen Standard (AZT) versetzte und auf 37°C in einem Thermomixer temperierte. Durch Zupipettieren von 11.4 µl der 50 mM DMSO-Stammlösung wurde die Hydrolyse gestartet (Gesamtkonzentrationen in der Hydrolyselösung: $c_{\text{Puffer}} = 24.8 \text{ mM}$, $c_{\text{Triester}} = 0.94 \text{ mM}$), kurz durchmischt und sofort das erste Aliquot (t_0) entnommen. Während des Reaktionsverlaufs (Hydrolysedauer: 22-32 h) wurden weitere Aliquote entnommen. Zum Stoppen der Hydrolyse wurden die Aliquote nach der Entnahme zu einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure gegeben. Die so erhaltenen Proben konnten nun RP-HPLC-analytisch mit Hilfe eines UV-Detektors vermessen werden.

Zur Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurde der Quotient aus den Peakflächen des Triesters (Edukt) und des internen Standards gebildet und gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Durch diese experimentell erhaltenen Meßpunkte konnte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes „Microsoft Excel 8.0®“ eine exponentielle Ausgleichskurve gelegt werden. Die Annahme einer unimolekularen Kinetik wurde durch die Verwendung eines großen Überschusses an Wasser ermöglicht, demzufolge für solche Hydrolysen ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, der allgemeinen Form gilt:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Die so erhaltene Geschwindigkeitskonstante k ermöglichte nun die Berechnung der Halbwertszeit nach der allgemeinen Gleichung:

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

Alle chemischen Hydrolysekinetiken wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. In den folgenden Balkendiagrammen sind die so berechneten Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse bei pH 7.3 zusammengestellt. Die verschiedenen *cycloSal*-Nukleotide sind dabei nach der jeweiligen Nukleobase und die d4T- und BVDU-Verbindungen zusätzlich nach dem Substitutionsmuster (3- und 5-Position) geordnet.

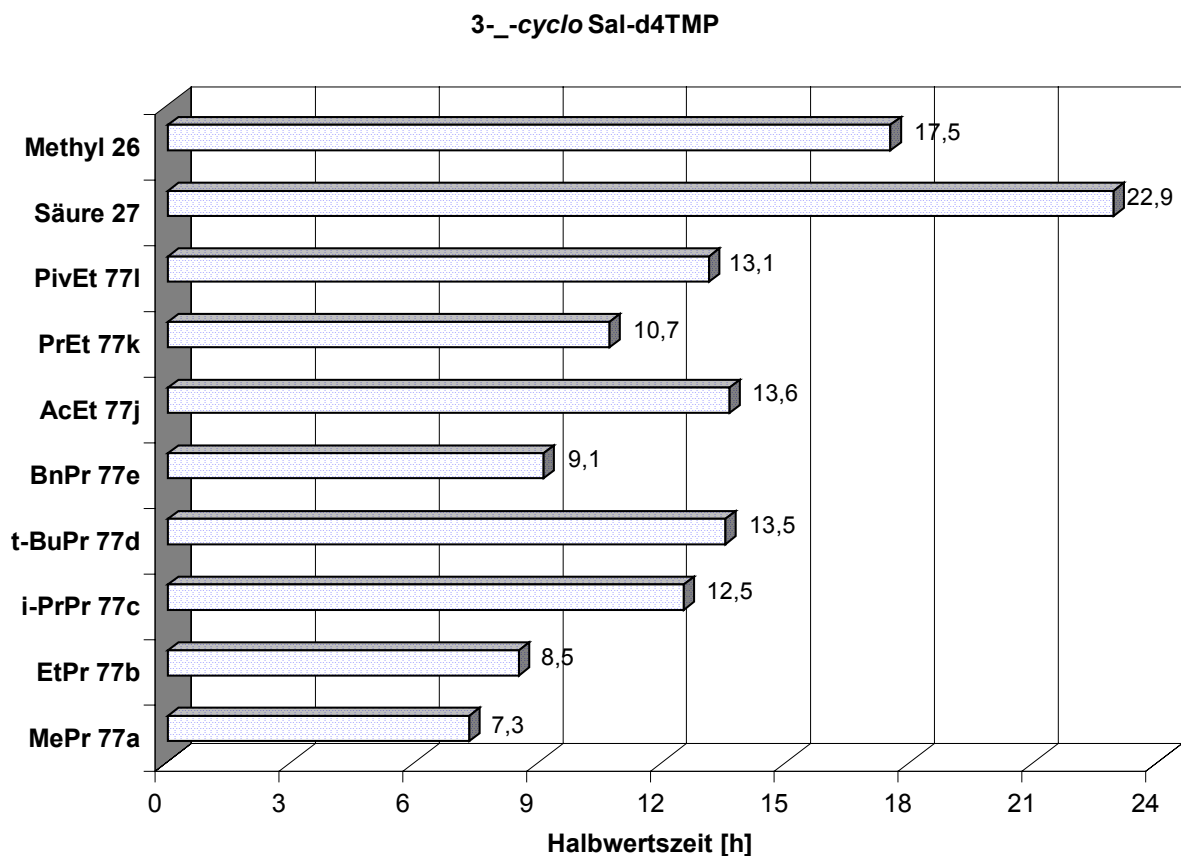


Abbildung 64 Hydrolysehalbwertszeiten der 3-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **26, 27, 77a-e und 77j-l** in PBS bei pH 7.3

Bevor die Werte nun diskutiert und interpretiert werden sollen, müssen an dieser Stelle einige nicht zu vernachlässigende Bemerkungen zu der gerade beschriebenen Bestimmungsmethode gemacht werden:

Die erhaltenen Halbwertszeiten geben nur Auskunft über die Stabilität der *cycloSal*-Nukleotide unter den gewählten Bedingungen, wobei keine genauen Aussagen über

die chemischen Vorgänge, die zur Abnahme der Triester geführt haben, gemacht werden können. So kann noch nicht einmal ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Abnahme der Edukte durch eine Reaktion an einer anderen funktionellen Gruppe der Pronukleotide und nicht, wie vorausgesetzt, durch die Hydrolyse des Phosphatriesters verursacht wurde. Hinzu kommt, daß sich alle *cycloSal*-Nukleotide nur als Gemisch zweier diastereomerer Phosphatriester untersuchen ließen, da eine vorherige chromatographische Trennung aller Diastereomere nicht möglich gewesen wäre (einige, wenige Diastereomere hätte man mittels präparativer HPLC trennen können, z. B. 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j**). Die beiden Diastereomere könnten sich aber unter Umständen sowohl in ihrer Halbwertszeit, als auch in ihrem Hydrolyseverhalten unterscheiden. Wie bereits im Kenntnisstand über den Hydrolyseweg des *cycloSal*-d4TMPs **17** (Abbildung 14, S. 17) dargestellt, konkurrieren im ersten Schritt der chemischen Hydrolyse zwei Reaktionswege, die entweder zum Benzyl- **18** oder zum Phenyl-Phosphatdiester **19** führen. Im Gegensatz zu den Benzyl-Phosphatdiestern, die in der Folgereaktion d4TMP freisetzen, sind die Phenyl-Phosphatdiester dazu nicht mehr in der Lage. Daß dieser unerwünschte Hydrolyseweg nicht einfach ausgeschlossen werden kann, zeigte sich erstmals bei Untersuchungen an Benzylsubstituierten *cycloSal*-Nukleotiden⁴⁴, bei denen auch Saligenyl-Substituenten in diese Sackgasse führten. Um das Problem zu überprüfen, wurde mit einigen ausgewählten *cycloSal*-Nukleotiden eine ³¹P-NMR-Untersuchung des Hydrolysewegs durchgeführt, die in Abschnitt 4.4.4. (S. 112) beschrieben ist. Alle genannten Fakten machen deutlich, daß die Halbwertszeit alleine bei der Bewertung einer *cycloSal*-Verbindung als effiziente Nukleotidquelle nur wenig Aussagekraft hat. Das Problem der Auswertung einer Hydrolysekinetik eines Diastereomeregemisches kann zwar nicht gelöst, aber in diesem Fall vernachlässigt werden. Die exponentiellen Trendlinien ließen sich in den meisten Fällen sehr gut durch die erhaltenen Meßwerte legen. Bei den wenigen Ausnahmen lag immer der t_0 -Wert über der Ausgleichskurve, was darauf schließen läßt, daß eines der beiden Diastereomere schneller hydrolysierte, als es der berechnete Wert wiedergibt.

Wenn sichergestellt ist, daß bei den Hydrolysen tatsächlich d4TMP entsteht, kann mit der Auswertung der Halbwertszeiten begonnen werden. Der Einfluß der Estermodifizierung in 3- oder 5-Position am Saligenylaromaten soll durch den Vergleich mit dem unsubstituierten *cycloSal*-d4TMP **17** und dem 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **26** verdeutlicht werden. Die Halbwertszeiten der hergestellten *cycloSal*-d4TMPs **77a-n**

haben eine Größenordnung, die zwischen den beiden Vergleichsverbindungen **17** und **26** liegt, was ein deutlicher Hinweis auf Elektronendonator-Substitution ist. Da eine Estergruppe aber Akzeptor-Eigenschaften besitzt, ist die Verlängerung aller Halbwertszeiten – im Vergleich zu **17** – ein guter Beweis für die abschirmende Wirkung der Ethyleneinheit. Dennoch wurde der (-)I-Effekt der Ester nicht vollständig kompensiert. Wäre dies der Fall, müssten alle Werte der 3-substituierten Verbindungen im Bereich der 17.5 h von 3-Methyl-cycloSal-d4TMP **26** liegen. Die Werte geben aber deutlichen den Einfluß der verschiedenen Estergruppen wieder, indem der (+)I-Effekt der Ethylengruppe durch die unterschiedlichen (-)I-Effekte der Ester entsprechend abgeschwächt wurde. Im Einklang damit hatte das 3-Methylpropionat **77a** (7.3 h) eine deutlich geringere Halbwertszeit, als das 3-*tert*-Butylpropionat **77d** (13.5 h) (siehe Abbildung 64).

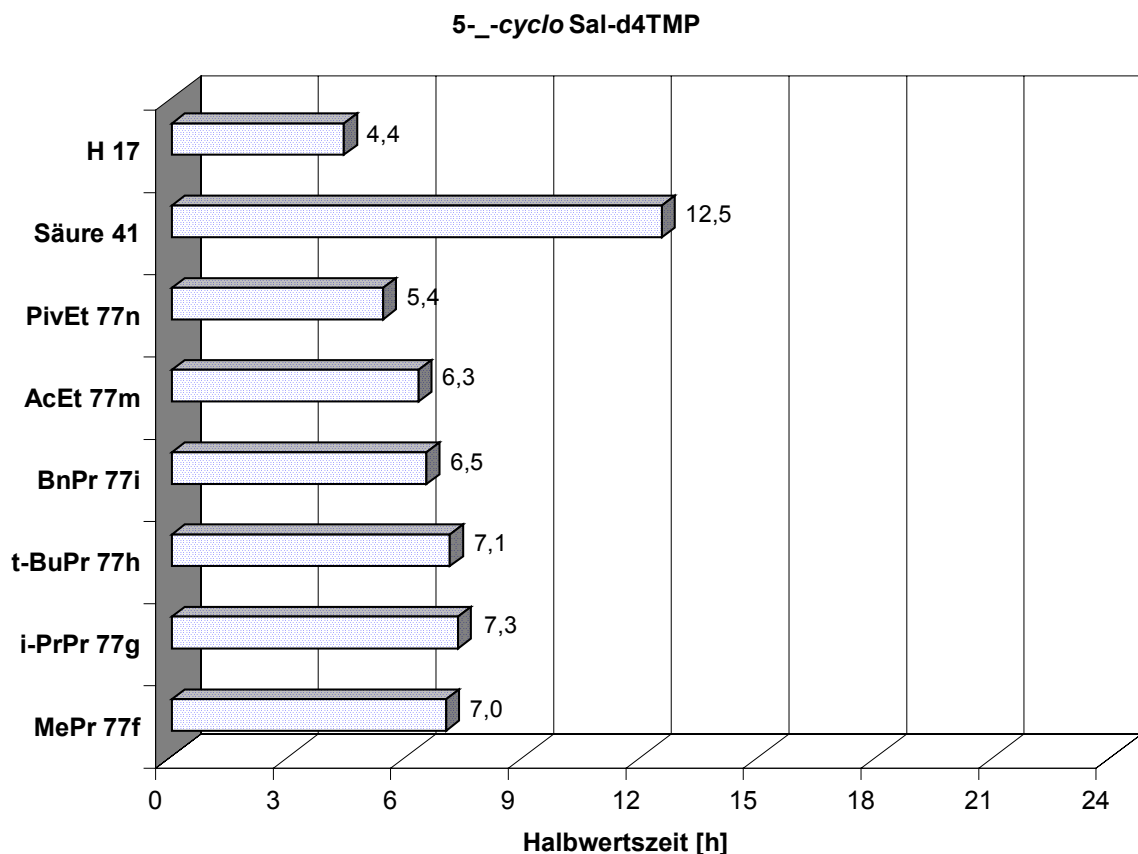


Abbildung 65 Hydrolysehalbwertszeiten der 5-substituierten cycloSal-d4TMPs **17**, **41**, **77f-i** und **77m,n** in PBS bei pH 7.3

Um so mehr überraschte die enorme Stabilität der freien Säuren **27** und **41**, wobei das 3-Isomer **27** mit 22.9 h die mit Abstand stabilste Verbindung ist. Dieses Verhal-

ten läßt sich nicht befriedigend mit dem geringsten (-)I-Effekt der Carboxylatgruppe (pH 7.3) begründen. Hinzu kommt, daß der 2-Carboxyethyl-Substituent (trotz der negativen Ladung) in keinem Fall ein stärkerer Elektronendonator sein kann, als es die Methylgruppe bei 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **26** ist. Eine mögliche Erklärung für diese enorme Stabilität könnte die elektrostatische Abstoßung sein, die ein negativ geladenes Molekül auf ein nukleophil angreifendes Hydroxid-Ion ausübt und so die Hydrolyse des Phosphattriesters verlangsamt. Dieser Befund steht aber im starken Gegensatz zur Beschleunigung, die der theoretisch denkbare, assistierende Effekt, wie er in der nächsten Abbildung für die 3-Säure **27** postuliert wird, verursachen sollte. Nach einem ersten nukleophilen Angriff des Carboxylates entsteht das gemischte Anhydrid **80**. Durch Arbeiten von G.J. Friis und H. Bungaard ist bekannt, daß bei Bis[3-(2'-acetoxyphenyl)propionyl]oxymethylestern nach der enzymatischen Hydrolyse einer Acetylgruppe spontan das Lacton (Dihydrocumarin **45**) entsteht⁹³. Da das Anhydrid **80** reaktiver ist als deren Oxymethylesterfunktion, sollte auch hier das nukleophile Phenolat intramolekular angreifen und zügig das Lacton **85** entstehen lassen. Nach der Hydrolyse des Benzyl-Phosphatdiesters wird letztendlich d4TMP und das Dihydrocumarin-Derivat **86** freigesetzt.

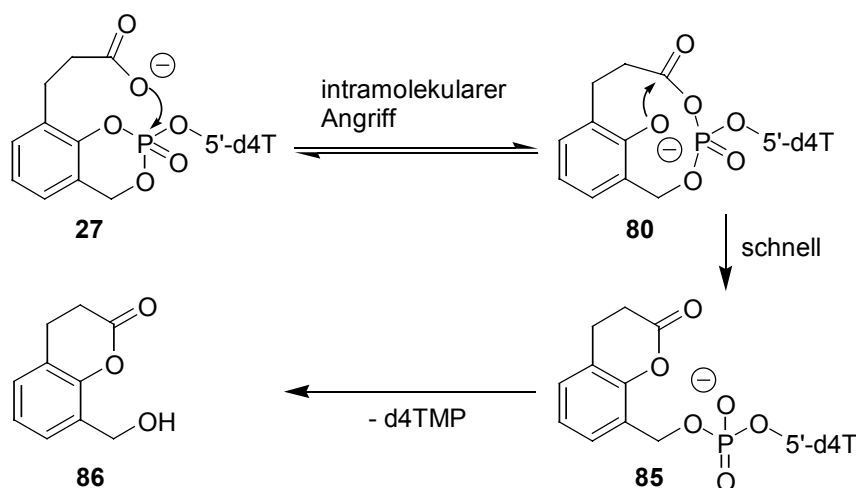


Abbildung 66 Theorie zur beschleunigten d4TMP-Freisetzung durch die freigesetzte Carbonsäuregruppe (assistierender Effekt)

Daß der assistierende Effekt in diesem Fall nicht beobachtet werden konnte, muß aber nicht bedeuten, daß er generell auszuschließen ist. Vielleicht war nur die Kettenlänge des Carboxyethyl-Substituenten für eine intramolekulare Anhydrid-Bildung zu kurz. Somit dürfte sich das oben skizzierte Gleichgewicht nicht einstellen und in-

folgedessen auch nicht die schnelle Weiterreaktion zum Lacton **85** beobachtet werden.

Vergleicht man nun die Werte der Substitutionsisomere, erkennt man, daß alle 3-Isomere deutlich stabiler sind als ihre 5-Analoga. Dieser Befund läßt sich wieder leicht mit dem größeren (+)I-Effekt eines zum Phenylester *ortho*-ständigen Elektrodonor-Substituenten erklären. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß die Variation der Ester sich nachweislich mehr auf die 3-Isomere auswirkte. So umfassen die Halbwertszeiten der 5-Isomere 5.4-7.3 h (Abbildung 65), wohingegen sie bei den 3-Isomeren zwischen 7.3-13.6 h (Abbildung 64, S. 69) liegen.

Alle beschriebenen Beobachtungen und Erklärungen sollten sich in ähnlicher Weise auch bei den Halbwertszeiten der analogen BVDU-Verbindungen wiederfinden, deren Werte in den nächsten beiden Abbildungen zu sehen sind.

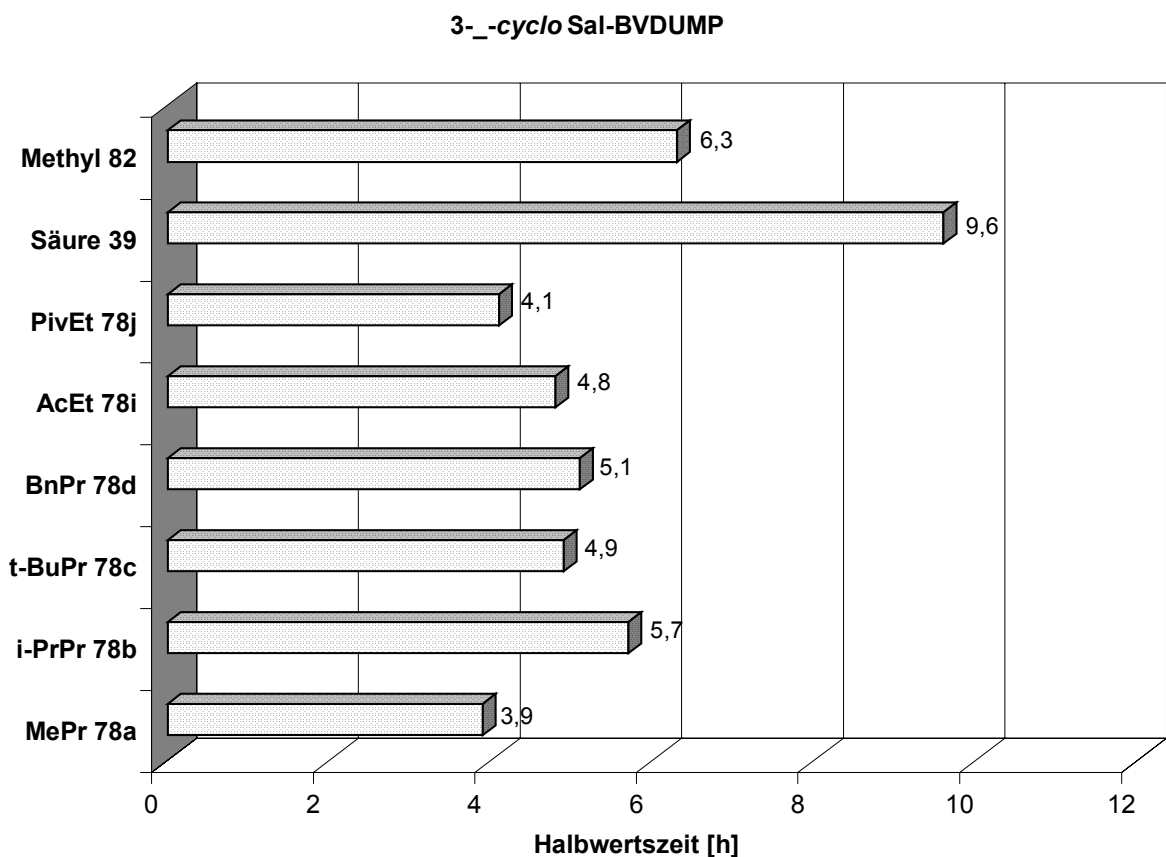


Abbildung 67 Hydrolysehalbwertszeiten der 3-substituierten *cyclo*Sal-BVDUMPs **39, 78a-d, 78i,j** und **82** in PBS bei pH 7.3

Im Vergleich zu den *cycloSal*-d4TMPs bewirkte die 3'-Hydroxylgruppe des BVDU-Glycons eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeiten, die schon bei vorangegangenen Hydrolysestudien u. a. mit 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP **82** beobachtet wurde⁵⁰. Hier hydrolysierten die 3-substituierten *cycloSal*-BVDUMPs etwa doppelt, und die 5-substituierten (untere Abbildung) sogar dreimal so schnell wie ihre d4T-Analoga. Der Faktor drei findet sich auch, wenn man die beiden 3-Methyl-*cycloSal*-NMPs **26** und **82** miteinander vergleicht, d. h. die Hydrolyse der Prototyp-Verbindung **82** verläuft schneller. Anscheinend wird durch einen längeren, lipophilen Ester-Substituenten eine bessere Abschirmung gegen den nukleophilen Angriff des Hydroxid-Ions bewirkt, als durch die Methylgruppe.

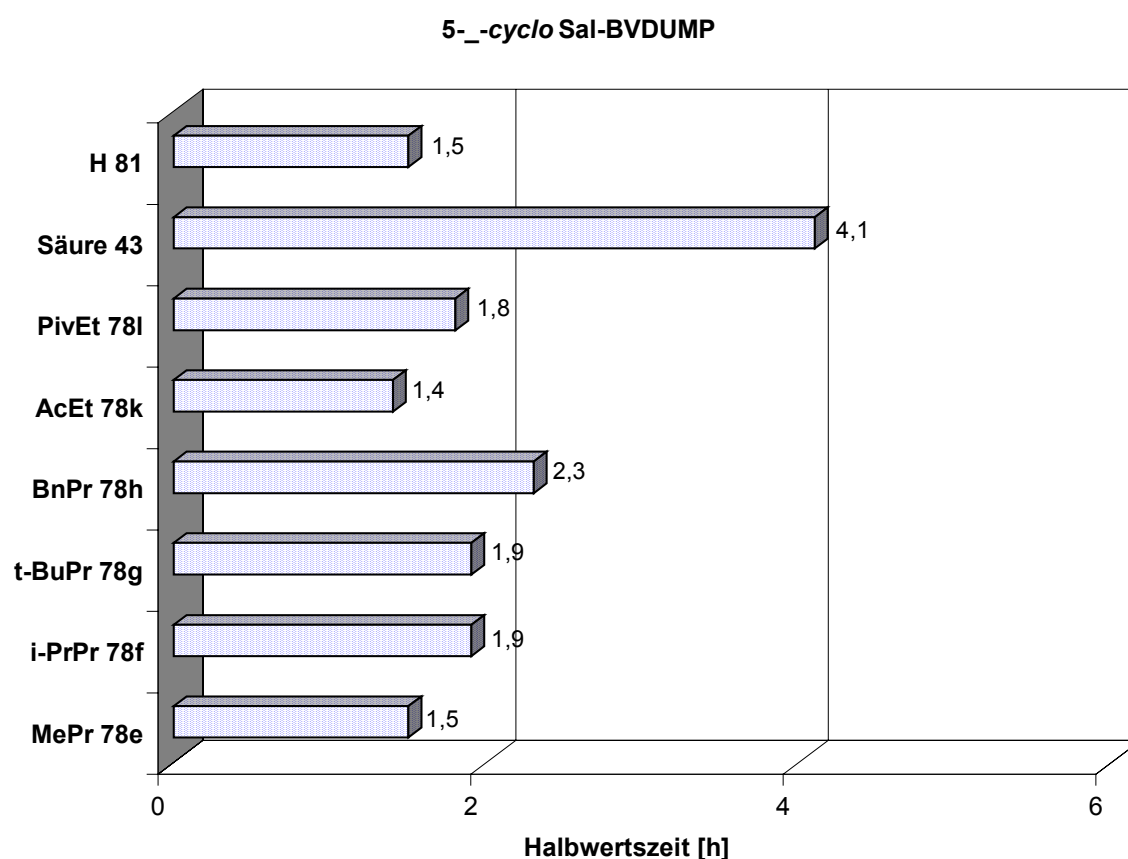


Abbildung 68 Hydrolysehalbwertszeiten der 5-substituierten *cycloSal*-BVDUMPs **43**, **78e-h**, **78k,l** und **81** in PBS bei pH 7.3

Überraschenderweise konnte bei den 3-substituierten *cycloSal*-BVDUMPs eine Umkehrung der Reihenfolge der Stabilitäten festgestellt werden (Abbildung 67, 3-Methylpropionat **78a** ausgeschlossen), mit dem 3-*iso*-Propylpropionat **78b** (5.7 h) als stabilste der Esterverbindungen, was man alleine aufgrund des induktiven Effektes

nicht erwarten würde. Offensichtlich dominieren hier sterisch abschirmende Effekte über die elektronischen. So ist es auch nicht verwunderlich, daß sich die Variation der Estertypen weitaus weniger bemerkbar machte (**5-**: 1.4-2.3 h; **3-**: 3.9-5.7 h). Die Frage, warum hierbei gerade der *iso*-Propylester **78b** am meisten profitierte, konnte nach den durchgeführten Untersuchungen nicht beantwortet werden. Ein erster Hinweis kann vielleicht durch den Vergleich mit den folgenden *cycloSal*-2-Amino-dPMP **79a-d** gefunden werden.

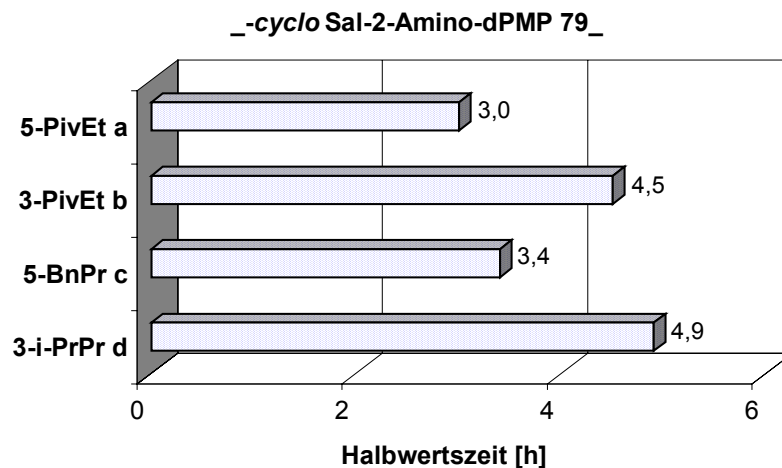


Abbildung 69 Hydrolysehalbwertszeiten der *cycloSal*-2-Amino-dPMPs **79a-d** in PBS bei pH 7.3

Auf den ersten Blick ergibt sich ein ähnliches Bild, wie bei den zuvor beschriebenen *cycloSal*-NMPs, wobei der Unterschied zwischen den 3- und 5-Isomeren mit 3.0-4.9 Stunden wesentlich geringer ausfiel. Durch die 3'-Hydroxylgruppe waren die Halbwertszeiten, verglichen mit den *cycloSal*-d4TMPs, wieder deutlich verkürzt. Bis auf das 3-*iso*-Propylpropionat **79a** ließ sich eine etwas größere Stabilität gegenüber den entsprechenden BVDU-Verbindungen feststellen. Diese Unregelmäßigkeit beweist, daß die besondere Stabilität des 3-*i*-PrPr-*cycloSal*-BVDUMPs **78b** durch das Zusammenspiel des *iso*-Propionates und der BVU-Nukleobase verursacht wird, zu dem die 2-Amino-dP-Base offensichtlich nicht fähig ist.

Was läßt sich nun über die Eignung der hergestellten *cycloSal*-NMPs als Pronukleotid sagen, zu deren Abschätzung die chemischen Hydrolysen in erster Linie durchgeführt wurden? Die Erfahrungen haben gezeigt, daß Halbwertszeiten, die im Bereich der beiden Prototyp-Verbindungen H- und 3-Me-*cycloSal*-NMP liegen, prinzipiell gut in der Lage sind, bei den späteren *in vitro*-Zelltests das Nukleotid freizusetzen.

Deshalb war das Ziel, die „lock-in“-Modifizierung so vorzunehmen, daß die Stabilität der *cycloSal*-Maske nur so beeinflußt wird, wie es die gemessenen Halbwertszeiten wiedergeben.

4.4.2. Carboxyesterase (PLE) katalysierte Hydrolysestudien

Die enzymatischen Hydrolysestudien sollten bis auf wenige Änderungen ebenso durchgeführt werden, wie die zuvor beschriebenen chemischen Hydrolysen, um möglichst vergleichbare Werte zu erhalten. Zu der unter 4.4.1. beschriebenen Kinetiklösung wurden lediglich 50 Units Carboxyesterase (PLE, Sigma EC 3.1.1.1.) zugegeben. Dafür wurde die entsprechende Menge eingewogen und in einem Gemisch aus 300 µl 50 mM PBS und 100 µl Wasser aufgenommen. Anschließend mußte so lange geschüttelt werden, bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte. Erst dann konnten die zum Lösen der Pronukleotide notwendigen 188.6 µl DMSO und der interne Standard (AZT) zupipettiert und im Thermomixer auf 37°C temperiert werden. Durch die Zugabe von 11.4 µl der 50 mM DMSO-Stammlösung wurde die Kinetik gestartet. Wie zuvor wurde sofort das erste Aliquot entnommen. Die Hydrolyse der Aliquote wurde mit einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure und 40 µl Acetonitril verhindert. Um alle Hydrolyseprodukte, vor allem die Polaren, sicher auf der RP-HPLC-Säule zu binden und damit auch identifizieren zu können, wurde bei diesen Messungen neben Acetonitril ein mit **Tetra**butylammoniumhydroxid (TBAH) angesetzter Puffer als Eluent verwendet. Bei der Auswertung der Chromatogramme wurde wieder analog der chemischen Hydrolysekinetiken vorgegangen.

Das Ziel dieser Studie war die praktische Funktionsprüfung der entworfenen „lock-in“-Masken, die ihre Wirkung erst nach der erfolgreichen, enzymatischen Hydrolyse der Carbonsäureester entfalten können. Die mangels humaner Carboxyesterase verwendete PLE, ist ein Gemisch von fünf Isoenzymen; die beiden Hauptenzyme, I und V, hydrolysieren aromatische/langkettige Ester beziehungsweise kurzkettige Ester. Es gibt viel Beweise dafür, daß die meisten Säugetier-Esterasen ähnlich, wenn auch nicht identisch sind. So gibt es sehr große Übereinstimmungen zwischen den beiden Aminosäuresequenzen der PLE und der humanen Carboxyesterase, von der aber weniger Isoenzyme bekannt sind⁹⁴.

Die ermittelten Halbwertszeiten geben, wie oben ausführlich beschrieben, nur Auskunft über die Geschwindigkeit, mit der die eingesetzten Edukte verschwinden.

Möchte man nun Informationen über den genaueren Reaktionsverlauf haben, bietet es sich an, die bei der Hydrolyse gebildeten Produkte zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf die abgelaufenen Reaktionen der Edukte ziehen zu können. Wenn eines der hergestellten *cycloSal*-NMPs tatsächlich ein Substrat für die ausgewählte PLE sein sollte, muß sich im HPLC-Chromatogramm ein Peak der freien Säure (**27**, **39**, **41**, **43**) bzw. des Alkohols (**38**, **40**, **42**, **44**) finden lassen. Da die Wechselwirkung vor dem Hintergrund der ebenfalls stattfindenden chemischen Hydrolyse untersucht werden muß, stellte sich die Frage, wie die zusätzliche Hydrolyse bei der zu messenden Halbwertszeit zum Ausdruck kommt. Eine weitere Reaktion, wie die enzymatische Hydrolyse, würde zusätzlich Edukt verbrauchen und dessen Abnahme beschleunigen, was letzten Endes zu einer geringeren Halbwertszeit führen muß.

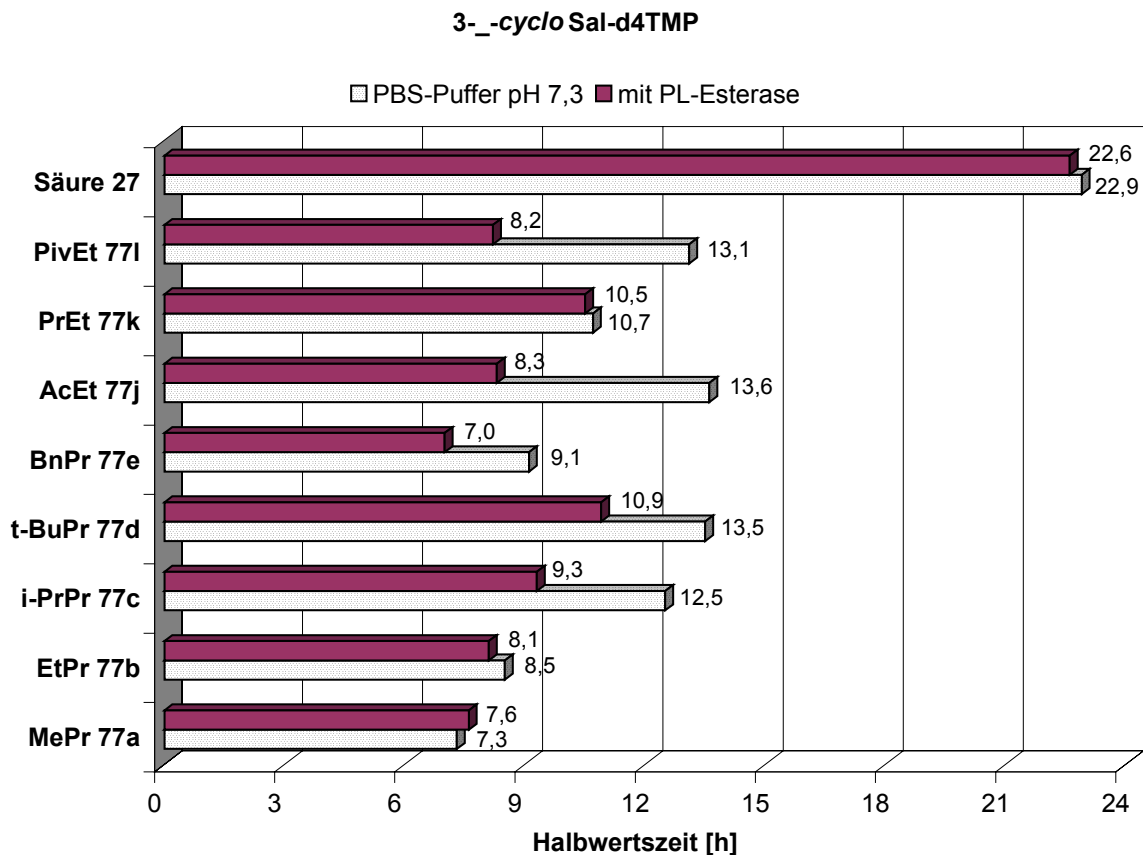


Abbildung 70 Halbwertszeiten der 3-substituierten *cycloSal*-d4TMPs **27**, **77a-e**, und **77j-l** in PBS bei pH 7.3 mit und ohne PLE

Natürlich können auch andere Faktoren für eine Beschleunigung verantwortlich sein. Ein Beispiel wäre der Angriff der Carboxyesterase direkt am Phosphattriester, bei dem dann keine anderes Hydrolyseprodukt als das Nukleotid gefunden werden

dürfte. Die Auswertung der chemischen Hydrolysen hat gezeigt, daß die freigesetzten Säuren sehr stabil sind und selbst bei den 3-Isomeren **27** und **39** kein beschleunigter Abbau durch einen assistierenden Effekt befürchtet werden muß. Vielmehr zeichnen sich gerade diese Säuren durch ihre enorme Stabilität aus. Demnach gibt es keine Gründe, diese nicht auch sicher nachweisen zu können, wenn sie freigesetzt wurden.

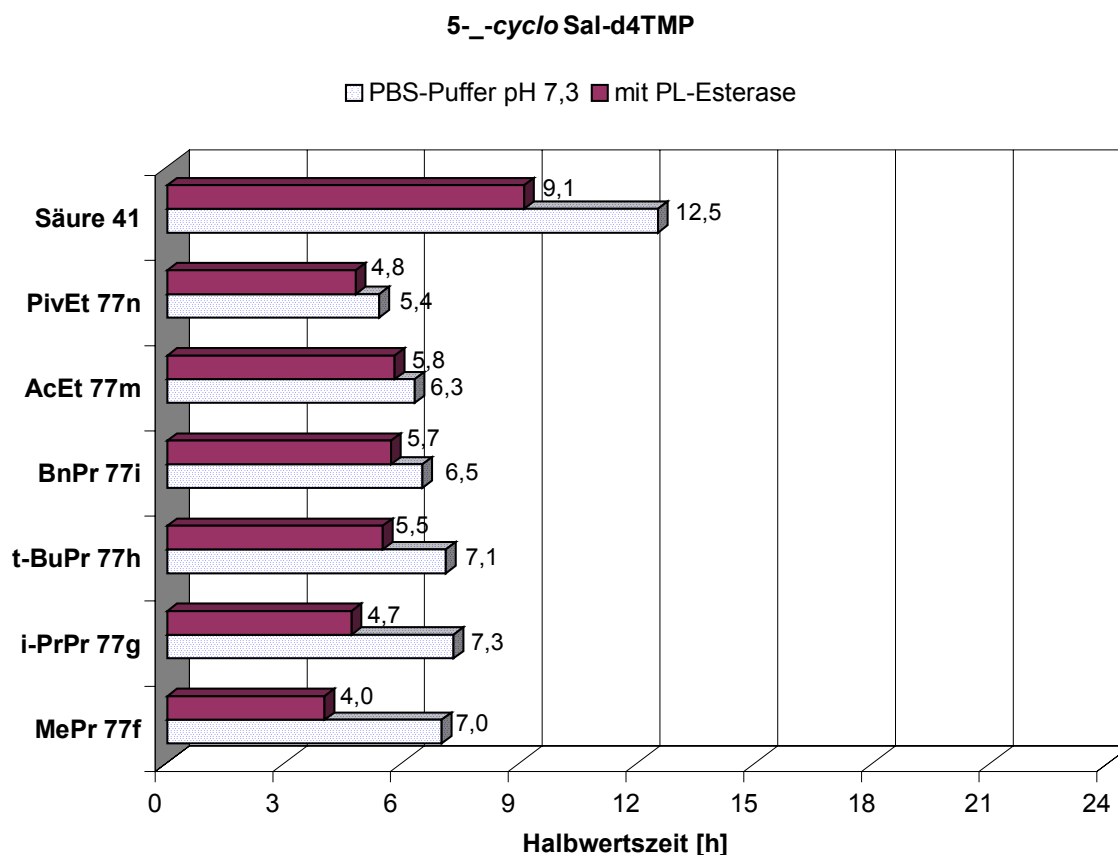


Abbildung 71 Halbwertszeiten der 5-substituierten *cyclo*Sal-d4TMPs **41**, **77f-i** und **77m,n** in PBS bei pH 7.3 mit und ohne PLE

Bei der Auswertung reicht es also, nach einer Verkürzung der chemischen Halbwertszeit zu suchen. Wenn das der Fall ist, müssen nur noch die Chromatogramme nach dem entsprechenden Hydrolyseprodukt hin überprüft werden, um eine enzymatische Hydrolyse nachweisen zu können.

Vergleicht man nun die Werte, fallen zwei Verbindungen ins Auge, die sich anscheinend völlig konträr zur allgemeinen Tendenz der verkürzten Halbwertszeit verhielten. Zum einen verringerte sich die Stabilität durch die Zugabe des Enzyms bei der 5-Säure **41** deutlich ($t_{1/2}$ ohne PLE: 12.5 h; $t_{1/2}$ mit PLE: 9.1 h), wohingegen sie beim 3-

Isomer **27**, wie erwartet, kaum beeinflusst wurde. Zum anderen führte die PLE bei dem 3-Methylpropionat **77a** sogar zu einer Stabilisierung ($t_{1/2}$ ohne PLE: 7.3 h; $t_{1/2}$ mit PLE: 7.6 h). Diese widersprüchlichen Beobachtungen machen deutlich, daß eine verringerte Halbwertszeit alleine noch kein Beweis für eine enzymatische Hydrolyse sein muß. Dadurch, daß sich – bis auf eine Ausnahme – alle Halbwertszeiten verkürzt haben, geben sie noch nicht einmal den gewünschten Hinweis für eine enzymatische Aktivität. Um die Auswirkungen der PLE zu relativieren und damit besser bewerten zu können, wurde aus den beiden Halbwertszeiten der chemischen ($t_{1/2}NMP_{(PBS)}$) und der enzymkatalysierten Hydrolyse ($t_{1/2}NMP_{(PLE)}$) der Quotient gebildet:

$$\frac{t_{1/2}NMP_{(PBS)}}{t_{1/2}NMP_{(PLE)}} = \text{kleinster Betrag} \approx 1SI$$

Der kleinste Wert aller berechneter Quotienten wurde dann als **S**ubstrat-**I**ndex (SI) mit dem Betrag 1 (für 3-MePr **77a**: 0.96 \approx 1 SI) festgelegt. Die Werte der übrigen Quotienten mußten nun durch Dividieren mit diesem kleinsten Wert (0.96) in das entsprechende Verhältnis gebracht werden, wodurch sie ebenfalls zu Substrat-Indices wurden. In der folgenden Tabelle sind die so berechneten Werte zusammengefaßt.

Tabelle 5 Berechnete Substrat-Indices bei der PLE-Hydrolyse für die cycloSal-d4TMPs **77a-n**, **27** und **41**

SI	MePr	EtPr	<i>i</i> -PrPr	<i>t</i> -BuPr	BnPr	AcEt	PrEt	PivEt	Säure
3-	1.00	1.09	1.41	1.29	1.34	1.71	1.06	1.68	1.05
5-	1.82	n.s.*	1.60	1.34	1.19	1.12	n. s.*	1.19	1.43

*n. s.: nicht synthetisiert

Anhand der Umrechnung läßt sich gut erkennen, daß auch ohne die Möglichkeit einer enzymatischen Esterhydrolyse ein SI von 1.43 (5-Säure **41**) erreicht wurde. Sollte tatsächlich einer der Ester als Substrat für die PLE in Frage gekommen sein, müßte sich das durch einen Wert bemerkbar machen, der über 1.43 liegt. Insgesamt findet man nur vier cycloSal-d4TMPs, die diesen Grenzwert überschreiten (5-MePr **77f**: 1.82, 5-*i*-PrPr **77g**: 1.60, 3-AcEt **77j**: 1.71, 3-PivEt **77l**: 1.68) und deshalb einer genaueren Betrachtung unterzogen werden sollen.

Das Hydrolyseprodukt der ersten beiden Ester (5-MePr **77f**, 5-*i*-PrPr **77g**) wäre die 5-Säure **41**, die unter diesen Bedingungen immerhin eine Halbwertszeit von 9.1 Stunden besaß. Die Frage, warum die PLE sogar die Phosphattriester-Hydrolyse beschleunigt hat, läßt sich nach den durchgeführten Untersuchungen nicht beantworten. Das ist aber auch nicht so entscheidend, da die Säuren **27** und **41** in erster Linie als Referenzverbindungen für die Coinjektion hergestellt wurden. Für eine erfolgreiche Identifizierung in den Aliquoten ist es nur wichtig, daß ihre Stabilität ausreicht, um eine nachweisbare Konzentration entstehen zu lassen. Damit die 5-Säure **41** bei der anschließenden Auswertung der HPLC-Chromatogramme aufgrund ihrer Retentionszeit erkannt werden kann, empfiehlt es sich, zuerst einen Blick auf die nächste Abbildung zu werfen, die das Chromatogramm des ersten entnommenen Aliquoten (t_0) der PLE-Hydrolyse wiedergibt.

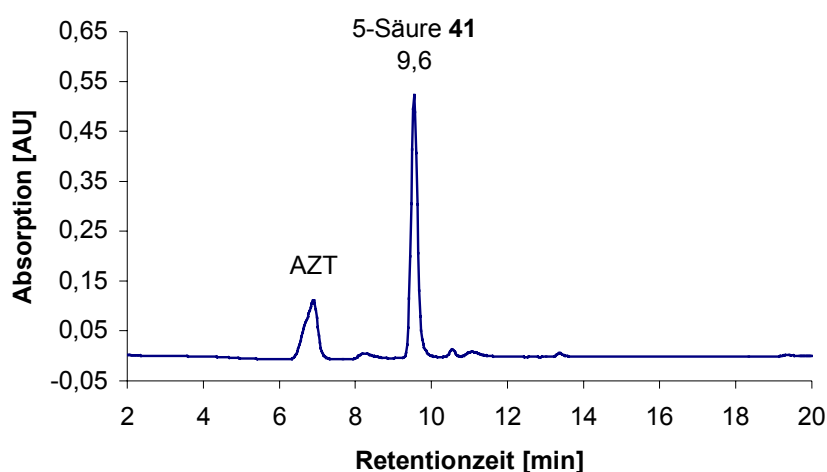


Abbildung 72 HPLC-Chromatogramm der 5-Säure-cycloSal-d4TMP **41** zu Beginn der PLE-Hydrolyse

Unter diesen Bedingungen hat die 5-Säure **41** eine Retentionszeit von 9.6 Minuten, und liegt damit in einem optimalen Detektionsbereich. Somit kann mit der Untersuchung der ersten beiden PLE-Hydrolysen (5-MePr-**77f** und 5-*i*-PrPr-cycloSal-d4TMP **77g**) begonnen werden.

Der SI von 5-MePr **77f** lag mit 1.82 am weitesten über dem gesetzten Grenzwert von 1.43 und ließ somit eine Enzymhydrolyse als sehr wahrscheinlich erscheinen. Um so mehr überraschte das Chromatogramm (Abbildung auf der nächsten Seite), daß durch die Vermessung des Aliquoten nach etwa 5 Stunden erhalten wurde. Der Triester **77f** ist mit einer Retentionszeit von 10.6 min ebenso gut zu erkennen, wie das

freigesetzte d4TMP, welches durch den verwendeten Puffer erst nach 8.3 Minuten eluiert wurde. Daß es sich bei diesem Peak tatsächlich um d4TMP handelt, konnte durch einen Coinjektionsversuch bewiesen werden. Im Bereich zwischen 9-10 Minuten kann aber kein Hinweis auf die vermutete 5-Säure **41** gefunden werden. Damit ist eine enzymatische Methylester-Hydrolyse definitiv ausgeschlossen.

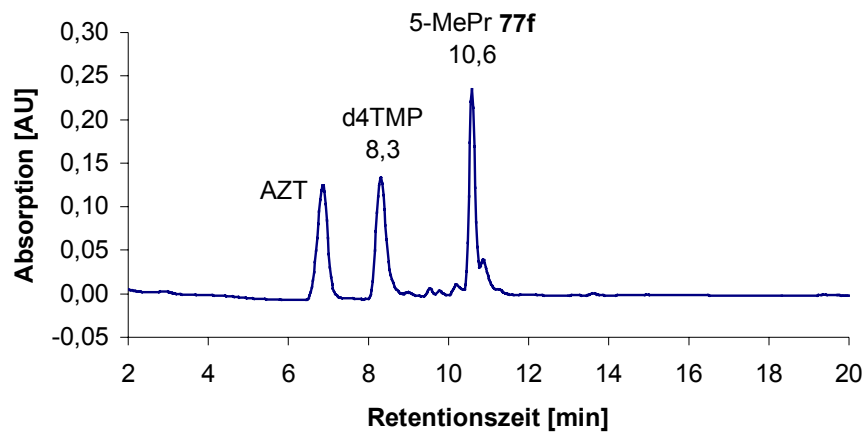


Abbildung 73 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 5-MePr-cycloSal-d4TMP **77f**

Dieses unerwartete Ausbleiben der Enzymaktivität ließ kaum mehr hoffen, daß 5-*i*-PrPr-cycloSal-d4TMP **77g** (SI: 1,60) eher ein Substrat für die PLE gewesen sein konnte, und so ist es auch nicht verwunderlich, daß das nächste Chromatogramm ein ähnliches Bild zeigt.

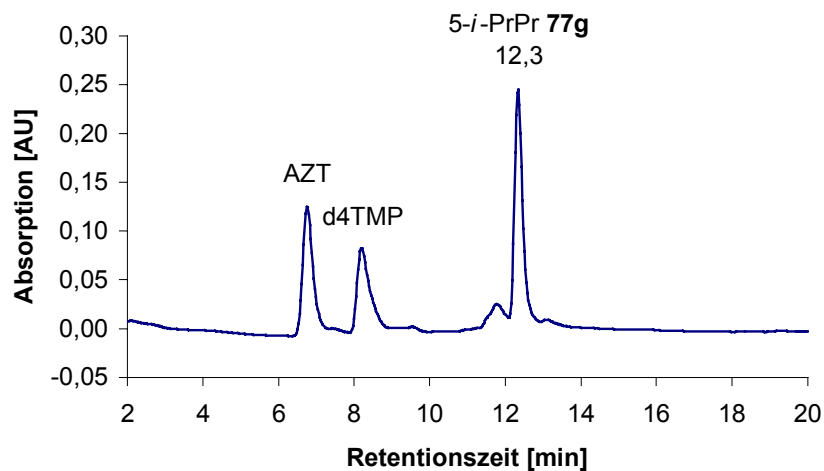


Abbildung 74 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 5-*i*-PrPr-cycloSal-d4TMP **77g**

Wie zu erwarten, hat der lipophilere *iso*-Propylester **77g** eine größere Retentionszeit (12.3 min), wobei sich die beiden anderen Peaks wieder eindeutig als AZT **2** und d4TMP identifizieren lassen. Damit ist erneut der Beweis erbracht, daß auch der *iso*-Propylester **77g** nicht als Substrat von der PLE akzeptiert wurde.

Nach diesen ersten negativen Resultaten schien die Frage, ob sich die „umgedrehten“ Ester anders verhalten würden, wegen der noch kleineren Substrat-Indices schon mit einem Nein beantwortet zu sein. Auch wenn der SI von 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j** mit 1.71 eigentlich eine enzymatische Hydrolyse nahe legte. Als Hydrolyseprodukt müßte hier der Alkohol **38** entstehen und nachzuweisen sein. Leider konnte nur eine (5-OHEt-*cycloSal*-BVDUMP **44**) der vier geplanten Referenzverbindungen **38**, **40**, **42** und **44** isoliert werden, weshalb bei der Auswertung der folgenden beiden Chromatogramme auf wichtige Informationen verzichtet werden muß. So ist die Stabilität des potentiellen Hydrolyseproduktes **38** genauso unbekannt, wie der weitere Verlauf der Hydrolyse, bei dem vielleicht – im Gegensatz zur 3-Säure **27** – der assistierende Effekt der Hydroxylgruppe beschleunigt d4TMP freisetzt. Infolgedessen könnte das Produkt **38** in so geringen Mengen entstehen, daß eine Detektion mit Hilfe der HPLC-Analytik unmöglich ist.

Das nächste Chromatogramm gibt den Stand der Kinetik nach ca. 1.2 Stunden wieder. Neben dem gewohnten Bild (AZT **2**, d4TMP und **77j**) ist hier zum ersten Mal ein weiteres kleines Signal nach 11.1 Minuten zu sehen. Außerdem sind auch die beiden Diastereomere angetrennt als Doppelpeak (10.2 und 10.4 min) zu erkennen.

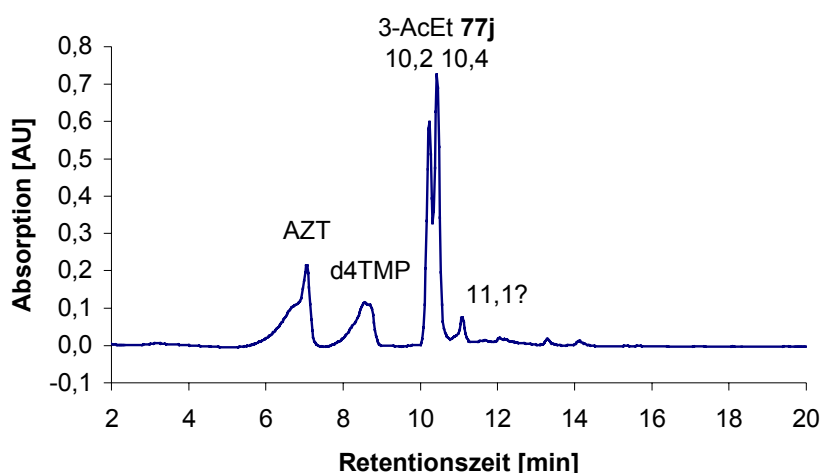


Abbildung 75 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j**

Die Vermutung, daß vielleicht einer dieser beiden Peaks durch das Hydrolyseprodukt **38** verursacht wurde, ließ sich durch den Vergleich mit den Chromatogrammen der chemischen Hydrolyse ausschließen. Sollte der Peak bei 11.1 Minuten tatsächlich durch 3-OHEt-*cycloSal*-d4TMP **38** verursacht worden sein, wäre das ein erster Hinweis, daß die Alkohole wesentlich instabiler sind, als die Säuren und deshalb auch nur in geringen Konzentrationen akkumuliert werden können. Ein erster Beweis für diese Vermutung wäre die Beobachtung des selben Signals bei der folgenden Hydrolyse von 3-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77i**.

Dessen SI war mit 1.68 beinahe identisch mit dem zuvor diskutierten 3-AcEt **77j**. Um möglichst vergleichbare Bedingungen voraussetzen zu können, mußte dessen 4-fach längere Halbwertszeit (8.2 h) berücksichtigt werden. Deshalb wird in der nächsten Abbildung die Zusammensetzung der Hydrolyselösung nach etwa 5 Stunden Reaktionsdauer gezeigt, was relativ zur 4-fachen Halbwertszeit genau dem Zeitpunkt entspricht, bei dem die vorangegangene Probe von 3-AcEt **77j** vermessen wurde. Eine Spur des 3-OHEt **38** kann aber nicht gefunden werden. Das könnte wieder an der Labilität des Zwischenproduktes **38** liegen. Angenommen es wäre hier in der selben Menge entstanden, wie bei der vorherigen Hydrolyse, würde nach 5 Stunden eine noch geringere Konzentration von 3-OHEt **38** übrig bleiben, dessen Nachweis nicht mehr möglich sein könnte. So kann die naheliegende Zuordnung des Peaks als Hydrolyseprodukt **38** bei 11.1 Minuten (Abbildung 75) weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden.

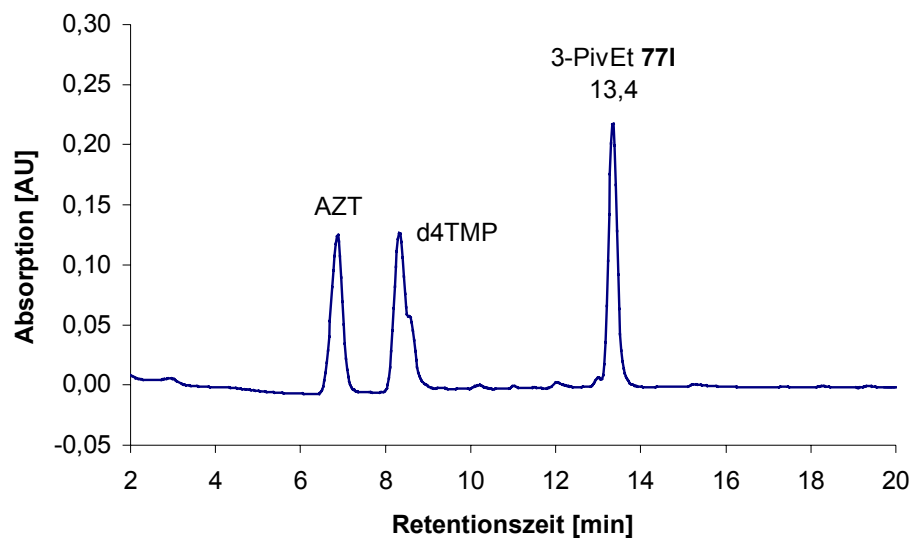


Abbildung 76 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 3-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77i**

Als Zwischenergebnis bleibt festzuhalten, daß die PLE bisher keinen Ester der Propionate **77a-i** hydrolysiert hat. Bei den „umgedrehten“ Estern **77j-n** konnte die enzymatische Hydrolyse weder belegt, noch in allen Fällen ausgeschlossen werden, da es die berechnete Vermutung gibt, daß die Eigenschaften der Hydrolyseprodukte **38** und **42** einen Nachweis mit dieser Methode verbieten.

Bevor nun nach Gründen für das Ausbleiben der enzymatischen Hydrolysen gesucht werden soll, empfiehlt es sich, zunächst einmal das Verhalten der analogen Ester der *cycloSal*-BVDUMPs **78a-l**, **39** und **43** zu untersuchen und die Resultate in die Diskussion einfließen zu lassen. Deren Balkendiagramme sind in den folgenden beiden Abbildungen zu sehen.

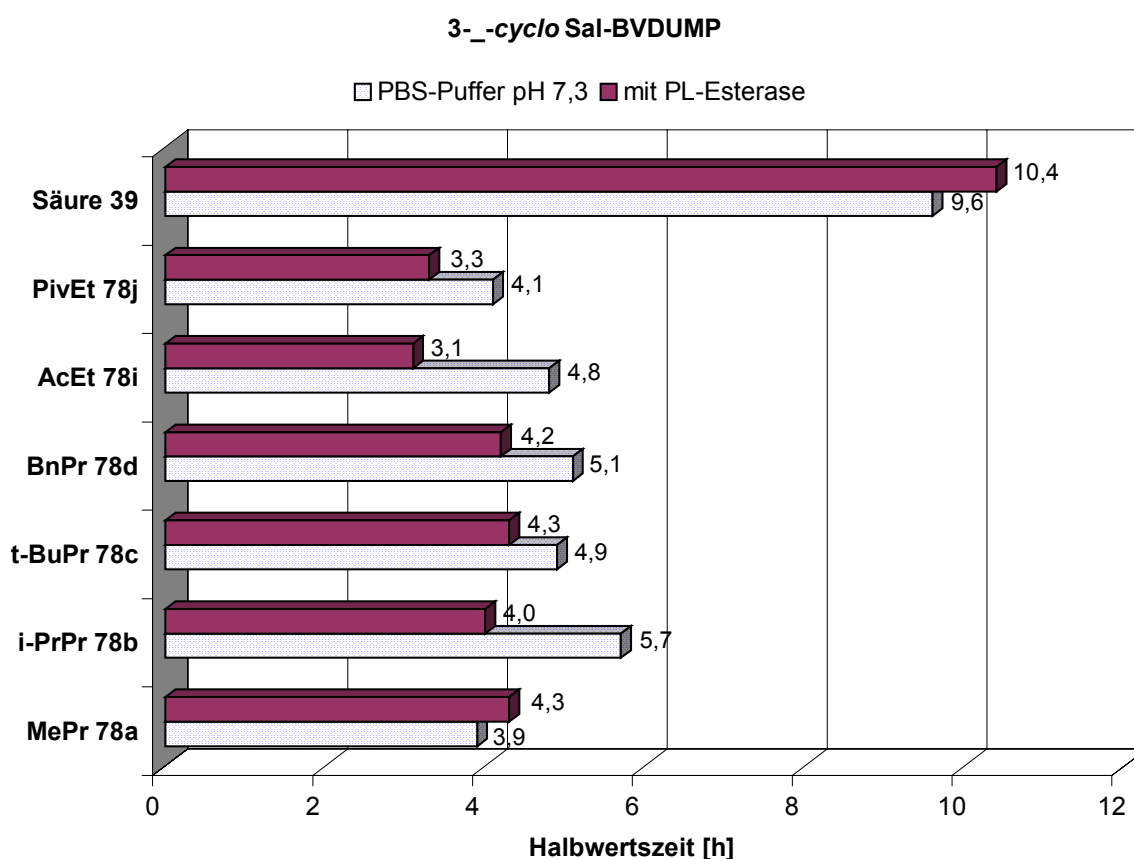


Abbildung 77 Halbwertszeiten der 3-substituierten *cycloSal*-BVDUMPs **39**, **78a-d** und **78i,j** in PBS bei pH 7.3 mit und ohne PLE

Diesmal zeigten die beiden Säuren **39** und **43** das erwartete Verhalten und ihre Halbwertszeiten wurden durch die Zugabe von PLE nicht verkürzt, sondern sogar verlängert. Solch eine stabilisierende Wirkung findet sich nur noch bei den beiden

regioisomeren Methylpropionaten **78a,e**, deren Verhalten damit als Abweichung von der allgemeinen Verkürzung der restlichen Halbwertszeiten bezeichnet werden kann. Zur besseren Interpretation der Werte wurden wieder die Substrat-Indices der einzelnen Verbindungen nach der oben beschriebenen Weise berechnet und in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 6 Berechnete Substrat-Indices bei der PLE-Hydrolyse für die cyclo-Sal-BVDUMPs **78a-l, 39** und **43**

SI	MePr	i-PrPr	t-BuPr	BnPr	AcEt	PivEt	Säure
3-	1.06	1.64	1.32	1.41	1.82	1.44	1.06
5-	1.00	1.44	1.40	1.28	8.47	25.72	1.03

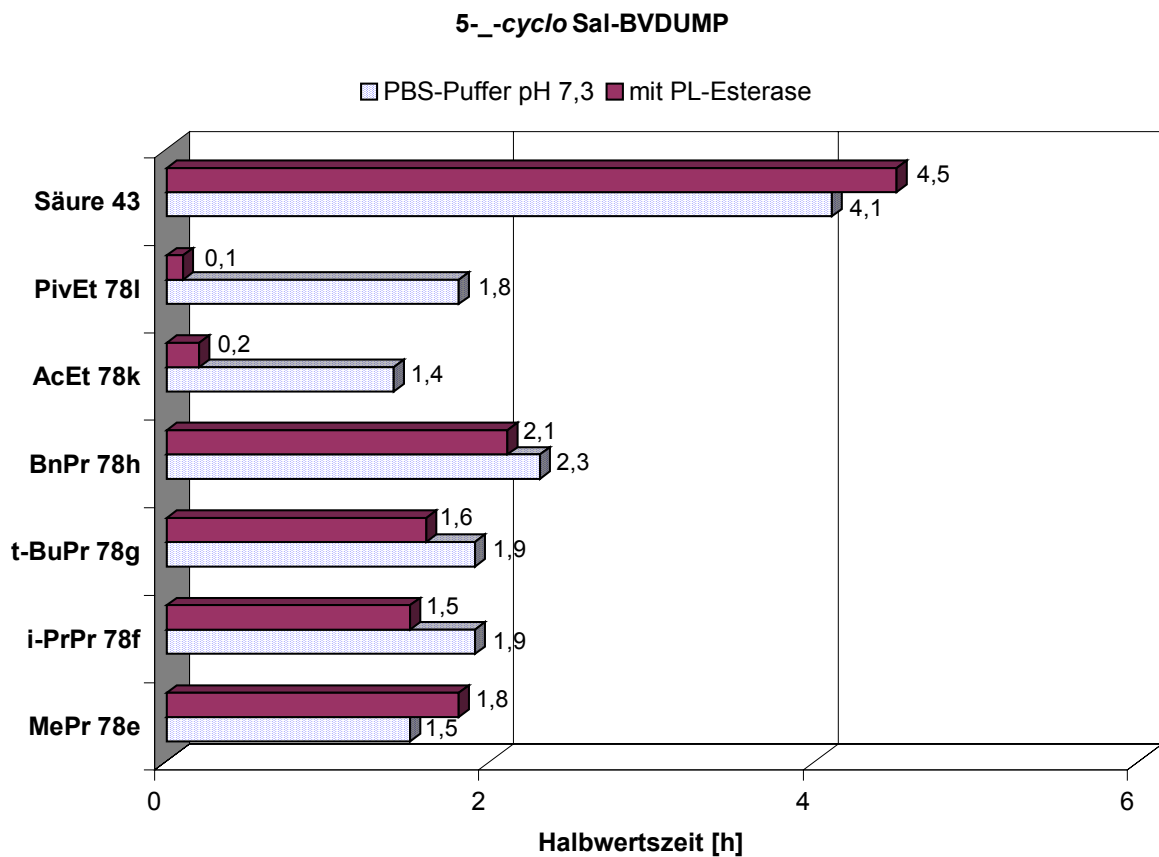


Abbildung 78 Halbwertszeiten der 5-substituierten cycloSal-BVDUMPs **43, 78e-h** und **78k,l** in PBS bei pH 7.3 mit und ohne PLE

Obwohl es sich bei diesen Werten ebenfalls um Substrat-Indices handelt, ist ein direkter Vergleich mit den ersten SI-Daten der d4T-Derivate nicht ohne weiteres er-

laubt. Die erhaltenen Beträge könnten alleine durch die unterschiedliche Nukleobase, deren Einfluß durch die Berechnungsmethode nicht berücksichtigt wird, höher sein. Eine solche Erhöhung müßte sich aber gleichmäßig auf alle SI-Werte auswirken.

Wie schon aus beiden Balkendiagrammen zu erkennen ist, konnten diesmal Substrat-Indices erreicht werden, die weit über denen der d4T-Verbindungen liegen. Im Falle von 5-PivEt **78I** macht sich das sogar durch einen SI-Wert bemerkbar, der den Wert der 5-Säure **43** um das 25-fache übertrifft.

Zuerst sollen aber wieder die Hydrolysen der Propionate **78a-h** ausgewertet werden. Mit einem Betrag von 1.64 hat 3-*i*-PrPr **78b** den größten SI. Nach 2.7 Stunden PLE-Hydrolyse ergibt sich folgendes Bild:

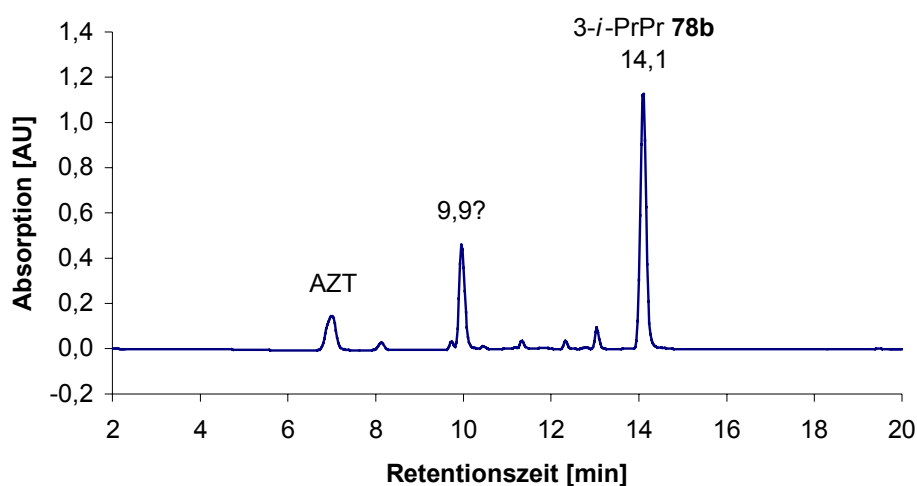


Abbildung 79 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 3-*i*-PrPr-cycloSal-BVDUMP **78b**

Nach ca. 7 Minuten eluierte, wie gewohnt, der interne Standard (AZT) gefolgt von einer Verbindung, die eine Retentionszeit von 9.9 Minuten aufweist, und schließlich das Edukt **78b**. Es liegt nahe, den unbekanntem Peak als freie 3-Säure **39** zu betrachten. Diese Vermutung müßte sich durch Coinjektion der reinen 3-Säure **39** beweisen lassen. Sollte die getroffene Zuordnung richtig sein, darf danach nur eine Intensivierung des vermuteten Signals beobachtet werden. Ist dagegen ein neuer Peak nachzuweisen, kann es sich eindeutig nicht um die gleiche Verbindung handeln. Das Ergebnis des Coinjektionsversuches ist in der nächsten Abbildung dargestellt. Ohne Zweifel läßt sich in diesem Chromatogramm ein weiterer Peak mit einer Retentionszeit von 11.3 Minuten erkennen, der somit die Zuordnung widerlegt. Als

wahrscheinlichster Verursacher dieses Signals kommt dann BVDUMP in Betracht, welches durch die chemische Hydrolyse des Phosphattriesters entstanden wäre. Durch einen weiteren Coinjektionsversuch (diesmal mit BVDUMP; ist nicht abgebildet) konnte diese Vermutung bestätigt werden.

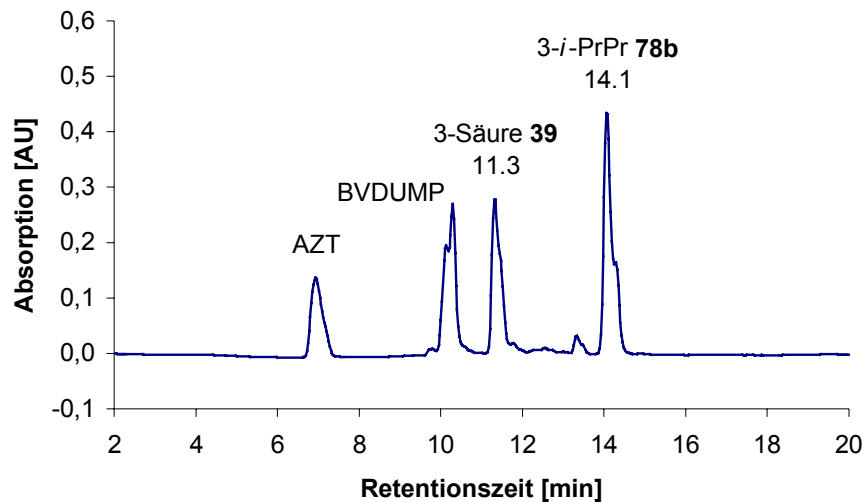


Abbildung 80 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 3-i-PrPr-cycloSal-BVDUMP 78b mit Coinjektion der 3-Säure 39

Das 5-Isomer 78f der beiden *iso*-Propylpropionate hat immerhin noch einen SI von 1.44. Das ausgewählte Chromatogramm zeigt ein recht ähnliches Bild, wie das zuvor untersuchte.

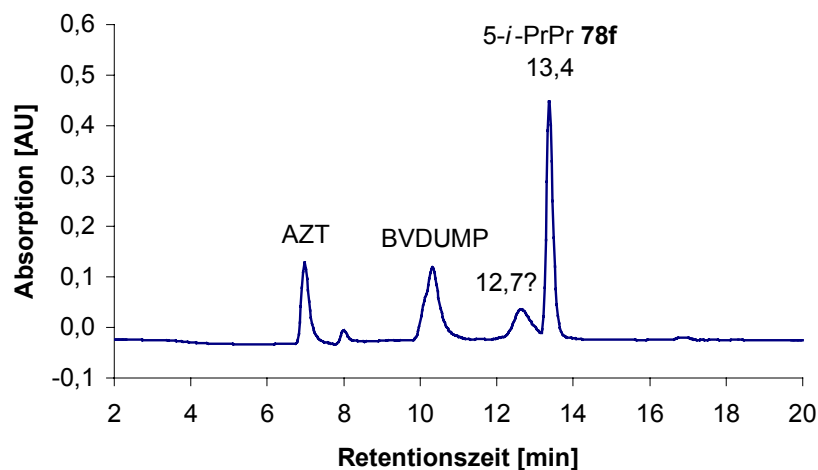


Abbildung 81 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 5-i-PrPr-cycloSal-BVDUMP 78f

Nach etwas mehr als 10 Minuten eluierte ein breiter Peak, der durch die bisher gemachten Beobachtungen, sofort als BVDUMP erkennbar ist. Die eventuell entstandene 5-Säure **43** würde sich mit einer Retentionszeit von 10.8 Minuten zwar nur um 0.5 Minuten unterscheiden, müßte aber dennoch als weiterer Peak, vor allem zu Beginn der Hydrolyse, in den entsprechenden Aliquoten (kaum BVDUMP vorhanden) nachzuweisen sein. Tatsächlich ist noch ein weiterer, unbekannter Peak bei 12.7 Minuten zu erkennen, bei dem es sich aber um ein Nebenprodukt, ähnlich wie BVDU **15** (kleiner Peak bei 8 Minuten), handeln muß.

Nachdem weder 3-*i*-PrPr- und 5-*cyclo*Sal-BVDUMP **78b,f** Substrate der PLE waren, noch die zuvor untersuchten Ester der d4T-Verbindungen, könnte man schon den Schluß ziehen, daß alle „lock-in“-modifizierten *cyclo*Sal-NMPs generell ungeeignete Substrate für die PLE seien. Diese Einschätzung wurde nach der Auswertung der Aliquote, die das Hydrolyseverhalten der *tert*-Butylpropionate **78c,g** aufklären sollten, weiter untermauert, da sich erneut keine Spur von den freien Säuren **39** und **43** finden ließ (nicht abgebildet).

Um so mehr überrascht das Chromatogramm des 3-BnPr-*cyclo*Sal-BVDUMPs **78d**, mit dem erstmals der Nachweis für die erfolgreiche, enzymatische Hydrolyse eines Propionates erbracht werden kann.

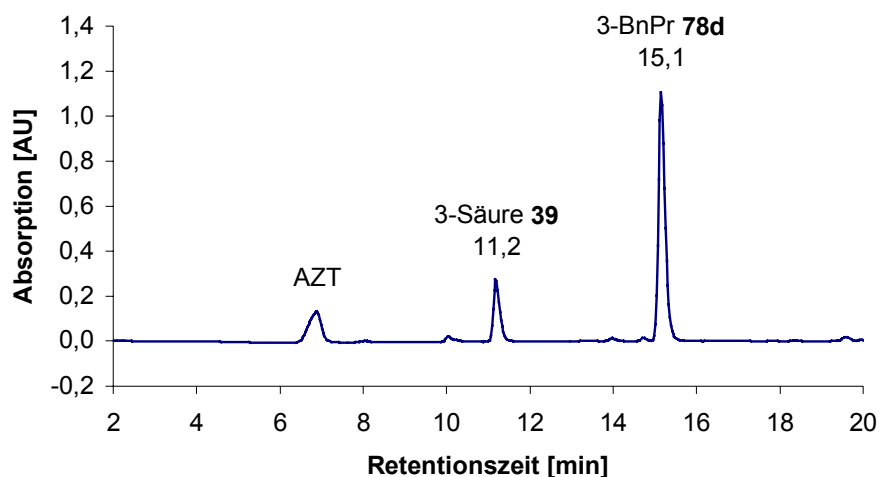


Abbildung 82 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 3-BnPr-*cyclo*Sal-BVDUMP **78d**

Der mittlere Peak zeigt exakt die notwendige Retentionszeit von 11.2 Minuten und liegt damit etwa eine Minute über dem vermeintlichen BVDUMP-Signal (somit kann BVDUMP als Verursacher ausgeschlossen werden). Der endgültige Beweis wurde

wieder durch einen Coinjektionsversuch erbracht, bei dem in der Tat lediglich eine Intensivierung dieses Peaks zu erkennen ist, wie das folgende Chromatogramm beweist.

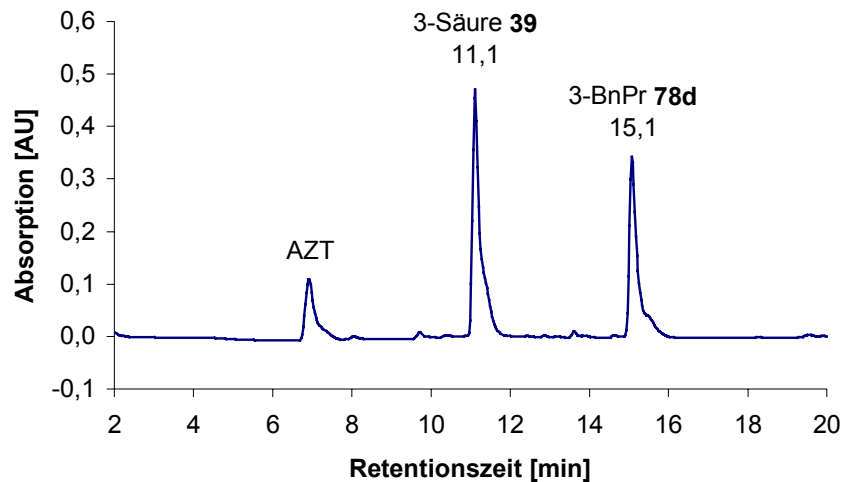


Abbildung 83 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 3-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78d** mit Coinjektion der 3-Säure **39**

Dieser erste Erfolg sollte aber schon beim nächsten und damit auch letzten Propionat (5-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78h**) wieder ausbleiben. So konnte also letzten Endes nur eine einzige enzymatische Hydrolyse unter allen untersuchten Propionaten der cycloSal-d4TMPs und -BVDUMPs beobachtet werden.

Abschließend folgt nun die Auswertung der vielversprechenden Acetat- **78i,k** und Pivalat-Verbindungen **78j,l**. Wie schon erwähnt, stand als Coinjektionsstandard hierfür nur das 5-OHEt-cycloSal-BVDUMP **44** zur Verfügung. Dadurch bereitet die Identifizierung des Hydrolyseproduktes **40** die gleichen Schwierigkeiten, wie sie für die analoge d4T-Verbindung weiter oben schon beschrieben wurden.

Der SI (1.82) von 3-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78i** läßt auf eine enzymatische Aktivität schließen. Doch bei der Überprüfung der Chromatogramme aller entnommener Aliquote konnte kein Hinweis für die Freisetzung des Alkohols **40** gefunden werden. Da dessen physikalisch-chemische Eigenschaften unbekannt sind, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, daß das Zwischenprodukt **40** entstanden ist, aber danach so schnell weiter hydrolysierte, so daß ein Nachweis nicht möglich war.

Das 3-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78j** hat unter diesen Bedingungen eine ähnliche Halbwertszeit (3.3 h), weshalb man Chromatogramme erwarten sollte, die sich nur

durch die unterschiedlichen Retentionszeiten der Edukte (**78i**: 12.4 min; **78j**: 15.1 min) unterscheiden. Der Vergleich der Chromatogramme beider Verbindungen, der in der nächsten Abbildung wiedergegeben ist, bietet aber eindeutig einen anderen Anblick. Das Aliquot des 3-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78i** zeigt bei etwa 10 Minuten den gewohnten BVDUMP-Peak, wohingegen bei 3-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78j** in dieser Region ein kleines, gefolgt von einem größeren, scharfen Signal mit 10.6 Minuten Retentionszeit zu erkennen gibt. Dieser Wert ließe sich gut mit den Erwartungen für den freien Alkohol **40** vereinbaren, der damit nämlich im Bereich der 10.2 Minuten des regioisomeren 5-OHEt-cycloSal-BVDUMP **44** liegen würde.

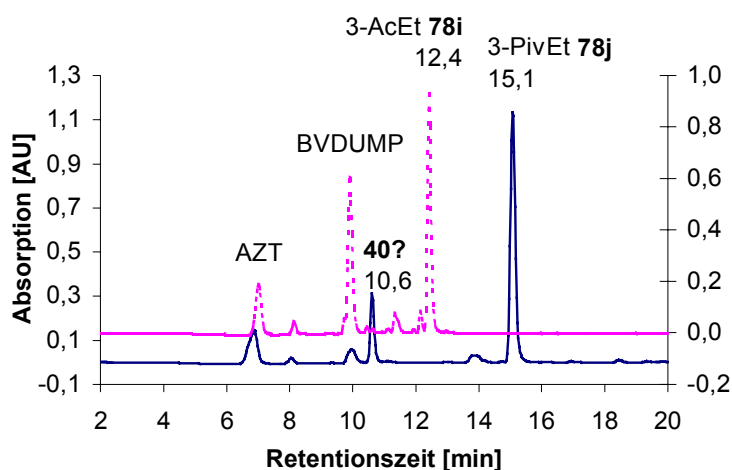


Abbildung 84 Vergleich der HPLC-Chromatogramme der PLE-Hydrolyse von 3-AcEt- **78i** und 3-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78j**

Bei der Auswertung der restlichen Aliquote, ließ sich auch der charakteristische Verlauf, der nach solch einer Enzymhydrolyse folgen würde, sehr gut nachvollziehen. Mit dem Fortschreiten der Hydrolyse von 3-PivEt **78j** stieg die BVDUMP-Konzentration weiter an, wohingegen die Intensität des vermeintlichen Alkohol-Signals einige Zeit nahezu unverändert blieb, um dann aber langsam abgebaut zu werden, bis am Ende nur noch BVDUMP nachzuweisen war. Diese Beobachtungen sind zwar ein guter, wenn auch nicht ausreichender Beweis für die aufgestellte Vermutung. Die Ungewißheit ließe sich mittels einer NMR-Untersuchung beseitigen, wofür man das Zwischenprodukt aber isolieren müßte. Dies wäre aber nur möglich, wenn die Umsetzung des Eduktes **78j** wesentlich schneller verlaufen würde. Denn

nur so könnte eine größere Menge des Alkohols **40** entstehen, die eine Isolierung aus dem Gemisch heraus möglich und praktikabel erscheinen ließ.

Genau dieser Weg führte im Fall des 5-Isomers **78I** zur ersten, erfolgreichen Synthese von 5-OHEt-*cycloSal*-BVDUMP **44**, wodurch immerhin einer der vier geplanten Coinjektionsstandards isoliert werden konnte. Das nachfolgende Chromatogramm gibt den Stand der Hydrolyse nach nur einer Minute wieder, bei dem schon etwa die Hälfte des eingesetzten Eduktes **78I** verbraucht war. Nach weiteren 10 Minuten war so viel Edukt umgesetzt, daß nur noch der Peak bei 10.2 Minuten detektiert werden konnte. Diese schnelle Umsetzung machte es sogar möglich, die Halbwertszeit des Zwischenproduktes **44** ($t_{1/2} = 2.6$ h, Abbildung 86) direkt mit Hilfe dieser Daten zu bestimmen.

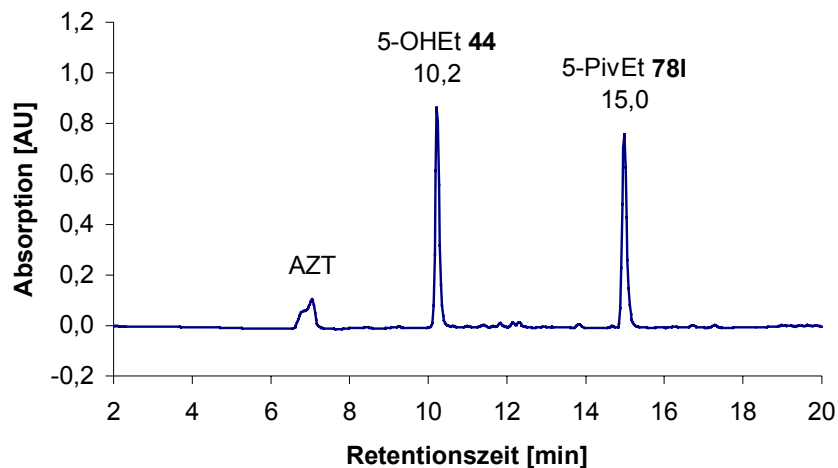


Abbildung 85 HPLC-Chromatogramm der PLE-Hydrolyse von 5-PivEt-*cycloSal*-BVDUMP **78I**

Wie der SI (8.47) von 5-AcEt-*cycloSal*-BVDUMP **78k** schon erahnen läßt, ist auch dieser Ester ein hervorragendes Substrat der PLE. So zeigten die Chromatogramme, wie bei der Hydrolyse von 5-PivEt **78I** beschrieben, wieder eine schnelle Freisetzung (ca. 30 min) des Alkohols **44**. Durch die etwas langsamere Hydrolyse konnte diesmal auch die weiterführende Hydrolyse zu BVDUMP beobachtet werden. Das entsprechende Chromatogramm, das die enzymatische Hydrolyse belegt, ist wegen der Analogie zum eben gezeigten Verlauf nicht extra abgebildet.

Nachdem jetzt alle PLE-Hydrolysen ausgewertet sind, läßt sich feststellen, daß nur vier (3-BnPr-*cycloSal*-BVDUMP **78d**, 5-AcEt-*cycloSal*-BVDUMP **78k** 3-PivEt-*cyclo*-

Sal-BVDUMP **78j** und 5-PivEt-*cyclo*Sal-BVDUMP **78l**) der sechszwanzig Ester nachweislich durch die Carboxyesterase hydrolysiert wurden. Dennoch konnte bei den meisten Verbindungen durch die Anwesenheit der PLE eine Destabilisierung – im Vergleich zur rein chemischen Hydrolyse – festgestellt werden, die sich nicht so ohne weiteres erklären läßt, da die Hydrolysebedingungen ansonsten identisch waren.

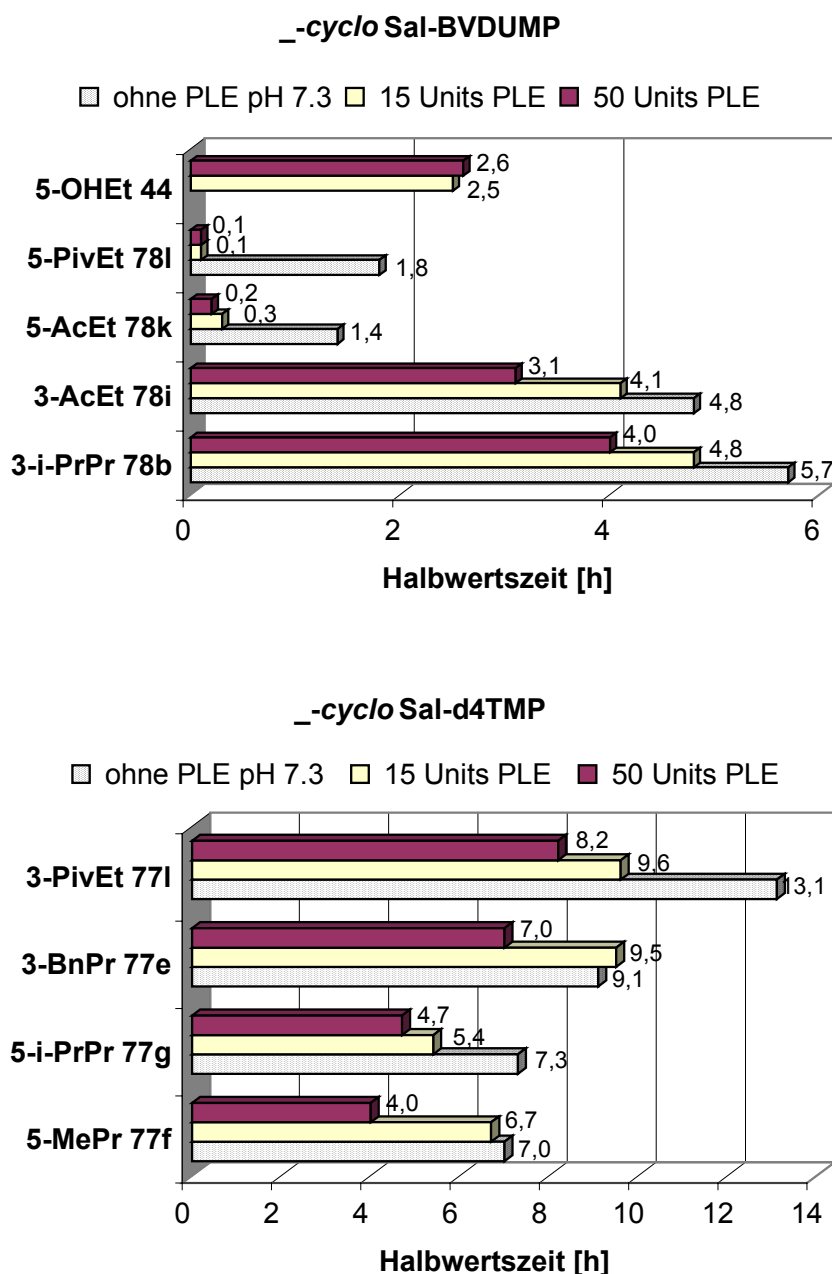


Abbildung 86 *Einfluß der PLE-Konzentration auf die Hydrolysehalbwertszeiten*

Um den Einfluß des Enzyms weiter aufzuklären, wurden einige Hydrolysen mit einer geringeren Menge (15 Units) an PLE wiederholt. Von den BVDUMPs wurden dafür

jeweils zwei Ester ausgewählt, die enzymatisch hydrolysiert wurden und zwei die nur beschleunigt BVDUMP freisetzen. Im Vergleich dazu wurden noch vier d4T-Ester verwendet, deren Hydrolyse sich zuvor am meisten beschleunigt hatte.

Betrachtet man die beiden Balkendiagramme auf der vorherigen Seite, fällt sofort auf, daß sich die verringerte PLE-Konzentration nur wenig auf die Halbwertszeiten der enzymatischen Hydrolysen auswirkte, während sich bei den restlichen Verbindungen eine deutliche Stabilisierung abzeichnet. Anscheinend war die Menge des Enzyms im Fall der Substrate immer noch groß genug, um ähnlich schnell zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes zu führen (wohlgemerkt soll und kann hierbei keine Aussagen über die Bildungsgeschwindigkeit des Produktes oder die Reaktionskinetik gemacht werden, da ja nur die Abnahme der Edukte bestimmt wurde), wohingegen sich der Effekt, der für die beschleunigte Hydrolyse bei den Nicht-Substraten verantwortlich zeichnet, eher linear zur PLE-Konzentration verhielt. Diese Beobachtung kann als weiteres Indiz für eine enzymkatalysierte Hydrolyse genutzt werden. Vorausgesetzt eine geringe Beeinflussung der Halbwertszeiten ließe sich nur bei Substraten des Enzyms feststellen, könnte die Ungewißheit bei der Auswertung von 3-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78i** beseitigt werden, da eine eindeutige Abhängigkeit von der PLE-Konzentration (50 Units: 3.1 h; 15 Units: 4.1 h; ohne PLE: 4.8 h) festzustellen ist. Diese Beobachtung würde eine enzymatische Hydrolyse ausschließen. Eine Erklärung für den beschleunigten Abbau der Nicht-Substrat-Verbindungen könnte zum Beispiel eine Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche des Enzyms sein, die in der Lage sein muß, die Phosphatdiester-Hydrolyse zu katalysieren.

Abschließend stellt sich nun die Frage, warum die PLE nur so wenige Ester als Substrat akzeptierte und wodurch ihre Selektivität bestimmt wurde. Um eine Antwort geben zu können, empfiehlt es sich, einen Blick auf das aktive Zentrum des Enzyms zu werfen, das für die Substratselektivität verantwortlich sein sollte. Nachdem in der Vergangenheit immer wieder Anomalien in der Struktur- und Stereospezifität der PLE auftraten, wurde ein Modell für das aktive Zentrum entworfen und veröffentlicht, mit dem eine Abschätzung möglich sein sollte⁹⁵. Das ursprüngliche Modell mußte im Laufe der Zeit mehrfach geändert werden, um die angenommenen Größen der verschiedenen Taschen, die nicht immer mit den hydrolysierten Estern zu vereinbaren waren, anzupassen, bis schließlich das Modell auf der nächsten Seite in den dargestellten Dimensionen erhalten wurde⁹⁶. Ein potentiell Substrat muß demnach so beschaffen sein, daß es beim Andocken zum Enzym-Substrat-Komplex mit zwei po-

laren Bindungsstellen, bezeichnet als $P_{F(\text{ront})}$ und $P_{B(\text{ack})}$, und zwei hydrophoben Taschen, $H_{L(\text{arge})}$ und $H_{S(\text{mall})}$, zu interagieren vermag, wobei das Volumen für den lipophilen Teil des Substrates durch die H_L -Tasche auf etwa 56 \AA^3 ($\sim 6.2 \times 2.3 \times 3.9 \text{ \AA}$) begrenzt wird.

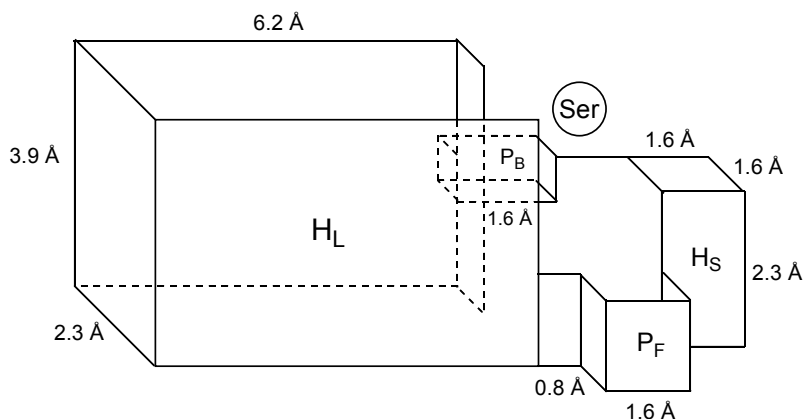


Abbildung 87 Modell des aktiven Zentrums der PLE

Die beiden polaren Taschen zwingen die Carbonylgruppe des Carbonsäureesters sich so anzuordnen, daß der Angriff des benachbarten Serin-Alkohols (Ser), der katalytischen Triade, begünstigt wird. Ester die sich aus sterischen oder konfigurativen Gründen nicht in diese Form bringen lassen, bleiben unberührt, wodurch die bekannte Stereoselektivität des Enzyms begründet wird^{97,98}. Die Stereoselektivität kann aber in diesem Fall nicht für das Ausbleiben der Enzymaktivität verantwortlich gemacht werden, da immer beide Diastereomere zur Verfügung standen. Die Ursache dürfte vielmehr in der begrenzten Größe der H_L -Tasche zu finden sein.

Betrachtet man die vier Substrate 3-BnPr- **78d**, 5-AcEt- **78k**, 3-PivEt- **78j** und 5-PivEt-*cycloSal*-BVDUMP **78l**, fällt auf, daß nur Pronukleotide darunter sind, die zur Klasse der BVDU-Verbindungen gehören. Alle d4T-Verbindungen waren inaktiv und es stellt sich wiederum die Frage, warum BVDU **15** so begünstigt wurde. Neben dem Bromvinyl-Substituenten – anstelle der 5-Methylgruppe – besitzt BVDU **15** noch eine 3'-Hydroxylgruppe am Glycon, die eine zusätzliche Polarisierung in dieser Region bewirken sollte, wohingegen d4T **7** dort vollkommen unpolar ist. Es könnte sein, daß genau diese 3'-Hydroxylgruppe zur Bildung des ES-Komplexes notwendig ist. Die Doppelbindung am Glycon von d4T **7** hat aber auch eine konformative Auswirkung. Die Freiheitsgrade des Glycons werden im Vergleich zu BVDU deutlich eingeschränkt, und damit auch die mögliche Anordnung der Nukleobase und des 4'-Hydroxymethyl-Restes des Nucleosides. Diese mangelnde Flexibilität könnte bei den

cycloSal-d4TMPs dafür verantwortlich gewesen sein, daß sich keines der Pronukleotide so anordnen konnte, daß der große lipophile Rest in die H_L-Tasche der PLE paßte.

Auch die Auswahl der Ester selbst ist bemerkenswert. Bis auf eine Ausnahme (3-BnPr **78d**) wurden nur die „umgedrehten“ Ester hydrolysiert, was die Vermutung nahelegt, daß sich diese Ester besser in das aktive Zentrum einfügen lassen, wenn der große *cycloSal*-NMP-Rest die Rolle des Alkohols übernimmt. Die einzige Ausnahme, das 3-BnPr **78d**, könnte vielleicht nur durch die besonderen Eigenschaften eines Benzylalkohol-Restes toleriert worden sein.

Bei der publizierten Größe⁹⁶ der H_L-Tasche ist es außerdem mehr als verwunderlich, daß überhaupt eine der untersuchten Verbindungen in das aktive Zentrum der PLE paßte. Vielmehr stellen die Ergebnisse dieser Studie die Dimension des Modells erneut in Frage, und machen eine genauere Untersuchung hinsichtlich dieser Beobachtung unumgänglich. Zumal eine Reihe von ähnlichen PLE-Hydrolysestudien mit anderen Pronukleotiden bekannt sind^{99,100}, bei denen ebenfalls eine PLE-katalysierte Hydrolyse beobachtet wurde. Vielleicht ist auch die Vorstellung des aktiven Zentrums als starrer Hohlraum, wie es das Modell vermittelt, eine zu große Vereinfachung der tatsächlichen Gegebenheiten. Die gleichen Bedenken sollten hinsichtlich der Bewertung der gewonnenen Erkenntnisse für das spätere Hydrolyseverhalten gelten: Kann durch solch einen einfachen PLE-Assay wirklich eine zuverlässige Aussage über die „lock-in“-Fähigkeit der Pronukleotide bei einem späteren *in vitro*- oder *in vivo*-Einsatz gemacht werden? Auch wenn man davon ausgeht, daß die humane Carboxyesterase eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit denen anderer Säugetiere aufweist, ist sie dennoch nicht identisch und kann daher auch nicht die gleiche Substratspezifität besitzen. Zur Klärung dieser Ungewißheit wurde eine weitere Studie in humanen Zellextrakten durchgeführt, die auf die gerade gestellte Frage eine Antwort geben sollte, und im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

4.4.3. Hydrolysestudien in humanen Zellextrakten

Das intrazelluläre Verhalten der „lock-in“-modifizierten Pronukleotide sollte nun durch Untersuchungen in den Extrakten humaner CEM/0-Zellen (für die d4T-Verbindungen) bzw. P3HR-1-Zellen (für die BVDU-Derivate) aufgeklärt werden. Diese Zellextrakte wurden von Dr. Lieve Naesens, Rega-Institut Leuven, Belgien,

(CEM/0-Zellen) sowie Dr. Astrid Meerbach, Universität Jena, (P3HR-1-Zellen) zur Verfügung gestellt.

Vor Beginn der Kinetiken wurden 1 ml des jeweiligen Zellextraktes auf zehn Eppendorf-Caps verteilt und mit 20 μ l einer 70 mM Magnesiumchlorid-Lösung versetzt. Die Hydrolysen wurden nun in jedem Cap durch die Zugabe von jeweils 20 μ l einer 3.0 mM DMSO-Lösung, die zuvor durch Verdünnen der 50 mM DMSO-Stammlösung hergestellt wurde, gestartet.

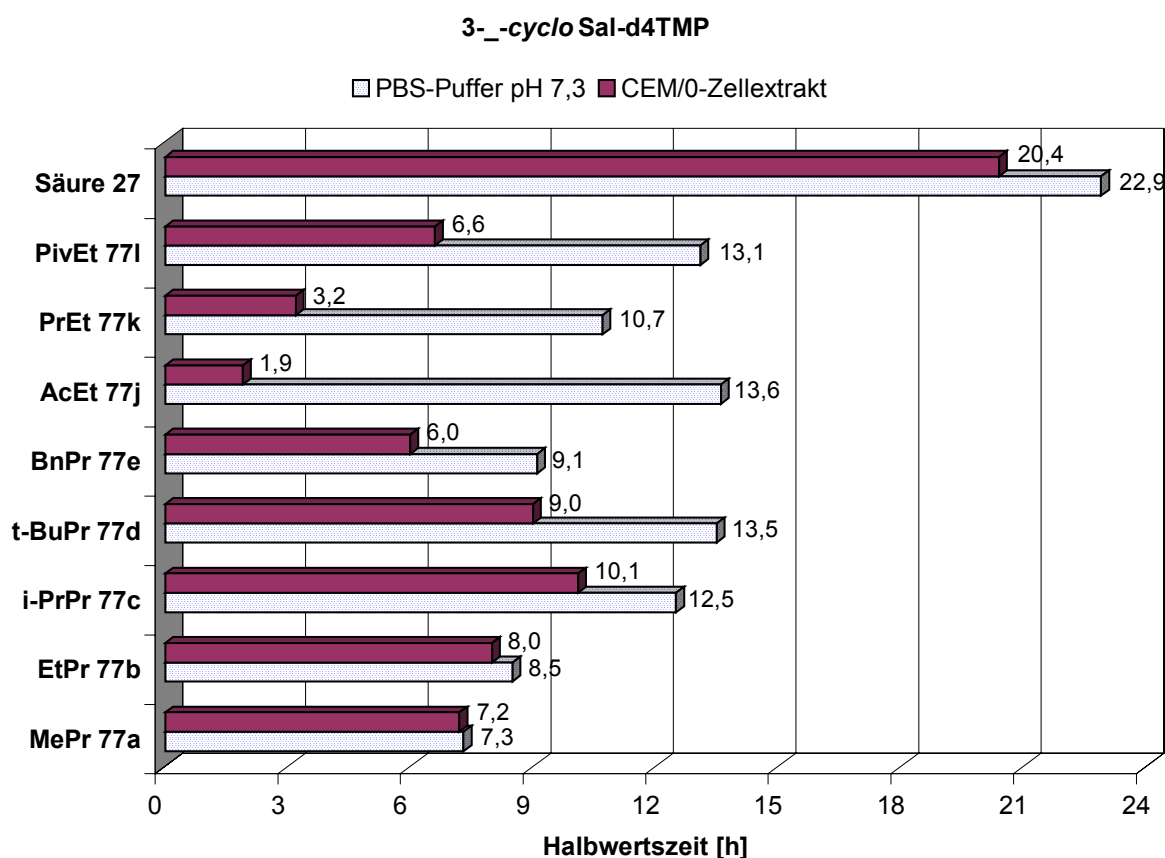


Abbildung 88 Halbwertszeiten der 3-substituierten *cyclo*Sal-d4TMPs **27**, **77a-e** und **77j-l** bei 37°C in PBS bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakt

Im Gegensatz zu den vorherigen Kinetiken mußten jetzt keine Aliquote mehr entnommen werden, sondern jede der zehn Proben wurde durch Zupipettieren von 300 μ l essigsäurem Methanol zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt und so selbst zum Aliquoten. Die Meßwerte einer Kinetik wurden also diesmal durch zehn unabhängige Hydrolysen erhalten. Damit konnte eine Kontaminierung der Zellextrakte bei der Aliquotenentnahme ausgeschlossen werden, die sonst zu stark verfälschten Ergebnissen geführt hätte. Durch diese Strategie war aber die Verwendung

eines internen Standards nicht mehr möglich, weshalb Konzentrationsschwankungen, die sich unweigerlich beim Pipettieren ergeben, als neue Fehlerquelle hingenommen werden mußten. Nach dem Stoppen wurde die Probe für 15 Minuten auf 0°C abgekühlt, um eine vollständige Fällung der denaturierten Proteinbestandteile zu gewährleisten. Diese konnten dann durch Zentrifugieren und anschließendem Filtrieren des Überstandes abtrennt werden. Diese Proben wurden nun unter gleichen Bedingungen, wie zuvor die Aliquote der PLE-Hydrolysen (HPLC-Methode II), RP-HPLC-analytisch vermessen.

Zur Auswertung konnten diesmal nur die Absolutflächen des Phosphatresters gegen die Hydrolysedauer in einem XY-Diagramm aufgetragen werden. Die Berechnung der Halbwertszeiten erfolgte analog zu dem in Kapitel 4.4.1. (S. 68) für die chemischen Hydrolysekinetiken beschriebenen Verfahren.

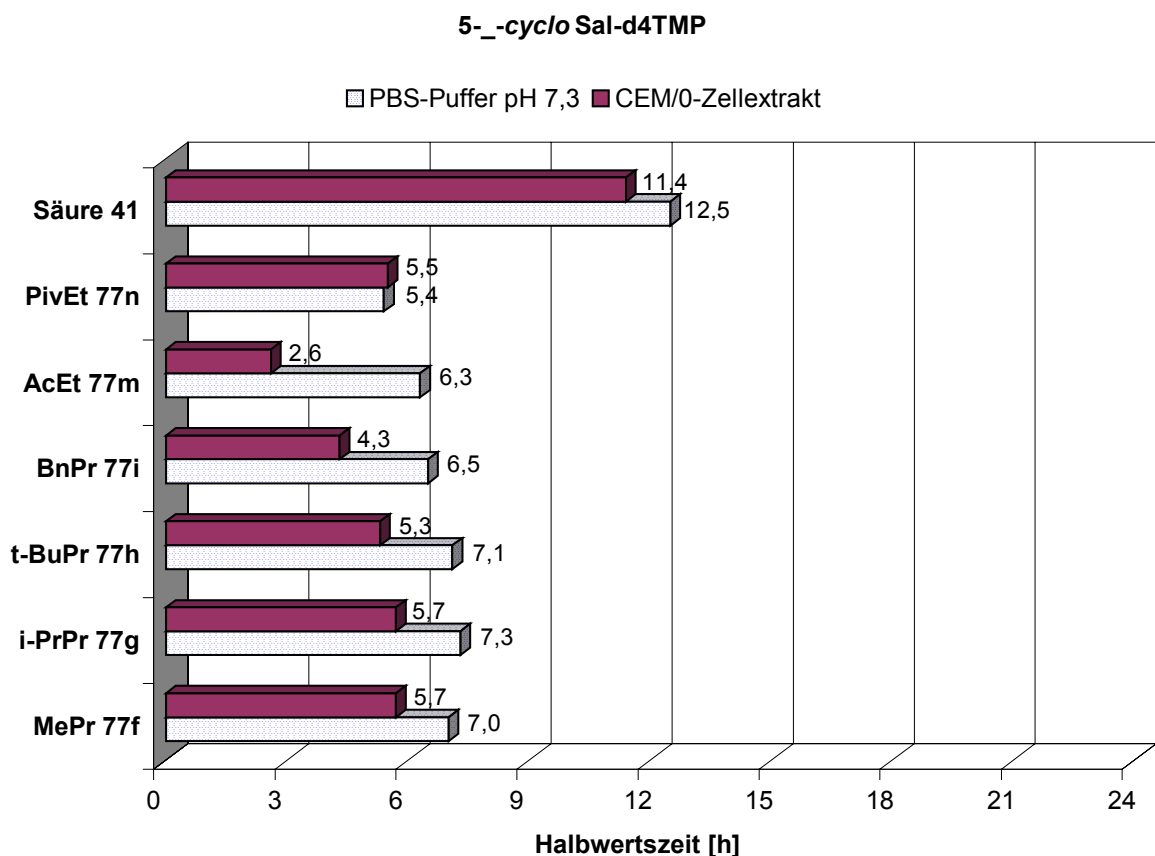


Abbildung 89 Halbwertszeiten der 5-substituierten *cyclo*Sal-d4TMPs **41**, **77f-i** und **77m,n** bei 37°C in PBS bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakt

Die Halbwertszeiten der untersuchten d4T-Verbindungen waren im Zellextrakt (ZE) generell niedriger als bei den chemischen Hydrolysekinetiken. Eine Ausnahme bil-

dete das 5-PivEt-cycloSal-d4TMP **77n**, welches im ZE eine vergleichbare Halbwertszeit aufwies (ZE: 5.5 h; PBS: 5.4 h). Es gilt anzumerken, daß bei allen Halbwertszeiten eine gewisse Fehlertoleranz zu berücksichtigen ist, die eine Diskussion von solchen kleinen Differenzen verbietet. Die in den chemischen Hydrolysen ermittelte Reihung der Stabilitäten findet sich auch in den ZE-Kinetiken wieder, wobei jedoch die Acetate **77j,m** und Pivalate **77l** deutlicher destabilisiert wurden. Das drückt sich selbstverständlich auch in den berechneten Substrat-Indices aus, die in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt sind.

Tabelle 7 Berechnete Substrat-Indices für die cycloSal-d4TMPs **77a-n**, **27** und **41** in CEM/0-ZE

SI	MePr	EtPr	i-PrPr	t-BuPr	BnPr	AcEt	PrEt	PivEt	Säure
3-	1.03	1.08	1.25	1.52	1.52	7.11	3.33	2.00	1.13
5-	1.22	n. s.*	1.28	1.34	1.54	2.45	n. s.*	1.00	1.11

*n. s.: nicht synthetisiert

Die Erfahrungen bei der Auswertung der PLE-Substrat-Indices haben gezeigt, daß SI-Werte unter 1.40 kein brauchbares Indiz für eine Enzymaktivität waren. Deshalb sollen nun nur noch Verbindungen untersucht werden, deren SI diesen Wert überschreitet.

Das erste Chromatogramm gibt die Zusammensetzung des CEM/0-Zellextraktes von 3-*t*-BuPr-cycloSal-d4TMP **77d** (SI: 1.52) nach drei Stunden Inkubationszeit bei 37°C wieder.

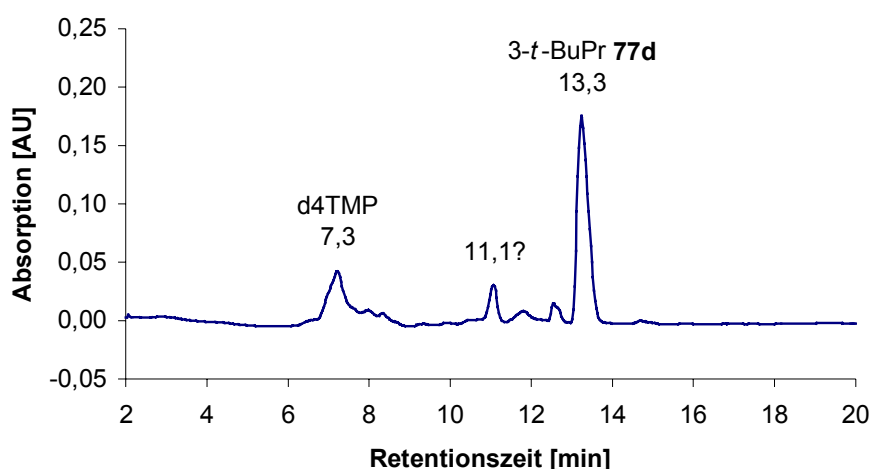


Abbildung 90 HPLC-Chromatogramm der CEM/0-ZE-Hydrolyse von 3-*t*-BuPr-cycloSal-d4TMP **77d**

Im Vergleich mit den PLE-Chromatogrammen fällt auf, daß die Basislinie durch Bestandteile aus dem ZE gestört wird. Wäre das 3-Säure-*cycloSal*-d4TMP **27** freigesetzt worden, müßte ein Absorptionssignal mit etwa 9.6 Minuten Retentionszeit zu finden sein. Statt dessen ist ein Peak bei 11.1 Minuten entstanden, dem aber keines der erwarteten Hydrolyseprodukte zugeordnet werden kann.

Interessanterweise konnte an dieser Stelle schon einmal ein Abbauprodukt (bei der PLE-Hydrolyse von 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j**; siehe Abbildung 75, S. 82) nachgewiesen werden. Vorausgesetzt die beiden Verursacher sind identisch, muß das unbekannte Produkt aus zwei unterschiedlichen Estern entstanden sein. Diese Beobachtung ließe sich erklären, wenn man davon ausgeht, daß es sich um ein Abbauprodukt des gemeinsam gebildeten d4TMPs handelt.

Nachdem auch in den Zellextrakten keine Hydrolyse der 3-Propionate **77a-e** nachzuweisen war, steht nun die Überprüfung der 5-Isomere **77f-i** an. Exemplarisch dafür wurde das folgende Chromatogramm (Inkubationsdauer: 1.2 h) des 5-BnPr-*cycloSal*-d4TMPs **77i** (SI: 1.54) ausgewählt. Im Hintergrund befindet sich ein Referenz-Chromatogramm, welches durch die Zugabe der 5-Säure **41** zum t_0 -Aliquoten von **77i** gewonnen wurde.

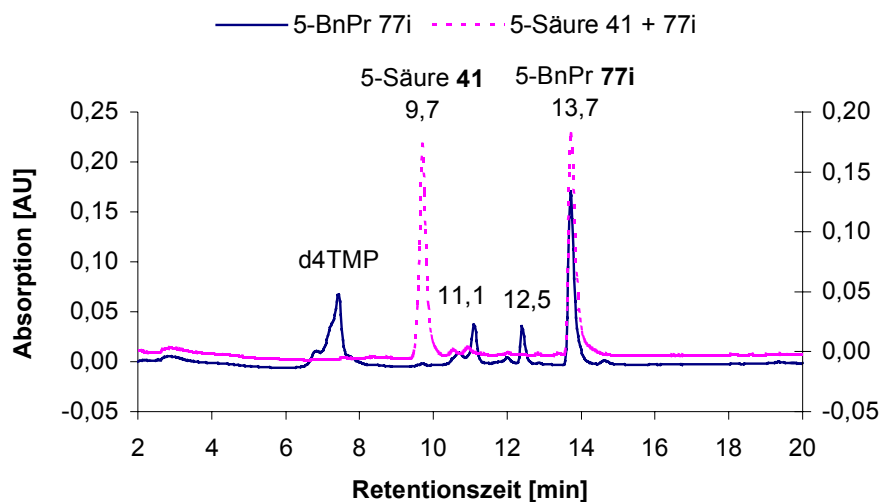


Abbildung 91 Vergleich der HPLC-Chromatogramme der CEM/0-Zellextrakte von 5-BnPr- **77i** und 5-Säure-*cycloSal*-d4TMP **41**

Der Vergleich beider Kurven läßt sofort erkennen, daß keine freie 5-Säure **41** freigesetzt wurde. Somit konnte wieder ein beschleunigter Abbau des Triesters registriert werden, der sich nicht auf die enzymatische Verseifung des Carbonsäureesters zurückführen läßt. Die beiden kleineren Absorptionssignalen, wovon das eine wieder-

um mit 11.1 Minuten und das andere mit 12.5 Minuten eluiert, könnten z. B. auch durch Abbauprodukte der *cycloSal*-Maske verursacht werden. Der Nachweis der intakten Saligenylalkohole **58a-n** (im Fall von **58i** wäre die Retentionszeit unter diesen Bedingungen 13.5 Minuten gewesen) konnte – wie erwartet – bei keiner der PLE- und ZE-Kinetiken beobachtet werden, da im Gegensatz zu den Pronukleotiden alle Carbonsäureester der Saligenylalkohole schnell hydrolysiert werden sollten⁵².

Die Substrat-Indices der „umgedrehten Ester“ **77j-l** lassen sich nur so deuten, daß es zu einer aktiven Wechselwirkung zwischen den Estern und den Carboxyesterasen im Zellextrakt gekommen sein mußte. Der fehlende Coinjektionsstandard 3-OHET-*cycloSal*-d4TMP **38** macht die Beweisführung aber problematisch. Die nachfolgende Abbildung vereint die beiden Chromatogramme von 3-AcEt-**77j** und 3-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77l**.

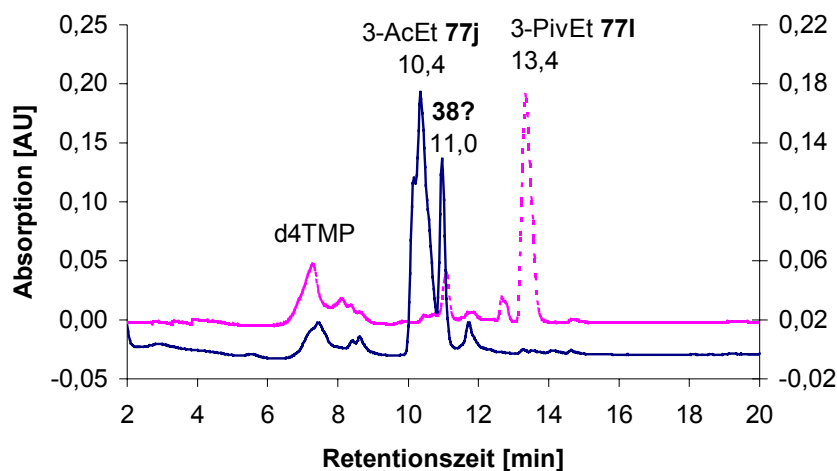


Abbildung 92 Vergleich der HPLC-Chromatogramme der CEM/0-Zellextrakte von 3-AcEt- **77j** und 3-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77l**

Bei der Inkubation von 3-AcEt **77j** ist eindeutig ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 11.0 Minuten entstanden. Dieses Signal findet sich auch bei der untersuchten Probe von 3-PivEt **77l** wieder, wenn auch mit einer wesentlich geringeren Intensität. Man sollte nicht vergessen, daß auch bei den zuletzt überprüften Hydrolysen immer ein Signal an dieser Stelle zu sehen war. Insofern wäre diese Beobachtung nicht weiter erwähnenswert gewesen. Erst die außergewöhnliche Intensität im Chromatogramm von 3-AcEt **77j**, verbunden mit dem SI von 7.11, sprechen für die Vermutung, daß es sich bei diesem Peak tatsächlich um das Hydrolyseprodukt 3-OHET **38** handelt.

Wie der SI (3.33) des 3-PrEt-*cycloSal*-d4TMPs **77k** nahelegt, könnte die Auswertung dieser Kinetik zur weiteren Unterstützung der Zuordnung beitragen. Leider eluierte aber in diesem Fall schon der Triester **77k** mit 11.2 Minuten und das potentiell entstehende 3-OHEt **38** wäre daneben nicht zu differenzieren gewesen, weshalb dessen Daten nicht mit herangezogen werden konnten.

Daß bei solchen Zuordnungen Vorsicht geboten ist, wird deutlich, wenn man die 11.0 Minuten Retentionszeit mit den 10.6 Minuten des mutmaßlichen analogen BVDUMP-Alkohols **40** (Abbildung 84, S. 90) vergleicht, die bei der PLE-Hydrolyse gemessen wurden. In der Regel unterschieden sich die d4T-Verbindungen von ihren BVDU-Analoga, indem sie etwa zwei Minuten früher eluieren. Somit stellt sich die Frage, warum dieser Unterschied nicht auch bei den beiden Alkoholen **38** und **40** festzustellen ist.

Die beiden 5-Isomere der „umgedrehten“ Ester verhalten sich, nach den Substrat-Indices zu urteilen, völlig gegensätzlich. Wie schon erwähnt, ist das 5-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77n** die einzige Verbindung, deren Halbwertszeit sich im ZE kaum veränderte. Der SI des 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMPs **77m** dagegen weist mit 2.45 auf eine enorme Beschleunigung hin, die einen Nachweis des 5-OHEt-*cycloSal*-d4TMPs **42** erwarten läßt.

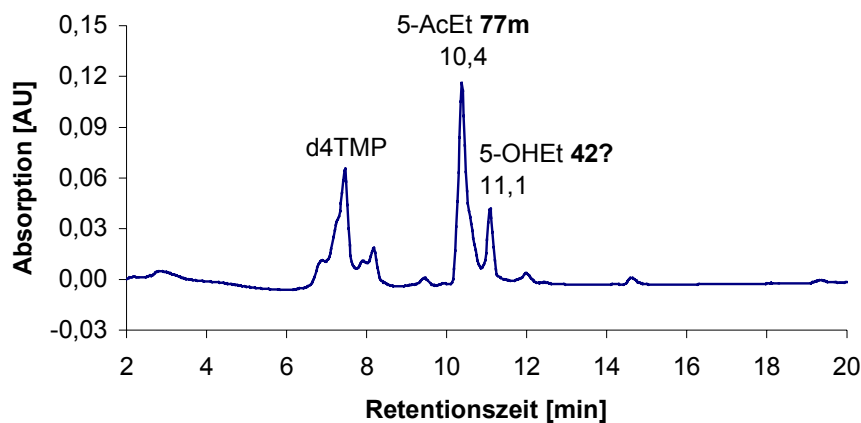


Abbildung 93 HPLC-Chromatogramm der CEM/0-ZE-Hydrolyse von 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m**

Tatsächlich kann wieder ein Hinweis für eine erfolgreiche Hydrolyse des Acetats in Form des Peaks bei 11.1 Minuten gefunden werden. Ein endgültiger Beweis für diese Behauptung ist aber auch hier, wegen des fehlenden Coinjektionsstandards **42**, nicht möglich.

Was läßt sich nun nach Auswertung der ZE-Hydrolysen aller d4T-Verbindungen zu deren Fähigkeit sagen, durch eine intrazelluläre, enzymkatalysierte Hydrolyse der Carbonsäureester einen „lock-in“-Effekt auszulösen? Zunächst einmal wurden die Ergebnisse der PLE-Hydrolysen bestätigt, in dem alle Propionate **77a-i** nachweislich nicht hydrolysiert wurden. Bei den „umgedrehten“ Ester **77j-n** hingegen spricht vieles dafür, daß die gewünschten Hydrolysen im Zellextrakt tatsächlich zu beobachten sind (Ausnahme: 5-PivEt **77n**).

Bevor eine abschließende Diskussion geführt werden soll, müssen noch die Hydrolyseuntersuchungen der BVDU-Verbindungen ausgewertet werden, deren Ergebnisse in den nächsten beiden Balkendiagrammen zusammengefaßt sind.

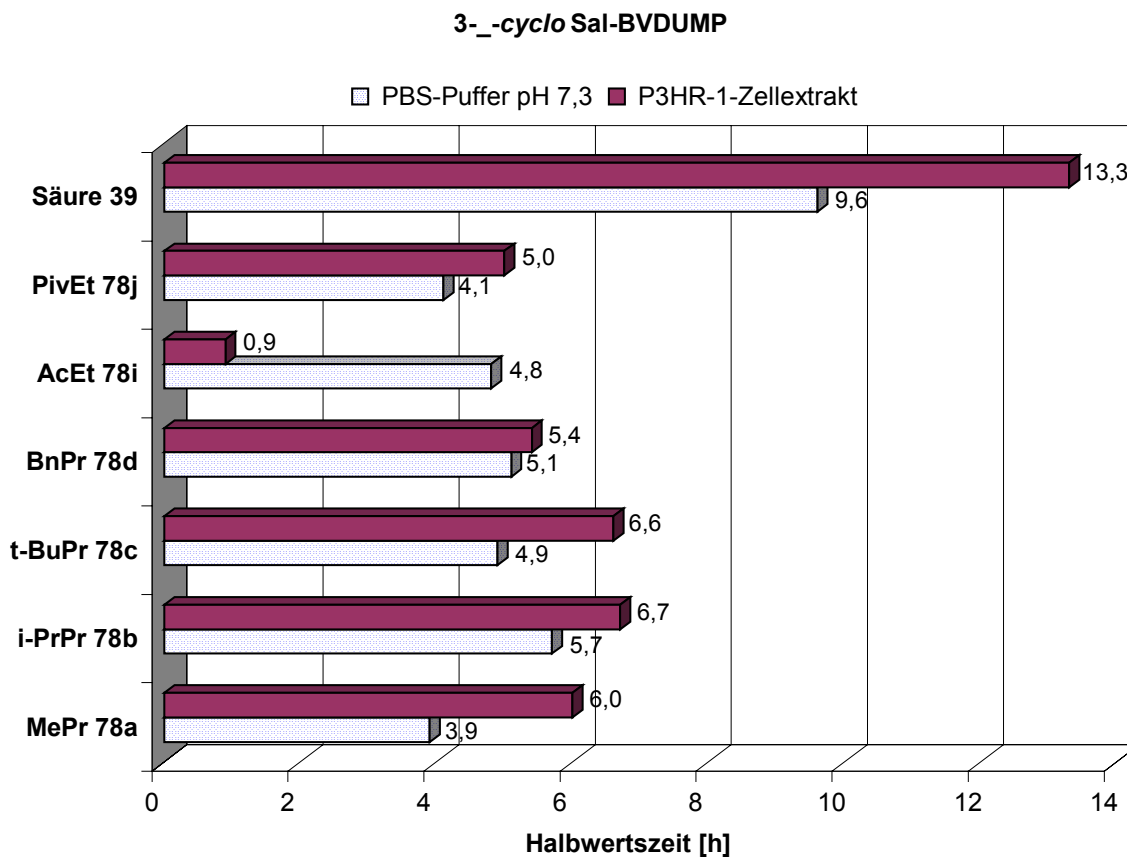


Abbildung 94 Halbwertszeiten der 3-substituierten cycloSal-BVDUMPs **39**, **78a-d** und **77i,j** bei 37°C in PBS bei pH 7.3 und in P3HR-1-Zellextrakt

Der Wechsel des Zelltyps zur Gewinnung des Zellextraktes war notwendig gewesen, da sich die BVDU- von den d4T-Verbindungen auch durch ihren späteren Angriffspunkt unterscheiden. P3HR-1-Zellen werden z. B. für *in vitro*-Zelltests gegen das

Epstein-Barr-Virus verwendet, weshalb deren ZE auch für diese Untersuchung gut geeignet sein sollte.

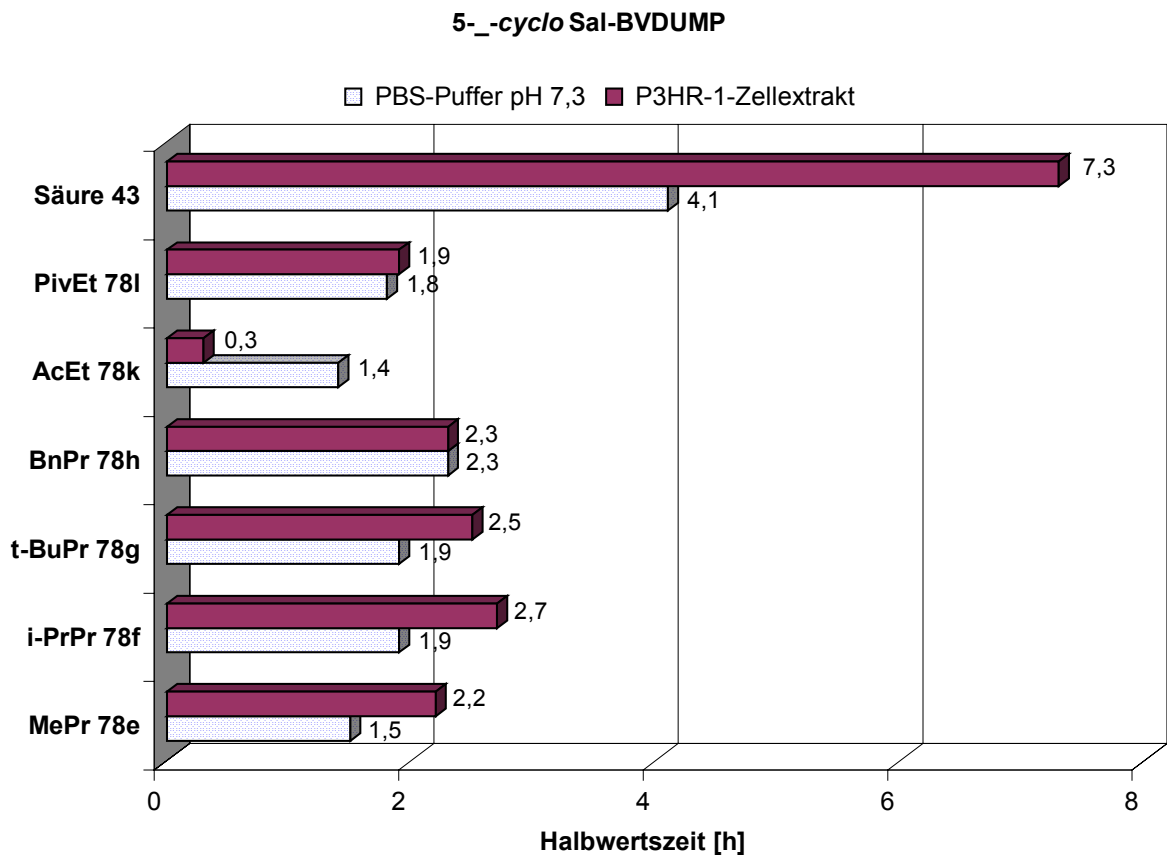


Abbildung 95 Halbwertszeiten der 5-substituierten cycloSal-BVDUMPs **43**, **78e-h** und **77k,l** bei 37°C in PBS bei pH 7.3 und in P3HR-1-Zellextrakt

Zum erstenmal kann hier eine insgesamt stabilisierende Tendenz festgestellt werden. Die einzigen beiden kürzeren Halbwertszeiten von 3- und 5-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78i,k** sollten sich deshalb um so mehr durch zwei enorm hohe Substrat-Indices bemerkbar machen. Die Werte, die in der nächsten Tabelle zu finden sind, lassen erahnen, daß eigentlich nur fünf Ester als Kandidaten für eine enzymatische Hydrolyse in Frage kommen.

Tabelle 8 Berechnete Substrat-Indices bei der P3HR-1-ZE-Hydrolyse für die cycloSal-BVDUMPs **78a-l**, **39** und **43**

SI	MePr	i-PrPr	t-BuPr	BnPr	AcEt	PivEt	Säure
3-	1.18	1.55	1.36	1.71	9.55	1.49	1.31
5-	1.29	1.27	1.36	1.80	7.71	1.75	1.00

Vergleicht man die SI-Werte mit denen der PLE-Studie (Tabelle 6, S. 85), ist außerdem eine gute Übereinstimmung bei den überdurchschnittlich hohen Substrat-Indices festzustellen. Darunter ist auch wieder 3-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78d** (SI: 1.71), das sich als einziges PLE-Substrat unter allen untersuchten Propionaten herausgestellt hat.

Auf den ersten Blick ist das nächste Chromatogramm, welches den Stand der Hydrolyse nach 6.8 Stunden wiedergibt, durch die Vielzahl der vorhandenen Absorptionssignale etwas unübersichtlich. Der wichtigste Peak ist sicherlich bei 11.1 Minuten zu sehen, mit dem erneut der Beweis für eine erfolgreiche Carbonsäureester-Spaltung erbracht werden kann, da er eindeutig durch die freie 3-Säure **39** verursacht wurde.

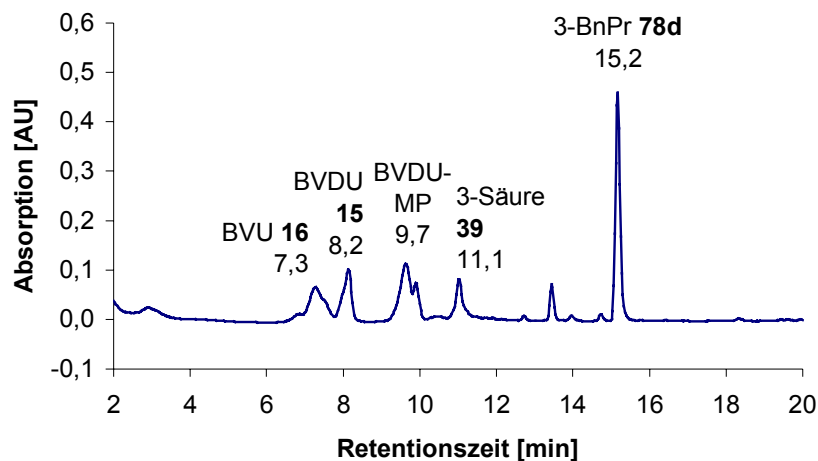


Abbildung 96 HPLC-Chromatogramm der P3HR-1-ZE-Hydrolyse von 3-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78d** nach 6.8 h

Etwa 1.5 Minuten früher eluierte das BVDUMP und noch etwas früher zwei Verbindungen, die bisher nicht beobachtet werden konnten. Es ist bekannt⁵⁰, daß im P3HR-1-ZE neben der Carboxyesterase auch Phosphatasen und Nukleotidasen enthalten sind, die das gebildete BVDUMP relativ schnell zu BVDU **15** dephosphorylieren können. Dieses wiederum kann durch Spaltung der glycosidischen Bindung bis zum Endprodukt BVU **16** abgebaut werden. Alle genannten Hydrolyseprodukte konnten hier durch ihre Retentionszeiten und die anschließenden Coinjektionsversuche einwandfrei identifiziert werden.

Sollte die Substratspezifität der ZE-Carboxyesterase identisch mit der der PLE sein, darf trotz des noch größeren SI (1.80) bei der Inkubation von 5-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78h** kein Signal des 5-Säure-cycloSal-BVDUMP **43** zu finden sein. Das

nachfolgende Chromatogramm, welches den Stand der Kinetik nach 1.6 Stunden wiedergibt, entspricht aber in mehrfacher Hinsicht nicht den Erwartungen. Zum einen sind im Bereich der Retentionszeit (10.6-10.8 min) der 5-Säure **43** gleich zwei sich überlappende Peaks zu entdecken. Eine exakte Zuordnung, welches der beiden Signale durch die 5-Säure **43** verursacht wurde, wäre in diesem Fall alleine durch die Retentionszeit nicht möglich gewesen. Die Verwendung eines DAD-Detektors ermöglicht es aber, die simultan aufgezeichneten UV-Spektren aller eluierten Verbindungen zur Auswertung dieses Problems heranzuziehen. Der Vergleich der UV-Spektren lieferte ein eindeutiges Ergebnis. Die zuerst eluierte Verbindung (10.7 min) weist eine Übereinstimmung mit dem Spektrum der 5-Säure **43** auf, wohingegen das Spektrum bei 10.8 Minuten keiner bekannten Verbindung zu zuordnen war. Mit Hilfe dieser UV-Spektren konnte bei der vorherigen Hydrolyse zusätzlich geprüft werden, ob der Peak bei 11.1 Minuten tatsächlich durch die 3-Säure **39** und nicht etwa durch ein anderes, unerwartetes Abbauprodukt verursacht wurde.

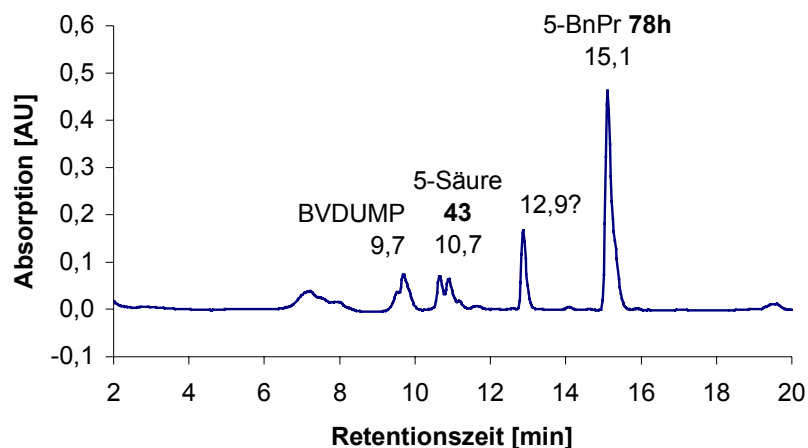


Abbildung 97 HPLC-Chromatogramm der P3HR-1-ZE-Hydrolyse von 5-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78h**

Zum anderen ist ein neuer, unerwarteter Metabolit mit einer Retentionszeit von 12.9 Minuten entstanden. Nachdem in dieser Region nicht zum erstenmal ein Absorptionssignal aufgezeichnet wurde, sollte nun – ebenfalls mit Hilfe der UV-Spektren – die Vermutung überprüft werden, ob es sich bei diesem Signal vielleicht um ein Abbauprodukt der *cycloSal*-Maske **58i** oder des Nukleotides handelt. Alle nukleosidhaltigen Peaks können durch ihr charakteristisches UV-Spektrum (2 Maxima bei 250 nm und 293 nm, 2 Minima bei 227 nm und 270 nm) identifiziert

werden⁵⁰. Vergleicht man das DAD-UV-Spektrum (nächste Abbildung) unter Berücksichtigung dieser Werte, wird deutlich, daß der Peak eindeutig nur durch eine BVDU-haltige Verbindung verursacht worden sein kann. Die Retentionszeit von 12.9 min läßt sich aber mit keinem der vorstellbaren Abbauprodukte von 5-BnPr-cycloSal-BVDUMP **78h** (BVDUMP, BVDU **15**, BVU **16**) vereinbaren, die ja schon im vorletzten Chromatogramm (Abbildung 96) nachgewiesen und identifiziert wurden. So handelt es sich hierbei also um einen unerwarteten Metaboliten, dessen Identität mit der zur Verfügung stehenden Analytik nicht aufgeklärt werden konnte.

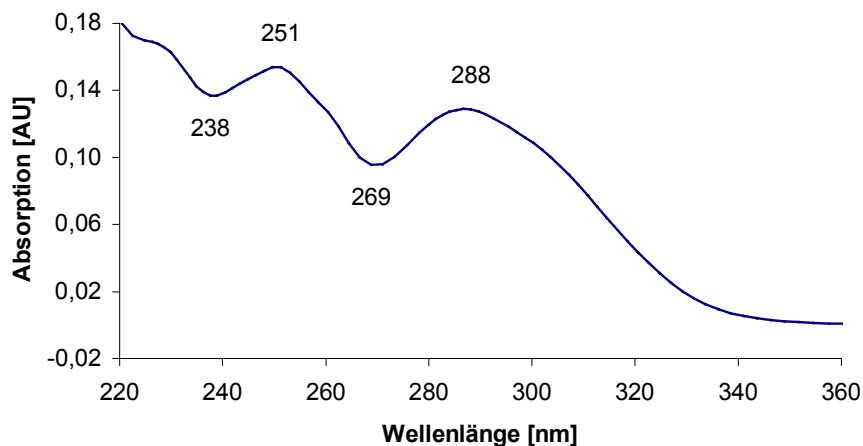


Abbildung 98 DAD-UV-Spektrum des Signals bei 12.9 min

Nun folgt die Auswertung der Hydrolyse von 3-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78i**, die aufgrund ihres enormen SI-Wertes von 9.55 äußerst vielversprechend ist. Die nächste Abbildung gibt die Zusammensetzung des Aliquoten nach etwa 50 Minuten wieder. Deutlich ist zu erkennen, wie die Enzymkatalyse die Reaktion so schnell vorangeht, daß nur geringe Mengen an BVDUMP, BVDU **15** und BVU **16** gebildet wurden. Das Hauptprodukt ist ein Signal mit einer Retentionszeit von 10.5 Minuten. Es spricht alles dafür, daß das Acetat sehr schnell enzymatisch verseift wurde und hier das 3-OHEt-cycloSal-BVDUMP **40** als Zwischenprodukt zu sehen ist. Ein erster Beweis für diese Vermutung wäre die Beobachtung des gleichen Produktes bei der Hydrolyse des 3-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78j**. Doch, wie der SI von 1.49 befürchten ließ, zeigten die entsprechenden Chromatogramme keinerlei Spuren der erhofften Esterspaltung. Nach dieser Enttäuschung sollte aber nicht vergessen werden, daß bei den vorangegangenen PLE-Hydrolysen die gleichen Ester schon einmal untersucht wurden, wobei gerade das Pivalat **78j** als besonders reaktiv auffiel. Würde man in

einem dieser Chromatogramme das gleiche Signal bei etwa 10.5 Minuten finden, wäre das ein noch besserer Beweis, als der gerade vorgeschlagene Vergleich.

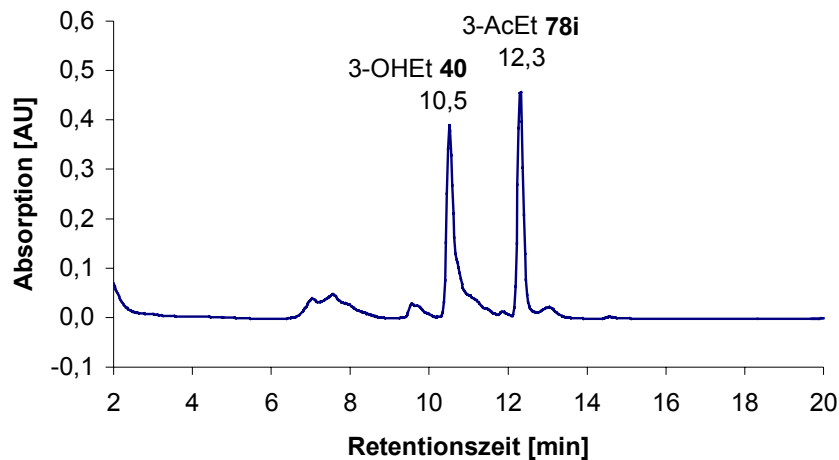


Abbildung 99 HPLC-Chromatogramm der P3HR-1-ZE-Hydrolyse von 3-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78i**

In Abbildung 84 (S. 90) sind die Chromatogramme der beiden Ester **78i,j** miteinander verglichen worden und das Aliquot des Pivalates **78j** zeigte tatsächlich einen Peak bei 10.6 Minuten. Diese Beobachtung läßt nur noch wenig Zweifel an der Richtigkeit der postulierten Esterhydrolyse aufkommen, da es äußerst unwahrscheinlich ist, daß zwei unterschiedliche Assays, die mit zwei verschiedenen Verbindungen durchgeführt wurden, zu ein und dem selben Produkt führen, ohne das dabei die für den Unterschied der beiden Pronukleotide verantwortlichen Ester verändert würden.

Abschließend steht noch die Überprüfung der analogen 5-Isomere aus, die beide das 5-OHEt-cycloSal-BVDUMP **44** als Hydrolyseprodukt liefern sollten und deshalb in der nächsten Abbildung vereint sind.

Das 5-AcEt-cycloSal-BVDUMP **78k** ist schon nach 23 Minuten mehr als zur Hälfte verbraucht und größtenteils in das 5-OHEt-cycloSal-BVDUMP **44** überführt. Im Gegensatz dazu kann bei der Inkubation von 5-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78l** selbst nach 1.3 Stunden keine signifikante Menge des Alkohols **44** nachgewiesen werden.

An dieser Stelle sollte noch einmal darauf hingewiesen werden, daß alle Hydrolysen einer unimolekularen Kinetik folgen. Deshalb sollte der Nachweis der Hydrolyseprodukte am ehesten innerhalb eines Zeitraums, der dem der jeweiligen Halbwertszeit (5-PivEt **78l**: $t_{1/2} = 1.9$ h) entspricht, möglich sein. Bis dahin ist schon die Hälfte des Eduktes umgesetzt und damit auch die Hälfte der Konzentration an Hydrolysepro-

dukten erreicht. Da hier zudem Zwischenprodukte identifiziert werden sollen, die selbst ständig weiter hydrolysiert werden, verringert sich deren Konzentration zu einem späteren Zeitpunkt immer mehr, da auch immer weniger nachgebildet werden kann.

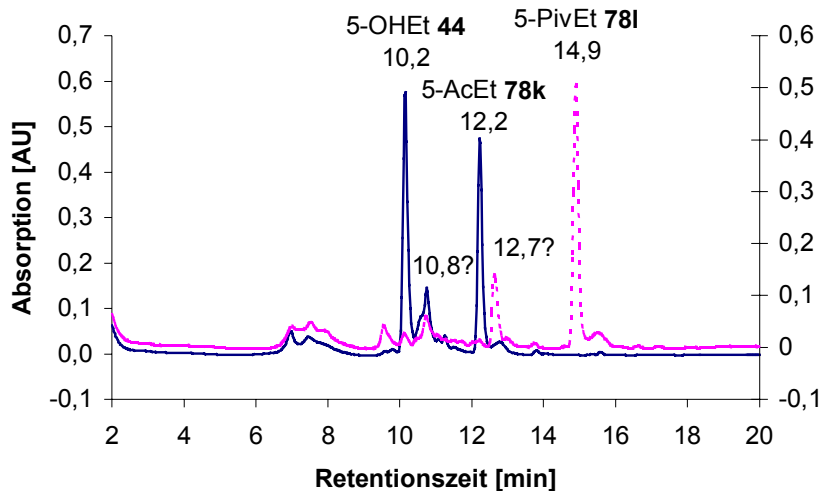


Abbildung 100 Vergleich der HPLC-Chromatogramme der P3HR-1-Zellextrakte von 5-AcEt- **78k** und 5-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78I**

Betrachtet man beide Kurven genauer, ist bei beiden Hydrolysen ein weiteres Produkt bei 10,8 Minuten entstanden. Dessen Identität konnte zwar mit Hilfe der UV-Spektren nicht bestimmt werden, aber es ist eindeutig keine BVDU-haltige Verbindung. Es könnte demnach ein Abbauprodukt der cycloSal-Maske (z. B. **58q**, siehe Abbildung 102, S. 111) oder des Glycons sein. Bei dem zweiten Peak (12,7 min), der nur bei der Hydrolyse des Pivalates **78I** zu finden ist, ließen sich hingegen wieder eindeutig die charakteristischen BVDU-Absorptionsmerkmale nachweisen.

Vor der Diskussion der ZE-Ergebnisse muß noch berücksichtigt werden, daß die verwendeten Extrakte nicht mit dem gleichen pH-Wert von 7,3 erhältlich waren, sondern nur als leicht saure Lösung mit pH 6,8. Selbstverständlich hat aber der pH-Wert einen Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Um dessen Auswirkung relativieren zu können, wurden mit jeweils zwei Verbindungen aus den beiden Nukleotidklassen nochmals rein chemische Hydrolysen bei pH 6,8 durchgeführt. Die Ergebnisse sind im nächsten Balkendiagramm im Vergleich mit den Werten der Hydrolyse bei pH 7,3 dargestellt.

Theoretisch sollten sich die Kinetiken im Säuren verlangsamen^{45,46}, was durch die Untersuchung auch bestätigt wird. Insgesamt sind die Änderungen der Halbwerts-

zeiten aber gering. Trotzdem bieten sie die Möglichkeit, vor allem bei den P3HR-1-Hydrolysen, die beobachtete Stabilisierung vieler *cycloSal*-BVDUMPs im Extrakt, als reine pH-bedingte Änderung zu erkennen. So stimmt die gemessene Halbwertszeit (5.0 h) von 3-PivEt-*cycloSal*-BVDUMP **78j** exakt mit dem ermittelten Wert der ZE-Hydrolyse überein. Dies wiederum belegt, daß der berechnete SI von 1.49 (Tabelle 8, S. 103) tatsächlich kein Hinweis für eine Enzymaktivität gewesen sein mußte.

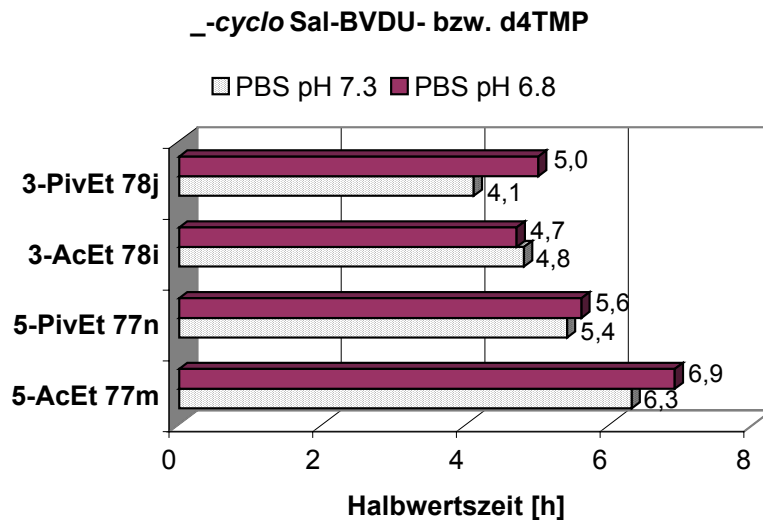


Abbildung 101 Einfluß des pH-Wertes auf die Hydrolysehalbwertszeit

Daß sich generell fast alle Halbwertszeit der *cycloSal*-d4TMPs im CEM/0-ZE auch ohne nachweisbare Enzymhydrolyse im leicht Sauren beschleunigten, erscheint dadurch aber um so erstaunlicher. Dafür kann man eigentlich nur Enzyme verantwortlich machen, die zusätzlich neben der Carboxyesterase im ZE enthaltenen sind. Diese müssen die Umwandlung der Phosphattriester katalysiert haben, da eine rein chemische Ursache ausgeschlossen werden kann.

Nach Auswertung der ZE-Hydrolysen steht fest, daß die Zweifel an der Aussagekraft des PLE-Assays für die Bewertung der „lock-in“-Fähigkeit der entworfenen *cycloSal*-NMPs berechtigt waren. Dies wird deutlich, wenn man die nachfolgende Tabelle betrachtet, in der alle nachgewiesenen und vermuteten Carbonsäureester-Hydrolysen nebeneinander aufgelistet sind.

So war es erst durch die Beobachtung der Hydrolyse von 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j** ($t_{1/2ZE}$: 1.9 h) und 3-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77i** ($t_{1/2ZE}$: 6.6 h) im ZE möglich, eine Begründung für den mangelhaften oder fehlenden Nachweis des Hydroly-

seproduktes **38** in den Chromatogrammen des PLE-Assays der beiden Ester zu geben.

Tabelle 9 Zusammenfassung aller beobachteten und vermuteten, enzymatischen Carbonsäureester-Hydrolysen

<i>_cycloSal-d4TMP 77_</i>		<i>_cycloSal-BVDUMP 78_</i>	
PL-Esterase	CEM/0-ZE	PL-Esterase	P3HR-1-ZE
3-AcEt j	3-AcEt j	3-BnPr d	3-BnPr d
3-PivEt I*	3-PivEt I	5-AcEt k	5-AcEt k
	3-PrEt k	3-PivEt j	5-BnPr h
	5-AcEt m	5-PivEt I	3-AcEt i

**nicht nachgewiesen*

Der Unterschied zwischen den Carboxyesterasen drückt sich nämlich nicht nur durch deren Selektivität aus, sondern auch in der Geschwindigkeit, mit der sie die Hydrolysen katalysieren. Durch die langsamere PLE-Hydrolyse der beiden Ester ($t_{1/2}$ PLE: 8.3 h **77j**; $t_{1/2}$ PLE: 8.2 h: **77I**) wurde der Alkohol **38** ebenfalls nur mit dieser geringen Geschwindigkeit – oder sogar noch langsamer, da in dem Wert auch die Phosphattriester-Hydrolyse beinhaltet ist – freigesetzt. Der Alkohol **38** scheint aber bei weitem nicht so stabil zu sein, wie die beiden Säuren **27** und **41**. Der Vergleich mit dem einzigen, isolierten 5-OHEt-*cycloSal*-BVDUMP **44** ($t_{1/2}$ PLE: 2.6 h) läßt für den Alkohol **38** eine relativ geringe Halbwertszeit zwischen 4-6 Stunden als realistisch erscheinen. Durch das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Bildungs- und Abbaugeschwindigkeiten hydrolysierte der Alkohol **38** wahrscheinlich schneller zum d4TMP weiter, als er gebildet werden konnte. Deshalb war der Nachweis des Zwischenproduktes **38** bei der Auswertung der Hydrolyse-Chromatogramme kaum oder gar nicht erst möglich, wodurch die Beweisführung mit dieser Methode hinfällig ist. Die verschiedenen Hydrolysewege und die daraus resultierenden Produkte sind in der nächsten Abbildung exemplarisch für das 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j** nochmals zusammengefaßt.

Wie der Vergleich der jeweiligen Substrate beweist, war die humane Carboxyesterase nicht nur reaktiver, sondern auch weniger selektiv als die PLE. Neben den übereinstimmend akzeptierten Estern **77j,I** wurde durch den ZE zusätzlich ein weiteres 3-Isomer **77k** und sogar das 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m** hydrolysiert. Diese Beob-

achtung spricht dafür, daß das aktive Zentrum der humanen Carboxyesterase flexibler oder sogar größer sein muß, als das der PLE (Abbildung 87; S. 94).

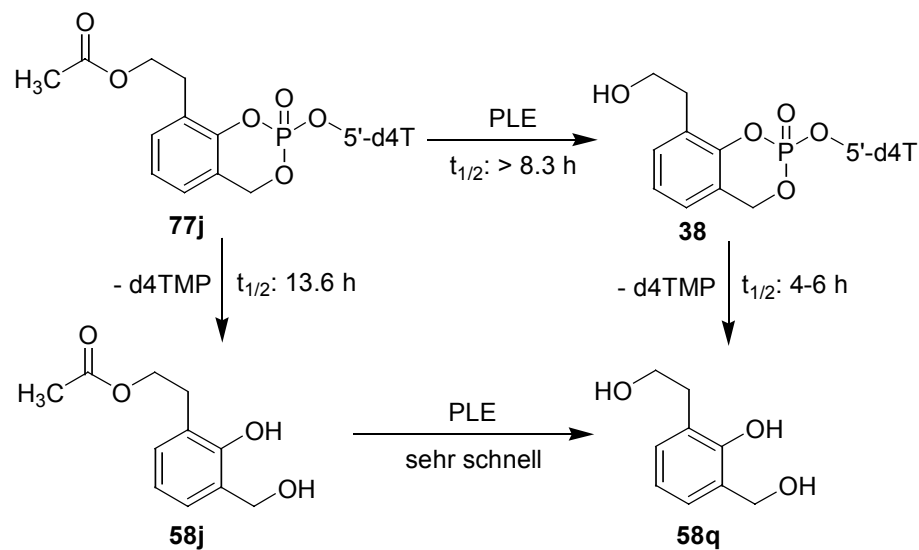


Abbildung 102 Hydrolysewege mit Angabe der entsprechenden Halbwertszeiten von 3-AcEt-cycloSal-d4TMP 77j während der PLE-Hydrolyse

Die Selektivität der PLE war gegenüber den BVDU-Verbindungen wesentlich weniger einschränkend, und so ist es auch nicht verwunderlich, daß eines der Propionate (3-BnPr-cycloSal-BVDUMP 78d) hydrolysiert wurde. Der Vergleich mit der Selektivität der ZE-Carboxyesterase liefert aber eine widersprüchliche Aussage. In Übereinstimmung mit der Vermutung, daß das aktive Zentrum größer ist, wurde im P3HR-1-ZE auch das 5-BnPr-cycloSal-BVDUMP 78h hydrolysiert. Andererseits waren aber nur die beiden Acetat-Isomere 78i,k Substrate, wohingegen die Pivalate 78j,l unberührt blieben. Diese wiederum waren, neben dem ebenfalls akzeptierten 5-BnPr-cycloSal-BVDUMP 78h, beide gute Substrate der PLE. Das zeigt, daß die Selektivität eines Enzyms das Ergebnis eines komplizierten Zusammenspiels verschiedener Faktoren ist, das sich nicht einfach auf die Größe einer lipophilen Tasche beschränken läßt.

Als Fazit der beiden Studien läßt sich resümieren, daß der PLE-Assay alleine nur eine unzureichende Aussagekraft hat, wenn es darum geht, das Verhalten der synthetisierten cycloSal-NMPs in humanen Medien vorherzusagen. Die – wenn auch nur geringen – Unterschiede der Carboxyesterasen verursachten eine abweichende Selektivität und, was vielleicht noch wichtiger ist, eine unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit. So lassen sich die Halbwertszeiten aus dem PLE-Assay nicht einfach zu *in vitro*- oder gar *in vivo*-Halbwertszeiten extrapolieren^{101,102}, wie z. B. durch die

beiden Halbwertszeiten von 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j** ($t_{1/2}$ PLE: 8.3 h; $t_{1/2}$ ZE: 1.9 h) deutlich wurde. Der Nutzwert der PLE-Hydrolyse ist somit gering, und könnte die Entwicklung und Bewertung neuer Pronukleotide sogar erschweren. Als Werkzeug in der Synthese konnte mit ihrem Einsatz aber immerhin das erste *cycloSal*-BVDUMP **44** mit einer freien Alkoholgruppe an der *cycloSal*-Maske isoliert werden.

4.4.4. ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien

Aus früheren Arbeiten von C. Meier *et al.* ist bekannt⁴⁴, daß der Prototyp *cycloSal*-d4TMP **17** bei der Hydrolyse ausschließlich den Benzyl-Phosphatdiester und infolgedessen auch d4TMP bildet. Wird eine zusätzliche Methylgruppe in 3-Position des Saligenylaromaten (3-Me-*cycloSal*-d4TMP **26**) angebracht, führt dies zu einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeit und zu einer nachweisbaren Bildung des unbrauchbaren Phenyl-Phosphatdiesters. Wie wirkt sich nun die „lock-in“-Funktionalisierung auf das Hydrolyseverhalten der hergestellten *cycloSal*-NMPs aus? Eine geeignete Untersuchungsmethode, bei der die unterschiedlichen Hydrolyseprodukte nebeneinander nachgewiesen und quantifiziert werden können, ist eine ^{31}P -NMR-Hydrolysestudie.

Zur Durchführung wurden ungefähr 7 μmol des jeweiligen *cycloSal*-NMPs in einem Gemisch aus deuteriertem DMSO und einem 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7.3) gelöst. Die Hydrolysen fanden bei Raumtemperatur im NMR-Röhrchen statt und wurden durch Messung ^1H -entkoppelter ^{31}P -NMR-Aufnahmen verfolgt. Unter den genannten Bedingungen lagen die Hydrolysehalbwertszeiten im Bereich mehrerer Tage, so daß eine spektroskopische Verfolgung der Reaktion problemlos möglich war.

Exemplarisch für alle hergestellten Verbindungen wurden die beiden regioisomeren 3- bzw. 5-MePr-*cycloSal*-BVDUMP **78a,e** und das d4T-Analogon 3-MePr-*cycloSal*-d4TMP **77a** ausgewählt, dessen Hydrolyseverlauf (Abbildung auf der nächsten Seite) zuerst diskutiert werden soll. Die Zuordnung der Signale zu den Hydrolyseprodukten erfolgte auf Basis der chemischen Verschiebung, sowie mit Hilfe von ^1H -gekoppelter ^{31}P -NMR-Spektroskopie.

Zunächst einmal sind die beiden Diastereomere im ^{31}P -Spektrum gut getrennt (**77a** 1. D: -5.5 ppm, **77a** 2. D: -6.6 ppm) zu erkennen. Dadurch war es möglich, das genaue Verhältnis der Diastereomere zu bestimmen, indem man die Diastereomeren-

gemische in deuteriertem DMSO aufnahm und die erhaltenen Signale integrierte. Die Verhältnisse aller hergestellten Triester sind im experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden.

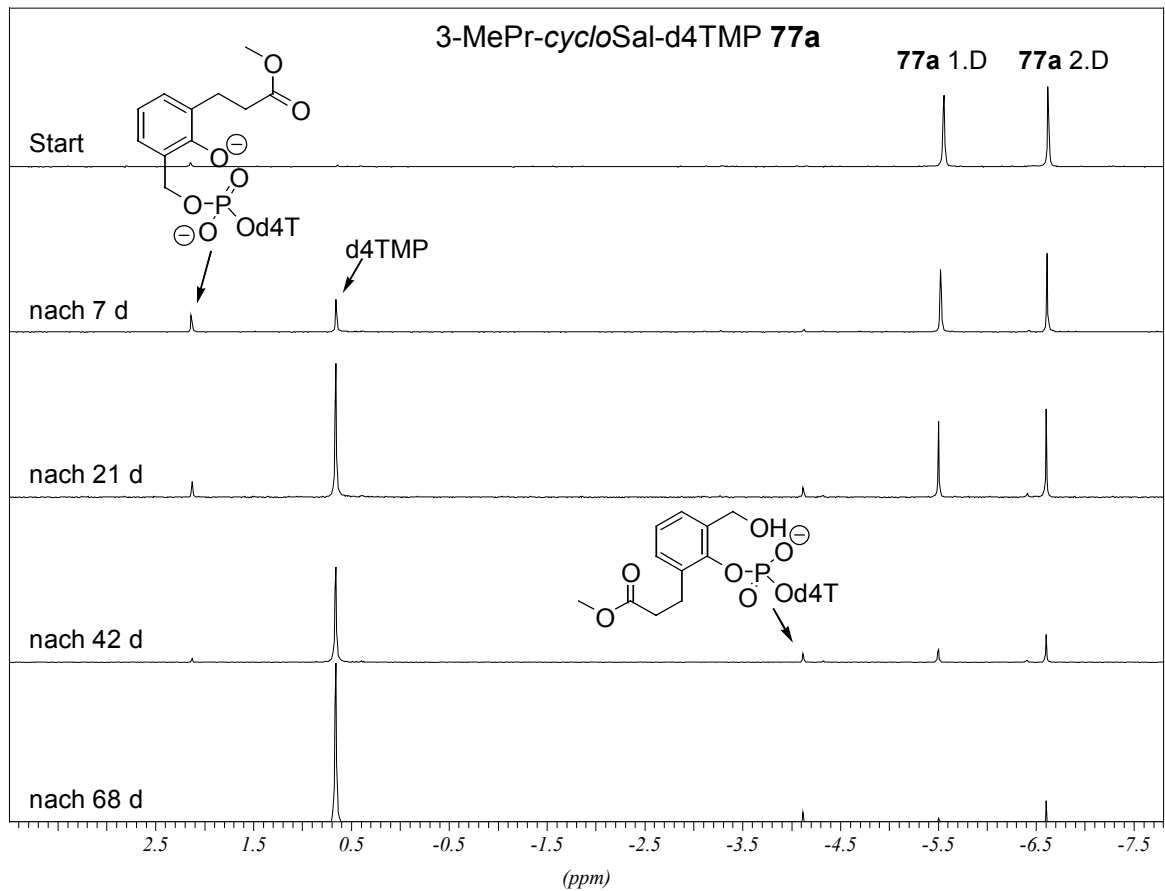


Abbildung 103 Gestapelte Darstellung der ^{31}P -NMR-Spektren der Imidazol-HCl-Puffer-Hydrolyse von 3-MePr-cycloSal-d4TMP 77a

Das erste erkennbare Hydrolyseprodukt entstand gleich nach dem Start bei 2.1 ppm und kann aufgrund der chemischen Verschiebung nur der erwartete Benzyl-Phosphatdiester sein. Außerdem reagierte dieses Produkt auch zügig weiter und nach 68 Tagen ist d4TMP (0.7 ppm) deutlich als Endprodukt zu erkennen. Dennoch kann spätestens nach 21 Tagen ein weiteres, wenn auch schwaches, Signal ausgemacht werden, dessen chemische Verschiebung (-4.1 ppm) charakteristisch für den Phenyl-Phosphatdiester ist. Die entstandene Menge (< 2 %) ist aber so gering, daß dessen Bildung vernachlässigt werden darf. Weiterhin läßt sich ein geringer Unterschied in der Hydrolysegeschwindigkeit der beiden Diastereomere feststellen. Erste Hinweise für solch ein unterschiedliches Hydrolyseverhalten wurden schon bei der

Auswertung der chemischen Hydrolysekinetiken gefunden, wobei hier das 2. Diastereomer langsamer hydrolysierte.

Als nächster Triester folgt nun das BVDU-Analogon, dessen Hydrolyseverlauf in der folgenden Abbildung zusammengestellt ist.

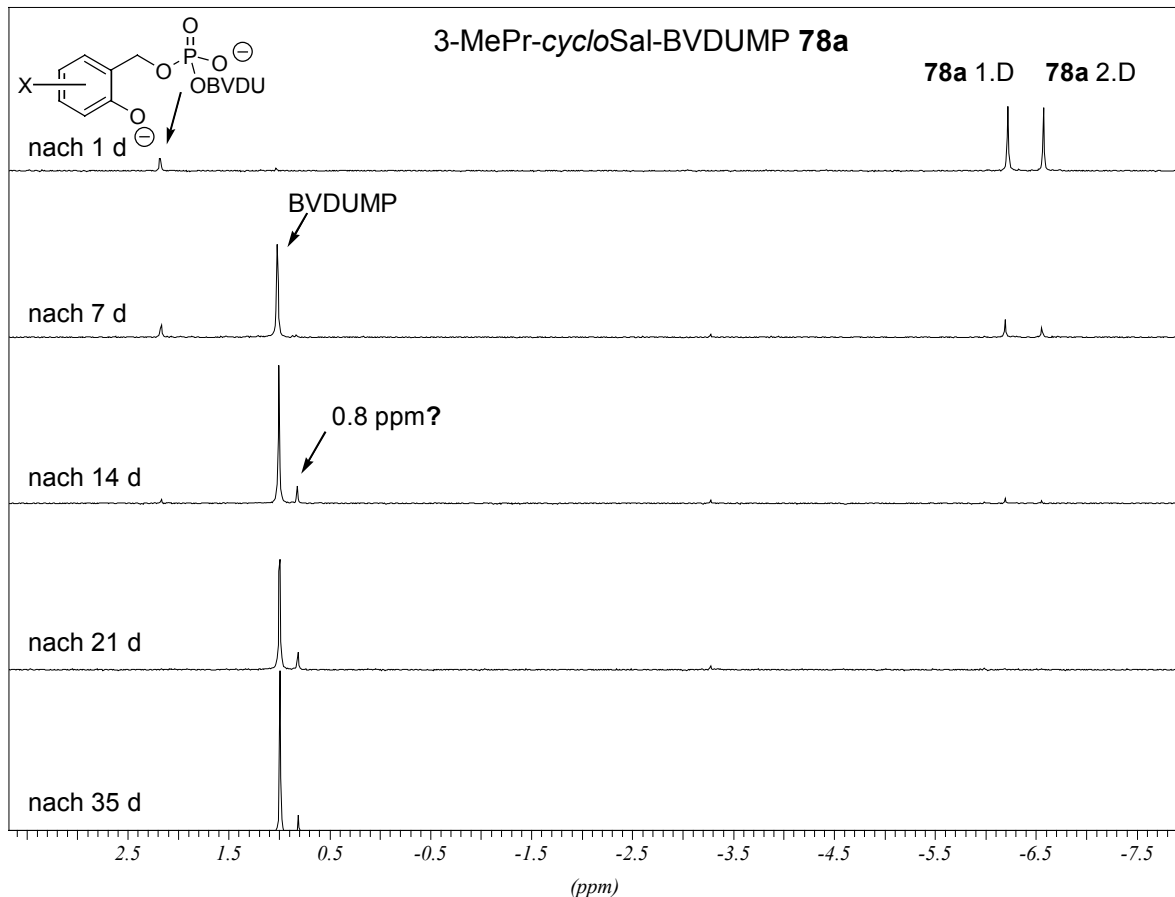


Abbildung 104 Gestapelte Darstellung der ^{31}P -NMR-Spektren der Imidazol-HCl-Puffer-Hydrolyse von 3-MePr-cycloSal-BVDUMP **78a**

Die Trennung der beiden Diastereomeren (**78a** 1. D: -6.1 ppm, **78a** 2. D: -6.4 ppm) fällt deutlich geringer aus. Nach einem Tag ist wieder die Bildung des Benzyl-Phosphatdiester bei 2.1 ppm nachzuweisen. Der geänderte Nukleosid-Rest hat auf die chemische Verschiebung offensichtlich keinen Einfluß und macht sich erst beim BVDUMP (1.0 ppm) selbst bemerkbar. Schon nach 14 Tage war das Edukt **78a** fast vollständig verbraucht und in das freie Nukleotid überführt, ohne daß eine erwähnenswerte Menge an Phenyl-Phosphatdiester entstanden ist. Um so mehr überrascht die Beobachtung eines neuen, unerwarteten Signals bei 0.8 ppm. Interessanterweise blieb dessen Konzentration im weiteren Verlauf der Hydrolyse unverändert und es stellt sich die interessante Frage, ob dieses unerwartete Produkt auch

bei der folgenden Untersuchung von 5-MePr-*cycloSal*-BVDUMP **78e** zu finden sein würde.

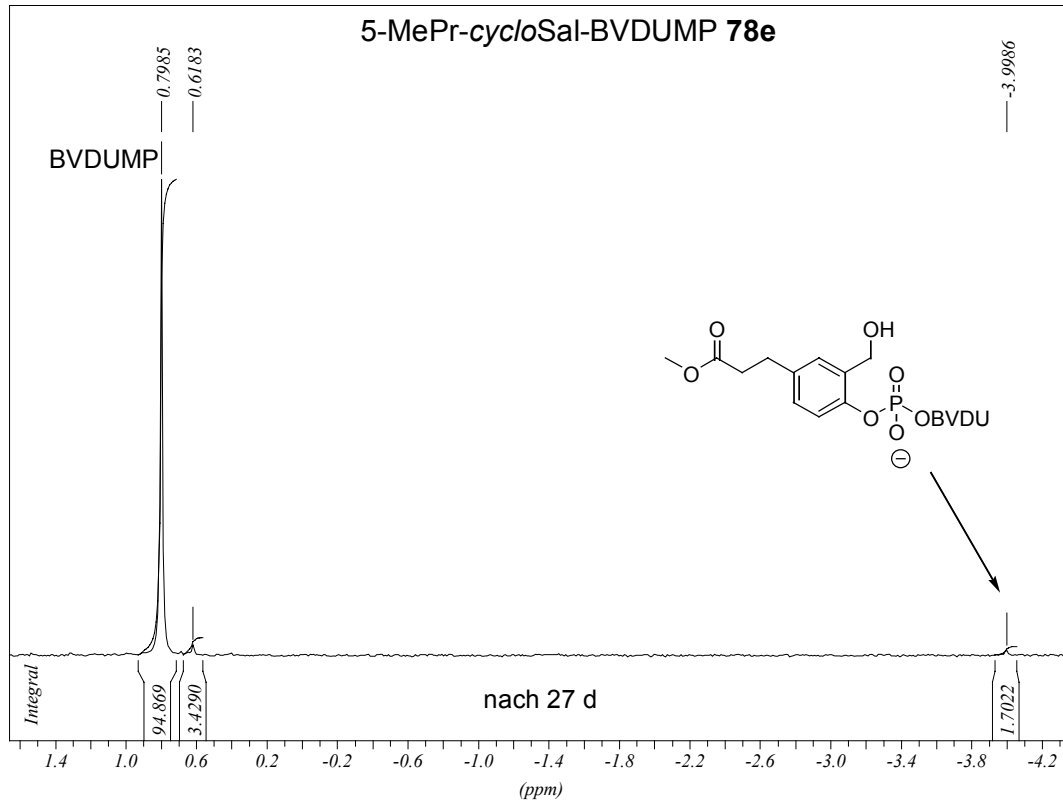


Abbildung 105 Prozentuale Verteilung der Endprodukte nach der Imidazol-HCl-Puffer-Hydrolyse von 5-MePr-*cycloSal*-BVDUMP **78e**

Die Hydrolyse der beiden Diastereomere (**78e** 1. D: -6.9 ppm; **78e** 2. D: -7.1 ppm) verlief noch schneller als bei den zuvor untersuchten 3-isomeren Diastereomeren von **78a**, wobei der Benzyl-Phosphatdiester diesmal bei 1.3 ppm entstand. Durch Integration aller Signale konnte die prozentuale Verteilung der Endprodukte bestimmt werden. Zu fast 95 % konnte das Edukt **78e** in BVDUMP umgewandelt werden. Der nicht gewünschte Phenyl-Phosphatdiester ist mit 1.7 % noch nicht einmal das wichtigste Nebenprodukt, sondern ein Signal bei 0.6 ppm, das mit 3.4 % gebildet wurde. In Analogie zum 3-Isomer ist also wieder die unbekannte Verbindung entstanden, die sich in beiden Fällen um 0.18 ppm vom BVDUMP unterscheidet.

Das wichtigste Ergebnis der ^{31}P -NMR-Untersuchungen ist jedoch die Tatsache, daß die Bildung des Phenyl-Phosphatdiesters generell als unproblematisch bezeichnet werden kann und somit bei der chemischen Hydrolyse der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs keine Rolle spielt.

4.5. Fluoreszenzuntersuchung der *cycloSal-2-Amino-dPMP 79a-d*

Die vier hergestellten *cycloSal-2-Amino-dPMPs 79a-d* müssen vor einem späteren *in vitro*-Einsatz auf ihre Fluoreszenzfähigkeit geprüft werden. Das Analytik-Verfahren der Wahl dafür ist die HPLC, da sich mit ihr mehrere Eigenschaften nebeneinander bestimmen lassen. Zum einen ist die Fluoreszenz von der Umgebung des entsprechenden Moleküls abhängig. Für die *in vitro*-Untersuchungen liegen die Verbindungen in einer wässrigen Lösung mit einem Cosolvens vor, in der sie auf die Zellkultur aufgetragen werden. Der Fluoreszenznachweis soll von der Oberfläche der Zellmembran bis hinein in das Cytoplasma erfolgen, welches ebenfalls ein Medium auf wässriger Basis ist. Besteht aber ein Lösungsmittel aus Molekülen, deren Schwingungsniveaus weit auseinander liegen (z. B. Wasser), so kann es die großen Quanten der elektronischen Übergänge übernehmen und damit die Fluoreszenz auslösen. Ist dieser ungünstige Effekt auch bei den *cycloSal-2-Amino-dPMPs 79a-d* zu beobachten? Für den passiven Influx sollte deren Lipophilie in einer ähnlichen Größenordnung, wie die der *cycloSal-d4TMPs*, liegen. Eine einfache Abschätzung der Lipophilie ist durch die Bestimmung der Retentionszeit mit Hilfe einer RP-HPLC-Säule möglich. Danach haben Verbindungen mit einer ähnlichen Retentionszeit auch eine ähnlich hohe Lipophilie. Wie hoch ist nun die Lipophilie der fluoreszierenden Triester? Für die *in vitro*-Fluoreszenz ist natürlich auch die nachweisbare Konzentration von besonderem Interesse. Reicht die Empfindlichkeit überhaupt für einen *in vitro*-Nachweis aus? Alle diese Fragen lassen sich sehr gut durch eine HPLC-analytischen Untersuchung beantworten.

Vor der Messung mußte zunächst eine geeignete Konzentration für die Injektionslösungen gefunden werden. Dazu wurden 5 µl der 3.0 mM DMSO-Lösung des jeweiligen *cycloSal-dPMPs* zu 495 µl Wasser pipettiert und so auf 30 µM verdünnt. Diese Lösungen sollten nun mit Hilfe eines HPLC-Fluoreszenzdetektors unter Verwendung der Methode II, die zuvor schon für die Aliquote der PLE-Hydrolysen verwendet wurde, vermessen werden. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge (WL) von 320 nm gearbeitet und diese mit einer Emissions-WL von 360 nm detektiert, in dem man die Intensität (in mV) bestimmte. Es stellte sich heraus, daß die Lösungen noch viel zu konzentriert waren, weshalb jeweils 5 µl der 30 µM Lösungen zu 95 µl Wasser gegeben und damit eine Verdünnung von 1.5 µM erreicht wurde. Mit diesen Lösungen konnten schließlich Chromatogramme aufgezeichnet werden, die

immer noch eine starke Fluoreszenz aufwiesen. Vergleicht man die injizierte Konzentration mit den Werten der nachfolgenden antiviralen Daten (Tabelle 12, S. 119), wird deutlich, daß diese in Höhe der antiviral-wirksamen Konzentration liegt. Somit ist die „fluoreszierende Sonde“ empfindlich genug, um unter möglichst identischen Bedingungen arbeiten zu können. Für jede Verbindung gibt es eine optimale WL mit der sich die Fluoreszenz anregen läßt und eine charakteristische WL mit der die Relaxation erfolgt. Bei dieser Untersuchung wurden alle vier *cycloSal*-2-Amino-dPMP **79a-d** mit der gleichen WL bestrahlt und deren emittierte Strahlung bei der gleichen WL vermessen. Dadurch kommt es zu den beobachteten Unterschieden bei der Empfindlichkeit bzw. Intensität der Fluoreszenz (564.1-265.8 mV). Die gewählten Wellenlängen sind in diesem Fall für die 3-Isomere günstiger gewesen. Bei den späteren *in vitro*-Untersuchungen sollten die Fluoreszenzparameter aber noch besser angepaßt werden.

Tabelle 10 *analytische Eigenschaften der cycloSal-2-Amino-dPMPs 79a-d*

	cycloSal-2-Amino-dPMP 79			
Verbindung	3- <i>i</i> -PrPr a	5-BnPr b	3-PivEt c	5-PivEt d
Retentionszeit [min]:	11.0	12.5	12.0	12.1
Intensität* [mV]:	564.1	268.6	391.2	265.8

*Ex. WL (nm): 320; Em. WL (nm): 360

Für die Bewertung der Retentionszeiten empfiehlt sich der Vergleich mit den Werten der analogen d4T- und BVDU-Verbindungen, die in der nächsten Tabelle aufgelistet sind. Die fluoreszierende Nukleobase bewirkt offensichtlich eine Polarisierung der Pronukleotide, wodurch die Retentionszeit und infolgedessen auch die Lipophilie noch geringer ist, als bei den *cycloSal*-d4TMPs **77c,i,l,n**.

Tabelle 11 *Vergleich mit den Retentionszeiten der analogen cycloSal-d4TMPs 77c,i,l,n und -BVDUMPs 78b,h,j,l*

_cycloSal-NMP	HPLC-Retentionszeiten [min] nach Methode II*			
Nukleosid	3- <i>i</i> -PrPr	5-BnPr	3-PivEt	5-PivEt
D4T: 77_	12.3 c	13.7 i	13.3 l	13.4 n
BVDU: 78_	14.1 b	15.2 h	15.1 j	14.9 l

*siehe HPLC-Methoden, Kapitel 6.1.1.

Die Lipophilie der *cycloSal*-BVDUMPs **78b,h,j,l** ist trotz der vorhandenen 3'-Hydroxylgruppe am höchsten. Dies beweist, daß durch die BVU-Base **16** die polarisierende Wirkung der 3'-Hydroxylgruppe am Glycon, im Vergleich zu d4T **7**, mehr als ausgeglichen wird.

In jedem Fall sollte die Lipophilie der *cycloSal*-2-Amino-dPMP **79a-d** ausreichen, um die Zellmembran durchdringen zu können. Um den Einfluß der Lipophilie bei der Überwindung der Zellmembranbarriere umfassend aufklären zu können, wären sicher noch lipophilere Fluoreszenzsonden von Interesse, die im Bereich der *cycloSal*-BVDUMPs liegen sollten. Diese Aufgabe könnten die geplanten *cycloSal*-ddPMPs erfüllen, deren Synthese im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr durchgeführt werden konnte.

4.6. Antivirale *in vitro*-Aktivität der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **77a-n, **27** und **41****

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Balzarini, Rega-Institut, Universität Leuven, Belgien wurden die „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-d4TMPs **77a-n**, **27** und **41** einem *in vitro*-anti-HIV-Test in unterschiedlichen Zellkulturen unterzogen. Als Testsystem dienten HIV-1- bzw. HIV-2-infizierte humane T-Lymphozyten (CEM/0), sowie HIV-2-infizierte Thymidin-Kinase-defiziente Zellen (CEM/TK⁻). Als Referenzverbindung wurde zusätzlich das Nukleosidanalogen d4T **7** getestet.

Betrachtet man die antiviralen Aktivitätsdaten des freien Nukleosides d4T **7** (Tabelle auf der nächsten Seite), läßt sich eine gute Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 in den CEM/0-Zellen feststellen. Diese Aktivität geht in den CEM/TK⁻-Zellen aber verloren. Diese Beobachtung kann nur auf den Mangel an Thymidin-Kinase zurückgeführt werden, denn dieses Enzym ist essentiell für die Metabolisierung zum eigentlich aktiven d4TTP (siehe Abbildung 10, S. 13). Nur Nukleotide selbst bieten in dieser Zelllinie die Möglichkeit einer TP-Bildung und bleiben damit antiviral aktiv.

Die *cycloSal*-d4TMP-Derivate **77a-n**, **27** und **41** weisen in der Wildtyp-Zelllinie (CEM/0) eine Wirksamkeit gegen HIV-1 und HIV-2 auf, die in der gleichen Größenordnung liegt, wie die von d4T **7**. Des weiteren läßt sich ein Zusammenhang zwischen dem Substitutionsmuster (und dem damit verbundenen elektronischen Einfluß des Substituenten auf die *cycloSal*-Maske) und der antiviralen Aktivität beobachten.

Der gleiche Substituent ist prinzipiell in der 3-Position ein besserer Elektronendonator als in der 5-Position. Je stärker der Elektronendonator ist, desto besser ist auch die antivirale Aktivität. So sind die 3-Isomere in der Regel die aktiveren Regioisomere. Eine Korrelation mit den Substitutionsmuster wurde auch bei der Bestimmung der chemischen Hydrolysestabilität gefunden (siehe 4.4.1., S. 68). Die Unterschiede der Estertypen kommen aber im Gegensatz zu den Halbwertszeiten hier nicht zum Tragen.

Tabelle 12 *Anti-HIV-1 und -HIV-2-Aktivitäten und cytotoxische Eigenschaften der cycloSal-d4TMPs 77a-n, 27 und 41*

Verbindung	EC ₅₀ ^a (μM)	CC ₅₀ ^b (μM)		
		CEM/0		CEM/TK ⁻
		HIV-1	HIV-2	HIV-2
<i>_</i> -cycloSal-d4TMP				
5-Säure 41	0.14 ± 0.10	0.80 ± 0.20	50.0 ± 30.0	76
3-Säure 27	0.19 ± 0.08	1.40 ± 0.60	20.0 ± 0.00	100
5-PivEt 77n	0.23 ± 0.16	0.90 ± 0.42	0.60 ± 0.28	21.5 ± 0.35
3-PivEt 77l	0.16 ± 0.09	0.70 ± 0.42	0.40 ± 0.00	54.8 ± 0.42
3-PrEt 77k	0.24 ± 0.05	0.41 ± 0.27	0.60 ± 0.21	43.5 ± 8.30
5-AcEt 77m	0.15 ± 0.06	0.80 ± 0.57	0.55 ± 0.21	43.5 ± 11.3
3-AcEt 77j	0.16 ± 0.09	0.33 ± 0.24	0.15 ± 0.00	39.9 ± 19.7
5-BnPr 77i	0.08 ± 0.00	1.00 ± 0.28	2.00 ± 0.00	60.6 ± 3.30
3-BnPr 77e	0.15 ± 0.09	1.00 ± 0.28	2.87 ± 1.96	43.5 ± 11.7
5- <i>t</i> -BuPr 77h	0.18 ± 0.08	2.40 ± 2.30	4.00 ± 0.00	41.2 ± 1.70
3- <i>t</i> -BuPr 77d	0.33 ± 0.11	0.50 ± 0.14	1.14 ± 0.96	43.0 ± 4.45
5- <i>i</i> -PrPr 77g	0.17 ± 0.08	0.90 ± 0.42	3.00 ± 0.00	58.9 ± 5.30
3- <i>i</i> -PrPr 77c	0.14 ± 0.06	1.00 ± 0.28	0.08 ± 0.13	54.0 ± 11.3
3-EtPr 77b	0.19 ± 0.09	0.65 ± 0.07	0.36 ± 0.00	49.3 ± 3.32
5-MePr 77f	0.33 ± 0.11	1.05 ± 0.35	1.20 ± 1.10	58.1 ± 1.84
3-MePr 77a	0.09 ± 0.05	0.25 ± 0.15	0.40 ± 0.42	57.1 ± 2.80
d4T 7	0.10 ± 0.00	0.55 ± 0.20	27.5 ± 3.50	34.9 ± 7.40

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

Die *cycloSal*-d4TMPs **27** und **41** mit der freien Säure verhalten sich wie d4T **7** und ihre Aktivität geht in den TK-defizienten Zellen verloren. Wie läßt sich das erklären? Durch die Carboxylatgruppe ist die Lipophilie der Pronukleotide viel geringer als bei den Esterverbindungen und der passive Membrantransport sollte stark gehemmt sein. Die Aktivität in den CEM/0-Zellen kann folglich nicht durch das Pronukleotid selbst verursacht worden sein, sondern nur durch d4T **7**, das aus dem enzymatischen Abbau von d4TMP resultiert, welches wiederum durch die extrazelluläre Hydrolyse der Triester entstanden sein muß. Die eingeschränkte Wirksamkeit ist von ganz besonderer Bedeutung, weil sich damit beweisen läßt, daß die beiden Säuren **27** und **41** nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen. Das ist wiederum die Basis für einen erfolgreichen „lock-in“ dieser Pronukleotide.

Nachdem die Funktion des „lock-in“-Prinzips (Abbildung 16, S. 21) nun gesichert ist (die beiden Alkohole **38** und **42** ausgeschlossen), soll nun die entscheidende Frage geklärt werden, ob sich die Fähigkeit der *cycloSal*-Pronukleotide zum „lock-in“ durch eine gesteigerte antivirale Aktivität in der TK-Zelllinie bemerkbar macht. Es müßte sich demnach ein Aktivitätsunterschied zwischen den *cycloSal*-d4TMPs feststellen lassen, die im Zellextrakt zur entsprechenden Säure hydrolysiert wurden und denen die, wie gewohnt, einfach d4TMP freisetzen. Leider wurden aber im Zellextrakt nur einige der „umgedrehten Ester“ verseift. Ob die beiden Alkohole **38** und **42** unter physiologischen Bedingungen einen „lock-in“ bewirken, bleibt fraglich. Welche Aktivitäten sollte man unter Berücksichtigung aller genannter Fakten nun erwarten? Wenn durch die CEM/0-ZE-Kinetiken tatsächlich vergleichbare *in vitro*-Bedingungen simuliert wurden, sollten sich die Unterschiede der Substrat-Indices (Tabelle 7, S. 98) in den Aktivitäten widerspiegeln, in dem die aktivsten *cycloSal*-d4TMPs auch die höchsten SI-Werte aufweisen. Und tatsächlich ist das 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j** mit dem größten SI (7.11), nach dem 3-*i*-PrPr-*cycloSal*-d4TMP **77c**, die mit Abstand aktivste Verbindung. Auch die übrigen „umgedrehten“ Ester gehören, wie die Substrat-Indices es erwarten lassen, zu den aktiveren *cycloSal*-d4TMPs. Dennoch gibt es unter den Propionaten auch drei Verbindungen (**77a-c**), die in ihrer Aktivität gleichwertig, oder sogar besser sind. Diese Beobachtung muß aber keinen Widerspruch darstellen, wenn man bedenkt, daß die Propionate nicht hydrolysiert wurden und daher zu keinem „lock-in“-fähig sind. Deshalb sollten diese *cycloSal*-d4TMPs, genauso wie die nicht „lock-in“-modifizierte *cycloSal*-d4TMPs, um so aktiver sein, desto hydrolysestabiler sie sind. Nach den beiden Säuren **27**

($t_{1/2ZE} = 20.4$ h) und **41** ($t_{1/2ZE} = 11.4$ h) war das 3-*i*-PrPr-*cycloSal*-d4TMP **77c** (Abbildung 88, S. 96) mit $t_{1/2ZE} = 10.1$ h das stabilste *cycloSal*-d4TMP unter den Propionaten. Somit kann man die enorme Aktivität des 3-*i*-PrPr-*cycloSal*-d4TMPs **77c** alleine mit dieser Beobachtung erklären. Die Halbwertszeiten im CEM/0-ZE haben selbstverständlich erst Gültigkeit, wenn das Pronukleotid die Zellmembran durchdrungen hat und bis in das Cytoplasma vorgedrungen ist. Davor geben nur die Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse Auskunft über die Stabilität. Auf dem ersten Blick könnten die gemessenen Aktivitäten auch nur von diesen Werten bestimmt werden, da gerade auch die 3-Isomere der „umgedrehten“ Ester unter diesen Bedingungen zu den stabilsten Verbindungen ($t_{1/2PBS}$: 10.7-13.6 h) gehörten. Versucht man aber einen Zusammenhang zwischen allen Werten und den antiviralen Daten herzustellen, erkennt man deutlich, daß die meisten Propionate trotz ähnlicher Halbwertszeiten inaktiver sind. Das 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m** hat mit $t_{1/2PBS} = 6.3$ h eine beinahe gleiche Halbwertszeit, wie 5-BnPr-*cycloSal*-d4TMP **77i** ($t_{1/2PBS} = 6.5$ h), ist aber in den TK-defizienten Zellen viermal aktiver (**77i**: 2.00 μM ; **77m**: 0.55 μM). Auch die unterschiedliche Lipophilie der beiden *cycloSal*-d4TMPs kann keine Begründung für diese Beobachtung sein, da das Benzylpropionat **77i** sicher lipophiler ist und deshalb auch besser die Zellmembranbarriere überwinden sollte. Erst wenn man davon ausgeht, daß beide Pronukleotide in das Cytoplasma eingedrungen sind, kann das 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m** seinen konzeptionellen Vorteil ausspielen und nach der enzymatischer Hydrolyse effizient d4TMP freisetzen. Trifft diese Erklärung zu, sind die sehr guten antiviralen Aktivitäten ein hervorragender Beweis für den erfolgreichen „lock-in“ der „umgedrehten“ Ester. Daß die antiviralen Konzentrationen der „lock-in“-fähigen *cycloSal*-d4TMPs **77j-m** nicht noch geringer ausfielen und damit die Aktivitäten sich noch deutlicher von den restlichen Verbindungen abheben, könnte an der relativ hohen Lipophilie (Abschätzung durch Korrelation der HPLC-Retentionszeiten nach Methode II: **42** = 11.1 min; **77m** = 10.4 min) des Hydrolyseproduktes 5-OHEt-*cycloSal*-d4TMP **42** liegen, die eine verbesserte Wirksamkeit wegen des mangelhaften Einschusses unterbindet und sich wahrscheinlich nur durch die beschleunigte d4TMP-Freisetzung als aktiver herausgestellt hat.

In Bezug auf die Cytotoxizität fällt auf, daß alle untersuchten Verbindungen bis auf das 5-PivEt **77n** weniger toxisch waren, als d4T **7** ($CC_{50} = 34.9$ μM) selbst. Dieses Ergebnis ist besonders erfreulich, da es beweist, daß die Überführung des Nukleosidi-

danalogons d4T **7** in die *cycloSal*-d4T-Pronukleotide und die vorgenommene „lock-in“-Modifizierung keine negativen Auswirkungen auf die Verträglichkeit des Wirkstoffes d4T **7** hat. Es wird nämlich vermutet, daß ein Teil der Toxizität der *cycloSal*-NMPs unter anderem durch ein reaktives Chinonmethid verursacht wird, das während der Hydrolyse als Intermediat zum freien Salicylalkohol gebildet wird¹⁰³. Neben dem nukleophilen Angriff von Wasser sind auch Reaktionen mit anderen in der Zelle vorhandenen Nukleophilen denkbar (z. B. nukleophile Stellen an Proteinen, Nucleosiden und Aminosäuren). Deren Produkte bzw. deren Metabolite könnten dann für einen Teil der cytotoxischen Wirkungen verantwortlich sein. Die, um die Hälfte geringere, Toxizität der beiden Säuren **27** und **41** läßt sich wieder durch den verminderten Influx begründen, wodurch die beobachtete Cytotoxizität nur von dem langsam gebildeten d4T **7** verursacht wurde, welches anschließend in die Zelle eindringen konnte.

Die synthetisierten „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-BVDUMPs **78a-I**, **39**, **43** und **44** werden gegenwärtig von Dr. A. Meerbach, Universität Jena, *in vitro* auf ihre anti-EBV-Aktivität getestet.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese neuer „lock-in“-modifizierter *cycloSal*-NMPs mit d4T **7**, BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** als Nukleosidkomponente durchgeführt. Diese Verbindungen wurden anschließend auf ihre Eigenschaften hinsichtlich des Hydrolyseverhaltens in verschiedenen Medien untersucht und die *cycloSal*-d4TMPs auf ihre anti-HIV-Aktivität überprüft. Erstmals konnten dabei die für den „lock-in“ verantwortlichen Ester an der *cycloSal*-Maske frei gewählt werden. So wurde der Estersubstituent sowohl in der Position (3 oder 5) als auch die Estergruppen selbst variiert. Entweder kam ein am C3-Kohlenstoff mit dem Saligenylaromaten verknüpftes Methyl-, Ethyl-, *iso*-Propyl-, *tert*-Butyl- und Benzylpropionat zum Einsatz oder ein über das C2-Kohlenstoff des Ethylalkohols mit der *cycloSal*-Maske verbundenes Ethylacetat, -propionat und -pivalat.

Die für die Synthese der *cycloSal*-NMPs benötigten Ausgangsverbindungen sind das Nukleosidanalogen und der entsprechende Salicylalkohol. Als gemeinsamer Ausgangspunkt der unterschiedlich estersubstituierten Saligenylalkohole **58a-o** boten sich Phenolderivate an, die in *ortho*- oder *para*-Position entweder einen Propionsäure- oder einen 2-Hydroxyethyl-Substituenten trugen, um so die verschiedenen Ester einführen zu können. Anschließend mußten diese Phenolderivate α -hydroxymethyliert werden, wodurch sie in die benötigten Salicylalkohole **58a-o** überführt wurden.

Zur Darstellung der 3-(2-Hydroxyphenyl)propionate **46a-e** kamen zunächst Methanol, Ethanol, 2-Propanol zum Einsatz. Dabei wurde nicht die freie 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** verestert, sondern das δ -Lacton Dihydrocumarin **45** mit den entsprechenden Alkoholen unter Säurekatalyse umgeestert (Abbildung 26, S. 33). Dies gelang in sehr guten Ausbeuten (96-73 %). Der Versuch, auf diese Weise den Benzyl- und *tert*-Butylester zu erhalten, scheiterte ebenso, wie die Veresterung der freien Carbonsäure **47** mit den entsprechenden Alkoholen, da dies unweigerlich zum bevorzugten Dihydrocumarin **45** führte. Durch nukleophile Substitution an Benzylbromid konnte das Problem hingegen für den Benzylester **46d** gelöst werden (Abbildung 31, S. 36). Der *tert*-Butylester **46e** wurde durch Veresterung der 3-(2-Hydroxyphenyl)-

propionsäure **47** mit *tert*-Butanol unter Vermittlung von DMF-Dineopentylacetal in guten Ausbeuten isoliert (Abbildung 32, S. 36).

Für die Synthese der *para*-ständigen Propionate **52a-d** konnte ebenfalls die freie 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **51** unter Standardbedingungen säurekatalysiert verestert werden (Abbildung 33, S. 37), was in hohen Ausbeuten (62-93 %) mit Methanol, 2-Propanol und Benzylalkohol gelang. Der *tert*-Butylester **52d** wurde analog der Synthese des *tert*-Butylester **46e** mit einer Ausbeute von 73 % hergestellt.

Die Veresterung des 2-(2-Hydroxyphenyl)- **53** und 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanols **54** erforderte eine Reaktion, die bei solchen Diolen selektiv den primären Alkylalkohol wählt. Dies gelang nach einer literaturbekannten Acylierungsreaktion (Abbildung 36, S. 39), bei der Ethylacetat zu den beiden regioisomeren Acetaten **55a,b** umgeestert wurde. Außerdem konnten die Synthesemöglichkeiten dieser Reaktion erweitert werden, indem auch die Ethylester anderer Carbonsäuren (Ethylpropionat, -butyrat, -pivaloat und -benzoat) eingesetzt wurden, wobei die Ester der unverzweigten Carbonsäuren zu positiven Resultaten führten (**55c**: 85 % Ausbeute).

Für die Darstellung der entsprechenden Pivalate **55d,e** wurde eine andere selektive Veresterung gefunden (Abbildung 39, S. 41), die als optimale Ergänzung der zuvor beschriebenen Reaktion bezeichnet werden kann. Ähnlich der Silicagel-unterstützten Umesterung von Ethylalkanoaten bediente man sich wieder eines Carbonsäurederivates, wobei die weniger reaktive Pivalinsäure eine besondere Aktivierung notwendig machte. Dies gelang durch Überführung in ein „twisted“-Amid, welches unter neutralen Bedingungen den nukleophileren, primären Alkohol und nicht den phenolischen wählt.

Nach Darstellung der verschiedenen phenolischen Esterderivate **46a-e**, **52a-d** und **55a-e** mußte nun ein Syntheseweg zu den entsprechenden Salicylalkoholen gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre die selektive Formylierung zum Salicylaldehyd mit anschließender Reduktion gewesen. Aufgrund früherer Arbeiten in unserem Arbeitskreis kam nur die Variante nach Casiraghi in Betracht, zumal die Labilität der Estergruppe in der Seitenkette die meisten bekannten *ortho*-Formylierungen ausschloß. Aber auch diese relativ milden Reaktionsbedingungen wurden von den Estergruppen nicht toleriert. Das als Nebenprodukt gebildete Methanol führte zu unbrauchbaren Umesterungsgemischen. Ein anderer Weg zu Salicylalkoholen, ausgehend von Phenolen, war die direkte α -Hydroxymethylierung mit Formaldehyd, wie sie

zuvor W. Nagata *et al.* durchgeführt hatte⁷⁹. Die Reaktionsbedingungen erwiesen sich als ideal für die geplante Umwandlung der estermodifizierten Phenole (Tabelle 1, S. 44) in die entsprechenden Salicylalkohole. Selbst die Umsetzung der freien 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** gelang mit einer Ausbeute von immerhin 36 %. Ein interessanter Aspekt dieser Reaktion ist die Überführung anderer multifunktionaler Phenole in die entsprechenden Salicylalkohole, wodurch nicht nur „lock-in“-modifizierte Phenole als *cycloSal*-Masken zugänglich gemacht werden können. So gelang es, durch die α -Hydroxymethylierung von 4-Methylumbelliferon **59** die erste fluoreszierende Saligenylmaske herzustellen, die zur weiteren Aufklärung des Metabolismus der *cycloSal*-Nukleotide in der Zelle beitragen könnte. Ein unerwartetes Ergebnis war die Regioselektivität, die bei dieser Reaktion beobachtet wurde und nur eines der beiden möglichen Regioisomere lieferte (Abbildung 42, S. 45).

Für die *cycloSal*-NMP-Synthese wurden nun noch die drei Nukleosidanaloga d4T **7**, BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** benötigt. Durch Synthese nach einer Literaturvorschrift⁶⁴ konnte d4T **7** erhalten werden, während BVDU **15** freundlicherweise von Prof. Dr. P. Wutzler, Universität Jena, zur Verfügung gestellt wurde. Um das 2-Amino-dP **32** zu erhalten, sollte eine Mikromaßstab-Synthese⁸⁴ so modifiziert werden, daß das fluoreszierende Nukleosid **32** in den benötigten, größeren Mengen zugänglich war. Die zweistufige Vorschrift stellte sich dabei aber als ungeeignet heraus und so wurde eine neue sechsstufige Synthese entworfen. Ausgehend von 2'-Desoxyguanosin **63** konnte das Zwischenprodukt 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** der Literatursynthese durch die Verwendung von *iso*-Butyryl-Schutzgruppen über fünf Stufen hinweg mit einer Ausbeute von 47 % erhalten werden (Abbildung 49, S. 51). Analog der Literatur⁸⁴ wurde dann 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** reduktiv durch Raney-Nickel-Katalyse in das fluoreszierende Nukleosid überführt (Abbildung 53, S. 55). Auf diesem Weg wurde eine Menge von ca. 2 g 2-Amino-dP **32** erhalten, was einer Ausbeute von insgesamt 36 % entspricht.

Nachdem alle Edukte für die *cycloSal*-NMP-Synthese bereitstanden, wurden die estermodifizierten Salicylalkohole **58a-o**, nach der in unserem Arbeitskreis üblichen Methode, mit Phosphortrichlorid zu den 2-Chlor-4*H*-benzo-[1.3.2]dioxaphosphorin-Derivaten (Saligenylchlorphosphanen) **76a-o** umgesetzt (Abbildung 57, S. 58). Das als Nebenprodukt anfallende Pyridiniumchlorid konnte jedoch nicht vollständig ent-

fernt werden, da die Hydrolyse- bzw. Oxidationsempfindlichkeit des Phosphors und die thermische Labilität der Esterfunktionen Aufreinigungsverfahren, wie Chromatographie oder Destillation, ausschlossen.

Trotz der geringen Verunreinigung wurde mit Hilfe dieser reaktiven Phosphor(III)-Verbindungen **76a-o** weiter gearbeitet und die Nukleosidanaloga d4T **7**, BVDU **15** und 2-Amino-dP **32** mit den „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-Masken verknüpft. Die „Eintopf“-Synthese umfaßte zwei Schritte: die Verknüpfung des Saligenylchlorphosphans mit dem jeweiligen Nukleosid zu einem cyclischen Phosphit als reaktives Zwischenprodukt gefolgt von einer Oxidation des Phosphits mit Hilfe von *tert*-Butylhydroperoxid zu den Zielverbindungen (Abbildung 58, S. 59; Abbildung 60, S. 63; Abbildung 63, S. 67). Die Synthesen gelangen mit moderaten bis guten Ausbeuten (Tabelle 2-4), wobei sowohl das Saligenylchlorphosphan als auch die Base DIPEA bei allen Synthesen im Überschuß zugegeben werden mußten.

Um für die nachfolgenden Hydrolysestudien Referenzverbindungen zur Verfügung zu haben und dabei auch deren Eigenschaften bestimmen zu können, sollten einige Ester vorab chemisch hydrolysiert werden. Die *tert*-Butylpropionate **77d,h** und **78c,g** ließen sich gut unter sauren Bedingungen (TFA) in die *cycloSal*-NMPs mit der freien Propionsäure (**27**, **39**, **41**, **43**) als Saligenyl-Substituent überführen (Abbildung 59, S. 62; Abbildung 61, S. 65), welche nun zur Coinjektion in der HPLC-Analytik eingesetzt werden konnten. Ebenso sollten die Acetate **77j,m** bzw. **78i,k** oder die Pivalate **77l,n** bzw. **78j,l** durch chemische Hydrolyse zur Quelle der *cycloSal*-NMPs mit dem freien Ethylalkohol-Substituenten (**38**, **40**, **42**, **44**) werden, um auch diese Coinjektionsstandards einsetzen zu können. Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit der *cycloSal*-Phosphattriester konnte aber keiner der „umgedrehten“ Ester auf diesem Weg hydrolysiert werden. Erst die überraschend schnell verlaufende enzymatische Hydrolyse des Pivalates **78l** mit Hilfe der PLE ermöglichte die Isolierung von 5-OH-Et-*cycloSal*-BVDUMP **44** in einer guten Ausbeute von 72 % (Abbildung 62, S. 66).

Das Hydrolyseverhalten aller „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs **27**, **39**, **41**, **43**, **77a-n**, **78a-l** und **79a-d** wurde zuerst in einer wäßrigen Phosphat-Pufferlösung bei pH 7.3 untersucht, um die Stabilität und damit den Einfluß der eingeführten Substituenten zu prüfen. Wie erwartet, lagen die gemessenen Halbwertszeiten zwischen denen der Prototyp-Verbindungen H- **17** bzw. **81** und 3-Me-*cycloSal*-NMP **26** bzw. **82**

(Abbildung 64 und 65, S. 69 bzw. 71) und boten damit die Grundlage für eine erfolgreiche Nukleotid-Freisetzung bei den späteren *in vitro*-Untersuchungen.

Bei den weiteren Hydrolysestudien stand die Untersuchung der „lock-in“-auslösenden enzymatischen Verseifung der Carbonsäureester im Vordergrund und damit die Überprüfung der Praxistauglichkeit der entworfenen „lock-in“-modifizierten Pronukleotide. Zunächst wurde ein Carboxyesterase-Assay durchgeführt, bei dem der „lock-in“-Mechanismus durch die Zugabe von PLE ausgelöst werden sollte. Überraschenderweise wurde keines der Propionate **77a-i** hydrolysiert. Nur das 3-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77j** und vermutlich auch 3-PivEt-*cycloSal*-d4TMP **77l**, dessen Hydrolyse aber mit Hilfe der HPLC-Analytik ohne den Coinjektionsstandard **38** nicht bewiesen werden konnte, wurde von der PLE als Substrat akzeptiert. Bei den *cycloSal*-BVDUMPs **78a-l** war die PLE weitaus weniger selektiv und es konnten insgesamt vier Hydrolysen (3-BnPr- **78d**, 5-AcEt- **78k**, 3-PivEt- **78j** und 5-PivEt-*cycloSal*-BVDUMP **78l**) beobachtet werden. Es wurde versucht, die Resultate dieses PLE-Assays durch die Gestalt des aktiven Zentrums der Carboxyesterase zu begründen. Das derzeit gültige Modell dieses Zentrums (Abbildung 87, S. 94) ließ aber keine eindeutigen Rückschlüsse auf die beobachtete Selektivität zu, sondern stellte eher das Modell selbst in Frage, da die Dimensionen der verschiedenen Taschen insgesamt als zu klein erschienen, um Ester in Größe der *cycloSal*-NMPs überhaupt hydrolysieren zu können. Als Ergebnis dieser PLE-Untersuchung ließ sich Folgendes festhalten:

- Ester der *cycloSal*-NMPs mit BVDU-Komponente werden eher hydrolysiert.
 - Ester, bei denen sich der *cycloSal*-NMP-Teil auf Seiten des Alkohols befindet, passen wesentlich besser in das aktive Zentrum der PLE.
 - Von den Propionaten ist nur das 3-Isomer **78d** der Benzylpropionate ein Substrat.
- Die insgesamt unbefriedigenden Ergebnisse dieses Assays ließen keine abschließende Aussagen über die „lock-in“-Fähigkeit der untersuchten Verbindungen zu, weshalb ein weiterer Assay mit humanen Zellextrakten durchgeführt wurde, der die tatsächlichen intrazellulären Bedingungen wesentlich besser simulieren sollte.

Diese Untersuchungen wurden in Extrakten von humanen CEM/0-Zellen (für die d4T-Verbindungen) bzw. P3HR-1-Zellen (für die BVDU-Derivate) durchgeführt. Der pH-Wert der Extrakte lag dabei mit 6.8 im leicht Sauren, weshalb sich die chemische Stabilität der *cycloSal*-Phosphattriester etwas vergrößern sollte. Erstaunlicherweise

verkürzt sich alle Hydrolysehalbwertszeiten der *cycloSal*-d4TMPs **77a-n** (Abbildung 88, S. 96) und ließen damit eine generelle enzymatische Hydrolyse der unterschiedlichen Carbonsäureester erwarten. Bei der Auswertung der Chromatogramme konnten aber insgesamt nur vier Esterspaltungen (3-AcEt- **77j**, 3-PrEt- **77k**, 3-PivEt- **77l** und 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m**) nachgewiesen werden. Die Ursache für die Destabilisierung der übrigen Verbindungen konnte nicht gefunden werden. Von den Estern der *cycloSal*-BVDUMPs **78a-l** waren ebenfalls nur vier Substrate (3-BnPr- **78d**, 5-BnPr- **78h**, 3-AcEt- **78i** und 5-AcEt-*cycloSal*-BVDUMP **78k**) für die humane Carboxyesterase darunter, wobei diesmal die übrigen Verbindungen tatsächlich stabiler waren (Abbildung 94, S. 102). Der Vergleich der PLE- und ZE-Untersuchungen brachte folgende Resultate:

- Die Selektivität der ZE-Carboxyesterase ist, vor allem bei den Estern der *cycloSal*-d4TMPs, wesentlich geringer als die der PLE.
- Die Unterschiedlichkeit der beiden Enzyme drückt sich auch in der Geschwindigkeit aus, mit der die Hydrolysen gleicher Verbindungen katalysiert werden.
- Die Propionate sind, bis auf die Benzylester und die Propionate der „umgedrehten“ Ester, keine geeigneten Substrate für die Carboxyesterasen und daher auch für die „lock-in“-Funktionalisierung.

Außerdem wurde deutlich, daß nur die Zellextrakt-Untersuchungen verläßlich Auskunft geben können, wenn es um die Beurteilung eines Esters als potentielle „lock-in“-bewirkende Gruppe geht.

Da bei der Bestimmung der chemischen Halbwertszeiten nur der Abbau des Eduktes verfolgt wurde und bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme keine quantitative Aussage über die entstandenen Hydrolyseprodukte gemacht werden konnte, wurden drei ausgewählten Verbindungen (3-MePr-*cycloSal*-d4TMP **77a**, 3-MePr-**78a** und 5-MePr-*cycloSal*-BVDUMP **78e**) exemplarisch für alle Übrigen einer ³¹P-NMR-Hydrolysestudie im Imidazol-HCl-Puffer unterzogen. Ergebnis dieser Untersuchung war, daß alle Verbindungen das entsprechende Nukleotid als Endprodukt liefern, ohne dabei nennenswerte Mengen an Nebenprodukten zu bilden.

Die vier *cycloSal*-2-Amino-dPMPs **79a-d** wurden als Fluoreszenzsonde für zukünftige *in vitro*-Untersuchungen hergestellt. Vor diesem Einsatz sollten deren physika-

lich-chemische Eigenschaften überprüft werden. Nachdem schon die Hydrolysehalbwertszeiten bestimmt waren, fehlte noch die Untersuchung ihrer Fluoreszenzeigenschaften. Dafür wurde die Lösungen der *cycloSal*-2-Amino-dPMPs **79a-d** so lange verdünnt, bis eine Konzentration von 1.5 μM erreicht war. Erst bei dieser Verdünnung konnten die Lösungen mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors HPLC-analytisch vermessen werden (Tabelle 10 und 11, S. 117).

Die *in vitro*-HIV-Zelltests der *cycloSal*-d4TMPs **77a-n**, **27** und **41** gegen HIV-1 und HIV-2 (Tabelle 12, S. 119) in humanen T-Lymphozyten (CEM/0) zeigten eine mit d4T **7** vergleichbare antivirale Aktivität. Zur Überprüfung des Funktionsprinzips der Pronukleotide wurde zusätzlich eine Thymidin-Kinase-defiziente Zelllinie (CEM/TK⁻) verwendet, bei der nur intrazellulär freigesetztes d4TMP aktiv sein konnte. Im Gegensatz zu d4T **7** zeigten alle *cycloSal*-d4TMPs **77a-n** – mit Ausnahme der beiden Säuren **27** und **41** – auch in dieser Zelllinie gute antivirale Aktivitäten, d. h. die „lock-in“-modifizierten Pronukleotide setzten immer erfolgreich d4TMP frei, was aufgrund der vorangegangenen Hydrolysestudien auch erwartet wurde. Durch die Inaktivität der freien Säuren **27** und **41** konnte außerdem der Beweis erbracht werden, daß das „lock-in“-Konzept prinzipiell funktionieren würde (aber nur mit den Propionaten **77a-i**), da deren Hydrolyseprodukte die Zellmembran nicht passieren können. Das interessanteste und auch wichtigste Ergebnis dieser Untersuchung wäre deshalb die Beobachtung herausragender Aktivitäten der nachgewiesenen, „lock-in“-fähigen Verbindungen (3-AcEt- **77j**, 3-PrEt- **77k**, 3-PivEt- **77l** und 5-AcEt-*cycloSal*-d4TMP **77m**) gewesen. Da im Zellextrakt aber nur Ester hydrolysiert wurden, die die beiden Alkohole **38** und **42** (deren Isolierung nicht gelang und deshalb die Eigenschaften nicht bestimmt werden konnten) freisetzen, überraschte es nicht, daß keine außergewöhnlichen Aktivitäten festgestellt werden konnten. Dennoch zeigten gerade die „umgedrehten“ Ester **77j-n** in der TK-defizienten Zelllinie eine erhöhte Wirksamkeit. Leider konnten die Ergebnisse der vielversprechenden, antiviralen Aktivitätsuntersuchung der BVDU-Verbindungen **78a-l** in dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt werden.

5.2. Summary

New „lock-in“-modified *cycloSal*-NMP derivatives were synthesized to deliver membrane-insoluble intracellular prodrugs after carboxyesterase catalyzed hydrolysis of the saligenyl side-chain ester group. For the preparation of *cycloSal* pronucleotides the major building blocks were the corresponding nucleoside analogues (in this case: d4T **7**, BVDU **15** and 2-Amino-dP **32**) and the salicylic alcohol derivatives **58a-o**, bearing different ester substituent groups (in *ortho*- or *para*-position) with systematic variation of the structure of the carboxylic ester function.

To obtain the salicylic alcohols **58a-n**, different bifunctionalized phenols have been esterified selectively. The products of these esterifications were transformed into the appropriate salicylic alcohol by an *ortho*-hydroxymethylation reaction, first performed by Nagata *et al.* This reaction was also of great value for the synthesis of many other salicylic alcohol derivatives. As a result, it was possible to achieve the first fluorescent *cycloSal*-mask **58o** (chapter 4.1.).

The salicylic alcohols were then used to prepare cyclic chlorophosphites by condensation reactions with phosphorustrichloride. Once the cyclic chlorophosphites were obtained, they were used as phosphitylating agents for the corresponding nucleoside analogue in the third step. The synthesis was completed by oxidation of the intermediately formed phosphite triesters to the corresponding phosphotriester with *tert*-butyl hydroperoxide (chapter 4.3.).

The prodrugs were tested for their hydrolytic behaviour under different conditions. First the chemical hydrolysis half-lives of the phosphotriester group was determined in a buffered aqueous phosphate brine solution (PBS) to evaluate the influence of the introduced ester substituents. Then further hydrolysis in the presence of pig-liver esterase (PLE) and in human cell extracts should proof the ability of the “lock-in“-modified *cycloSal*-NMPs, to show the necessary intracellular enzymatic-hydrolysis of the “lock-in“-effecting ester group. The relevant products were identified by HPLC retention times (supported by coinjection of the expected product), UV-spectra and ³¹P-NMR-spectroscopy (chapter 4.4.).

Particularly, the *cycloSal*-d4TMPs were tested for their ability to inhibit the replication of HIV-1 and HIV-2 in human lymphocytes (CEM cells) and compared with the activity of d4T **7** (chapter 4.6.).

5.3. Ausblick

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die „lock-in“-Funktionalisierung der *cyclo*-Sal-NMPs nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch möglich ist und im Prinzip auch funktionieren kann. Ob mit diesem Konzept tatsächlich eine Verbesserung der *cyclo*Sal-NMP-Wirksamkeit erreicht werden kann, läßt sich vielleicht nach Auswertung der Aktivitätsuntersuchung der BVDU-Verbindungen **78a-I** sagen, die sich zur Zeit aber noch in der Durchführung befindet. Um die Ergebnisse dieser Arbeit weiter zu untermauern und alle enzymatischen Hydrolysen zweifelsfrei belegen zu können, steht noch die Synthese der Referenzverbindungen **38**, **40** und **42** aus. Ein Lävulinsäureester hatte sich bei anderen Arbeiten⁵⁰ in unserem Arbeitskreis als geeignete Hydroxyl-Schutzgruppe, die neben dem Phosphattriester problemlos entfernt werden konnte, herausgestellt. Es gibt keinen Grund, weshalb dies nicht auch in diesem Fall möglich sein sollte.

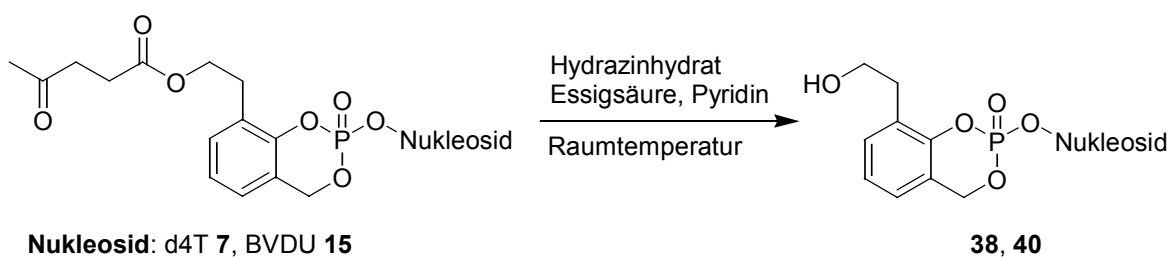


Abbildung 106 Synthesevorschlag für die Ethylalkohol-substituierten *cyclo*Sal-NMPs **38** und **40**

Die Lävulinsäureester-modifizierten *cyclo*Sal-NMPs können in Analogie zu den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen erhalten werden. Für die Isolierung der beiden 5-Isomere **42** und **44** müssen dementsprechend die 5-substituierten *cyclo*Sal-NMPs hergestellt werden.

Beim Entwurf der bisherigen „lock-in“-modifizierten *cyclo*Sal-NMPs konnte nicht mit einem so selektiven Verhalten der Carboxyesterase gerechnet werden. Zudem war die Selektivität noch äußerst ungünstig. Gerade die Propionate, bei denen die Säure mit dem *cyclo*Sal-NMP verknüpft ist, wurden nicht hydrolysiert. Sehr wahrscheinlich sind aber nur die Säuren in der Lage, einen effektiven Einschluß des Pronukleotides in der Zelle zu verursachen. Bei zukünftigen Arbeiten gilt es somit, die Selektivität der Carboxyesterase zu berücksichtigen, um einen Ester zu finden, der enzymatisch hydrolysiert wird, und danach eine ausreichende Polarisierung des Pronukleotides

bewirkt. Da sich die „umgedrehten“ Ester als gute Substrate herausgestellt haben, scheint es sinnvoll, bei der Suche nach dem geeigneten Ester sich auf diese Anordnung zu beschränken. Durch die Anwendung des bekannten Doppelester-Prodrug-Konzeptes⁹³ für die „lock-in“-Funktionalisierung, bei dem zwei Ester nacheinander in einer Kaskade hydrolysiert werden, könnten auch die „umgedrehten“ Ester zur Quelle negativ-geladener Propionate werden. Gestartet würde die Hydrolyse – wie zuvor – durch eine Carboxyesterase. Ob die Selektivität des Enzyms durch diese Modifizierung beeinflusst wird, bleibt aber offen.

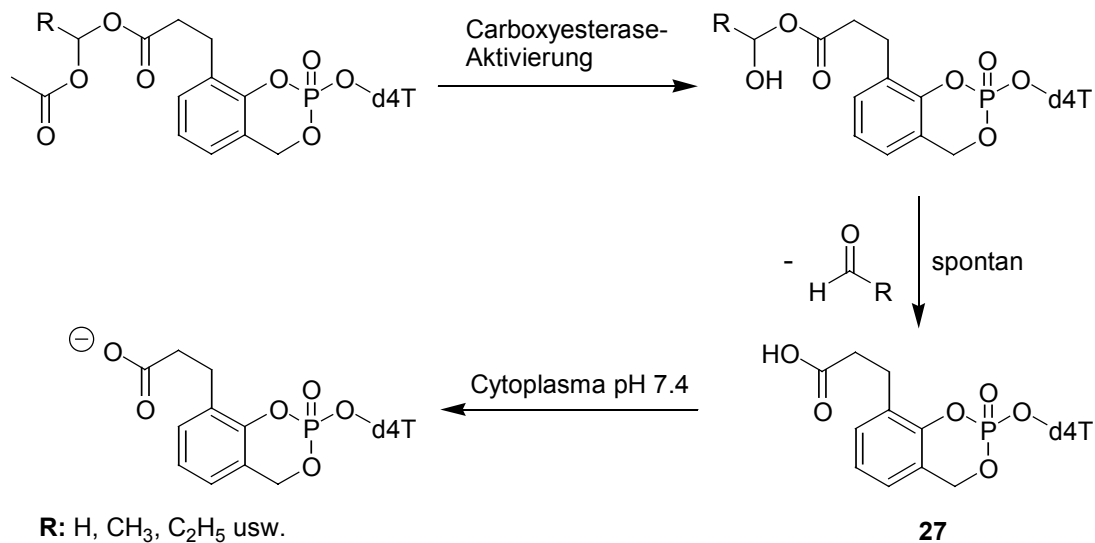


Abbildung 107 Vorschlag eines Doppelester-modifizierten cycloSal-d4TMPs und die Kaskadenfreisetzung des „lock-in“-fähigen Propionates 27

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung einer anderen funktionellen Gruppe. Würde man z. B. anstelle der Carbonsäureester Carbamate in der dargestellten Weise (untere Abbildung) anbringen, wäre das Hydrolyseprodukt kein Alkohol, sondern ein Amin, welches sich im Cytoplasma sofort in das entsprechende Ammoniumkation verwandeln würde und als solches an der cycloSal-Maske verbliebe.

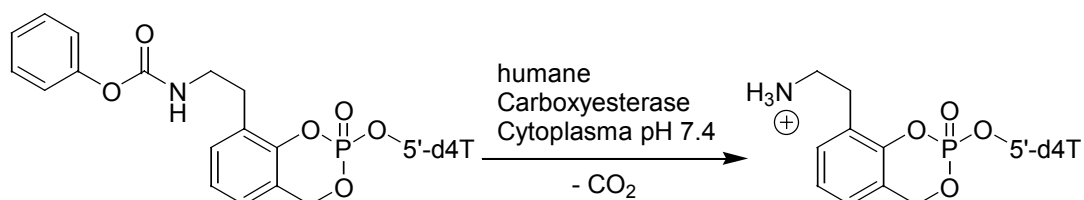


Abbildung 108 Vorschlag für ein neuartiges, „lock-in“-fähiges cycloSal-NMP

Ein bekanntes Prodrug, dem dieses Carbamat-Konzept zu Grunde liegt, ist das klinisch erprobte Cytostatikum CPT-11 (Irinotecan). Der eigentliche Wirkstoff SN-38

wird nach Hydrolyse der Carbamatfunktion (hauptsächlich durch die humane Carboxyesterase 2 (hCE-2)) freigesetzt¹⁰⁴. Da die positive Ladung an der *cycloSal*-Maske einen ähnlich guten „lock-in“, wie der negativ-geladene Carboxylat-Substituent, bewirken sollte, spricht vieles für den Erfolg der Carbamat-Funktionalisierung. Die zum Phosphattriester benachbarte positiv-geladene Ammoniumgruppe könnte auch zu neuartigen, interessanten Abbauprodukten führen. Nach der Hydrolyse des Phenyl-Phosphattriesters könnte die negative Ladung des Phenolates, oder des Phosphates, intramolekular abgefangen werden. Nach der anschließenden Hydrolyse des Benzyl-Phosphatdiesters würde die *cycloSal*-Maske als zwitterionischer, ungeladener Benzylalkohol (ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt) zurückbleiben. Das nach außen hin ungeladene Molekül könnte anschließend sogar durch einen passiven Membrantransport die Zelle wieder verlassen. Dadurch würde sich vielleicht die Toxizität der *cycloSal*-Nukleotide insgesamt verringern.

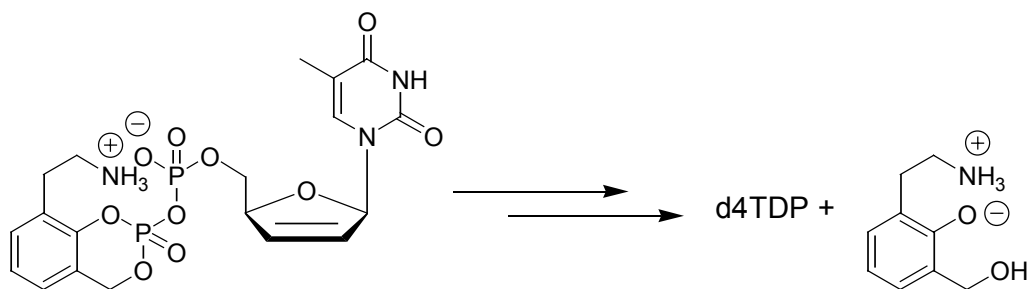


Abbildung 109 Vorschlag für das erste Nukleosid-Diphosphat liefernde Pronukleotid am Beispiel von d4T 7

Führt man den Gedanken der Wechselwirkung zwischen der Ammonium- und der Phosphatfunktion weiter, lässt sich auch ein vollkommen neuartiges Pronukleotid vorstellen und entwerfen, das in der obigen Abbildung dargestellt ist. Die intrazelluläre Bereitstellung eines Diphosphates wäre ein Novum in der antiviralen Therapie. Die Verbesserungen, die in der Vergangenheit mit den Monophosphat-liefernden Pronukleotiden erreicht wurden, könnten von dieser Verbindungsklasse noch übertroffen werden. Dafür spricht vor allem die Verringerung der intrazellulären Metabolisierungsschritte zum aktiven Triphosphat, die sich auf nur noch einen Enzym-abhängigen Schritt beschränken würde. Selbstverständlich behielten die Vorteile des *cycloSal*-Konzeptes auch bei diesem neuen Prodrug ihre Gültigkeit.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemeines

6.1.1. Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr.: 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Laufstrecke betrug 7-8 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Präparative Dünnschichtchromatographie:

Mittels eines Chromatotrons der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4.00 g getrennt. Als Trennmittel diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck Nr.: 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie):

Substanzgemische mit mehr als 4.00 g Rohausbeute wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck aufgereinigt. Als Trennmittel wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 63-200 μm (Baker Nr.: 0253) verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software
Interface:	D-7000
Pumpe:	L-7100
Automatischer Probenwechsler:	L-7200
Detektion:	Diode Array Detector L-7455 FL-Detector L-7480

Analytische Säule: LiChroCart 125-3 mit Lichrospher 100 RP 18 (5 μm) Füllmaterial

HPLC-Methoden:

Methode I: Für die Vermessung der Aliquote der chemischen Hydrolysen wurde ein Acetonitril-Gradient in Wasser von 5-100 % in 20 min, dann 15 min isokratisch Acetonitril/Wasser 5:95 v/v, mit einer Flußrate von 0.5 ml/min und einer UV-Detektion bei 265 nm verwendet.

Methode II: Die Aliquote der Zellextrakt- und PLE-Hydrolysen wurden mit einem Acetonitril-Gradienten in Ionenpaarungspuffer (Tetrabutylammoniumphosphat, pH 3.8) von 8-100 % in 22 min, 5 min 100 % Acetonitril, dann 6 min isokratisch 8 % Acetonitril mit einer Flußrate von 0.6 ml/min und einer UV-Detektion 240-260 nm vermessen. Für die Vermessung der fluoreszierenden Triester wurde zusätzlich der Fluoreszenzdetektor eingeschleift. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte dabei mit einer Wellenlänge von 320 nm, und die emittierte Fluoreszenzstrahlung wurde bei 360 nm detektiert.

6.1.2. Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg auf den Bruker-Geräten aufgenommen. Auf dem Modell AMX 400 wurden 400 MHz- ^1H -NMR- und 101 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren gemessen. Auf dem Modell DRX 500 wurden 500 MHz- ^1H -NMR, 125 MHz ^{13}C -NMR- und 202 MHz ^{31}P -NMR-Spektren gemessen.

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale bezogen, wobei DMSO- d_6 auf 2.49 ppm (^1H) bzw. 39.7 ppm (^{13}C) und CDCl_3 auf 7.27 ppm (^1H) bzw. 77.0 ppm (^{13}C) kalibriert wurde. Die Verschiebungen der ^{31}P -NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard von 85 %-iger Phosphorsäure angegeben.

Infrarotspektroskopie (IR):

Die IR-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer 1600 Series FTIR-Gerät aufgenommen.

Ultraviolettspektroskopie (UV):

Die UV-Spektren wurden auf einem UV-Spektralphotometer, Cary 1E, der Firma Varian aufgenommen.

Massenspektroskopie (MS):

Die Massenspektren wurden auf einem Elektrospray-Gerät der Firma Finnigan MAT, TSQ 7000 gemessen und mit der Software ISIS 8.1 nachbearbeitet. Als Fließmittel wurde Acetonitril mit 0.1 % Essigsäure benutzt.

Die Charakterisierung der Zielverbindungen durch FAB-MS bzw. hochaufgelöste FAB-MS erfolgte auf einem Micromass VG 70-250 S Massenspektrometer in einer *m*-Nitrobenzylalkohol-Matrix mit Polyethylenglycol als Referenzsubstanz (durchschnittliches Molekulargewicht: 600 g/mol).

6.1.3. Geräte*Schmelzpunktbestimmung:*

Schmelzpunkte wurden auf dem Gerät FP5 der Firma Mettler gemessen.

Gefriertrocknung:

Wäßrige Lösungen wurden an der Gefriertrocknungsanlage Amsco/Finn-Aqua Lyovac GT2 lyophilisiert.

Thermomixer:

Die HPLC-Hydrolysestudien wurden bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer 5436 durchgeführt.

6.1.4. Lösungsmittel

Acetonitril; C₂H₃N [41.05]; Fluka Nr. 00709, puriss., absolut über Molekularsieb (H₂O < 0.001 %); Sdp.: 82 °C.

Dichlormethan; CH₂Cl₂ [84.93]; technische Qualität; Sdp.: 39-40°C; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

Diethylether; C₄H₁₀O [74.11]; technische Qualität; Sdp.: 34°C über Natrium getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

N,N-Dimethylformamid (DMF); C₃H₇NO [73.10]; Fluka Nr. 40248, puriss., aminfrei; absolut über Molekularsieb (H₂O < 0.01 %); > 99.5 %; Sdp.: 153°C

Essigsäureethylester; C₄H₈O₂ [88.11]; technische Qualität; Sdp.: 77°C; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

Ethanol; C₂H₅O [45.06]; Riedel-deHaen Nr. 32205; Sdp.: 78-79°C; 99.8 % (GC).

iso-Propanol; C₃H₈O [60.11]; Fluka Nr. 59304, 99.5 % (GC); Sdp.: 81.8°C.

Methanol; CH₄O [32.04]; technische Qualität; Sdp.: 64°C; bei Normaldruck destilliert.

Petrolether (45-65); technische Qualität; Sdp.: 45-65°C; im Vakuum destilliert.

Pyridin; C₅H₅N [79.10]; Fluka Nr. 82704, puriss., absolut über Molekularsieb (< 50 ppm H₂O); ≥99.8 %; Sdp.: 116°C

Tetrahydrofuran (THF); C₄H₈O [72.11]; Fluka Nr. 87371, puriss., absolut über Molekularsieb (H₂O ≤ 0.005 %), ≥99.5 %.

Toluol; C₇H₈ [92.31]; Merck-Schuchard 818765; > 99 % (GC).

6.1.5. Verwendete Pufferlösungen

Ionenpaarungspuffer für die HPLC:

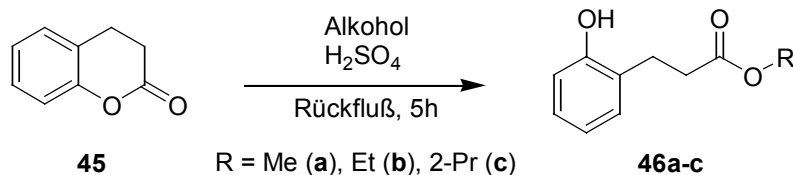
Es wurden 1000 ml Wasser und 6.6 ml Tetrabutylammoniumhydroxid vermischt und mit 85 %-iger Phosphorsäure der pH-Wert auf 3.8 eingestellt (Puffer I). Zu 60 ml des Puffers I wurden wiederum 1000 ml Wasser gegeben, um den eigentlichen Ionenpaarungspuffer zu erhalten (Puffer II).

50 mM Phosphatpuffer (pH 7.3) für die enzymkatalysierte Esterhydrolyse:

In 10 ml Wasser wurden 68.5 mg (385 µmol) Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat (Na₂HPO₄·2 H₂O) und 1.55 g (114 µmol) Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) gelöst und falls nötig der pH-Wert mittels verdünnter Phosphorsäure oder verdünnter Natronlauge auf 7.3 eingestellt.

6.2. Synthese der Saligenylalkohol-Derivate 58a-p und 62

6.2.1. Darstellung von Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionaten 46a-c nach AAV-1

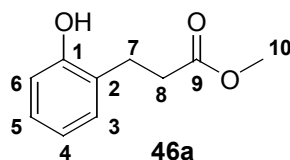


Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-1:

Zu 60 ml des entsprechenden, absoluten Alkohols wurden 10.4 g (70.0 mmol) Dihydrocoumarin **45** und 5 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Anschließend mußte das Reaktionsgemisch für 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt werden.

Zur Aufreinigung wurde zunächst der überschüssige Alkohol unter Vakuum abdestilliert. Danach blieb ein öliger Rückstand übrig, der in 50 ml Diethylether aufgenommen und mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt wurde. Die wäßrige Phase wurde verworfen und die Diethylether-Phase zweimal mit 30 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Diethylether-Lösung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt. Das isolierte Rohprodukt enthielt noch Spuren von Dihydrocoumarin **45**, die durch eine abschließende chromatographische Aufreinigung mit Hilfe des Chromatotröns (Dichlormethan mit einem Petrolether (45-65)-Gradienten von 50-0 %) entfernt werden konnten.

6.2.1.1. Darstellung von Methyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46a



Synthese und Aufreinigung erfolgte nach **AAV-1**.

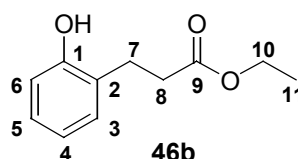
Ausbeute: 12.1 g (67.2 mmol, 96 %); farblose, feine Nadel

Schmelzpunkt: 41.5°C

DC: R_f -Wert (Dichlormethan): 0.56

$^1\text{H-NMR}$:	δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3): 7.33 (s, 1H, Aryl-OH); 7.16-7.10 (m, 1H, H5-Aryl); 7.12 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.91-6.85 (m, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 3.71 (s, 3H, H10); 2.96 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H8); 2.75 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H7)
$^{13}\text{C-NMR}$:	δ [ppm] (63 MHz, CDCl_3): 175.7 (C9); 154.1 (C1); 130.3 (C3); 127.8 (C2); 127.0 (C5); 120.6 (C4); 116.5 (C6); 52.0 (C10); 34.6 (C7); 24.9 (C8)
UV (CH_3CN):	λ_{max} : 298.77, 272.61 nm λ_{min} : 241.37 nm
IR (KBr):	ν^{-1} [cm^{-1}]: 3457 (OH), 3038, 1719 (CO), 1594, 1506, 1456, 1421, 1102, 989, 845, 786, 751, 707

6.2.1.2. Darstellung von Ethyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat 46b



Synthese und Aufreinigung erfolgte nach **AAV-1**.

Ausbeute: 13.6 g (56.7 mmol, 81 %), farblose, feine Nadeln

Schmelzpunkt: 34-35°C

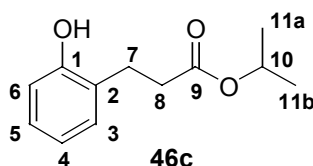
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.66

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3): 7.42 (s, 1H, Aryl-OH); 7.13 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 7.11 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.90 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.88 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 1H, H4-Aryl); 4.17 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, 2H, H10); 2.93 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H8); 2.74 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H7); 1.26 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, 3H, H11)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (63 MHz, CDCl_3): 175.4 (C9); 154.2 (C1); 130.3 (C3); 127.7 (C5); 127.1 (C2); 120.5 (C4); 116.6 (C6); 61.1 (C10); 34.9 (C8); 24.9 (C7); 14.0 (C11)

IR (KBr): ν^{-1} [cm⁻¹]: 3500 (OH), 1705 (CO)

6.2.1.3. Darstellung von *iso*-Propyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46c**



Synthese und Aufreinigung erfolgte nach **AAV-1**.

Ausbeute: 10.6 g (51.1 mmol, 73 %), farbloses Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.68

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.40 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.13 (ddd, $2 \times {}^3J_{H-H} = 7.6$ Hz, ${}^4J_{H-H} = 1.8$ Hz, 1H, H5-Aryl); 7.09 (dd, ${}^3J_{H-H} = 7.5$ Hz, ${}^4J_{H-H} = 1.7$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.92-6.85 (m, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 5.02 (sept, ${}^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, 1H, H10); 2.90 (t, ${}^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, 2H, H7); 2.69 (dd, ${}^3J_{H-H} = 6.5$ Hz, ${}^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, 2H, H8); 1.21 (d, ${}^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, 6H, H11a,b)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 175.0 (C9); 154.3 (C1); 130.4 (C3); 127.7 (C5); 127.2 (C2); 120.5 (C4); 116.6 (C6); 68.7 (C10); 35.2 (C8); 24.9 (C7); 21.6 (C11a,b)

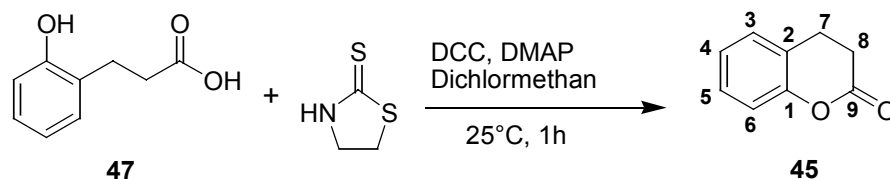
UV (CH₃CN): λ_{\max} : 272.61, 214.39, 202.32 nm
 λ_{\min} : 239.95, 210.84 nm

IR (Film): ν^{-1} [cm⁻¹]: 3398 (OH), 3038, 1702 (CO), 1609, 1595, 1506, 1491, 1458, 1375, 1236, 1105, 754

6.2.2. Darstellung der Alkyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionate **46d,e**

Die beiden Propionate **46d,e** konnten nicht nach der **AAV-1** hergestellt werden, weshalb ein alternativer Syntheseweg gefunden werden mußte. Die verschiedenen Ansätze und die schließlich erfolgreiche Synthese beider Verbindungen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

6.2.2.1. Versuch zur Darstellung von 3-[3-(2-Hydroxyphenyl)propanoyl]-1,3-thiazolidin-2-thion **48**



Es wurde eine Lösung von 2.18 g (13.1 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47**, 1.56 g (13.1 mmol) 1,3-Thiazolidin-2-thion und 160 mg (1.31 mmol) 4-DMAP in 22 ml Dichlormethan hergestellt. Zu diesem Gemisch wurden nun 2.97 g (14.4 mmol) DCC gegeben, woraufhin ein kristalliner Niederschlag entstand. Nach einer Stunde war das Edukt **47** vollständig verbraucht (DC-Kontrolle) und die Kristalle konnten durch Filtration abgetrennt werden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mit Hilfe des Chromatotrons aufgereinigt (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-20 %). Das erhaltene, mutmaßliche Produkt **48** stellte sich nach der $^1\text{H-NMR}$ -Analyse als Dihydrocumarin **45** heraus, dessen Bildung mit dieser Synthese gerade vermieden werden sollte.

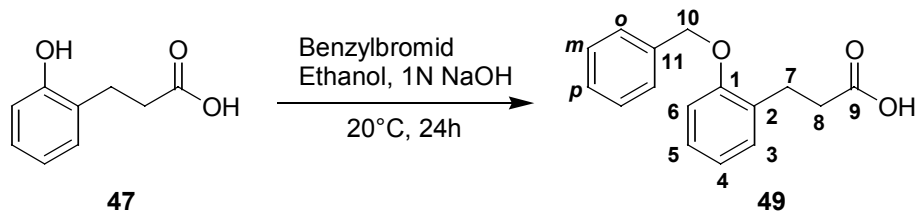
Ausbeute: 1.34 g (9.04 mmol Dihydrocumarin, 69 %), blaßgelbes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.80

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 7.29 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 1H, H3-Aryl); 7.26 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.9$, 1H, H5-Aryl); 7.11 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.04 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H, H6-Aryl); 2.97 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, 2H, H7); 2.77 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, 2H, H8)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 168.5 (C9); 151.8 (C1); 128.5 (C3); 128.1 (C5); 124.3 (C4); 123.6 (C2); 116.4 (C6); 28.7 (C8); 22.9 (C7)

6.2.2.2. Benzyl-Schützung von 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** zu 3-(2-Benzyloxyphenyl)propionsäure **49**



3.32 g (20.0 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** wurden in 60 ml Ethanol vorgelegt. Unter Rühren wurden bei Raumtemperatur nacheinander 40 ml 1 N NaOH-Lösung und 3.42 g (20.0 mmol) Benzylbromid, das zuvor in 10 ml Ethanol aufgenommen wurde, innerhalb von 2 Stunden zu getropft. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur abreagiert hatte, wurde die Lösung in 100 ml Eiswasser gegossen und unter starkem Rühren mit 37 %-iger Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Es entstand eine milchige Suspension, deren wäßrige Phase nach einer Diethylether-Extraktion (dreimal 30 ml) verworfen wurde. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und dem Entfernung des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfer wurde ein gelbbraunes Öl erhalten. Das reine Produkt wurde schließlich durch Flash-Chromatographie (Dichlormethan mit einem angesäuerten (0.10 % Essigsäure) Methanol-Gradienten von 0-30 %) erhalten.

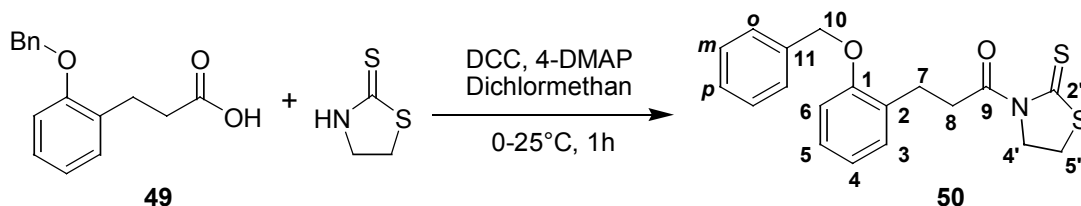
Ausbeute: 4.38 g (18.8 mmol, 94 %), gelbes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.74

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 12.04 (s(br), 1H, COOH); 7.47-7.44 (m, 2H, Ho-Ph); 7.39 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, Hm-Ph); 7.34-7.29 (m, 1H, Hp-Ph); 7.16 (dd, 1H, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, H5); 7.16 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H3); 7.01 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H, H6); 6.85 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H, H4); 5.12 (s, 2H, H10); 2.83 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H7); 2.49 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H8)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 174.1 (C9); 156.2 (C1); 137.6 (C11); 129.8 (C3); 129.0 (C2); 128.5 ($2 \times \text{Cm-Ph}$); 127.9 (Cp-Ph); 127.6 (C5); 127.4 ($2 \times \text{Co-Ph}$); 120.6 (C4); 112.1 (C6); 69.3 (C10); 33.8 (C8); 25.6 (C7)

6.2.2.3. Darstellung von 3-[3-(2-Benzyloxyphenyl)propanoyl]-1,3-thiazolidin-2-thion 50



Es wurden 1.25 g (4.88 mmol) 3-(2-Benzyloxyphenyl)propionsäure **49**, 582 mg (4.88 mmol) 1,3-Thiazolidin-2-thion und 60 mg (0.49 mmol) 4-DMAP in 10 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C abgekühlt. Unter Rühren wurden nun 1.11 g (5.36 mmol) DCC zugegeben. Nach 5 Minuten entfernte man das Eisbad und rührte 30 Minuten weiter. Dabei färbte sich die Lösung gelb und ein farbloser, kristalliner Feststoff fiel aus. Der Niederschlag wurde durch Filtration abgetrennt und die Kristalle mit Dichlormethan gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Danach blieb ein gelbes Öl als Rohprodukt zurück, welches mit Hilfe des Chromatotrons aufgereinigt werden konnte (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-20 %).

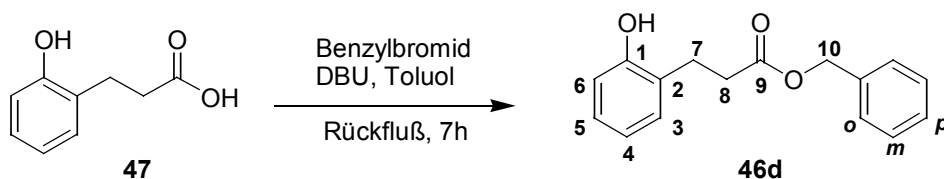
Ausbeute: 1.68 g (4.70 mmol, 96 %), hellgelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.81

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3): 7.46-7.42 (m, 2H, Ho-Ph); 7.40 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 2H, Hm-Ph); 7.35-7.31 (m, 1H, Hp-Ph); 7.22 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H3-Aryl); 7.19 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H5-Aryl); 6.93-6.89 (m, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 5.10 (s, 2H, H10); 4.52 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H4'); 3.62 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H, H7); 3.21 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H5'); 3.07 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H, H8)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (126 MHz, CDCl_3): 201.3 (C2'); 174.4 (C9); 156.7 (C1); 137.2 (C11); 130.3 (C3); 129.0 (C2); 128.8 (2×Cm-Ph); 127.8 (C5); 127.6 (Cp-Ph); 127.3 (2×Co-Ph); 120.7 (C4); 111.6 (C6); 69.8 (C10); 56.0 (C4'); 38.4 (C8); 28.3 (C5'); 26.1 (C7)

6.2.2.4. Darstellung von Benzyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46d**



Zu einer röhrenden Lösung von 2.08 g (12.5 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** in 30 ml trockenem Toluol wurden 1.87 ml DBU und 1.48 ml (12.5 mmol) Benzylbromid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nun 7 Stunden unter Rückfluß erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser und einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit einer konzentrierten Natriumchlorid-Lösung vorgetrocknet. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat konnte schließlich das Lösungsmittel entfernt werden. Das reine Produkt wurde nach der Aufreinigung mit Hilfe des Chromatotröns (*n*-Hexan mit einem Ethylacetat-Gradienten von 10-50 %) erhalten.

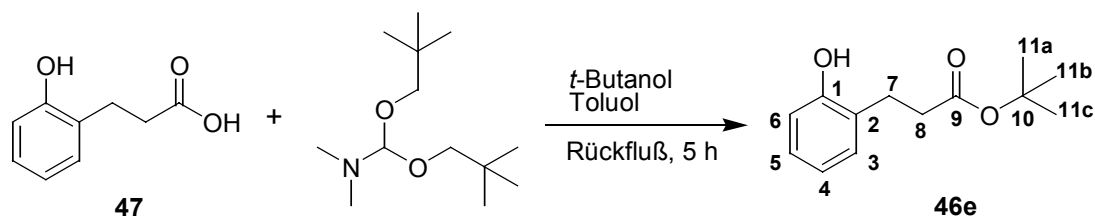
Ausbeute: 3.11 g (12.1 mmol, 97 %), blaßgelbes Öl

DC: R_f -Wert (*n*-Hexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.48

R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.71

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.36 (s, 1H, Aryl-OH); 7.37-7.29 (m, 5H, Ph); 7.02 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 1H, H3-Aryl); 7.00 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H5-Aryl); 6.77 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.67 (ddd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 1H, H4-Aryl); 5.06 (s, 2H, H10); 2.79 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H7); 2.61 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, 2H, H8)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.6 (C9); 155.3 (C1); 136.4 (C11); 129.9 (C3); 128.6 (2 \times C m -Ph); 128.1 (C p -Ph); 128.1 (2 \times C o -Ph); 127.4 (C5); 126.5 (C2); 119.1 (C4); 115.0 (C6); 65.5 (C10); 33.7 (C8); 25.7 (C7)

6.2.2.5. Darstellung von *tert*-Butyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46e**

Eine Lösung von 1.50 g (9.03 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47** und 8.70 g (117 mmol) *tert*-Butanol in 22 ml Toluol wurde bis zum Rückfluß erhitzt. Zu diesem siedenden Gemisch wurden 6.27 g (27.1 mmol) *N,N*-DMF-Dineopentylacetal in etwa einer halben Stunde zugetropft. Nach insgesamt 5 Stunden Reaktionszeit ließ man den Ansatz auf Raumtemperatur abkühlen. Um den überschüssigen *tert*-Butanol und eventuell nicht umgesetztes Edukt **47** zu entfernen, wurde die organische Phase nacheinander mit einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat konnte das Lösungsmittel entfernt und der ölige Rückstand mittels Chromatotron (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-20 %) aufgereinigt werden.

Ausbeute: 1.62 g (7.29 mmol, 81 %), farbloses Öl

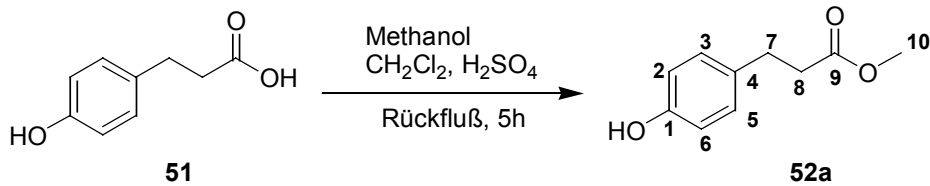
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.61

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 8.06 (s, 1H, Aryl-OH); 7.13 (ddd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, ${}^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 7.08 (dd, ${}^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, ${}^4J_{\text{H-H}} = 1.6$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.90 (dd, ${}^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, ${}^4J_{\text{H-H}} = 1.0$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.86 (ddd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, ${}^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H, H4-Aryl); 2.86 (t, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 2H, H7); 2.65 (t, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 2H, H8); 1.43 (s, 9H, H11a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 174.5 (C9); 153.8 (C1); 129.9 (C3); 127.3 (C5); 126.7 (C2); 120.0 (C4); 116.2 (C6); 73.5 (C10); 35.8 (C8); 26.8 (C11a-c); 25.6 (C7)

6.2.3. Synthesen der Alkyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionate 52a-d

6.2.3.1. Darstellung von Methyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 52a



Zu 6 ml absolutem Methanol wurden 2.49 g (15.0 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **51** und 2-3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Anschließend mußte das Reaktionsgemisch für 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt werden. Dabei wurde das entstehende Reaktionswasser kontinuierlich mit einem Wasserabscheider entfernt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch nacheinander mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende Rohprodukt konnte durch eine Trennung am Chromatotron (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-20 %) aufgereinigt werden.

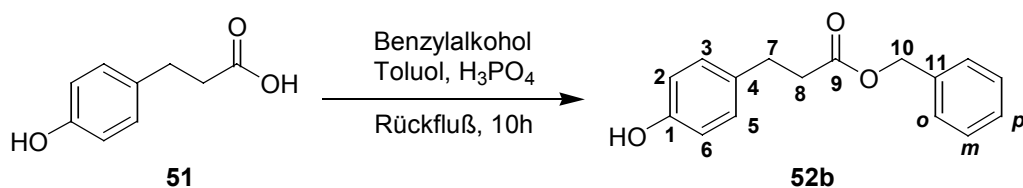
Ausbeute: 2.51 g (13.9 mmol, 93 %), farbloser Feststoff

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.70

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.07 (d, ³J_{H-H}= 8.3 Hz, 2H, H3-Aryl+H5-Aryl); 6.76 (d, ³J_{H-H}= 8.4 Hz, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 3.68 (s, 3H, H10); 2.89 (t, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, 2H, H7); 2.61 (t, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, 2H, H8)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 173.6 (C9); 154.0 (C1); 132.6 (C4); 129.4 (C5+C3); 115.3 (C2+C6); 51.6 (C10); 36.0 (C8); 30.1 (C7)

6.2.3.2. Darstellung von Benzyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat 52b



Ein Gemisch aus 7.00 g (42.1 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **51**, 13 ml Benzylalkohol und 3 Tropfen 85 %-ige Phosphorsäure in 80 ml Toluol wurde bis zum Rückfluß erhitzt, wobei man das entstehende Reaktionswasser mit Hilfe einer Dean-Stark-Apparatur abtrennte. Das verdampfende Toluol/Wasser-Gemisch wurde bei einer Reaktionstemperatur von 145-150°C 10 Stunden kontinuierlich destilliert. Anschließend konnte unter Ölpumpenvakuum (1 Torr) bei einer Ölbadtemperatur von 150°C der überschüssige Benzylalkohol entfernt werden. Das zurückbleibende, ölige Rohprodukt wurde nun in Diethylether aufgenommen, mit einer gesättigten Natriumhydrogen-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das reine Produkt **52b** konnte schließlich durch Destillation im Ölpumpenvakuum (Ölbad: 235°C, Übergangstemperatur: 185-190°C) erhalten werden.

Ausbeute: 7.92 g (30.9 mmol, 73 %), blaßgelbes, zähes Öl

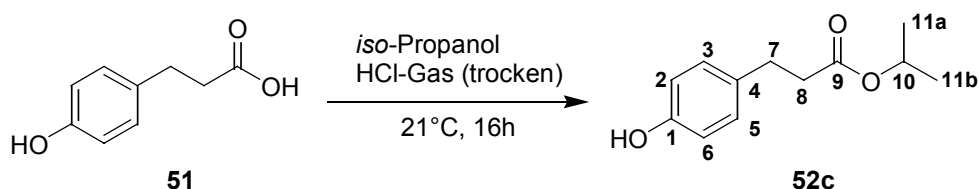
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.85

R_f -Wert (Dichlormethan/Diethylether 9:1 v/v): 0.47

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.15 (s, 1H, Aryl-OH); 7.36-7.27 (m, 5H, Ph); 6.98 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.4$ Hz, 2H, H3-Aryl+H5-Aryl); 6.64 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H, H4-Aryl+H6-Aryl); 5.06 (s, 2H, H10); 2.74 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H7); 2.60 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H, H8)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.4 (C9); 155.8 (C1); 136.4 (C11); 130.6 (C4); 129.3 (C5+C3); 128.6 (2×Cm-Ph); 128.1 (Cp-Ph); 128.0 (2×Co-Ph); 115.3 (C2+C6); 65.5 (C10); 35.7 (C8); 29.7 (C7)

6.2.3.3. Darstellung von *iso*-Propyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52c**



Zu einer rührenden Lösung von 3.34 g (20.1 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **51** in 150 ml (1.95 mol) *iso*-Propanol wurde trockenes Chlorwasserstoff-Gas eingeleitet. Dabei erwärmte sich die Lösung bis zum Sieden des Alkohols. Nach ei-

ner Stunde wurde der Vorgang abgebrochen. Zur Vervollständigung wurde die Reaktionslösung unter einer Argonatmosphäre bei Raumtemperatur 16 Stunden weiter gerührt. Das Lösungsmittel konnte danach am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende farblose, zähe Öl mit Hilfe des Chromatotrons (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0 bis 20 %) aufgereinigt werden.

Ausbeute: 2.60 g (12.5 mmol, 62 %), farbloser Feststoff

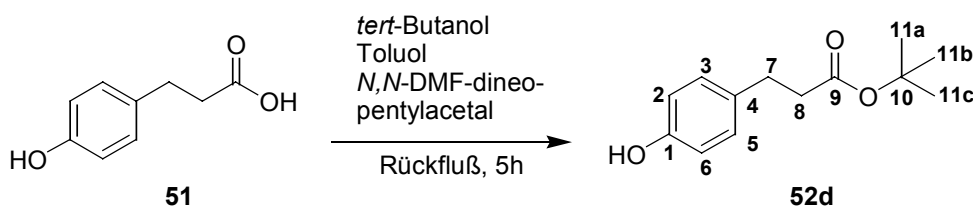
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.71

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.12 (s, 1H, Aryl-OH); 6.98 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 2H, H3-Aryl+H5-Aryl); 6.64 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 4.84 (sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H, H10); 2.70 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H7); 2.47 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H8); 1.12 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 6H, H11a,b)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 171.9 (C9); 155.7 (C1); 132.6 (C4); 129.2 (C5+C3); 115.2 (C2+C6); 67.1 (C10); 36.0 (C8); 29.7 (C7); 21.7 (C11a,b)

IR (NaCl): ν^{-1} [cm^{-1}]: 3412, 3024, 1712 (CO), 1613, 1595, 1519, 1449, 1377, 1298, 1266, 1149, 1108, 904, 837, 820, 609

6.2.3.4. Darstellung von *tert*-Butyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52d**



Eine Lösung von 1.99 g (12.0 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **51** und 11.6 g (156 mmol) *tert*-Butanol in 25 ml Toluol wurde bis zum Rückfluß erhitzt. Zu diesem siedenden Gemisch wurden 8.33 g (36.0 mmol) *N,N*-DMF-Dineopentylacetal in etwa einer halben Stunde zugetropft. Nach insgesamt 5 Stunden Reaktionszeit ließ man den Ansatz auf Raumtemperatur abkühlen. Um den überschüssigen *tert*-Butanol und nicht umgesetztes Edukt **51** zu entfernen, wurde die organische Phase mit einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat konnte das Lösungsmittel entfernt und der ölige Rückstand mit

dem Chromatotron (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-20 %) aufgereinigt werden.

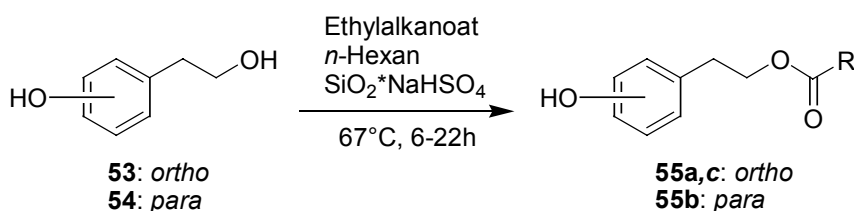
Ausbeute: 1.96 g (8.82 mmol, 73 %), farbloser Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.79

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.05 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 2H, H3-Aryl+H5-Aryl); 6.75 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 2.84 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H7); 2.51 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 1.42 (s, 9H; 11a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.7 (C9); 154.3 (C1); 132.4 (C4); 129.3 (C5+C3); 115.2 (C2+C6); 73.5 (C10); 37.4 (C8); 30.3 (C7); 28.0 (C11a-c)

6.2.4. Synthesen der 2-(2-Hydroxyphenyl)- und 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethylalkanoate 55a-c nach AAV-2

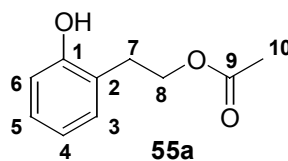


Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-2:

Zu einem Gemisch von 1 mmol des entsprechenden Diols in 15 ml einer 30 %-igen Lösung von Ethylacetat in *n*-Hexan wurden 100 mg des $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ -Katalysators gegeben, dessen Darstellung nachfolgend beschrieben ist. Danach wurde unter Rühren die Temperatur auf 67°C erhöht und in regelmäßigen Abständen der Reaktionsverlauf mit Hilfe der DC verfolgt. Sobald das Edukt vollständig verbraucht war, wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, der Katalysator mit einem einfachen Papierfilter abgetrennt und der Katalysator mit etwas Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten, organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und das isolierte, ölige Rohprodukt am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-20 %).

Darstellung des NaHSO₄·SiO₂-Katalysators:

In einem Becherglas wurden 4.14 g (0.03 mol) NaHSO₄·H₂O in 20 ml Wasser gelöst und mit 10 g Silicagel (SiO₂; säulenchromatographische Qualität, 60 Å, 200-400 mesh) vermischt. Dieses Gemisch wurde zunächst 15 Minuten gerührt und anschließend unter leichtem Erwärmen so lange gerührt, bis ein trockenes Pulver entstanden war. Der Katalysator mußte zum weiteren Trocknen noch 48 Stunden bei 120°C gebacken werden und war danach fertig zum Gebrauch.

6.2.4.1. Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylacetat 55a

Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-2** (siehe Abschnitt 6.2.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.68 g (19.4 mmol) 2-(2-Hydroxyphenyl)ethanol **53**, 1.94 g NaHSO₄·SiO₂-Katalysator, 88 ml Ethylacetat, 204 ml *n*-Hexan, Reaktionszeit: 18 h;

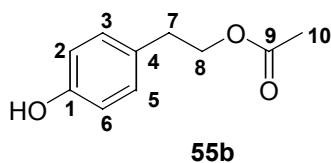
Ausbeute: 3.04 g (16.9 mmol, 87 %), kristalliner, farbloser Feststoff

DC: R_F-Wert (*n*-Hexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.44

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.08 (s, 1H, Aryl-OH); 7.13 (ddd, 2×³J_{H-H}= 7.7 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.6 Hz, 1H, H5-Aryl); 7.12 (dd, ³J_{H-H}= 7.5 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.6 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88 (dd, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.3 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.84 (dd, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.0 Hz, 1H, H6-Aryl); 4.29 (t, ³J_{H-H}= 7.0 Hz, 2H, H8); 2.97 (t, ³J_{H-H}= 7.0 Hz, 2H, H7); 2.09 (s, 3H, H10)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 172.0 (C9); 154.8 (C1); 130.9 (C3); 128.3 (C5); 123.6 (C2); 120.7 (C4); 115.9 (C6); 64.5 (C8); 30.1 (C7); 21.0 (C10)

6.2.4.2. Darstellung von 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylacetat **55b**



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-2** (siehe Abschnitt 6.2.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.68 g (19.4 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol **54**, 1.94 g NaHSO₄·SiO₂-Katalysator, 88 ml Ethylacetat, 204 ml *n*-Hexan, Reaktionszeit: 18 h;

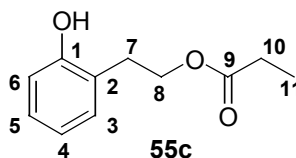
Ausbeute: 3.04 g (16.9 mmol, 87 %), kristalliner, farbloser Feststoff

DC: R_F-Wert (*n*-Hexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.44

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.08 (s, 1H, Aryl-OH); 7.13 (ddd, 2×³J_{H-H}= 7.7 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.6 Hz, 1H, H5-Aryl); 7.12 (dd, ³J_{H-H}= 7.5 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.6 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88 (dd, ³J_{H-H}= 7.6 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.3 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.84 (dd, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.0 Hz, 1H, H6-Aryl); 4.29 (t, ³J_{H-H}= 7.0 Hz, 2H, H8); 2.97 (t, ³J_{H-H}= 7.0 Hz, 2H, H7); 2.09 (s, 3H, H10)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 172.0 (C9); 154.8 (C1); 130.9 (C3); 128.3 (C5); 123.6 (C2); 120.7 (C4); 115.9 (C6); 64.5 (C8); 30.1 (C7); 21.0 (C10)

6.2.4.3. Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpropionat **55c**



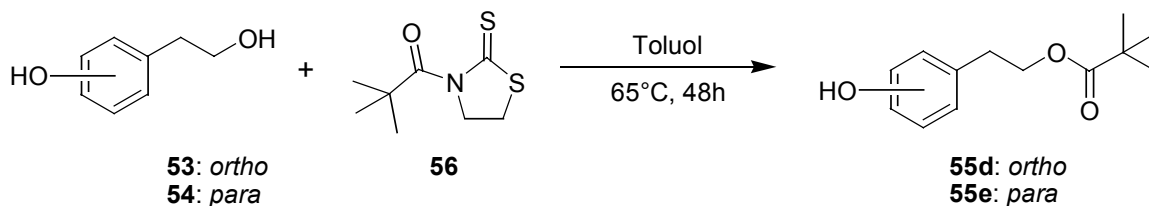
Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-2** (siehe Abschnitt 6.2.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.53 g (11.0 mmol) 2-(2-Hydroxyphenyl)ethanol **53**, 1.10 g NaHSO₄·SiO₂-Katalysator, 60 ml Ethylpropionat, 140 ml *n*-Hexan, Reaktionszeit: 22 h;

Ausbeute: 1.66 g (9.16 mmol, 83 %), farbloses Öl

DC:	R _F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.68
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, CDCl ₃): 7.12 (ddd, 2× ³ J _{H-H} = 7.6 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.7 Hz, 1H, H5-Aryl); 7.10 (dd, ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.7 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88 (dd, ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.3 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.84 (dd, ³ J _{H-H} = 7.6 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.2 Hz, 1H, H6-Aryl); 4.32 (t, ³ J _{H-H} = 7.0 Hz, 2H, H8); 2.98 (t, ³ J _{H-H} = 7.0 Hz, 2H, H7); 2.37 (q, ³ J _{H-H} = 7.7 Hz, 2H, H10); 1.16 (t, ³ J _{H-H} = 7.7 Hz, 3H, H11)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, CDCl ₃): 174.6 (C9); 154.8 (C1); 130.9 (C3); 128.3 (C5); 123.6 (C2); 120.7 (C4); 115.9 (C6); 64.7 (C8); 30.1 (C7); 27.8 (C10); 9.4 (C11)

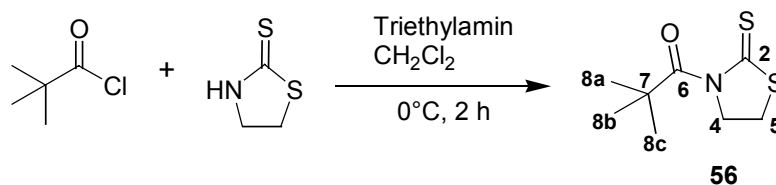
6.2.5. Synthesen der 2-(2-Hydroxyphenyl)- und 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethylpivalate **55d,e** nach AAV-3



Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-3:

Ein Gemisch von 1.0 mmol des entsprechenden Diols und 1.1 mmol des „twisted-Amids“ **56**, dessen Darstellung nachfolgend beschrieben ist, wurden in 20 ml trockenem Toluol für 48 Stunden bei 65°C gerührt. Danach wurde der Erfolg der Umsetzung mittels DC-Kontrolle überprüft. Wenn noch Edukt nachzuweisen war, wurde die Reaktionszeit entsprechend verlängert. Anschließend mußte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das isolierte, ölige Rohprodukt durch eine zweifache Trennungen (1. Eluent: *n*-Hexan/Ethylacetat 3:1 v/v; 2. Eluent: *n*-Hexan/Diethylether 7:3 v/v) am Chromatotron aufgereinigt werden.

Darstellung von 3-Pivaloyl-1,3-thiazolidin-2-thion **56** („twisted-Amid“):



Zu einer Lösung von 3.00 g (25.2 mmol) 1,3-Thiazolidin-2-thion und 5.00 g (50.0 mmol) Triethylamin in 60 ml Dichlormethan wurden bei 0°C 3.62 g (30.2 mmol) Pivaloylchlorid zugetropft. Danach wurde das Gemisch für 2 Stunden bei 0°C weiter gerührt. Durch die Zugabe von Wasser wurde die Reaktion beendet, die organische Phase abgetrennt und diese über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittel blieb ein gelber Feststoff zurück, der in einem *n*-Hexan/Diethylether-Gemisch (2:1 v/v) aufgenommen wurde und die unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Aus dem Filtrat konnte das Produkt durch die Zugabe von *n*-Hexan auskristallisiert werden.

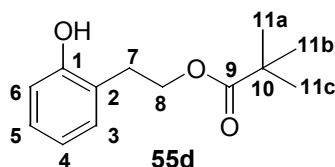
Ausbeute: 4.52 g (22.2 mmol, 88 %), fahlgelbe Plättchen

DC: R_f -Wert (n-Hexan/Ethylacetat 3:1 v/v): 0.42

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 4.24 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H4); 3.61 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H, H5); 1.31 (s, 9H, H8a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 199.9 (C2); 187.7 (C6); 57.5 (C4); 43.9 (C7); 32.0 (C5); 27.3 (C8a-c)

6.2.5.1. Darstellung von 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpivalat **55d**



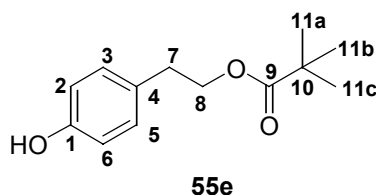
Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-3** (siehe Abschnitt 6.2.5.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.90 g (13.7 mmol) 2-(2-Hydroxyphenyl)ethanol **53**, 3.07 g (15.1 mmol) 3-Pivaloyl-1,3-thiazolidin-2-thion **56**, 200 ml Toluol;

Ausbeute: 2.46 g (11.1 mmol, 80 %), farbloses Öl

DC:	R _F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60 R _F -Wert (<i>n</i> -Hexan/Diethylether 7:3 v/v): 0.32
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, CDCl ₃): 8.01 (s, 1H, Aryl-OH); 7.12 (ddd, 2× ³ J _{H-H} = 7.7 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.8 Hz, 1H, H5-Aryl); 7.10 (dd, ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.8 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.85 (ddd, 2× ³ J _{H-H} = 7.4 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.2 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.83 (dd, ³ J _{H-H} = 7.9 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.1 Hz, 1H, H6-Aryl); 4.27 (t, ³ J _{H-H} = 7.1 Hz, 2H, H8); 2.95 (t, ³ J _{H-H} = 7.1 Hz, 2H, H7); 1.19 (s, 9H, H11a-c)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, CDCl ₃): 176.8 (C9); 154.5 (C1); 130.9 (C3); 128.2 (C5); 123.5 (C2); 120.5 (C4); 115.8 (C6); 64.3 (C8); 38.8 (C10); 30.1 (C7); 27.1 (C11a-c)
IR (Film):	ν ⁻¹ [cm ⁻¹]: 3418, 1704 (CO), 1481, 1458, 1292, 1233, 1170, 753

6.2.5.2. Darstellung von 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylpivalat **55e**



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-3** (siehe Abschnitt 6.2.5.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.76 g (20.0 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol **54**, 4.47 g (22.0 mmol) 3-Pivaloyl-1,3-thiazolidin-2-thion **56**, 200 ml Toluol;

Ausbeute: 2.27 g (10.2 mmol, 51 %), farbloses Öl

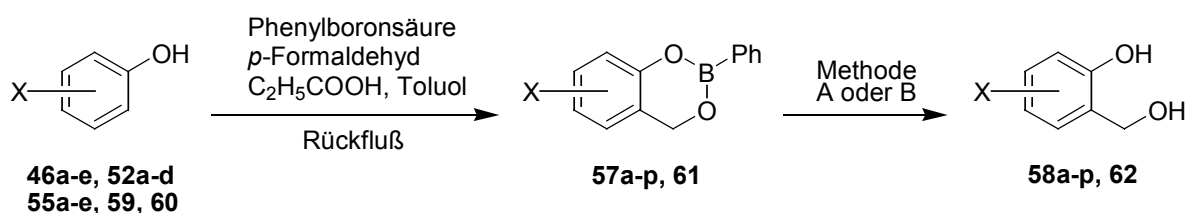
DC: R_F-Wert (*n*-Hexan/Ethylacetat 3:1 v/v): 0.81

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.09 (d, ³J_{H-H}= 8.6 Hz, 2H, H3-Aryl+H5-Aryl); 6.78 (d, ³J_{H-H}= 8.4 Hz, 2H, H4-Aryl+H6-Aryl); 4.24 (t, ³J_{H-H}= 6.9 Hz, 2H, H8); 2.87 (t, ³J_{H-H}= 6.9 Hz, 2H, H7); 1.17 (s, 9H, H11a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 177.2 (C9); 154.4 (C1); 130.0 (C3+C5); 129.8 (C4); 115.3 (C2+C6); 65.2 (C8); 38.7 (C10); 34.2 (C7); 27.1 (C11a-c)

IR (Film): ν^{-1} [cm^{-1}]: 3403, 2973, 1704, 1517, 1292, 1225, 1169

6.2.6. α -Hydroxymethylierung der Phenolderivate 46a-e, 52a-d, 55a-e, 59 und 60 nach AAV-4



Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-4:

2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin-Synthese 57a-q:

Das Reaktionsgemisch, bestehend aus dem entsprechenden Phenolderivat (1 Äquivalent), Phenylboronsäure (1.2 Äquivalente), *para*-Formaldehyd (2 Äquivalente) und Propionsäure ($\frac{1}{2}$ Äquivalent), wurde in trockenem Toluol bis zum Rückfluß erhitzt. Das entstehende Reaktionswasser entfernte man dabei mit Hilfe einer Dean-Stark-Apparatur durch azeotrope Destillation. Nach 2 Stunden wurde das Fortschreiten der Reaktion mittels DC-Kontrolle überprüft und weitere 2 Äquivalente *para*-Formaldehyd zugegeben. Dieser Schritt mußte so oft wiederholt werden, bis das Phenolderivat und die Phenylboronsäure vollständig umgesetzt waren (mindestens aber dreimal). Das entstandene Produkt war immer gut als stark UV-absorbierende Bande zu erkennen.

Nach ausreichender Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers abdestilliert und der zurückgebliebene Rückstand in 80 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde nun nacheinander mit einer 10 %-igen Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat konnte das Lösungsmittel entfernt werden. Das Produkt wurde als schwachgelbes, zähes Öl erhalten, das nach dem Abkühlen kristallisierte. In den meisten Fällen war dieses Zwischenprodukt rein genug, um ohne weitere Aufreinigung für die Hydrolyse zum Saligenol-Derivat verwendet werden zu können. Wenn dies nicht der Fall war, wurde eine chromatographische Trennung mit der entspre-

chenden Methode (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 0-10 %) durchgeführt.

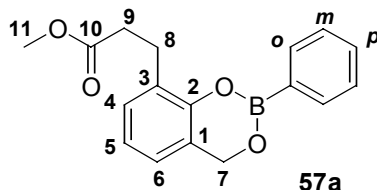
Hydrolyse der 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborine 57a-q zu den Saligenol-Derivaten 58a-q nach Methode A oder B:

Methode A: Ein Gemisch aus dem entsprechenden 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin-Derivat (10 mmol), 1,3-Propandiol (0.2 mol) und Toluol (20 ml) wurde für 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 50 ml Wasser hinzugegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit je 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand enthält neben dem Saligenol-Derivat auch das durch Umesterung entstandene 2-Phenyl-4H-benzo[1,3,2]-dioxaborinan, das sich relativ einfach chromatographisch von dem viel polarerem Saligenol abtrennen ließ (*n*-Hexan mit einem Diethylether-Gradienten von 30-60 %).

Methode B: Das 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin-Derivat (10 mmol) wurde in THF (20 ml) aufgenommen und bei 0°C mit einer 30 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung (10 ml) versetzt. Nachdem maximal (DC-Kontrolle) eine halbe Stunde gerührt war, wurde das Reaktionsgemisch zu 50 ml Wasser gegossen und viermal mit 20 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden mit einer Natriumhydrogensulfit-Lösung gewaschen, um überschüssiges Perhydrol zu zerstören. Nach dem Ausschütteln mit einer gesättigten NaCl-Lösung wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel konnte nun abdestilliert werden und es blieb ein Gemisch aus dem Saligenol-Derivat und dem Oxidationsnebenprodukt Phenol zurück. Die Trennung der beiden Produkte mit Hilfe des Chromatotrons war je nach Saligenol-Derivat mehr oder weniger problematisch. Als optimaler Eluent für diese Aufgabe stellte sich ein Gemisch von *n*-Hexan und Diethylether heraus. Der Salicylalkohol sollte zum Auftragen in *n*-Hexan mit einem möglichst geringen Diethylether-Anteil gelöst werden. Außerdem sollte der Gradient zu Beginn der Trennung nicht allzu schnell verändert werden (Diethylether-Gradient von 10-60 %).

6.2.6.1. Darstellung von Methyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionat 58a

Methyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)propionat-Synthese 57a:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.21 g (12.3 mmol) Methyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46a**, 1.79 g (14.7 mmol) Phenylboronsäure, 454 mg (6.13 mmol) Propionsäure, 2.94 g (98.1 mmol) *para*-Formaldehyd;

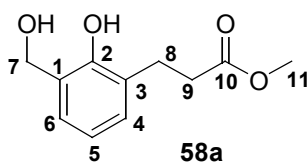
Ausbeute: 2.37 g (8.01 mmol, 65 %), fahlgelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.81

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.99-7.98 (m, 2H, Ho-Ph); 7.54-7.50 (m, 1H, Hp-Ph); 7.46-7.41 (m, 2H, Hm-Ph); 7.12 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 0.9$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.99 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 6.90 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz; 1H, H6-Aryl); 5.24 (s, 2H, H7); 3.70 (s, 3H, H11); 3.14 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 2.76 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H9)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 168.5 (C10); 147.0 (C2); 134.3 ($2 \times \text{Co-Ph}$); 131.6 (Cp-Ph); 129.9 (C1); 129.3 (C4); 127.8 ($2 \times \text{Cm-Ph}$); 126.8 (C3); 123.1 (6); 122.8 (C5); 122.6 (C-B); 63.0 (C7); 51.6 (C11); 34.2 (C9); 25.6 (C8)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57a zum Salicylalkohol 58a:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.37 g (8.01 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57a**, 8 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 15 ml THF;

Ausbeute: 1.29 g (6.17 mmol, 77 %), farbloses Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.67

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3): 8.11 (s, 1H, Aryl-OH); 7.05 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.95 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.79 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 1H, H5-Aryl); 4.79 (s, 2H, H7); 3.68 (s, 3H, H11); 2.96 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, 2H, H8); 2.63 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, 2H, H9)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (63 MHz, CDCl_3): 175.2 (C10); 153.9 (C2); 130.0 (C4); 127.7 (C1); 126.4 (C6); 125.8 (C3); 119.9 (C5); 64.2 (C7); 51.9 (C11); 34.4 (C9); 25.0 (C8)

IR (Film): ν^{-1} [cm^{-1}]: 3358 (OH), 1712 (C=O), 1595, 1465, 1369, 1227, 1083, 1006, 845, 779, 750

UV (CH_3CN): λ_{max} : 275.06, 208.82 nm

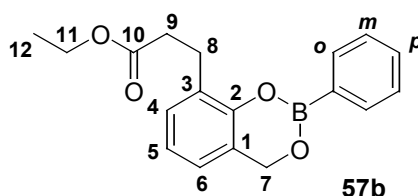
λ_{min} : 240.56 nm

MS(ESI^- , m/z): ber.: 210.2 (M)

gef.: 209.4 (M-H^+)

6.2.6.2. Darstellung von Ethyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionat **58b**

*Ethyl-3-(2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)propionat-Synthese **57b**:*



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

3.17 g (16.3 mmol) Ethyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46b**, 2.39 g (19.6 mmol) Phenylboronsäure, 604 mg (8.16 mmol) Propionsäure, 3.92 g (130.6 mmol) *para*-Formaldehyd;

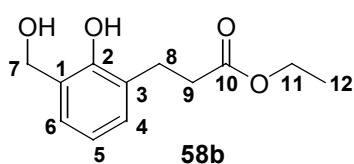
Ausbeute: 4.05 g (13.1 mmol, 80 %), fahlgelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.72

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 8.00-7.97 (m, 2H, Ho-Ph); 7.55-7.50 (m, 1H, Hp-Ph); 7.46-7.41 (m, 2H, Hm-Ph); 7.15 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.99 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H5-Aryl); 6.90 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz; 1H, H6-Aryl); 5.24 (s, 2H, H7); 4.16 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 2H, H11); 3.14 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 2.74 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H9); 1.27 (s, 3H, H12)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 173.1 (C10); 147.0 (C2); 134.3 ($2 \times \text{Co-Ph}$); 131.5 (Cp-Ph); 129.3 (C1); 129.3 (C4); 127.8 ($2 \times \text{Cm-Ph}$); 123.1 (C6); 122.8 (C5); 122.3 (C-B); 62.9 (C7); 60.4 (C11); 34.4 (C9); 25.7 (C8); 14.2 (12)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57b zum Salicylalkohol 58b:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

4.00 g (13.0 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57b**, 13 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 26 ml THF;

Ausbeute: 2.58 g (11.5 mmol, 88 %), farbloses Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.63

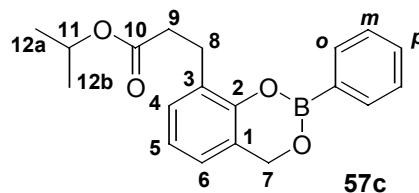
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.51 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.06 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.6$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.96 (dd, $^3J_{\text{H-H}} =$

7.5 Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.6$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.72 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H5-Aryl); 5.38 (s(br), 1H, Bn-OH); 4.56 (s, 2H, H7); 4.03 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 2H, H11); 2.80 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz; 2H, H8); 2.52 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H9); 1.15 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 3H, H12)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.7 (C10); 152.6 (C2); 128.4 (C4); 128.3 (C1); 127.4 (C3); 125.8 (C6); 119.4 (C5); 60.2 (C7); 60.0 (C11); 33.9 (C9); 25.5 (C8); 14.3 (C12)

6.2.6.3. Darstellung von *iso*-Propyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionat 58c

iso-Propyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)propionat-Synthese 57c:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.00 g (9.60 mmol) *iso*-Propyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46c**, 1.41 g (11.6 mmol) Phenylboronsäure, 355 mg (4.80 mmol) Propionsäure, 1.69 g (56.3 mmol) *para*-Formaldehyd;

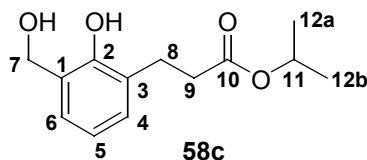
Ausbeute: 2.06 g (6.35 mmol, 66 %), schwach gelbes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.83

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.99 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H-B}} = 3.0$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 2H, Ho-Ph); 7.54-7.50 (m, 1H, Hp-Ph); 7.45-7.41 (m, 2H, Hm-Ph); 7.14 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.98 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 6.89 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz; 1H, H6-Aryl); 5.24 (s, 2H, H7); 5.05 (sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H, H11); 3.13 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 2.71 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H9); 1.24 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 6H, H12a,b)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (125 MHz, CDCl_3): 172.6 (C10); 147.0 (C2); 134.3 (2 \times Co-Ph); 131.5 (Cp-Ph); 129.3 (C1); 129.3 (C4); 127.9 (C3); 127.8 (2 \times Cm-Ph); 123.0 (C6); 122.8 (C5); 122.3 (C-B); 67.6 (C11); 63.0 (C7); 34.7 (C9); 25.8 (C8); 21.8 (C12a,b)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57c zum Salicylalkohol 58c:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.06 g (6.35 mmol) 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57c**, 6.5 ml 30%-iges Wasserstoffperoxid, 13 ml THF;

Ausbeute: 750 mg (3.10 mmol, 49 %), gelbes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.72

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.50 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.06 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.96 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.72 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 5.38 (s(br), 1H, Bn-OH); 4.86 (sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H, H11); 4.56 (s, 2H, H7); 2.79 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 2.49 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H9); 1.14 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 6H, H12a,b)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d_6): 172.2 (C10); 152.6 (C2); 128.4 (C4); 128.2 (C1); 127.3 (C3); 125.8 (C6); 119.3 (C5); 67.2 (C11); 60.2 (C7); 34.2 (C9); 25.5 (C8); 21.8 (C12a,b)

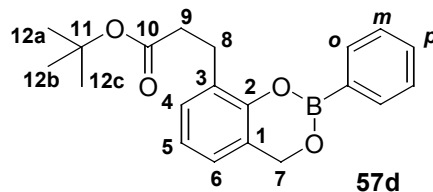
UV (CH_3CN): λ_{max} : 275.06, 211.58 nm

λ_{min} : 241.94 nm

IR (Film): ν^{-1} [cm^{-1}]: 3352 (OH), 1705 (C=O), 1596, 1467, 1375, 1268, 1228, 1107, 1083, 1009, 940, 836, 778, 749

6.2.6.4. Darstellung von *tert*-Butyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionat **58d**

tert-Butyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)propionat-Synthese **57d**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.20 g (8.72 mmol) *tert*-Butyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46d**, 1.28 g (10.5 mmol) Phenylboronsäure, 323 mg (4.36 mmol) Propionsäure, 2.09 g (69.8 mmol) *para*-Formaldehyd;

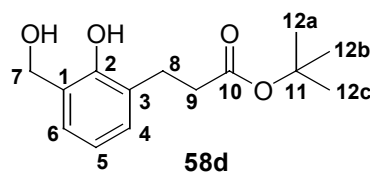
Ausbeute: 1.97 g (5.82 mmol, 66 %), schwach gelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.89

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 8.00-7.97 (m, 2H, H_o -Ph); 7.55-7.50 (m, 1H, H_p -Ph); 7.46-7.41 (m, 2H, H_m -Ph); 7.14 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H_4 -Aryl); 6.98 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H_5 -Aryl); 6.89 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz; 1H, H_6 -Aryl); 5.24 (s, 2H, H_7); 3.10 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, 2H, H_8); 2.65 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, 2H, H_9); 1.47 (s, 9H, H_{12a-c})

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.5 (C10); 147.0 (C2); 134.3 (2 \times C o -Ph); 131.5 (C p -Ph); 129.5 (C4); 129.0 (C1), 127.9 (C3); 127.8 (2 \times C m -Ph); 123.0 (C6); 122.7 (C5); 122.4 (C-B); 80.3 (C11); 63.0 (C7); 35.6 (C9); 28.1 (12a-c); 25.8 (C8)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57d** zum Salicylalkohol **58d**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.97 g (5.82 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57d**, 6.0 ml 30%-iges Wasserstoffperoxid, 12 ml THF;

Ausbeute: 1.26 g (4.99 mmol, 86 %), gelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.56

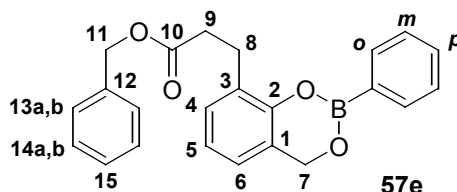
R_f -Wert (*n*-Hexan/Diethylether 1:1 v/v): 0.31

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.49 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.05 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.2$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.96 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.0$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.72 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 5.37 (s(br), 1H, Bn-OH); 4.55 (s, 2H, H7); 2.76 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, 2H, H8); 2.43 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H9); 1.36 (s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.1 (C10); 152.6 (C2); 128.4 (C4); 128.2 (C1); 127.5 (C3); 125.8 (C6); 119.3 (C5); 79.8 (C11); 60.3 (C7); 35.1 (C9); 28.0 (C12a-c); 25.6 (C8)

6.2.6.5. Darstellung von Benzyl-3-(3-hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionat **58e**

*Benzyl-3-(2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)propionat-Synthese 57e:*



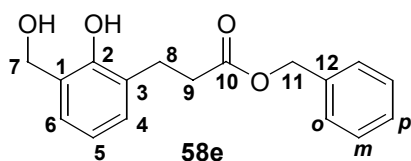
Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.57 g (10.0 mmol) Benzyl-3-(2-hydroxyphenyl)propionat **46e**, 1.46 g (12.0 mmol) Phenylboronsäure, 375 mg (5.00 mmol) Propionsäure, 2.40 g (80.0 mmol) *para*-Formaldehyd;

Ausbeute: 2.24 g (5.82 mmol, 60 %), blaßgelbes Öl

DC:	R _F -Wert (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.47
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, CDCl ₃): 7.99-7.96 (m, 2H, Ho-Ph); 7.54-7.49 (m, 1H, Hp-Ph); 7.42-7.32 (m, 7H, Hm-Ph+H13a,b-Aryl+H14a,b-Aryl+H15-Aryl); 7.12 (dd, ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.1 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.97 (dd, 2× ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, 1H, H5-Aryl); 6.80 (dd, ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.4 Hz, 1H, H6-Aryl); 5.23 (s, 2H, H7); 5.15 (s, 2H, H11); 3.17 (t, ³ J _{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H8); 2.82 (dd, ³ J _{H-H} = 7.8 Hz, ³ J _{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H9)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, CDCl ₃): 172.9 (C10); 147.0 (C2); 136.0 (C12); 134.3 (2×Co-Ph); 131.5 (Cp-Ph); 129.3 (C4); 129.1 (C1), 128.5 (2×C14a,b); 128.1 (2×C13a,b); 128.0 (C15); 127.9 (C3); 127.8 (2×Cm-Ph); 123.1 (C6); 122.8 (C5); 122.4 (C-B); 66.2 (C11); 62.9 (C7); 34.4 (C9); 25.6 (C8)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57e** zum Salicylalkohol **58e**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.24 g (6.02 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57e**, 6.0 ml 30%-iges Wasserstoffperoxid, 12 ml THF;

Ausbeute: 567 mg (1.98 mmol, 33 %), blaßgelbes Öl

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.77

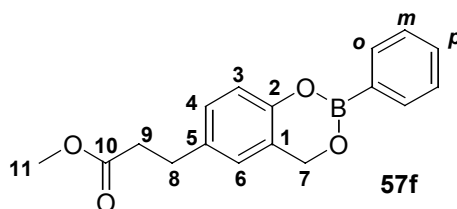
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.52 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.38-7.29 (m, 5H, Ph); 7.07 (dd, ³J_{H-H}= 7.5 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.8 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.96 (dd, ³J_{H-H}= 7.5 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.9 Hz, 1H, H6-Aryl); 6.72 (dd, ³J_{H-H}= 7.5 Hz, 1H, H5-Aryl); 5.37 (t(br), ³J_{H-H}= 4.2 Hz, 1H, Bn-OH); 5.07 (s, 2H, H11); 4.55 (d, ³J_{H-H}= 4.2 Hz, 2H, H7); 2.83

(t, $^3J_{H-H} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 2.61 (dd, $^3J_{H-H} = 8.1$ Hz, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, 2H, H9)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.5 (C10); 152.6 (C2); 136.4 (C12); 128.6 (2 \times C m -Ph); 128.4 (C4); 128.3 (C1); 128.1 (2 \times C o -Ph); 127.2 (C3); 125.8 (C6); 119.4 (C5); 65.5 (C11); 60.2 (C7); 33.8 (C9); 25.4 (C8)

6.2.6.6. Darstellung von Methyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)propionat 58f

Methyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)propionat-Synthese 57f:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.51 g (13.9 mmol) Methyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52a**, 2.03 g (16.6 mmol) Phenylboronsäure, 515 mg (6.95 mmol) Propionsäure, 3.34 g (111 mmol) *para*-Formaldehyd;

Ausbeute: 3.31 g (11.2 mmol, 80 %), schwach gelber Feststoff

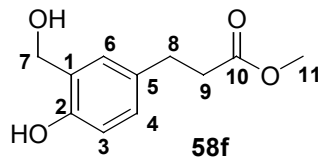
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.75

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.97 (ddd, $^3J_{H-H} = 8.0$ Hz, $^3J_{H-B} = 3.0$ Hz, $^4J_{H-H} = 1.6$ Hz, 2H, H o -Ph); 7.53-7.48 (m, 1H, H p -Ph); 7.45-7.40 (m, 2H, H m -Ph); 7.08 (dd, $^3J_{H-H} = 8.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.02 (d, $^3J_{H-H} = 8.3$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.86 (d, $^4J_{H-H} = 2.2$ Hz, 1H, H6-Aryl); 5.22 (s, 2H, H7); 3.69 (s, 3H, H11); 2.92 (t, $^3J_{H-H} = 7.7$ Hz, 2H, H8); 2.63 (t, $^3J_{H-H} = 7.7$ Hz, 2H, H9)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 173.2 (C10); 147.6 (C2); 135.3 (C5); 134.3 (2 \times C o -Ph); 131.4 (C p -Ph); 131.0 (C1); 128.5 (C4); 127.7

(2×Cm-Ph); 124.5 (C6); 122.5 (C-B); 117.9 (C3); 62.9 (C7); 51.6 (C11); 35.8 (C9); 30.2 (C8)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57f zum Salicylalkohol 58f:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

3.31 g (11.2 mmol) 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57f**, 11 ml 30%-iges Wasserstoffperoxid, 22 ml THF;

Ausbeute: 1.89 g (8.99 mmol, 80 %), farbloser Feststoff

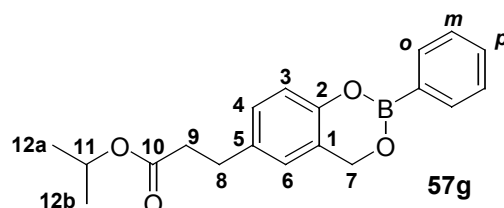
DC: R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.53

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 9.09 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.10 (d, ⁴J_{H-H} = 2.4 Hz, 1H, H6-Aryl); 6.85 (dd, ³J_{H-H} = 8.1 Hz, ⁴J_{H-H} = 2.4 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.64 (d, ³J_{H-H} = 8.3 Hz, 1H, H3-Aryl); 4.88 (t, ³J_{H-H} = 5.0 Hz, 1H, Bn-OH); 4.43 (d, ³J_{H-H} = 4.8 Hz, 2H, H7); 3.56 (s, 3H, H11); 2.73 (t, ³J_{H-H} = 7.7 Hz, 2H, H8); 2.53 (t, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H9)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 172.9 (C10); 152.6 (C2); 130.5 (C5); 128.2 (C1); 127.3 (C4); 127.0 (C6); 114.6 (C3); 58.4 (C7); 51.4 (C11); 35.6 (C9); 29.9 (C8)

6.2.6.7. Darstellung von *iso*-Propyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)propionat **58g**

iso-Propyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)propionat-Synthese **57g**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.60 g (12.5 mmol) *iso*-Propyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52c**, 1.83 g (15.0 mmol) Phenylboronsäure, 463 mg (6.25 mmol) Propionsäure, 3.00 g (100 mmol) *para*-Formaldehyd;

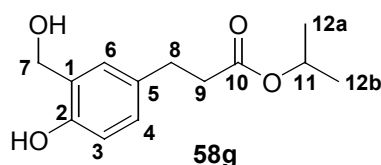
Ausbeute: 3.79 g (11.7 mmol, 93 %), blaßgelber Feststoff

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.75

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.92 (ddd, ³J_{H-H}= 8.0 Hz, ³J_{H-B}= 3.0 Hz, ⁴J_{H-H}= 1.5 Hz, 2H, Ho-Ph); 7.49-7.44 (m, 1H, H_p-Ph); 7.40-7.35 (m, 2H, H_m-Ph); 7.05 (dd, ³J_{H-H}= 8.1 Hz, ⁴J_{H-H}= 2.2 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.97 (d, ³J_{H-H}= 8.3 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.82 (d, ⁴J_{H-H}= 2.2 Hz, 1H, H6-Aryl); 5.20 (s, 2H, H7); 4.97 (sept, ³J_{H-H}= 6.3 Hz, 1H, H11); 2.87 (t, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, 2H, H8); 2.54 (t, ³J_{H-H}= 7.7 Hz, 2H, H9); 1.18 (d, ³J_{H-H}= 6.3 Hz, 6H, H12a,b)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 172.1 (C10); 147.3 (C2); 135.2 (C5); 134.1 (2×Co-Ph); 131.4 (C1); 131.2 (C_p-Ph); 128.4 (C4); 127.5 (2×C_m-Ph); 124.4 (C6); 122.1 (C-B); 117.6 (C3); 67.5 (C11); 62.7 (C11); 36.1 (C9); 30.1 (C8); 21.6 (C12a,b)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57g zum Salicylalkohol 58g:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

3.79 g (11.7 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57g**, 12 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 24 ml THF;

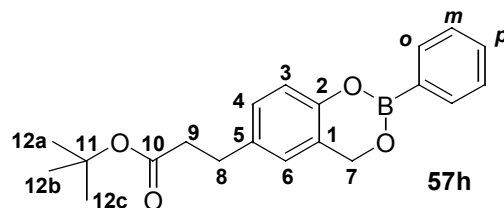
Ausbeute: 2.60 g (10.9 mmol, 93 %), farbloses Öl

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.61

$^1\text{H-NMR}$:	δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.08 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.10 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.85 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.64 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, 1H, H3-Aryl); 4.85 (sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 2H, H11+Bn-OH); 4.43 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 3.4$ Hz, 2H, H7); 2.72 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H8); 2.47 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9); 1.14 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 6H, H12a,b)
$^{13}\text{C-NMR}$:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.0 (C10); 152.6 (C2); 130.5 (C5); 128.4 (C1); 127.4 (C4); 127.1 (C6); 114.6 (C3); 67.1 (C11); 58.4 (C7); 36.2 (C9); 30.0 (C8); 21.8 (C12a,b)

6.2.6.8. Darstellung von *tert*-Butyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)propionat **58h**

tert-Butyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)propionat-Synthese **57h**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.96 g (8.82 mmol) *tert*-Butyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52d**, 1.29 g (10.6 mmol) Phenylboronsäure, 327 mg (4.41 mmol) Propionsäure, 2.12 g (70.6 mmol) *para*-Formaldehyd;

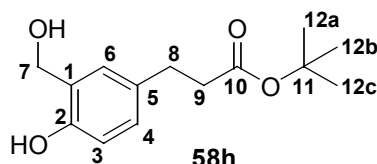
Ausbeute: 2.29 g (6.78 mmol, 77 %), blaßgelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.71

$^1\text{H-NMR}$:	δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.97 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H-B}} = 3.1$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.6$ Hz, 2H, Ho-Ph); 7.53-7.47 (m, 1H, Hp-Ph); 7.45-7.40 (m, 2H, Hm-Ph); 7.08 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.2$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.01 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.86 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.1$ Hz, 1H, H6-Aryl); 5.21 (s, 2H, H7); 2.87 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.53 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H, H9); 1.43 (s, 9H, H12a-c)
--------------------	--

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.2 (C10); 149.3 (C2); 135.6 (C5); 134.3 (2 \times Co-Ph); 132.9 (C1); 131.4 (Cp-Ph); 128.5 (C4); 127.7 (2 \times Cm-Ph); 124.5 (C6); 122.3 (C-B); 117.8 (C3); 80.4 (C11); 62.9 (C11); 37.2 (C9); 30.4 (C8); 28.1 (C12a-c)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57h zum Salicylalkohol 58h:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.29 g (6.78 mmol) 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57h**, 7 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 14 ml THF;

Ausbeute: 1.49 g (5.90 mmol, 87 %), blaßgelber Feststoff

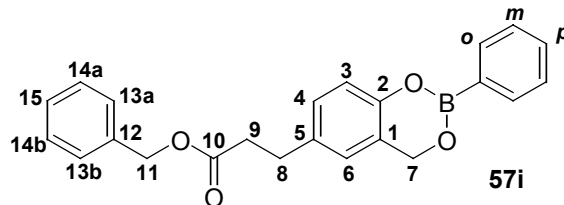
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 9.10 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.10 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.85 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.63 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, 1H, H3-Aryl); 4.88 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 4.9$ Hz, 1H, Bn-OH); 4.42 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 4.9$ Hz, 2H, H7); 2.68 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H8); 2.41 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9); 1.35 (s, 9H, H12a-c)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 173.7 (C10); 152.5 (C2); 130.6 (C5); 128.4 (C1); 127.4 (C4); 127.1 (C6); 114.5 (C3); 79.7 (C11); 58.4 (C7); 37.1 (C9); 30.2 (C8); 27.9 (C12a-c)

6.2.6.9. Darstellung von Benzyl-3-(3-hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)propionat **58i**

Benzyl-3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)propionat-Synthese 57i:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.96 g (7.65 mmol) Benzyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat **52b**, 1.12 g (9.18 mmol) Phenylboronsäure, 283 mg (3.82 mmol) Propionsäure, 1.84 g (61.2 mmol) *para*-Formaldehyd;

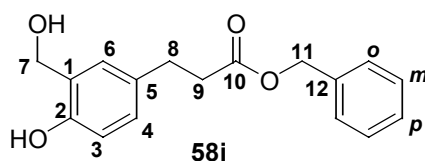
Ausbeute: 2.62 g (6.07 mmol, 92 %), blaßgelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.79

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.97 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{H-B}} = 2.9$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 2H, Ho-Ph); 7.53-7.48 (m, 1H, Hp-Ph); 7.45-7.40 (m, 2H, Hm-Ph); 7.38-7.29 (m, 5H, H13a,b-Aryl+H14a,b-Aryl+H15-Aryl); 7.06 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.00 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.82 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.2$ Hz, 1H, H6-Aryl); 5.17 (s, 2H, H7); 5.12 (s, 2H, H11); 2.93 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.68 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H9)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 172.6 (C10); 147.6 (C2); 135.9 (C12); 135.2 (C5); 134.3 (2 \times Co-Ph); 131.5 (C1); 131.4 (Cp-Ph); 128.6 (14a,b); 128.2 (C4); 128.2 (C13a,b); 128.2 (C15); 127.7 (2 \times Cm-Ph); 124.6 (C6); 122.4 (C-B); 117.9 (C3); 66.3 (C11); 62.9 (C11); 36.0 (C9); 30.2 (C8)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57i** zum Salicylalkohol **58i**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.29 g (6.78 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57h**, 7 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 14 ml THF;

Ausbeute: 1.49 g (5.90 mmol, 87 %), blaßgelber Feststoff

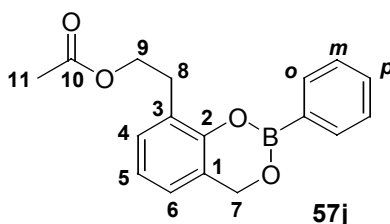
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.10 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.10 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.85 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.63 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, 1H, H3-Aryl); 4.88 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 4.9$ Hz, 1H, Bn-OH); 4.42 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 4.9$ Hz, 2H, H7); 2.68 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H8); 2.41 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9); 1.35 (s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.7 (C10); 152.5 (C2); 130.6 (C5); 128.4 (C1); 127.4 (C4); 127.1 (C6); 114.5 (C3); 79.7 (C11); 58.4 (C7); 37.1 (C9); 30.2 (C8); 27.9 (C12a-c)

6.2.6.10. Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)ethylacetat **58j**

2-(2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin-8-yl)ethylacetat-Synthese **57j**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

3.04 g (16.9 mmol) 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylacetat **55a**, 2.50 g (20.3 mmol) Phenylboronsäure, 650 mg (8.50 mmol) Propionsäure, 4.40 g (136 mmol) *para*-Formaldehyd;

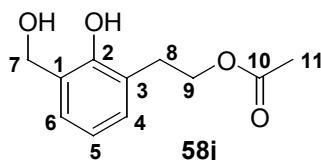
Ausbeute: 3.39 g (11.5 mmol, 68 %), blaßgelbes, zähes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.73

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.99-7.96 (m, 2H, *Ho*-Ph); 7.54-7.49 (m, 1H, *Hp*-Ph); 7.46-7.42 (m, 2H, *Hm*-Ph); 7.07 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, *H4*-Aryl); 7.01 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, *H5*-Aryl); 6.84 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, *H6*-Aryl); 5.24 (s, 2H, *H7*); 4.33 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, *H9*); 3.07 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, *H8*); 2.04 (s, 3H, *H11*)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 171.1 (*C10*); 154.0 (*C2*); 134.3 ($2 \times \text{Co-Ph}$); 131.6 (*Cp*-Ph); 129.9 (*C4*); 127.8 ($2 \times \text{Cm-Ph}$); 126.9 (*C1*); 125.7 (*C3*); 123.4 (*C6*); 122.8 (*C5*); 122.6 (*C-B*); 63.9 (*C9*); 62.9 (*C7*); 29.3 (*C8*); 21.0 (*C11*)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57j zum Salicylalkohol 58j:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

3.39 g (11.5 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57j**, 11 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 22 ml THF;

Ausbeute: 1.92 g (9.22 mmol, 81 %), farbloses Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.73 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.09 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H, *H4*-Aryl); 6.95 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H, *H6*-Aryl); 6.80 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H,

H5-Aryl); 4.86 (s, 2H, H7); 4.31 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 2H, H9); 2.98 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 2H, H8); 2.05 (s, 3H, H11)

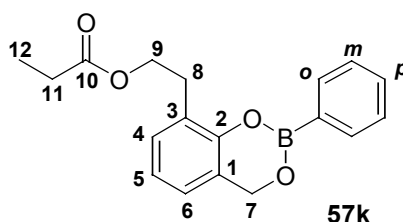
δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.55 (s, 1H, Aryl-OH); 7.09 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.99 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.75 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 4.56 (s, 2H, H7); 4.14 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, 2H, H9); 2.86 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, 2H, H8); 1.96 (s, 3H, H11)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 171.5 (C10); 154.6 (C2); 130.7 (C4); 126.5 (C6); 124.9 (C1); 124.6 (C3); 119.7 (C5); 64.8 (C9); 64.0 (C7); 29.6 (C8); 21.0 (C11)

δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 170.6 (C10); 153.0 (C2); 129.8 (C4); 128.0 (C6); 125.6 (C1); 125.3 (C3); 119.7 (C5); 63.5 (C9); 60.3 (C7); 29.6 (C8); 21.1 (C11)

6.2.6.11. Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)ethylpropionat 58k

2-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)ethylpropionat-Synthese 57k:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.66 g (9.17 mmol) 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpropionat **55c**, 1.28 g (10.5 mmol) Phenylboronsäure, 352 mg (4.60 mmol) Propionsäure, 1.65 g (54 mmol) *para*-Formaldehyd;

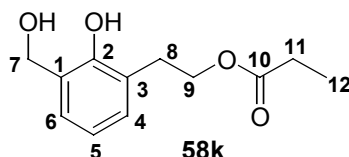
Ausbeute: 916 mg (2.95 mmol, 32 %), farbloses, zähes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.74

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.00-7.97 (m, 2H, Ho-Ph); 7.55-7.50 (m, 1H, Hp-Ph); 7.45-7.41 (m, 2H, Hm-Ph); 7.15 (dd, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.6 Hz, 1H, H4-Aryl); 7.01 (dd, 2×³J_{H-H} = 7.5 Hz, 1H, H5-Aryl); 6.92 (dd, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.6 Hz, 1H, H6-Aryl); 5.23 (s, 2H, H7); 4.43 (t, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 2H, H9); 3.16 (t, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 2H, H8); 2.32 (q, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H11); 1.13 (t, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, 3H, H12)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 173.6 (C10); 149.3 (C2); 134.3 (2×Co-Ph); 131.6 (Cp-Ph); 129.9 (C4); 127.8 (2×Cm-Ph); 126.9 (C1); 125.7 (C3); 123.4 (C6); 122.7 (C5); 122.5 (C-B); 63.7 (C9); 62.9 (C7); 30.2 (C11); 29.3 (C8); 9.8 (C12)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57k zum Salicylalkohol 58k:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

916 mg (2.96 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57k**, 3 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 6 ml THF;

Ausbeute: 660 mg (2.94 mmol, 99 %), farbloses, zähflüssiges Öl

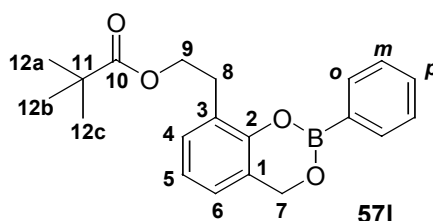
DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.54

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.07 (dd, ³J_{H-H} = 7.4 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.4 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.93 (dd, ³J_{H-H} = 7.4 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.4 Hz, 1H, H6-Aryl); 6.80 (dd, 2×³J_{H-H} = 7.4 Hz, 1H, H5-Aryl); 4.83 (s, 2H, H7); 4.30 (t, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 2H, H9); 2.97 (t, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 2H, H8); 2.32 (q, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, 2H, H11); 1.11 (t, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, 3H, H12)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 175.4 (C10); 155.0 (C2); 131.0 (C4); 126.9 (C6); 125.3 (C1); 125.2 (C3); 120.0 (C5); 65.0 (C9); 64.3 (C7); 30.1 (C11); 28.1 (C8); 9.5 (C12)

6.2.6.12. Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)ethylpivalat 58I

2-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)ethylpivalat-Synthese **57I**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.30 g (10.3 mmol) 2-(2-Hydroxyphenyl)ethylpivalat **55d**, 1.51 g (12.4 mmol) Phenylboronsäure, 383 mg (5.17 mmol) Propionsäure, 2.48 g (83 mmol) *para*-Formaldehyd;

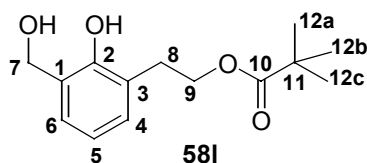
Ausbeute: 3.00 g (8.87 mmol, 86 %), blaßgelbes, zähes Öl

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.73

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.99-7.96 (m, 2H, Ho-Ph); 7.54-7.49 (m, 1H, Hp-Ph); 7.46-7.41 (m, 2H, Hm-Ph); 7.15 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.00 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 6.93-6.90 (m, 1H, H6-Aryl); 5.24 (s, 2H, H7); 4.41 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H9); 3.15 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H8); 1.17 (s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 178.5 (C10); 147.6 (C2); 134.3 ($2 \times \text{Co-Ph}$); 131.6 (Cp-Ph); 130.0 (C4); 127.8 ($2 \times \text{Cm-Ph}$); 126.8 (C1); 125.8 (C3); 123.3 (C6); 122.6 (C5); 122.3 (C-B); 63.6 (C9); 63.0 (C7); 38.4 (C11); 29.4 (C8); 27.2 (C12a-c)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57I** zum Salicylalkohol **58I**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

3.00 g (8.87 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57I**, 9 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 18 ml THF;

Ausbeute: 1.93 g (7.65 mmol, 86 %), blaßgelbes, zähflüssiges Öl

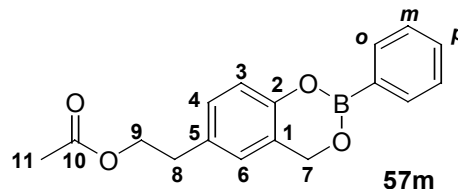
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.70

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 7.08 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.98 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.74 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 1H, H5-Aryl); 4.56 (s, 2H, H7); 4.15 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H9); 2.86 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H8); 1.08 (s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 177.6 (C10); 152.8 (C2); 129.4 (C4); 128.3 (C1); 126.1 (C6); 124.7 (C3); 119.3 (C5); 63.5 (C9); 60.2 (C7); 38.3 (C11); 29.3 (C8); 27.1 (C12a-c)

6.2.6.13. Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)ethylacetat **58m**

2-(2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)ethylacetat-Synthese **57m**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.50 g (8.32 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylacetat **55b**, 1.22 g (9.98 mmol) Phenylboronsäure, 308 mg (4.16 mmol) Propionsäure, 2.00 g (66.6 mmol) *para*-Formaldehyd;

Ausbeute: 2.02 g (6.82 mmol, 82 %), blaßgelbes, zähes Öl

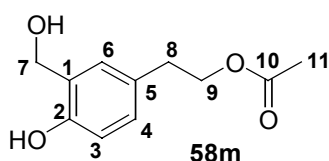
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.68

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.98-7.95 (m, 2H, H_o -Ph); 7.53-7.48 (m, 1H, H_p -Ph); 7.45-7.40 (m, 2H, H_m -Ph); 7.10 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.2$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.04 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, 1H, H3-

Aryl); 6.87 (d, $^4J_{H-H} = 1.9$ Hz, 1H, H6-Aryl); 5.23 (s, 2H, H7); 4.27 (t, $^3J_{H-H} = 7.0$ Hz, 2H, H9); 2.90 (t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, 2H, H8); 2.06 (s, 3H, H11)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 171.0 (C10); 148.6 (C2); 134.3 (2 \times Co-Ph); 132.9 (C5); 132.5 (Cp-Ph); 130.3 (C1); 129.1 (C4); 127.5 (2 \times Cm-Ph); 125.1 (C6); 122.5 (C-B); 118.0 (C3); 64.9 (C9); 62.9 (C7); 34.4 (C8); 21.0 (C11)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin 57m zum Salicylalkohol 58m:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.02 g (6.82 mmol) 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57m**, 7 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 14 ml THF;

Ausbeute: 1.36 g (6.48 mmol, 95 %), farbloser Feststoff

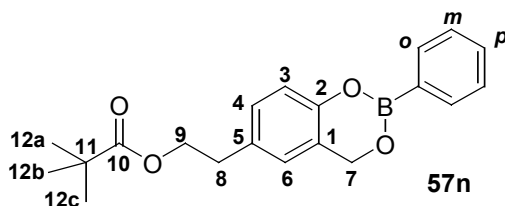
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 9.16 (s, 1H, Aryl-OH); 7.13 (d, $^4J_{H-H} = 2.1$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.89 (dd, $^3J_{H-H} = 8.1$ Hz, $^4J_{H-H} = 2.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.67 (d, $^3J_{H-H} = 8.1$ Hz, 1H, H3-Aryl); 4.92 (t, $^3J_{H-H} = 5.5$ Hz, 1H, Bn-OH); 4.44 (d, $^3J_{H-H} = 5.4$ Hz, 2H, H7); 4.11 (t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, 2H, H9); 2.75 (t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, 2H, H8); 1.97 (s, 3H, H11)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 170.5 (C10); 152.8 (C2); 128.6 (C5); 127.9 (C1); 127.8 (C4); 127.7 (C6); 114.7 (C3); 65.0 (C9); 58.4 (C7); 34.0 (C8); 20.9 (C11)

6.2.6.14. Darstellung von 2-(3-Hydroxymethyl-4-hydroxyphenyl)ethylpivalat **58n**

2-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-6-yl)ethylpivalat-Synthese **57n**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.10 g (4.95 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylpivalat **55e**, 724 mg (5.94 mmol) Phenylboronsäure, 183 mg (2.47 mmol) Propionsäure, 1.19 g (39.6 mmol) *para*-Formaldehyd;

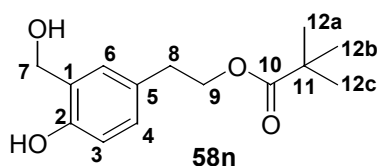
Ausbeute: 1.48 g (4.38 mmol, 88 %), fahlgelber Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.72

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.99-7.95 (m, 2H, H_o -Ph); 7.53-7.48 (m, 1H, H_p -Ph); 7.45-7.40 (m, 2H, H_m -Ph); 7.10 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.2$ Hz, 1H, H_4 -Aryl); 7.03 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, 1H, H_3 -Aryl); 6.88 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, 1H, H_6 -Aryl); 5.22 (s, 2H, H_7); 4.25 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 2H, H_9); 2.90 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 2H, H_8); 1.18 (s, 9H, H_{12a-c})

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 170.1 (C10); 147.8 (C2); 135.2 (C5); 134.3 (2 \times C $_o$ -Ph); 132.8 (C1); 131.4 (C $_p$ -Ph); 129.2 (C4); 127.7 (2 \times C $_m$ -Ph); 125.2 (C6); 123.0 (C-B); 117.9 (C3); 64.8 (C9); 62.9 (C7); 34.5 (C8); 30.9 (C11); 27.2 (C12a-c)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57n** zum Salicylalkohol **58n**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode B** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.48 g (4.37 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57n**, 4 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid, 8 ml THF;

Ausbeute: 795 mg (3.15 mmol, 72 %), blaßgelber Feststoff

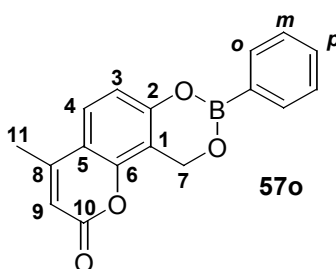
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.61

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.14 (s, 1H, Aryl-OH); 7.14 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.1$ Hz, 1H, H6-Aryl); 6.88 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, 1H, H4-Aryl); 6.66 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz, 1H, H3-Aryl); 4.90 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 5.5$ Hz, 1H, Bn-OH); 4.43 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5.5$ Hz, 2H, H7); 4.12 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H9); 2.75 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 2H, H8); 1.09 (s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 177.5 (C10); 152.8 (C2); 130.6 (C5); 128.0 (C4); 128.0 (C1); 127.8 (C6); 114.5 (C3); 65.1 (C9); 58.4 (C7); 34.0 (C8); 30.9 (C11); 27.1 (C12a-c)

6.2.6.15. Darstellung von 8-Hydroxymethyl-4-methylumbelliferon **58o**

2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin-Synthese **57o**:



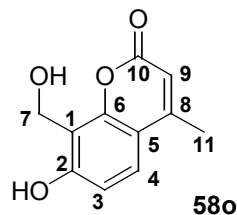
Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.00 g (10.3 mmol) 4-Methylumbelliferon-Monohydrat **59**, 1.51 g (12.4 mmol) Phenylboronsäure, 382 mg (5.15 mmol) Propionsäure, 2.47 g (82.4 mmol) *para*-Formaldehyd;

Ausbeute: 1.96 g (6.71 mmol, 65 %), blaßgelber Feststoff

DC:	R _F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.67
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, CDCl ₃): 7.98 (ddd, ³ J _{H-H} = 8.1 Hz, ³ J _{H-B} = 3.0 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.5 Hz, 2H, Ho-Ph); 7.55-7.50 (m, 1H, Hp-Ph); 7.52 (d, ³ J _{H-H} = 8.8 Hz, 1H, H4-Aryl); 7.45-7.41 (m, 2H, Hm-Ph); 7.06 (d, ³ J _{H-H} = 8.7 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.20 (q, ⁴ J _{H-H} = 1.3 Hz, 1H, H9); 5.43 (s, 2H, H7); 2.43 (d, ⁴ J _{H-H} = 1.3 Hz, 3H, H11)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, CDCl ₃): 160.4 (C10); 152.7 (C2); 151.8 (C8); 149.8 (C6); 134.4 (2×Co-Ph); 131.9 (Cp-Ph); 127.8 (2×Cm-Ph); 124.4 (C4); 115.4 (C1); 114.4 (C3); 112.8 (C9); 110.4 (C5); 59.1 (C7); 18.7 (C11)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57o** zum Salicylalkohol **58o**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode A** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

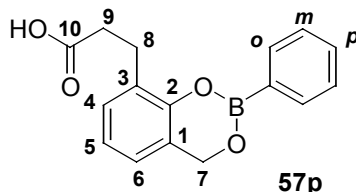
1.96 g (6.71 mmol) 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57o**, 9.7 ml (134 mmol) 1,3-Propandiol, 14 ml Toluol;

Ausbeute: 950 mg (4.61 mmol, 45 %), farbloser Feststoff

DC:	R _F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.35
¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d ₆): 10.47 (s(br), 1H, Aryl-OH); 7.53 (d, ³ J _{H-H} = 8.8 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.86 (d, ³ J _{H-H} = 8.7 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.13 (q, ⁴ J _{H-H} = 1.3 Hz, 1H, H9); 4.83 (s (br), 1H, Bn-OH); 4.62 (s, 2H, H7); 2.35 (d, ⁴ J _{H-H} = 1.3 Hz, 3H, H11)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d ₆): 160.5 (C10); 159.7 (C2); 153.9 (C6); 153.2 (C8); 125.4 (C4); 114.8 (C1); 112.5 (C3); 112.1 (C5); 110.2 (C9); 51.7 (C7); 18.4 (C11)

6.2.6.16. Darstellung von 3-(3-Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propionsäure **58p**

3-(2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborinin-8-yl)propionsäure-Synthese **57p**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.66 g (10.0 mmol) 3-(2-Hydroxyphenyl)propionsäure **47**, 1.46 g (12.0 mmol) Phenylboronsäure, 370 mg (5.00 mmol) Propionsäure, 1.57 g (70.0 mmol) *para*-Formaldehyd;

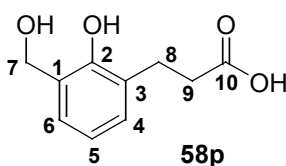
Ausbeute: 966 mg (3.58 mmol, 36 %), farbloser Feststoff

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.61

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 12.10 (s, 1H, COOH); 7.85-7.82 (m, 2H, Ho-Ph); 7.51-7.46 (m, 1H, Hp-Ph); 7.43-7.38 (m, 2H, Hm-Ph); 7.12 (dd, ³J_{H-H} = 7.5 Hz, ⁴J_{H-H} = 0.9 Hz, 1H, H4-Aryl); 6.99 (dd, 2×³J_{H-H} = 7.5 Hz, 1H, H5-Aryl); 6.90 (d, ³J_{H-H} = 7.3 Hz; 1H, H6-Aryl); 5.14 (s, 2H, H7); 2.96 (t, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H8); 2.59 (t, ³J_{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H9)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 174.0 (C10); 147.3 (C2); 133.8 (2×Co-Ph); 131.1 (Cp-Ph); 129.0 (C1); 128.9 (C4); 127.9 (2×Cm-Ph); 127.6 (C3); 123.4 (6); 122.9 (C-B); 122.3 (C5); 62.2 (C7); 34.0 (C9); 25.1 (C8)

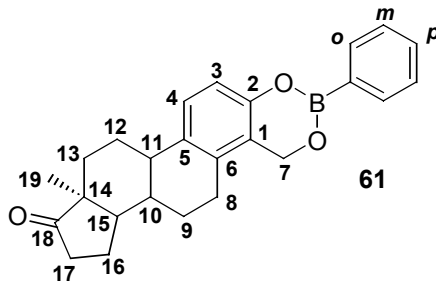
Hydrolyse von 2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin **57p** zum Salicylalkohol **58p**:



Diese Hydrolyse wurde nicht durchgeführt, da das Produkt **58p** nicht benötigt wurde.

6.2.6.17. Darstellung von 1-Hydroxymethylöstron **62**

2-Phenyl-4H-benzo[1.3.2]-dioxaborin-Synthese **61**:



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

2.50 g (9.25 mmol) Östron **60**, 1.35 g (11.1 mmol) Phenylboronsäure, 370 mg (5.00 mmol) Propionsäure, 1.66 g (55.4 mmol) *para*-Formaldehyd;

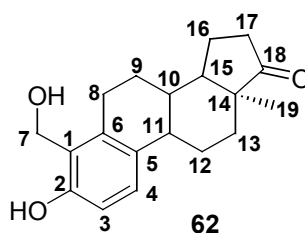
Ausbeute: 1.75 g (4.53 mmol, 49 %), farbloser Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.77

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.97-7.93 (m, 2H, $\text{H}_o\text{-Ph}$); 7.51-7.46 (m, 1H, $\text{H}_p\text{-Ph}$); 7.43-7.38 (m, 2H, $\text{H}_m\text{-Ph}$); 7.20 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H, $\text{H}_4\text{-Aryl}$); 6.90 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H, $\text{H}_3\text{-Aryl}$); 5.19 (d, $^2J_{\text{H-H}} = 15.1$ Hz, 1H, H7); 5.08 (d, $^2J_{\text{H-H}} = 15.1$ Hz, 1H, H7); 2.68-2.51 (m, 6H, $\text{H}_{17}+\text{H}_{13}+\text{H}_8$); 2.32-2.27 (m, 1H, H15); 2.19-1.92 (m, 4H, $\text{H}_{12}+\text{H}_{16}$); 1.72-1.38 (m, 4H, $\text{H}_9+\text{H}_{10}+\text{H}_{11}$); 0.91 (s, 3H, H19)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 220.4 (C18); 146.9 (C2); 137.2 (C6); 134.6 (C5); 134.3 (2 \times C $o\text{-Ph}$); 132.7 (C1); 131.4 (C $p\text{-Ph}$); 127.7 (2 \times C $m\text{-Ph}$); 125.3 (C4); 119.9 (C-B); 115.3 (C3); 61.6 (C7); 50.3 (C10); 47.9 (C14); 44.1 (C15); 37.5 (C11); 35.8 (C17); 31.5 (C9); 26.1 (C12); 26.0 (C13); 25.2 (C8); 21.6 (C16); 13.8 (C19)

Hydrolyse von 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **61** zum Salicylalkohol **62**:



Die Reaktion wurde gemäß **Methode A** der **AAV-4** (siehe Abschnitt 6.2.6.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

1.00 g (2.60 mmol) 2-Phenyl-4*H*-benzo[1.3.2]-dioxaborin **61**, 3.8 ml (52 mmol) 1,3-Propandiol, 14 ml Toluol;

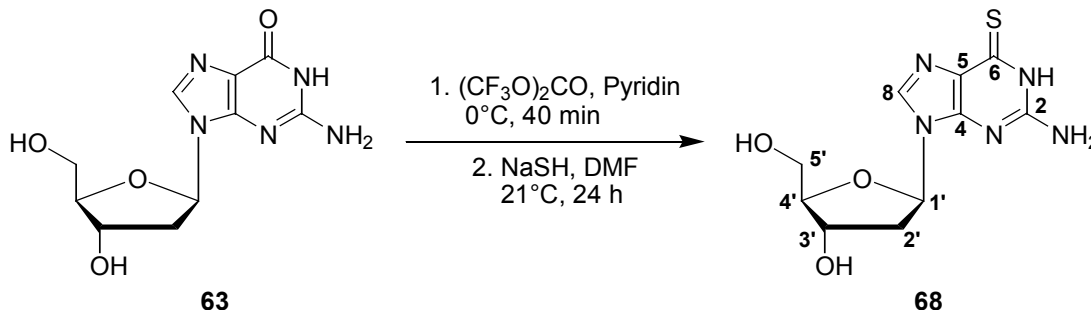
Ausbeute: 663 mg (2.21 mmol, 85 %), farbloser Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.55

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 9.02 (s, 1H, Aryl-OH); 6.91 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H, H4); 6.59 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H, H3); 4.85 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 5.4$ Hz, 1H, Bn-OH); 4.43 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.4$ Hz, 1H, H7); 4.33 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.4$ Hz, 1H, H7); 2.65-2.50 (m, 6H, H17+H13+H8); 2.31-2.25 (m, 1H, H15); 2.20-1.92 (m, 4H, H12+H16); 1.71-1.36 (m, 4H, H9+H10+H11); 0.90 (s, 3H, H19)

6.3. Synthesen zu den fluoreszierenden Nukleosiden 32 und 35

6.3.1. Synthese von 6-Thio-2'-desoxyguanosin 68 nach Methode A



0.53 g (2.00 mmol) 2'-Desoxyguanosin **63** wurden dreimal mit ca. 15 ml Pyridin koevaporiert und in 40 ml Pyridin suspendiert. Unter Kühlung (Eisbad) wurden tropfenweise 2.3 ml (16.0 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid zu der Suspension gegeben. Nach 40 Minuten tropfte man eine Suspension aus 3.40 g (60.0 mmol) Natriumhydrogensulfid und 60 ml trockenem DMF zu dem Reaktionsgemisch. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde das Gemisch unter starkem Rühren zu 100 ml einer 0.16 M Ammoniumcarbonat-Lösung gegossen. Diese Lösung wurde danach bis zur Trockene eingedunstet und das erhaltene Rohprodukt in 50 ml Methanol aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Filtration abgetrennt und das Filtrat bis zur Trockene eingedunstet. Das Rohprodukt mußte zur Reinigung zweimal aus 95 %-igem Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 138 mg (0.50 mmol, 25 %), gelblicher, feinkristalliner Feststoff

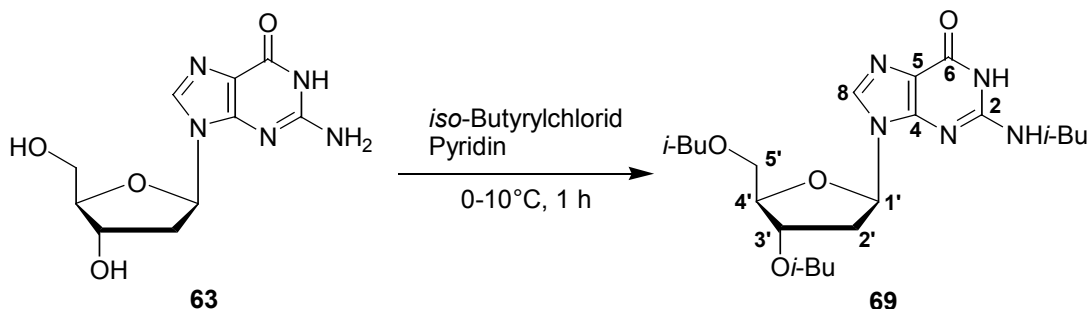
DC: R_f -Wert (Methanol/Ethylacetat 1:1 v/v): 0.57

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 11.96 (s, 1H, NH); 8.12 (s, 1H, H8); 6.85 (s, 2H, NH_2); 6.13 (dd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 6.4$ Hz, 1H, H1'); 5.30 (d, ${}^3J_{\text{H-H}} = 3.8$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.95 (t, ${}^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz; 1H, 5'-OH); 4.34 (m, 1H, H3'); 3.83 (m, 1H, H4'); 3.55 (m, 2H, H5'); 2.55 (m, 1H, H2'); 2.24 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 13.2$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 3.3$ Hz, 1H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 175.2 (C2); 153.2 (C6); 147.6 (C4); 138.4 (C8); 128.5 (C5); 87.8 (C4'); 82.9 (C1'); 70.8 (C3'); 61.7 (C5'); 39.9 (C2')

6.3.2. Synthese von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** nach Methode B

6.3.2.1. Darstellung von 2-N,3',5'-O-Tri-*iso*-butyryl-2'-desoxyguanosin **69**



2.70 g (10.1 mmol) 2'-Desoxyguanosin **63** wurden in 100 ml trockenem Pyridin suspendiert. Die Suspension wurde nun auf 0°C abgekühlt und mit der tropfenweise Zugabe von 10.5 ml (100 mmol) *iso*-Butyrylchlorid begonnen. Danach wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt werden. Das Reaktionsgemisch färbte sich rasch gelb, um im Laufe der Zeit über orange schließlich rot zu werden. Der Reaktionsverlauf wurde währenddessen dünnschichtchromatographisch verfolgt. Sobald das Edukt **63** erfolgreich umgesetzt war, konnte die Reaktion durch die Zugabe von 13 g (150 mmol) Natriumhydrogencarbonat, das zuvor in 100 ml Wasser gelöst wurde, beendet werden. Bei der Zugabe mußte ein starkes Aufschäumen beachtet werden. Die Lösung wurde nun so lange kräftig gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Danach wurde die Lösung auf ca. 100 ml am Roationsverdampfer eingengt und das Produkt **69** fing an auszukristallisieren. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

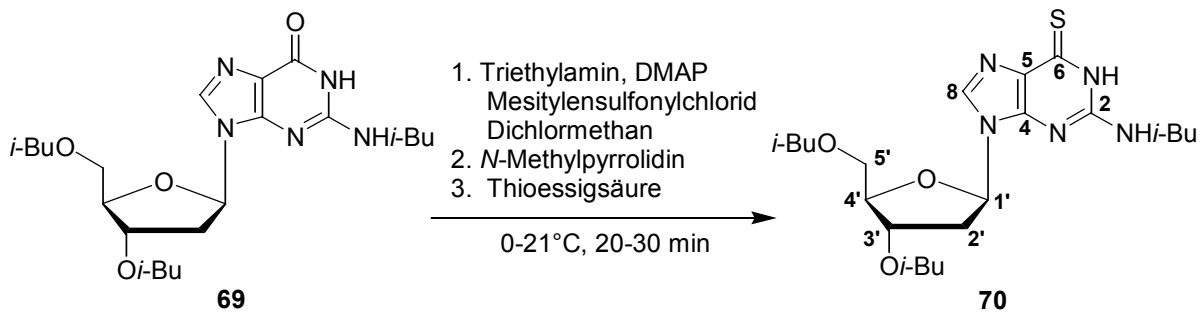
Ausbeute: 4.70 g (9.80 mmol, 97 %), farbloser Feststoff

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 12.11 (s, 1H, NH1); 11.63 (s, 1H, NH2); 8.24 (s, 1H, H8); 6.25 (dd, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, ³J_{H-H} = 5.6 Hz; 1H, H1'); 5.36 (m, 1H, H3'); 4.30-4.21 (m, 3H, H4'+H5'); 3.06-2.98 (m, 1H, H2'); 2.81 (sept, ³J_{H-H} = 6.9 Hz; 1H, O-CH*i*-Bu); 2.66-2.54 (m, 3H, H2'+O-CH*i*-Bu+NH-CH*i*-Bu); 1.15 (d, ³J_{H-H} = 6.9 Hz; 12H, 2×O-CH(CH₃)₂); 1.09 (d, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 3H, NH-CH(CH₃)₂); 1.07 (d, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 3H, NH-CH(CH₃)₂)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 180.3 (C6); 176.0-175.0 ($3\times\text{C}=\text{O}$ -*i*-Bu); 154.9 (C2); 148.7 (C4); 137.4 (C8); 120.6 (C5); 83.2 (C1'); 81.9 (C4'); 74.3 (C3'); 63.5 (C5'); 39.0 (C2'); 33.2-35.8 ($3\times\text{CH}$ -*i*-Bu); 19.2-18.7 ($6\times\text{CH}_3$ -*i*-Bu)

6.3.2.2. Darstellung von 6-Thio-2-*N*,3',5'-*O*-tri-*iso*-butyryl-2'-desoxyguanosin **70**



7.00 g (14.7 mmol) 2-*N*,3',5'-*O*-Tri-*iso*-butyryl-2'-desoxyguanosin **69** wurden in 300 ml trockenem Dichlormethan gelöst und nacheinander mit 7.5 ml (54.1 mmol) Triethylamin, 148 mg (1.21 mmol) Dimethylaminopyridin und 7.5 g (24.3 mmol) Mesitylsulfonylchlorid versetzt. Nachdem sich das Edukt **69** (R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60) zu einer Verbindung mit höherem R_f -Wert (0.84) umgesetzt hatte, wurden unter Eiskühlung 14.8 ml *N*-Methylpyrrolidin, gelöst in 40 ml Dichlormethan, langsam zugetropft. Dadurch entstand eine Verbindung mit einem sehr kleinen R_f -Wert (0.23). Nun konnten 14.8 ml (0.21 mmol) Thioessigsäure, die zuvor in 40 ml Dichlormethan aufgenommen wurden, zu dem Reaktionsgemisch getropft werden. Nachdem die Bande der Verbindung mit dem R_f -Wert von 0.23 nur noch schwach zu erkennen war (weniger als 30 Minuten Reaktionszeit), wurde die Reaktion beendet, indem man das Gemisch zu 370 ml einer 0.5 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung gab.

Die organische Phase wurde zweimal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 100 ml einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Danach konnte das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt werden. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Eluent: Ethylacetat), wobei die Trennung mehrfach wiederholt werden mußte.

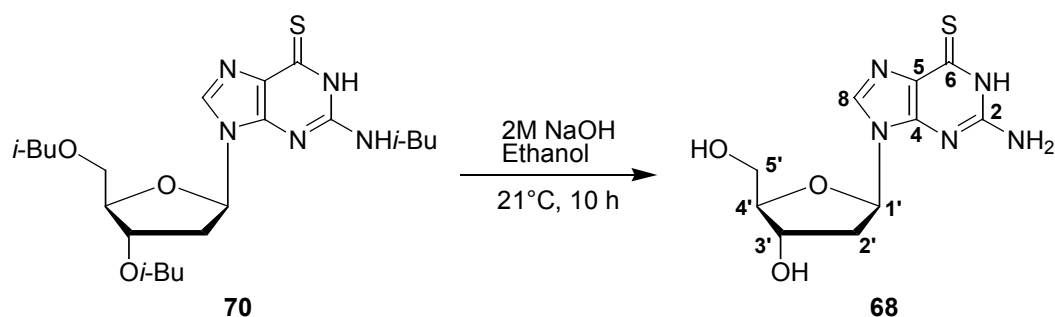
Ausbeute: 5.13 g (10.4 mmol, 71 %), bräunlicher Feststoff

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.71

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 13.44 (s, 1H, NH1); 11.89 (s, 1H, NH2); 8.41 (s, 1H, H8); 6.26 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$ Hz; 1H, H1'); 5.36 (m, 1H, H3'); 4.29-4.20 (m, 3H, H4'+H5'); 3.04-2.97 (m, 1H, H2'); 2.81 (sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz; 1H, O-CH*i*-Bu); 2.64-2.55 (m, 3H, H2'+O-CH*i*-Bu+NH-CH*i*-Bu); 1.16 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz; 6H, O-CH(CH $_3$) $_2$); 1.15 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz; 6H, O-CH(CH $_3$) $_2$); 1.09 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 3H, NH-CH(CH $_3$) $_2$); 1.07 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 3H, NH-CH(CH $_3$) $_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 180.6-175.8 (3 \times C=O*i*-Bu); 174.4 (C2); 147.8 (C6); 145.3 (C4); 140.1 (C8); 132.2 (C5); 83.4 (C1'); 82.1 (C4'); 74.2 (C3'); 63.5 (C5'); 39.9 (C2'); 35.9-33.3 (3 \times CH*i*-Bu); 19.0-18.8 (6 \times CH $_3$ *i*-Bu)

6.3.2.3. Darstellung von 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** durch Entschützung

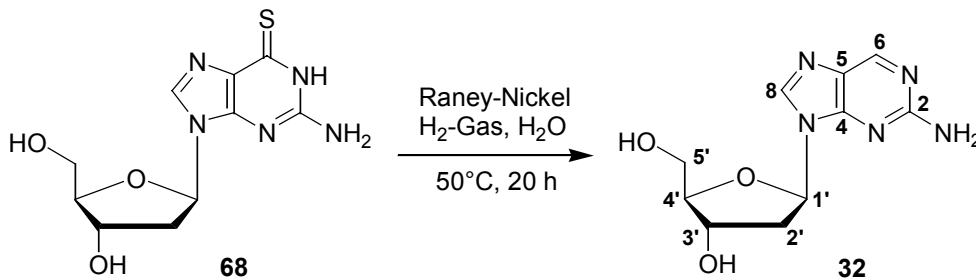


5.00 g (10.1 mmol) 6-Thio-2-*N*,3',5'-*O*-tri-*iso*-butyryl-2'-desoxyguanosin **70** wurden 10 Stunden bei Raumtemperatur in 200 ml einer 2 M ethanolischen Natronlauge gerührt. Um eine vollständige Entschützung zu gewährleisten, wurde der Erfolg der Umsetzung dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Vor der Isolierung des Produktes **68** mußte die Lösung zuerst unter Eiskühlung mit 2 N Salzsäure neutralisiert werden. Danach konnte das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt aus Wasser umkristallisiert werden.

Ausbeute: 1.91 g (6.74 mmol, 67 %), gelblicher, feinkristalliner Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen in Abschnitt 6.3.1. S. 184

6.3.3. Darstellung von 2-Amino-9-β-D-2'-desoxyribofuranosylpurin **32**



840 mg (3.40 mmol) 6-Thio-2'-desoxyguanosin **68** wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 6 ml Raney-Nickel-Suspension versetzt. Das Reaktionsgemisch mußte dann 20 Stunden bei 50°C unter einer Wasserstoffatmosphäre (ca. 2 Liter), die mit Hilfe einer Hydrierungsapparatur erzeugt wurde, gerührt werden. Die Reaktionszeit wurde dabei ausschließlich von der möglichst vollständigen Umsetzung des Edukts **68** bestimmt und kann um einige Stunden variieren. Anschließend filterte man das Gemisch durch Celite, wusch es viermal mit etwas warmen Wasser und dampfte diese wäßrige Lösung im Vakuum bis zur Trockene ein. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend mit Hilfe des Chromatotröns (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 20-50 %) aufgereinigt.

Ausbeute: 570 mg (2.30 mmol, 77 %), farbloser, feinkristalliner Feststoff

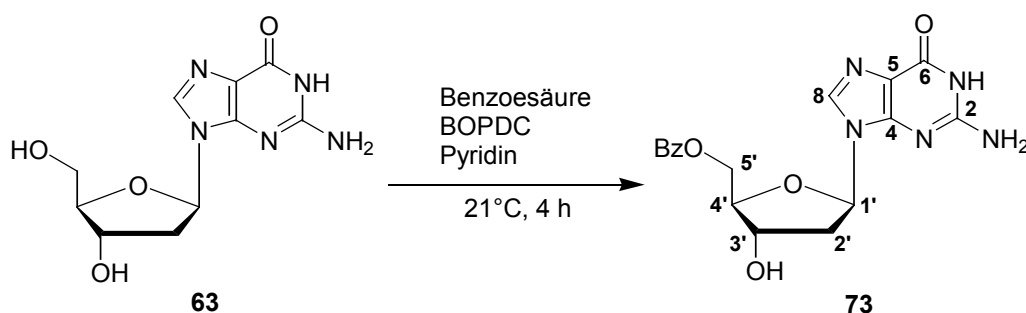
DC: R_F-Wert (Methanol/Ethylacetat 1:1 v/v): 0.38

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.57 (s, 1H, H6); 8.26 (s, 1H, H8); 6.51 (s, 2H, NH₂); 6.25 (m, 1H, H1'); 5.28 (s, 1H, 3'-OH); 4.94 (s, 1H, 5'-OH); 4.36 (s, 1H, H3'); 3.82 (m, 1H, H4'); 3.53 (m, 2H, H5'); 2.62 (m, 1H, H2'_a); 2.24 (m, 1H, H2'_b)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 160.7 (C2); 153.1 (C6); 149.5 (C4); 141.1 (C8); 127.4 (C5); 88.0 (C4'); 82.8 (C1'); 71.1 (C3'); 62.0 (C5'); 39.9 (C2')

MS (FAB, m/z): ber.: 251.1018 (M)
gef.: 252.3 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.3.4. Darstellung von 5'-O-Benzoyl-2'-desoxyguanosin 73



2.60 g (9.70 mmol) 2'-Desoxyguanosin **63** und 1.78 g (14.6 mmol) Benzoessäure wurden mit 50 ml Pyridin koevaporiert und anschließend in 150 ml Pyridin suspendiert. Nach der Zugabe von 7.41 g (29.1 mmol) Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)-phosphorsäurediamidchlorid wurde das Reaktionsgemisch 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mittels DC-Kontrolle verfolgt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Zugabe von 11 ml einer 1 M Kaliumcarbonat-Lösung und der anschließenden Extraktion durch dreimaliges Ausschütteln mit je 50 ml Chloroform. Die vereinigten, organischen Phasen wurde dann dreimal mit je 15 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abkondensiert. Zur vollständigen Entfernung des restlichen Pyridins wurde das Rohprodukt dreimal mit einem Gemisch aus Toluol und Ethanol koevaporiert, im Ölpumpenvakuum getrocknet und schließlich am Chromatotron (Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten von 10-30 %) aufgereinigt.

Ausbeute: 550 mg (1.50 mmol, 16 %), farbloser Feststoff

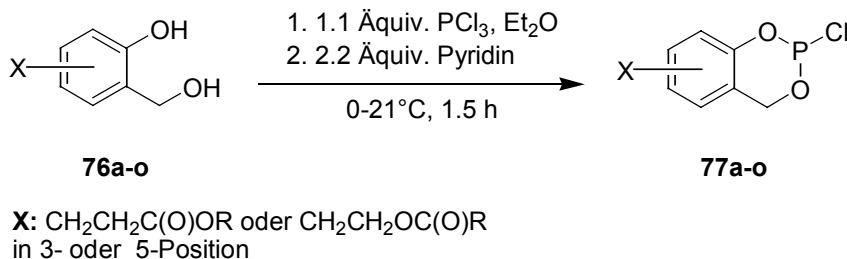
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.70

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.22 (s, 1H, H8); 7.90 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, *Hm*-Ph); 7.65 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 1H, *Hp*-Ph); 7.50 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, *Ho*-Ph); 6.93 (s, 2H, NH_2); 6.28-6.26 (m, 1H, H1'); 5.74 (s, 1H, 3'-OH); 5.50 (d, 2H, $\underline{\text{H}}_2\text{C-Ph}$); 4.51 (m, 1H, H3'); 4.27 (m, 2H, H5'); 4.09 (m, 1H, H4'); 2.81 (m, 1H_a, H2'); 2.37 (m, 1H_b, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 159.6 (C6); 154.1 (C2); 151.0 (C4); 133.8 (C8); 130.1-129.0 (5 \times C-Ph); 117.5 (C5); 84.4 (C1'); 83.4 (C4'); 70.9 (C3'); 65.3 (C5'); 45.6 (C2')

6.4. Synthese der „lock-in“-modifizierten *cycloSal*-NMPs

6.4.1. Synthesen der Saligenylchlorphosphane **76a-o** nach AAV-5



Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-5:

Alle Synthesen mu\u00dfen unter Argon als Inertgas durchgef\u00fchrt werden, um Sauerstoff und Feuchtigkeit ausschlie\u00dfen zu k\u00f6nnen.

Von den Saligenylalkohol **58a-o** wurden 3.0 mmol (600-800 mg) in mindestens 25 ml absolutem Diethylether gel\u00f6st (bei schlecht l\u00f6slichen Saligenylalkoholen wurde so viel Diethylether hinzugegeben, bis eine klare L\u00f6sung entstanden war). Unter R\u00fchren wurden dann bei Raumtemperatur 3.3 mmol (453 mg) Phosphortrichlorid z\u00fcgig zuge tropft. Anschließend mu\u00dfte das Reaktionsgemisch auf -0°C abgek\u00fchlt werden, bevor innerhalb einer halben Stunde 6.6 mmol (522 mg) Pyridin, gel\u00f6st in 4 ml Diethylether, zuge tropft werden konnte. Danach wurde das K\u00e4ltebad entfernt, um das Reaktionsgemisch wieder auf Raumtemperatur erw\u00e4rmen zu lassen. Vor der Filtration wurde nun der Ansatz zur m\u00f6glichst quantitativen F\u00e4llung des entstandenen Pyridiniumchlorids mehrere Stunden (am besten \u00fcber Nacht) bei -4°C aufbewahrt. Die ausgefallenen Pyridiniumsalze sollten durch Filtration mit Hilfe einer Umkehrfritte abgetrennt werden, was aber nicht vollst\u00e4ndig gelang. Nach dem Abkondensieren des L\u00f6sungsmittels wurden die Saligenylchlorphosphane **76a-o** als gelbe \u00d6le erhalten, die noch sichtbar mit Pyridiniumchlorid (farblose Salze) verunreinigt waren.

Ausbeute: Die Produkte konnten nicht analysenrein isoliert werden, da die Pyridiniumsalze mit Hilfe der Umkehrfritte nicht vollst\u00e4ndig abzutrennen waren. Durch die Messung von ^{31}P -NMR-Spektren (^1H -entkoppelt) konnten die gew\u00fcnschten Produkte aber identifiziert werden. Au\u00eferdem kann auch die erfolgreiche Verwendung dieser Produkte bei den nachfolgenden *cycloSal*-NMP-Synthesen

als Nachweis der Saligenylchlorphosphate **76a-o** gesehen werden.

Die Messung von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurde nach einigen Probespektren nicht weiter durchgeführt, da die Proben durch nicht zu vermeidende Oxidations- und Hydrolyseprozesse, so wie den Pyridiniumhydrochlorid-Verunreinigungen – vor allem im Aromatenbereich – nur eine unvollständige Wiedergabe der Daten erlaubt hätten. Die gemessenen ^{31}P -NMR-Daten der einzelnen Saligenylchlorphosphate **76a-o** sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

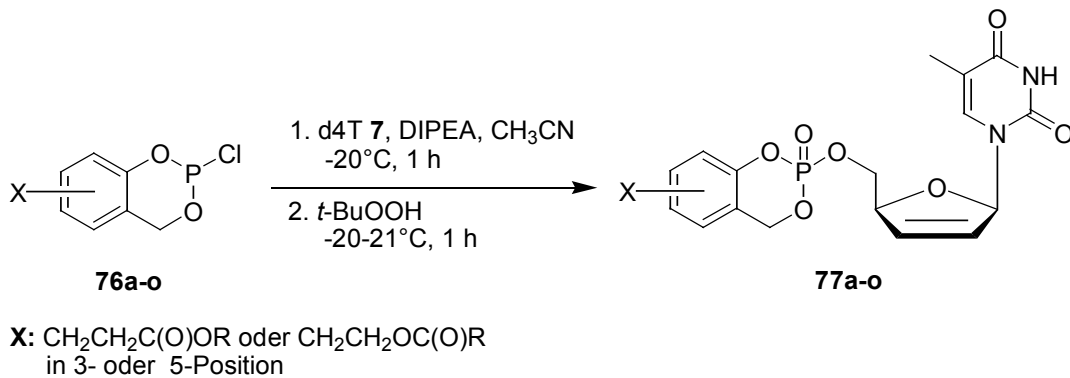
Tabelle 13 ^{31}P -NMR-Daten (101 MHz) der Saligenylchlorphosphate **76a-o**

Verbindung	Substituent X in		δ [ppm] in CDCl_3 :
	3-Position	5-Position	
76a	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{OMe}$	H	140.25
76b	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{OEt}$	H	140.27
76c	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{O}i\text{-Pr}$	H	140.40
76d	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{O}t\text{-Bu}$	H	140.46
76e	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{OBn}$	H	140.54
76f	H	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{OMe}$	140.07
76g	H	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{O}i\text{-Pr}$	140.20
76h	H	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{O}t\text{-Bu}$	140.33
76i	H	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO})\text{OBn}$	140.39
76j	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}(\text{CO})\text{Me}$	H	140.46
76k	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}(\text{CO})\text{Et}$	H	140.51
76l	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}(\text{CO})t\text{-Bu}$	H	140.94
76m	H	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}(\text{CO})\text{Me}$	139.82
76n	H	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}(\text{CO})t\text{-Bu}$	140.29
76o	8-Hydroxymethyl-4-MeU*		137.07

*Methylumbelliferon

Die Rohprodukte wurden unter Argon bei -21°C gelagert und konnten so über einige Wochen hinweg für die *cycloSal*-NMP-Synthese genutzt werden. Es ist trotzdem empfehlenswert nur kleine Mengen herzustellen, die in kurzer Zeit verbraucht werden, da die Reaktivität der Saligenylchlorphosphate kontinuierlich nachläßt. Das macht sich dann durch eine verringerte Nukleotid-Ausbeute bemerkbar.

6.4.2. Synthesen der *cycloSal*-d4TMPs 77a-o nach AAV-6



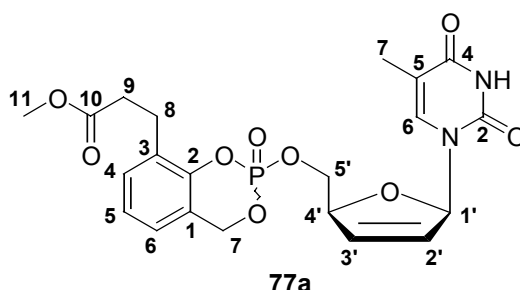
Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-6:

Alle Synthesen mußten unter Argon als Inertgas durchgeführt werden, um Sauerstoff und Feuchtigkeit ausschließen zu können. Deshalb wurde auch zu Beginn jeder Umsetzung zuerst d4T 7 mittels Pyridin koevaporiert.

Die gewünschte Menge d4T 7 (1 Äquivalent) wurde in 5 ml Acetonitril gelöst und mit 2 Äquivalenten DIPEA versetzt. Das Gemisch wurde auf -20°C abgekühlt (Ethanol-Kältebad mit flüssigem Stickstoff). Die benötigten 2 Äquivalente Saligenylchlorphosphan **76a-o** wurden mit Hilfe einer Spritze eingewogen und anschließend sofort zu der Reaktionslösung getropft. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten wurde auf ein vorheriges Verdünnen des Saligenylchlorphosphans mit Acetonitril verzichtet. Das Zutropfen der Saligenylchlorphosphane **76a-o** war in der Regel nach ca. 30 min abgeschlossen. Anschließend mußte das Kältebad entfernt werden, um die Reaktionslösung innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur erwärmen zu lassen. Die erfolgreiche Bildung von *cycloSal*-Monophosphit wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) überprüft. Sofern d4T 7 noch nicht vollständig verbraucht war, wurden weitere 0.5 Äquivalente Saligenylchlorphosphan zugegeben, bis kein Edukt mehr nachzuweisen war. Danach mußte das Reaktionsgemisch wieder auf -20°C abgekühlt werden, um das *cycloSal*-Monophosphit direkt durch die Zugabe von 3-4 Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan) oxidieren zu können. Die Oxidation wurde vervollständigt, indem man das Gemisch innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur erwärmen ließ. Dieser Reaktionsschritt wurde ebenfalls durch DC-Kontrolle überprüft. Danach konnte das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur abdestilliert werden. Als Rohprodukt wurde ein gelbes, zähes Harz erhalten.

Die chromatographische Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte durch zwei Trennungen mit Hilfe eines Chromatotrons. Die erste Trennung diente vor allem der Entfernung der entstandenen Salze und wurde mittels Ethylacetat und einem Methanol-Gradienten (0-10 %) als mobile Phase durchgeführt. Nach der zweiten Trennung (Dichlormethan mit angesäuertem (0.10 % Essigsäure) Methanol-Gradienten von 0-30 %) fielen die Produkte als farblose, zähe Öle an, die nach der abschließenden Gefriertrocknung in farblose, feste Schäume überführt werden konnten.

6.4.2.1. Darstellung von 3-MePr-cycloSal-d4TMP 77a



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

85 mg (379 μmol) d4T **7**, 207 mg (758 μmol) Saligenylchlorphosphan **76a** (verunreinigtes Rohprodukt), 98 mg (758 μmol) DIPEA, 300 μl (1.65 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 59 mg (123 μmol , 32 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.8)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.57

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.26 (dddd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, $3 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.20 (q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 1H_{1,D}, H6); 7.18 (q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H_{2,D}, H6); 7.16-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.79 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.79 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.5$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H_{2,D}, H1'); 6.40, 6.36 (2 \times ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H3'); 6.02 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H_{1,D}, H2'); 6.00 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.0$ Hz,

$^1\text{H-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.8$ Hz, 1H $_{1,\text{D}}$, H7-Benzyl); 5.38 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.2$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H7-Benzyl); 5.35 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.6$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H7-Benzyl); 4.98-4.93 (m, 1H, H4'); 4.34-4.24 (m, 2H, H5'); 3.57, 3.56 (2s, 3H, H11); 2.90-2.75 (m, 2H, H8); 2.59 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H $_{1,\text{D}}$, H9); 2.57 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H $_{2,\text{D}}$, H9); 1.63 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 3H $_{1,\text{D}}$, H7); 1.59 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 3H $_{2,\text{D}}$, H7)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.5 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.9, 150.8 (2 \times C2); 148.1 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C2 $_{1,\text{D}}$ -Aryl); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2 $_{2,\text{D}}$ -Aryl); 135.8, 135.7 (2 \times C6); 133.0, 132.9 (2 \times C3'); 130.3, 130.2 (2 \times C4-Aryl); 129.6, 129.5 (2 \times C1-Aryl); 127.6, 127.5 (2 \times C2'); 124.5 (2 \times C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7, 121.6 (2 \times C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2 \times C5); 89.4, 89.3 (2 \times C1'); 84.3 (2 \times C4'); 68.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, C5' $_{1,\text{D}}$); 68.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C5' $_{2,\text{D}}$); 68.4 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C7-Benzyl); 51.5 (2 \times C11); 33.3, 33.2 (2 \times C9); 24.3, 24.2 (2 \times C8); 12.0, 11.9 (2 \times C7)

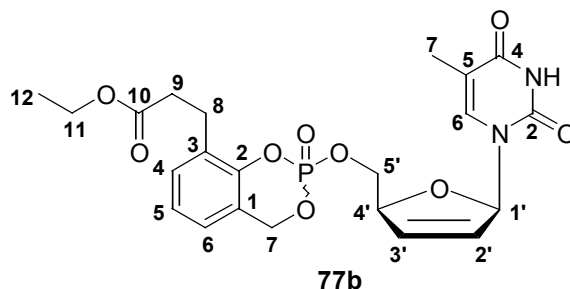
$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.53, -7.60

HPLC: $t_{\text{R}} = 11.3, 11.5$ min (Methode I)
 $t_{\text{R}} = 10.4$ min (Methode II)

UV (CH $_3$ CN): λ_{max} : 264.09, 207.47, 195.19 nm
 λ_{min} : 232.25 nm

MS (ESI $^+$, m/z): ber.: 478.4 (M)
 gef.: 478.9 (M+H $^+$)

6.4.2.2. Darstellung von 3-EtPr-cycloSal-d4TMP 77b



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

65 mg (290 μmol) d4T **7**, 167 mg (580 μmol) Saligenylchlorphosphan **76b** (verunreinigtes Rohprodukt), 75 mg (580 μmol) DIPEA, 200 μl (1.00 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 50 mg (101 μmol , 35 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.8)

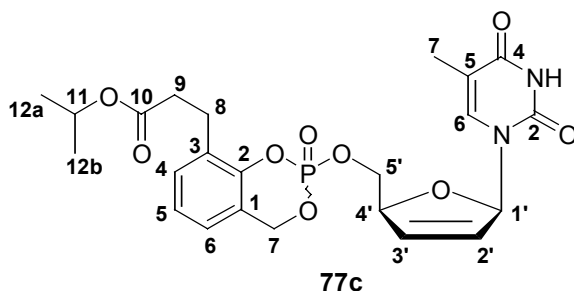
DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.58

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.32, 11.31 (2s, 1H, NH); 7.26 (dddd, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, 3⁴J_{H-H} = 2.0 Hz, 1H, H4-Aryl); 7.20 (q, ⁴J_{H-H} = 1.2 Hz, 1H_{1,D}, H6); 7.18 (q, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 1H_{2,D}, H6); 7.15-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.80-6.78 (m, 1H, H1'); 6.40, 6.36 (2ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.8 Hz, 1H, H3'); 6.02 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 2.5 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 1H_{1,D}, H2'); 6.00 (ddd, ³J_{H-H} = 5.9 Hz, ³J_{H-H} = 2.4 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.48 (dd, ²J_{H-H} = 14.2 Hz, ³J_{H-P} = 5.6 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.44 (dd, ²J_{H-H} = 14.2 Hz, ³J_{H-P} = 5.3 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.38 (dd, ²J_{H-H} = 14.2 Hz, ³J_{H-P} = 4.8 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.34 (dd, ²J_{H-H} = 14.2 Hz, ³J_{H-P} = 5.2 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.97-4.93 (m, 1H, H4'); 4.33-4.25 (m, 2H, H5'); 4.03, 4.02 (2q, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, 2H, H11); 2.88-2.77 (m, 2H, H8); 2.57 (dd, 2³J_{H-H} = 7.4 Hz, 2H, H9); 1.63, 1.58 (2d, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 3H, H7); 1.14, 1.13 (2dd, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, 3H, H12)

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 173.1 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.9, 150.8 (2 \times C2); 148.1, 147.9 (2d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C2-Aryl); 135.8, 135.7 (2 \times C6); 133.0, 132.9 (2 \times C3'); 130.3 (2 \times C4-Aryl); 129.7, 129.6 (2 \times C1-Aryl); 127.6, 127.5 (2 \times C2'); 124.5 (2 \times C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7, 121.6 (2 \times C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2 \times C5); 89.4, 89.3 (2 \times C1'); 84.3 (2 \times C4'); 68.8 (2d, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, C5'); 68.4 (2d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, C7-Benzyl); 60.1 (C11); 33.5, 33.4 (2 \times C9); 24.3, 24.2 (2 \times C8); 14.2 (C12); 12.0, 11.9 (2 \times C7)

^{31}P -NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.52, -7.57
HPLC:	t_R = 12.8 min (Methode I) t_R = 11.3 min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 492.1298 (M) gef.: 493.3 (M+H $^+$, Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.3. Darstellung von 3-*i*-PrPr-cycloSal-d4TMP 77c



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

82 mg (366 μmol) d4T **7**, 221 mg (731 μmol) Saligenylchlorphosphan **76c** (verunreinigtes Rohprodukt), 98 mg (731 μmol) DIPEA, 296 μl (1.63 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 101 mg (199 μmol , 54 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.35, 11.34 (2s, 1H, NH); 7.27-7.23 (m, 1H, H4-Aryl); 7.20, 7.18 (2q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H, H6); 7.15-7.08 (m, 2H, H5-, H6-Aryl); 6.80-6.78 (m, 1H, H1'); 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 $_{1,D}$, H3'); 6.36 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H $_{2,D}$, H3'); 6.02 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H $_{1,D}$, H2'); 6.00 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H $_{2,D}$, H2'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 4.8$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 4.3$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.38 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 4.8$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.34 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.6$

Hz, $^3J_{H-P}$ = 4.5 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.97-4.93 (m, 1H, H4'); 4.85, 4.84 (2sept, $^3J_{H-H}$ = 6.3 Hz, 1H, H11); 4.32-4.25 (m, 2H, H5'); 2.87-2.77 (m, 2H, H8); 2.54 (2dd, $^3J_{H-H}$ = 7.3 Hz, 2H, H9); 1.63, 1.57 (2d, $^4J_{H-H}$ = 1.1 Hz, 3H, H7); 1.14-1.11 (m, 6H, H12a,b)

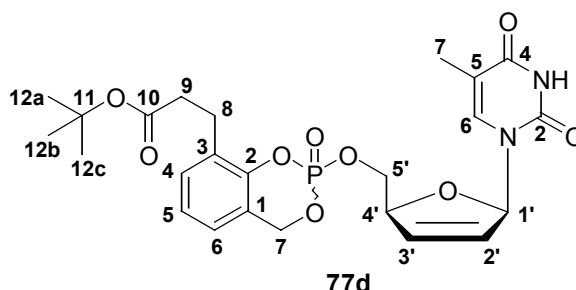
^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 171.6, 171.5 (2×C10); 163.9 (C4); 150.9, 150.8 (2×C2); 148.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.6 Hz, C2-Aryl); 147.9 (d, $^2J_{C-P}$ = 8.1 Hz, C2-Aryl); 135.8 (2×C6); 133.0 132.9 (2×C3'); 130.3 (2×C4-Aryl); 129.6 (2×C1-Aryl); 127.6, 127.5 (2×C2'); 124.5 (2×C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7 (C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2×C5); 89.4, 89.3 (2×C1'); 84.4, 84.3 (2×C4'); 68.8, 68.7 (2×C5'); 68.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.6 Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, C7-Benzyl); 67.5 (C11); 33.7 (2×C9); 24.3 (2×C8); 21.7 (C12a, b); 12.0, 11.9 (2×C7)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.50, -7.53

HPLC: t_R = 13.7 min (Methode I)
 t_R = 12.3 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 506.1454 (M)
 gef.: 507.2 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.4. Darstellung von 3-*t*-BuPr-cycloSal-d4TMP 77d

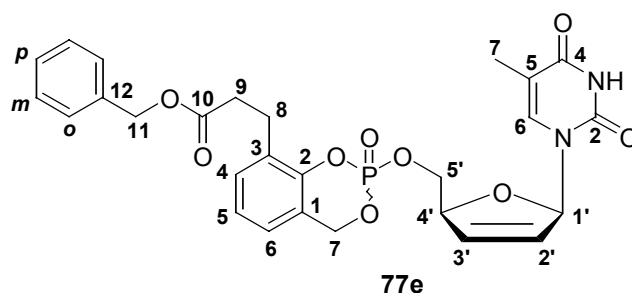


Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

68 mg (303 μmol) d4T **7**, 192 mg (606 μmol) Saligenylchlorphosphan **76d** (verunreinigtes Rohprodukt), 78 mg (606 μmol) DIPEA, 245 μl (1.35 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute:	115 mg (221 μ mol, 73 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)
DC:	R _F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.46
¹ H-NMR:	δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d ₆): 11.32, 11.31 (2s, 1H, NH); 7.27-7.24 (m, 1H, H4-Aryl); 7.20, 7.18 (2q, ⁴ J _{H-H} = 1.3 Hz, 1H, H6); 7.15-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.80-6.78 (m, 1H, H1'); 6.40, 6.36 (2ddd, ³ J _{H-H} = 6.0 Hz, ³ J _{H-H} = 1.7 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.7 Hz, 1H H3'); 6.02 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.1 Hz, ³ J _{H-H} = 2.4 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.4 Hz, 1H _{1,D} , H2'); 6.00 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.1 Hz, ³ J _{H-H} = 2.3 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.4 Hz, 1H _{2,D} , H2'); 5.47 (dd, ² J _{H-H} = 14.3 Hz, ³ J _{H-P} = 5.7 Hz, 1H _{1,D} , H7-Benzyl); 5.44 (dd, ² J _{H-H} = 14.6 Hz, ³ J _{H-P} = 4.8 Hz, 1H _{1,D} , H7-Benzyl); 5.37 (dd, ² J _{H-H} = 12.4 Hz, ³ J _{H-P} = 5.7 Hz, 1H _{2,D} , H7-Benzyl); 5.35 (dd, ² J _{H-H} = 12.3 Hz, ³ J _{H-P} = 5.7 Hz, 1H _{2,D} , H7-Benzyl); 4.97-4.93 (m, 1H, H4'); 4.34-4.25 (m, 2H, H5'); 2.87-2.73 (m, 2H, H8); 2.47 (dd, ³ J _{H-H} = 7.5 Hz, 2H _{1,D} , H9); 2.46 (dd, ³ J _{H-H} = 8.1 Hz, 2H _{2,D} , H9); 1.64, 1.57 (2d, ⁴ J _{H-H} = 1.1 Hz, 3H, H7); 1.35, 1.34 (2s, 9H, H12a-c)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d ₆): 171.4, 171.3 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.8 (2 \times C2); 148.0 (d, ² J _{C-P} = 6.6 Hz, C2-Aryl); 148.0 (d, ² J _{C-P} = 7.1 Hz, C2-Aryl); 135.8, 135.7 (2 \times C6); 133.0 132.9 (2 \times C3'); 130.3 (2 \times C4-Aryl); 129.7, 129.6 (2 \times C1-Aryl); 127.5 (2 \times C2'); 124.4 (2 \times C6-Aryl); 124.2 (C5-Aryl); 121.7, 121.6 (C3-Aryl); 109.8 (2 \times C5); 89.3 (2 \times C1'); 84.3 (2 \times C4'); 80.0 (C11); 68.8 (d, ² J _{C-P} = 6.1 Hz, C5'); 68.7 (d, ² J _{C-P} = 5.6 Hz, C5'); 68.4 (d, ² J _{C-P} = 7.1 Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, ² J _{C-P} = 6.6 Hz, C7-Benzyl); 34.6, 34.5 (2 \times C9); 27.9 (12a-c); 24.4 (2 \times C8); 12.0, 11.9 (2 \times C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d ₆): -7.50, -7.53
HPLC:	t _R = 14.7 min (Methode I) t _R = 13.2 min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 520.1611 (M) gef.: 521.2 (M+H ⁺ , Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.5. Darstellung von 3-BnPr-cycloSal-d4TMP 77e



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

80 mg (357 μmol) d4T **7**, 217 mg (620 μmol) Saligenylchlorphosphan **76e** (verunreinigtes Rohprodukt), 92 mg (714 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 85 mg (153 μmol , 43 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.64

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.33, 11.31 (2s, 1H, NH); 7.36-7.28 (m, 5H, Ph) 7.26-7.23 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18 (q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 1H $_{1,D}$, H6); 7.17 (q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H $_{2,D}$, H6); 7.15-7.12 (m, 2H, H6-Aryl); 7.09, 7.08 (2dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H, H5-Aryl) 6.79-6.77 (m, 1H, H1'); 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 $_{1,D}$, H3'); 6.32 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H $_{2,D}$, H3'); 5.99 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H $_{1,D}$, H2'); 5.97 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H $_{2,D}$, H2'); 5.47 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.9$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.2$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.37 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.8$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.34 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.1$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.07, 5.06 (2s, 2H, H11) 4.94-4.90 (m, 1H, H4'); 4.32-4.22 (m, 2H, H5'); 2.92-2.80 (m, 2H, H8); 2.68-2.62 (m, 2H, H9); 1.64, 1.58 (2 \times d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 3H, H7)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.4, 172,3 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.8, 150.7 (2 \times C2); 148.0 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C2-Aryl); 135.8, 135.7 (2 \times C6); 132.9 (2 \times C3'); 131.2 (C12); 130.3 (2 \times C4-Aryl); 129.5 (2 \times C1-Aryl); 128.6 (2 \times C m -Ph); 128.1 (2 \times C o -Ph); 128.1 (C p -Ph); 127.5 (2 \times C2'); 124.5 (2 \times C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7 (C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2 \times C5); 89.4, 89.3 (2 \times C1'); 84.3, 84.2 (2 \times C4'); 68.7 (2 \times C5'); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C7-Benzyl); 65.7 (C11); 33.4 (2 \times C9); 24.3, 24.2 (2 \times C8); 12.0, 11.9 (2 \times C7)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.57 (nur 1 Peak)

HPLC: $t_{\text{R}} = 15.0$ min (Methode I)

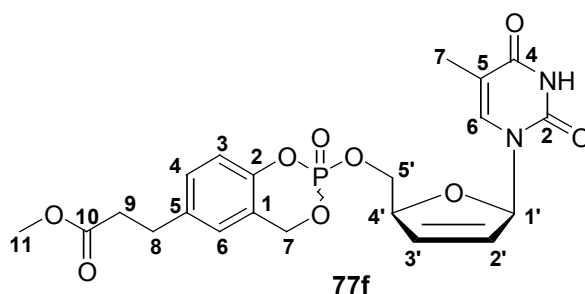
$t_{\text{R}} = 13.6$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 554.15 (M)

gef.: 555.2 (M+H $^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

555.1532 (M+H $^+$, Hochoflösung)

6.4.2.6. Darstellung von 5-MePr-cycloSal-d4TMP 77f



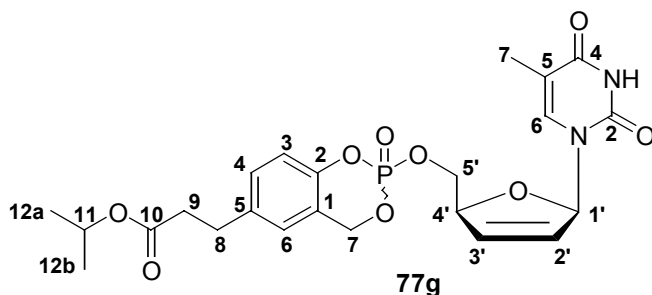
Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

85 mg (379 μmol) d4T **7**, 207 mg (758 μmol) Saligenylchlorphosphan **76f** (verunreinigtes Rohprodukt), 98 mg (758 μmol) DIPEA, 300 μl (1.65 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 70 mg (146 μmol , 39 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_{F} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.52

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.23-7.18 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18, 7.15 (2q, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 1H, H6); 7.13-7.11 (m, 1H, H6-Aryl); 7.03, 7.00 (2d, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.79, 6.78 (2ddd, ³J_{H-H} = 3.6 Hz, 2×⁴J_{H-H} = 1.8 Hz, 1H, H1'); 6.40 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.8 Hz, 1H_{1.D}, H3'); 6.34 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H_{2.D}, H3'); 6.01 (ddd, ³J_{H-H} = 5.9 Hz, ³J_{H-H} = 2.4 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.4 Hz, 1H_{1.D}, H2'); 5.99 (ddd, ³J_{H-H} = 6.1 Hz, ³J_{H-H} = 2.2 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H_{2.D}, H2'); 5.45 (dd, ²J_{H-H} = 14.4 Hz, ³J_{H-P} = 5.9 Hz, 1H_{1.D}, H7-Benzyl); 5.41 (dd, ²J_{H-H} = 14.4 Hz, ³J_{H-P} = 5.6 Hz, 1H_{1.D}, H7-Benzyl); 5.35 (d(br), ²J_{H-H} = 14.2 Hz, 1H_{2.D}, H7-Benzyl); 5.33 (d(br), ²J_{H-H} = 13.7 Hz, 1H_{2.D}, H7-Benzyl); 4.96-4.91 (m, 1H, H4'); 4.34-4.22 (m, 2H, H5'); 3.57 (s, 3H, H11); 2.81 (dd, 2×³J_{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H8); 2.60 (dd, 2×³J_{H-H} = 7.6 Hz, 2H, H9); 1.66, 1.59 (2d, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 3H, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 172.6 (2×C10); 163.9 (2×C4); 150.8 (C2); 148.0 (2d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C2-Aryl); 137.0 (C5-Aryl); 135.8 (2×C6); 133.0, 132.9 (2×C3'); 129.8, 129.7 (2×C4-Aryl); 129.0, 128.9 (2×C1-Aryl); 127.5, 127.4 (2×C2'); 125.9 (2×C6-Aryl); 118.2, 118.1 (2×C3-Aryl); 109.8 (2×C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2×C4'); 68.5 (d, ²J_{C-P} = 7.6 Hz, C5'_{1.D}); 68.5 (d, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, C5'_{2.D}); 68.4 (2d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, C7-Benzyl); 51.5 (C11); 34.8 (C9); 29.5 (C8); 12.1, 12.0 (2×C7)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.98, -8.04
- HPLC: t_R = 11.9, 12.0 min (Methode I)
t_R = 10.6 min (Methode II)
- MS (FAB, m/z): ber.: 478.1141 (M)
gef.: 479.4 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.7. Darstellung von 5-*i*-PrPr-cycloSal-d4TMP 77g

Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

85 mg (379 μ mol) d4T **7**, 229 mg (758 μ mol) Saligenylchlorphosphan **76g** (verunreinigtes Rohprodukt), 98 mg (758 μ mol) DIPEA, 300 μ l (1.65 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 64 mg (126 μ mol, 33 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.63

1 H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.32, 11.31 (2s, 1H, NH); 7.24-7.18 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18, 7.15 (2q, $^4J_{H-H}$ = 1.1 Hz, 1H, H6); 7.13-7.11 (m, 1H, H6-Aryl); 7.03 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.6 Hz, 1H_{1,D}, H3-Aryl); 7.00 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.4 Hz, 1H_{2,D}, H3-Aryl); 6.79 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 3.6 Hz, $2 \times ^4J_{H-H}$ = 1.8 Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.77 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 3.7 Hz, $2 \times ^4J_{H-H}$ = 1.9 Hz, 1H_{2,D}, H1'); 6.40 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 6.0 Hz, $^3J_{H-H}$ = 1.8 Hz, $^4J_{H-H}$ = 1.8 Hz, 1H_{1,D}, H3'); 6.33 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 5.9 Hz, $^3J_{H-H}$ = 1.7 Hz, $^4J_{H-H}$ = 1.7 Hz, 1H_{2,D}, H3'); 6.00 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 5.6 Hz, $^3J_{H-H}$ = 2.0 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2.0 Hz, 1H_{1,D}, H2'); 5.99 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 6.0 Hz, $^3J_{H-H}$ = 2.3 Hz, $^4J_{H-H}$ = 1.5 Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.45 (dd, $^2J_{H-H}$ = 14.4 Hz, $^3J_{H-P}$ = 4.6 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.40 (dd, $^2J_{H-H}$ = 14.2 Hz, $^3J_{H-P}$ = 4.1 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.35 (d(br), $^2J_{H-H}$ = 14.5 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.32 (d(br), $^2J_{H-H}$ = 14.1 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.96-4.92 (m, 1H, H4'); 4.85 (2sept, $^3J_{H-H}$ = 6.2 Hz, 1H, H11); 4.34-4.21 (m, 2H, H5'); 2.80 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 7.4 Hz, 2H, H8); 2.55 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 7.5 Hz, 2H, H9); 1.66, 1.60 (2d, $^4J_{H-H}$ = 1.1 Hz, 3H, H7); 1.13, 1.12 (2d, $^3J_{H-H}$ = 6.2 Hz, 6H, H12a,b)

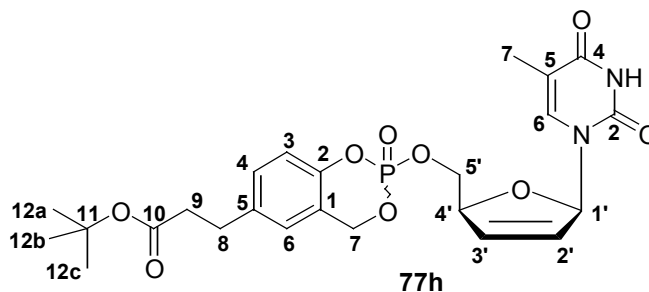
^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.9 (2 \times C10); 163.9 (2 \times C4); 150.9 (C2); 148.4 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C2-Aryl); 137.0 (C5-Aryl); 135.8 (2 \times C6); 133.0, 132.9 (2 \times C3'); 129.8, 129.7 (2 \times C4-Aryl); 129.0, 128.9 (2 \times C1-Aryl); 127.5, 127.4 (2 \times C2'); 125.9 (2 \times C6-Aryl); 118.2, 118.1 (2 \times C3-Aryl); 109.8 (2 \times C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2 \times C4'); 68.5 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.1$ Hz, C5'); 68.4 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C7-Benzyl); 67.3 (C11); 35.3 (C9); 29.6 (C8); 21.7 (2 \times C12a,b); 12.1, 12.0 (2 \times C7)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.00, -8.02

HPLC: $t_{\text{R}} = 13.9$ min (Methode I)
 $t_{\text{R}} = 12.4$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 506.1454 (M)
 gef.: 507.4 ($\text{M}+\text{H}^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.8. Darstellung von 5-*t*-BuPr-cycloSal-d4TMP 77h



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

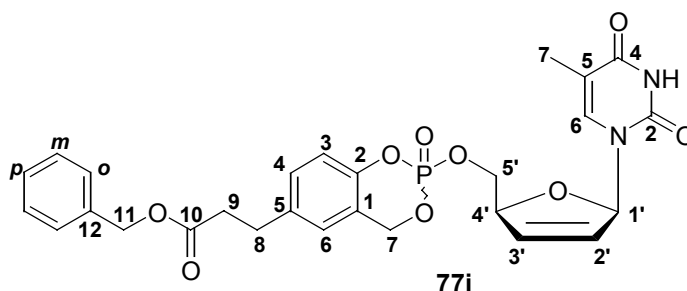
80 mg (357 μmol) d4T **7**, 225 mg (714 μmol) Saligenylchlorphosphan **76h** (verunreinigtes Rohprodukt), 92 mg (714 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 81 mg (156 μmol , 44 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren

DC: R_{F} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.49

¹ H-NMR:	δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d ₆): 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.23-7.18 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18, 7.15 (2q, ⁴ J _{H-H} = 1.1 Hz, 1H, H6); 7.12 (d, ⁴ J _{H-H} = 1.9 Hz, 1H, H6-Aryl); 7.03 (d, ³ J _{H-H} = 8.4 Hz, 1H _{1,D} , H3-Aryl); 7.01 (d, ³ J _{H-H} = 8.5 Hz, 1H _{2,D} , H3-Aryl); 6.79 (ddd, ³ J _{H-H} = 3.5 Hz, 2 ⁴ J _{H-H} = 1.7 Hz, 1H _{1,D} , H1'); 6.77 (ddd, ³ J _{H-H} = 3.6 Hz, 2 ⁴ J _{H-H} = 1.8 Hz, 1H _{2,D} , H1'); 6.40 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.0 Hz, ³ J _{H-H} = 1.8 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.8 Hz, 1H _{1,D} , H3'); 6.34 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.0 Hz, ³ J _{H-H} = 1.7 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.7 Hz, 1H _{2,D} , H3'); 6.00 (ddd, ³ J _{H-H} = 5.9 Hz, ³ J _{H-H} = 2.3 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.4 Hz, 1H _{1,D} , H2'); 5.99 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.1 Hz, ³ J _{H-H} = 2.1 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.4 Hz, 1H _{2,D} , H2'); 5.44, 5.41 (2dd, ² J _{H-H} = 14.4 Hz, ³ J _{H-P} = 5.6 Hz, 1H _{1,D} , H7-Benzyl); 5.35 (dd, ² J _{H-H} = 14.3 Hz, ³ J _{H-P} = 2.1 Hz, 1H _{2,D} , H7-Benzyl); 5.32 (dd, ² J _{H-H} = 14.3 Hz, ³ J _{H-P} = 2.4 Hz, 1H _{2,D} , H7-Benzyl); 4.96-4.92 (m, 1H, H4'); 4.33-4.22 (m, 2H, H5'); 2.77 (dd, 2 ³ J _{H-H} = 7.4 Hz, 2H, H8); 2.48 (dd, 2 ³ J _{H-H} = 7.4 Hz, 2H, H9); 1.67, 1.60 (2d, ⁴ J _{H-H} = 1.1 Hz, 3H, H7); 1.34, 1.33 (2s, 9H, H12a-c)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d ₆): 171.5 (C10); 163.9, 163.8 (2 \times C4); 150.8 (2 \times C2); 148.0 (C2-Aryl); 137.1 (C5-Aryl); 135.8 (2 \times C6); 133.0, 132.9 (2 \times C3'); 132.2 (C1-Aryl); 129.8 (C4-Aryl); 127.5, 127.4 (2 \times C2'); 126.0, 125.9 (2 \times C6-Aryl); 118.1, 118.0 (2 \times C3-Aryl); 109.8 (2 \times C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2 \times C4'); 79.9 (C11); 68.5-68.3 (C5'+C7-Benzyl); 36.2 (C9); 29.8 (C8); 27.9 (2 \times C12a-c); 12.1, 12.0 (2 \times C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d ₆): -8.02 (nur 1 Peak)
HPLC:	t _R = 14.6 min (Methode I) t _R = 13.4 min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 520.1611 (M) gef.: 521.3 (M+H ⁺ , Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.9. Darstellung von 5-BnPr-cycloSal-d4TMP 77i



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

80 mg (357 μmol) d4T **7**, 250 mg (714 μmol) Saligenylchlorphosphan **76i** (verunreinigtes Rohprodukt), 92 mg (714 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 116 mg (209 μmol , 59 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.63

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.36-7.26 (m, 5H, Ph); 7.23-7.18 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18, 7.15 (2q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H, H6); 7.11-7.09 (m, 1H, H6-Aryl); 7.01, 6.99 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.79 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.5$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.77 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H_{2,D}, H1'); 6.40, 6.34 (2ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, 1H, H3'); 6.01 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, 1H_{1,D}, H2'); 5.99 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.41 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.8$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.38 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.7$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.33 (d(br), $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.30 (d(br), $^2J_{\text{H-H}} = 14.1$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.06 (s, 2H, H11); 4.96-4.92 (m, 1H, H4'); 4.34-4.22 (m, 2H, H5'); 2.83 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.67 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H, H9); 1.66, 1.60 (2d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 3H, H7)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.1, 171.9 (2 \times C10); 163.9 (2 \times C4); 150.9 (2 \times C2); 148.1 (C2-Aryl); 136.9 (C12); 136.3 (C5-Aryl); 135.9, 135.8 (2 \times C6); 133.0 (2 \times C3'); 129.9, 129.8 (2 \times C4-Aryl); 128.6 (2 \times C m -Ph); 128.5 (C1-Aryl); 128.2 (C p -Ph); 128.1 (2 \times C o -Ph); 127.5 (2 \times C2'); 126.0, 125.9 (2 \times C6-Aryl); 118.2, 118.1 (2 \times C3-Aryl); 109.8 (2 \times C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2 \times C4'); 68.5, 68.4 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C5'); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C7 $_{1.D}$ -Benzyl); 68.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, C7 $_{2.D}$ -Benzyl); 65.6 (C11); 35.0 (C9); 29.6 (C8); 12.1, 12.0 (2 \times C7)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.98, -8.05

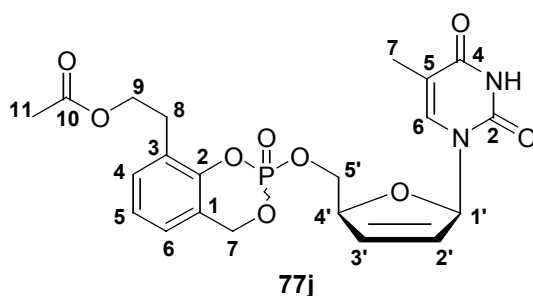
HPLC: $t_{\text{R}} = 15.3$ min (Methode I)

$t_{\text{R}} = 13.7$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 554.1454 (M)

gef.: 555.2 (M+H $^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.10. Darstellung von 3-AcEt-cycloSal-d4TMP 77j



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

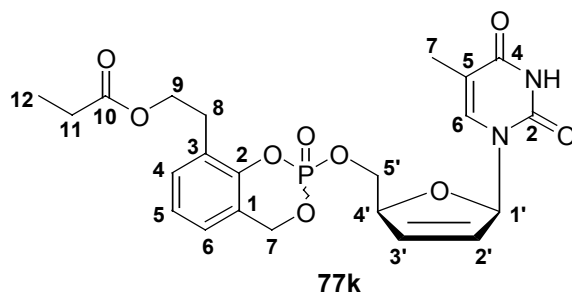
85 mg (379 μmol) d4T **7**, 207 mg (758 μmol) Saligenylchlorphosphan **76j** (verunreinigtes Rohprodukt), 98 mg (758 μmol) DIPEA, 300 μl (1.65 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 57 mg (119 μmol , 31 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_{F} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.61

- ¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.33, 11.31 (2s, 1H, NH); 7.29 (dddd, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, 3×⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H, H4-Aryl); 7.19, 7.18 (2q, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 1H, H6); 7.16-7.10 (m, 2H, H5-Aryl+H6-Aryl); 6.80-6.78 (m, 1H, H1'); 6.40 (ddd, ³J_{H-H} = 6.1 Hz, ³J_{H-H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H_{1,D}, H3'); 6.36 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.8 Hz, 1H_{2,D}, H3'); 6.02 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 2.3 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.5 Hz, 1H_{1,D}, H2'); 6.00 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 2.2 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.48 (dd, ²J_{H-H} = 14.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.7 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.45 (dd, ²J_{H-H} = 14.3 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.38 (dd, ²J_{H-H} = 14.0 Hz, ³J_{H-P} = 7.4 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.35 (dd, ²J_{H-H} = 14.2 Hz, ³J_{H-P} = 8.0 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.96-4.93 (m, 1H, H4'); 4.32-4.26 (m, 2H, H5'); 4.22-4.12 (m, 2H, H9); 2.97-2.82 (m, 2H, H8); 1.96, 1.95 (2s, 3H, H11); 1.63, 1.59 (2d, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 3H, H7)
- ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 173.3, 173.0 (2×C10); 163.9 (C4); 150.9, 150.8 (2×C2); 148.3, 148.2 (2×C2-Aryl); 135.8 (2×C6); 133.0, 132.9 (2×C3'); 131.1, 131.0 (2×C4-Aryl); 130.3, 130.2 (2×C1-Aryl); 127.6, 127.5 (2×C2'); 124.8 (2×C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7, 121.6 (2×C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2×C5); 89.4, 89.3 (2×C1'); 84.3, 84.2 (2×C4'); 68.8 (d, ²J_{C-P} = 5.1 Hz, C5'_{1,D}); 68.8 (d, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, C5'_{2,D}); 68.4 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, ²J_{C-P} = 7.6 Hz, C7-Benzyl); 63.0, 62.9 (2×C9); 28.3 (2×C8); 20.8 (2×C11); 12.0, 11.9 (2×C7)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.50, -7.64
- HPLC: t_R = 11.5, 11.7 min (Methode I)
t_R = 10.3 min (Methode II)
- MS (FAB, m/z): ber.: 478.1141 (M)
gef.: 479.2 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.11. Darstellung von 3-PrEt-cycloSal-d4TMP 77k



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

60 mg (260 μ mol) d4T **7**, 130 mg (470 μ mol) Saligenylchlorphosphan **76k** (verunreinigtes Rohprodukt), 70 mg (540 μ mol) DIPEA, 240 μ l (1.07 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

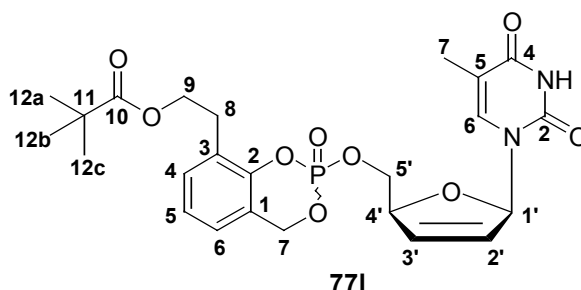
Ausbeute: 37 mg (73 μ mol, 28 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.63

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.32, 11.30 (2s, 1H, NH); 7.29 (dddd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, $3 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H, H4-Aryl); 7.19, 7.18 (2q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H, H6); 7.15-7.08 (m, 2H, H5-Aryl+H6-Aryl); 6.80-6.77 (m, 1H, H1'); 6.40 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H_{1,D}, H3'); 6.36 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H_{2,D}, H3'); 6.02 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H_{1,D}, H2'); 6.00 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.2$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.7$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.45 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.3$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.38 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.0$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.35 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.0$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.95-4.92 (m, 1H, H4'); 4.32-4.25 (m, 2H, H5'); 4.21-4.11 (m, 2H, H9); 2.95-2.81 (m, 2H, H8); 2.35, 2.34 (2q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H11); 1.63, 1.59 (2d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 3H, H7); 1.18, 1.17 (2t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 3H, H12)

^{13}C -NMR:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.9, 172.6 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.8, 150.7 (2 \times C2); 148.2, 148.0 (2 \times C2-Aryl); 135.8 (2 \times C6); 133.0 132.9 (2 \times C3'); 131.1, 131.0 (2 \times C4-Aryl); 130.3, 130.2 (2 \times C1-Aryl); 127.6, 127.5 (2 \times C2'); 124.8 (2 \times C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7, 121.6 (2 \times C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2 \times C5); 89.4, 89.3 (2 \times C1'); 84.3, 84.2 (2 \times C4'); 68.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.1$ Hz, C5' $_{1,D}$); 68.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C5' $_{2,D}$); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C7-Benzyl); 62.9, 62.8 (2 \times C9); 28.3 (2 \times C8); 26.9 (C11); 12.0, 11.9 (2 \times C7); 9.1 (C12)
^{31}P -NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.55, -7.66
HPLC:	$t_R = 12.7$ min (Methode I) $t_R = 11.4$ min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 429.1298 (M) gef.: 431.5 (M+H $^+$, Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.12. Darstellung von 3-PivEt-cycloSal-d4TMP 77I



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

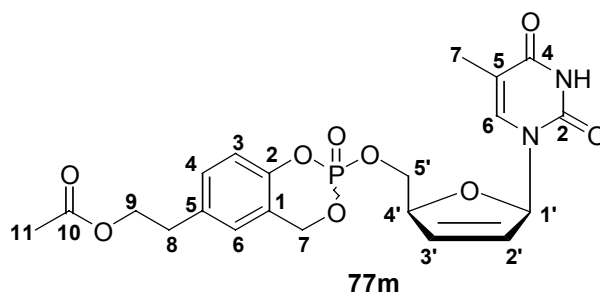
83 mg (370 μmol) d4T **7**, 234 mg (740 μmol) Saligenylchlorphosphan **76I** (verunreinigtes Rohprodukt), 96 mg (740 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 102 mg (196 μmol , 52 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.60

¹ H-NMR:	δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d ₆): 11.33, 11.31 (2s, 1H, NH); 7.30-7.26 (m, 1H, H4-Aryl); 7.19, 7.18 (2q, ⁴ J _{H-H} = 1.2 Hz, 1H, H6); 7.17-7.10 (m, 2H, H5-Aryl+H6-Aryl); 6.81-6.78 (m, 1H, H1'); 6.40 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.0 Hz, ³ J _{H-H} = 1.7 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.7 Hz, 1H _{1.D} , H3'); 6.36 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.0 Hz, ³ J _{H-H} = 1.8 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.8 Hz, 1H _{2.D} , H3'); 6.02 (ddd, ³ J _{H-H} = 6.2 Hz, ³ J _{H-H} = 2.4 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.2 Hz, 1H _{1.D} , H2'); 6.00 (ddd, ³ J _{H-H} = 5.9 Hz, ³ J _{H-H} = 2.4 Hz, ⁴ J _{H-H} = 1.4 Hz, 1H _{2.D} , H2'); 5.48 (dd, ² J _{H-H} = 14.3 Hz, ³ J _{H-P} = 5.1 Hz, 1H _{1.D} , H7-Benzyl); 5.44 (dd, ² J _{H-H} = 14.3 Hz, ³ J _{H-P} = 4.8 Hz, 1H _{1.D} , H7-Benzyl); 5.38 (dd, ² J _{H-H} = 14.2 Hz, ³ J _{H-P} = 4.8 Hz, 1H _{2.D} , H7-Benzyl); 5.35 (dd, ² J _{H-H} = 14.2 Hz, ³ J _{H-P} = 5.3 Hz, 1H _{2.D} , H7-Benzyl); 4.97-4.92 (m, 1H, H4'); 4.35-4.24 (m, 2H, H5'); 4.22-4.16 (m, 2H, H9); 2.99-2.82 (m, 2H, H8); 1.64, 1.59 (2d, ⁴ J _{H-H} = 1.2 Hz, 3H, H7); 1.05 (2s, 9H, H12a-c)
¹³ C-NMR:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d ₆): 177.4 (2×C10); 163.9 (C4); 150.8 (2×C2); 148.2 (d, ² J _{H-H} = 7.1 Hz, C2 _{1.D} -Aryl); 148.1 (d, ² J _{H-H} = 7.6 Hz, C2 _{2.D} -Aryl); 135.8 (2×C6); 132.9 (2×C3'); 131.2 (2×C4-Aryl); 127.5 (2×C2'); 127.3, 127.2 (2×C1-Aryl); 124.8 (2×C6-Aryl); 124.2, 124.1 (2×C5-Aryl); 121.7, 121.6 (2×C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2×C5); 89.4, 89.3 (2×C1'); 84.3 (2×C4'); 68.8 (d, ² J _{C-P} = 5.1 Hz, C5' _{1.D}); 68.7 (d, ² J _{C-P} = 6.1 Hz, C5' _{2.D}); 68.4 (d, ² J _{C-P} = 7.1 Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, ² J _{C-P} = 6.1 Hz, C7-Benzyl); 62.9 (2×C9); 30.8 (C11); 28.3 (2×C8); 26.9 (C12a-c); 12.0, 11.9 (2×C7)
³¹ P-NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d ₆): -7.51, -7.58
HPLC:	t _R = 15.1 min (Methode I) t _R = 13.3 min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 520.1611 (M) gef.: 521.2 (M+H ⁺ , Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol) 521.1689 (M+H ⁺ , Hoचाуflösung)

6.4.2.13. Darstellung von 5-AcEt-cycloSal-d4TMP 77m



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

85 mg (379 μmol) d4T **7**, 207 mg (758 μmol) Saligenylchlorphosphan **76m** (verunreinigtes Rohprodukt), 98 mg (758 μmol) DIPEA, 300 μl (1.65 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 75 mg (157 μmol , 41 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.65

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.26-7.21 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18 (q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H $_{1,\text{D}}$, H6); 7.15 (q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H6); 7.16-7.14 (m, 1H, H6-Aryl); 7.05, 7.03 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.4$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.79 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.5$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H $_{1,\text{D}}$, H1'); 6.77 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.7$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H1'); 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 $_{1,\text{D}}$, H3'); 6.34 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H3'); 6.01 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H $_{1,\text{D}}$, H2'); 5.99 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H2'); 5.47 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.1$ Hz, 1H $_{1,\text{D}}$, H7-Benzyl); 5.43 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.9$ Hz, 1H $_{1,\text{D}}$, H7-Benzyl); 5.37 (d(br), $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H7-Benzyl); 5.35 (d(br), $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, 1H $_{2,\text{D}}$, H7-Benzyl); 4.96-4.92 (m, 1H, H4'); 4.34-4.23 (m, 2H, H5'); 4.17 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H9); 2.85 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 2H, H8); 1.97 (s, 3H, H11); 1.66 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.1$ Hz, 3H $_{1,\text{D}}$, H7); 1.59 (d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 3H $_{2,\text{D}}$, H7)

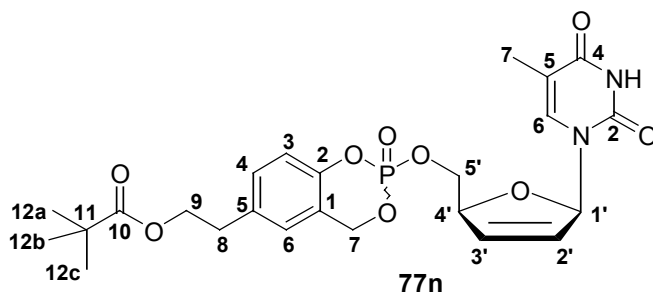
^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 170.4 (C10); 163.9 (2×C4); 150.9, 150.8 (2×C2); 148.3, 148.2 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2-Aryl); 135.8 (2×C6); 134.5 (C5-Aryl); 133.0, 132.9 (2×C3'); 130.4, 130.3 (2×C4-Aryl); 129.2 (C1-Aryl); 127.5 (2×C2'); 126.5, 126.4 (2×C6-Aryl); 118.2, 118.1 (2×C3-Aryl); 109.8 (2×C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2×C4'); 68.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, C5'_{1,D}); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C5'_{2,D}); 68.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C7-Benzyl); 64.2 (C9); 33.6 (C11); 20.8 (C8); 12.1, 12.0 (2×C7)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.99, -8.04

HPLC: $t_{\text{R}} = 11.6$ min (Methode I)
 $t_{\text{R}} = 10.4$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 478.1141 (M)
 gef.: 479.4 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.14. Darstellung von 5-PivEt-cycloSal-d4TMP 77n



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

80 mg (357 μmol) d4T **7**, 225 mg (714 μmol) Saligenylchlorphosphan **76n** (verunreinigtes Rohprodukt), 92 mg (714 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 72 mg (138 μmol , 39 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_{F} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.56

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.26-7.20 (m, 1H, H4-Aryl); 7.17, 7.15 (2q, ⁴J_{H-H} = 1.1 Hz, 1H, H6); 7.15-7.13 (m, 1H, H6-Aryl); 7.06, 7.04 (2d, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.79 (ddd, ³J_{H-H} = 3.5 Hz, 2×⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.77 (ddd, ³J_{H-H} = 3.7 Hz, 2×⁴J_{H-H} = 1.8 Hz, 1H_{2,D}, H1'); 6.40 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.8 Hz, 1H_{1,D}, H3'); 6.34 (ddd, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, ³J_{H-H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.7 Hz, 1H_{2,D}, H3'); 6.00 (ddd, ³J_{H-H} = 5.9 Hz, ³J_{H-H} = 2.3 Hz, ⁴J_{H-H} = 1.3 Hz, 1H_{1,D}, H2'); 5.99 (ddd, ³J_{H-H} = 5.8 Hz, ³J_{H-H} = 2.5 Hz, ⁴J_{H-H} = 2.5 Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.45 (dd, ²J_{H-H} = 14.5 Hz, ³J_{H-P} = 6.0 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.42 (dd, ²J_{H-H} = 14.4 Hz, ³J_{H-P} = 5.9 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.36 (dd, ²J_{H-H} = 14.3 Hz, ³J_{H-P} = 3.7 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.33 (dd, ²J_{H-H} = 14.4 Hz, ³J_{H-P} = 3.7 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.95-4.92 (m, 1H, H4'); 4.34-4.22 (m, 2H, H5'); 4.18 (dd, 2×³J_{H-H} = 6.6 Hz, 2H, H9); 2.85 (dd(br), 2×³J_{H-H} = 6.5 Hz, 2H, H8); 1.66, 1.60 (2d, ⁴J_{H-H} = 1.1 Hz, 3H, H7); 1.06 (2s, 9H, H12a-c)

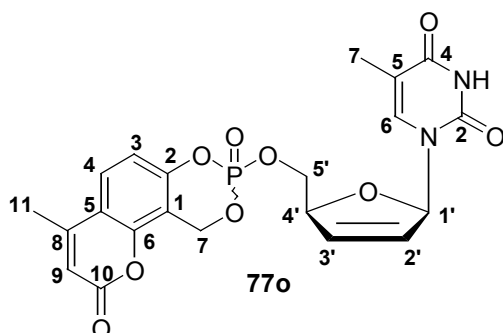
¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 177.4 (C10); 163.9, 163.8 (2×C4); 150.9, 150.8 (2×C2); 148.0 (2d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C2-Aryl); 135.8 (2×C6); 134.6 (C5-Aryl); 133.0, 132.9 (2×C3'); 130.5, 130.4 (C4-Aryl); 129.7, 129.6 (2×C1-Aryl); 127.5 (2×C2'); 126.6, 126.5 (2×C6-Aryl); 118.1 (2×C3-Aryl); 109.8 (2×C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2×C4'); 68.5 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, C5'_{1,D}); 68.4 (d, ²J_{C-P} = 8.1 Hz, C5'_{2,D}); 68.4 (d, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, C7_{1,D}-Benzyl); 68.3 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C7_{2,D}-Benzyl); 64.3 (C9); 38.3 (C11); 33.6 (C8); 27.0 (C12a-c); 12.1, 12.0 (2×C7)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -8.03, -8.06

HPLC: t_R = 15.0 min (Methode I)
t_R = 13.4 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 520.1611 (M)
gef.: 521.2 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.2.15. Darstellung von 8-Hydroxymethyl-4-methylumbelliferon-cyc/oSal-d4T-MP 77o



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-6** (siehe Abschnitt 6.4.2.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

50 mg (223 μmol) d4T **7**, 108 mg (393 μmol) Saligenylchlorphosphan **76o** (verunreinigtes Rohprodukt), 58 mg (446 μmol) DIPEA, 200 μl (890 μmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 28 mg (59 μmol , 26 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.30, 11.28 (2s, 1H, NH); 7.79 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.9$ Hz, 1H_{1,D}, H4-Aryl); 7.74 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.6$ Hz, 1H_{2,D}, H4-Aryl); 7.16, 7.15 (2q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3$ Hz, 1H, H6); 7.14, 7.08 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.9$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.78, 6.72 (2ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, $2 \times ^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H, H1'); 6.42, 6.36 (2ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H, H3'); 6.39-6.38 (m, 1H, H9-Vinyl); 6.01 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.6$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, 1H_{1,D}, H2'); 6.00 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.1$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.72 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.9$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.1$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.67 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.2$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.56 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 3.1$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.54 (d(br), $^2J_{\text{H-H}} = 15.0$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.98-4.93 (m, 1H, H4'); 4.40 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 2.7$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.35 (2dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 3.7$ Hz, 2H_{2,D}, H5'); 4.27 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz,

$^3J_{\text{H-H}} = 7.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 4.7 \text{ Hz}$, $1\text{H}_{1,\text{D}}$, $\text{H5}'$); 2.42 (2d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3 \text{ Hz}$, 3H, H10); 1.67, 1.66 (2d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.3 \text{ Hz}$, 3H, H7)

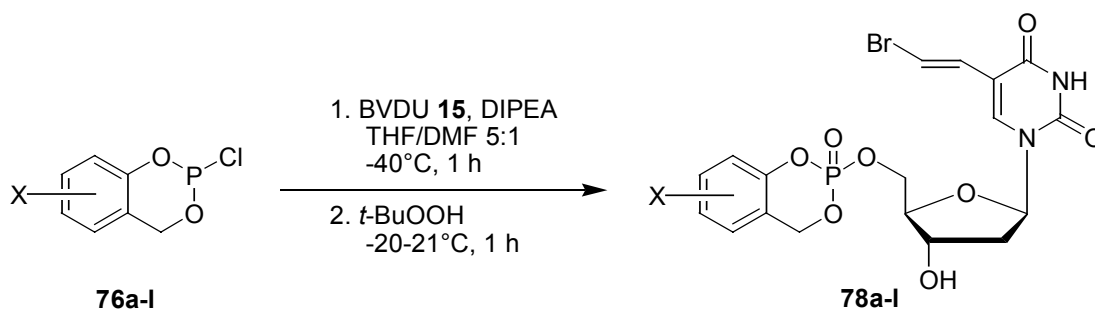
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 163.9 (C4); 158.7 (C10); 157.6 (C2-Aryl); 153.6 ($\text{C6-Aryl}+\text{C8}$); 150.9, 150.8 ($2\times\text{C2}$); 135.6 (C6); 132.6, 132.5 ($2\times\text{C3}'$); 127.3 ($\text{C2}'$); 126.5, 126.3 ($2\times\text{C4-Aryl}$); 117.1 (C1-Aryl); 114.3 ($2\times\text{C3-Aryl}$); 113.1 (C9); 112.8 (C5-Aryl); 109.8 (C5); 89.3 ($2\times\text{C1}'$); 84.0 ($\text{C4}'$); 68.7 ($\text{C5}'$); 64.8, 64.5 ($2\times\text{C7-Benzyl}$); 18.4 (C11); 12.1 (C7)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_6): -10.05, -10.55

HPLC: $t_{\text{R}} = 10.5 \text{ min}$ (Methode I)

MS (FAB, m/z): ber.: 474.08 (M)
gef.: 475.2 ($\text{M}+\text{H}^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3. Synthesen der *cycloSal*-BVDUMPs **78a-l** nach AAV-7



X: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)OR}$ oder $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC(O)R}$
in 3- oder 5-Position

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-7:

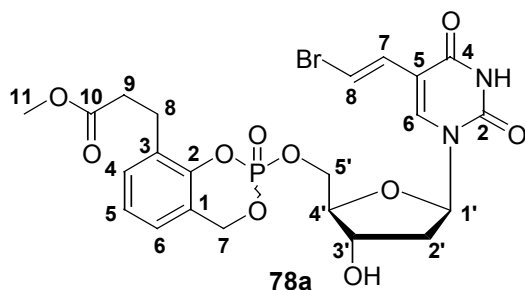
Alle Synthesen mußten unter Argon als Inertgas durchgeführt werden, um Sauerstoff und Feuchtigkeit ausschließen zu können. Deshalb wurde auch zu Beginn jeder Umsetzung zuerst BVDU **15** mit Hilfe von Pyridin koevaporiert.

Die gewünschte Menge BVDU **15** (1 Äquivalent) wurde in einem Gemisch aus 5 ml Tetrahydrofuran und 1 ml *N,N*-Dimethylformamid gelöst und mit 2 Äquivalenten DIPEA versetzt. Dieses Gemisch wurde auf -40°C abgekühlt (Ethanol-Kältebad mit flüssigem Stickstoff). Die benötigten 1.5 Äquivalente Saligenylchlorophosphan **76a,c-**

j,l-n wurden mit Hilfe einer Spritze eingewogen und anschließend mußte sofort mit dem Zutropfen begonnen werden. Die Zugabe der Saligenylchlorphosphane war in der Regel nach ca. 30 min abgeschlossen. Durch das Entfernen des Kältebads wurde die Reaktionslösung innerhalb von 45 min auf 0°C erwärmen lassen. Die erfolgreiche Bildung von *cycloSal*-Monophosphit wurde mit Hilfe einer DC-Kontrolle (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) überprüft. War noch eine größere Menge an **BVDU 15** nachzuweisen, wurde 20 min weiter bei 0°C gerührt. Danach mußte das Reaktionsgemisch wieder auf -20°C abgekühlt werden, um durch die Zugabe von 3-4 Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan) das *cycloSal*-Monophosphit direkt oxidieren zu können. Um eine quantitative Oxidation sicherzustellen, ließ man das Gemisch bis auf Raumtemperatur erwärmen. Dieser Reaktionsschritt wurde ebenfalls durch DC-Kontrolle überprüft. Danach konnte das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur abdestilliert werden. Als Rohprodukte wurden gelbe, zähe Harze erhalten.

Die chromatographische Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte durch zwei bis drei Trennungen am Chromatotron. Die erste Trennung diente dabei ausschließlich der Entfernung der entstandenen Salze und wurde mit Ethylacetat als mobile Phase und einem Methanol-Gradienten (0-10 %) erreicht. Die zweite und eventuell auch dritte Trennung wurde mit Dichlormethan und der Zugabe eines angesäuerten (0.10 % Essigsäure) Methanol-Gradienten von 0-20 % durchgeführt. Danach fielen die Produkte als farblose, zähe Öle an, die nach einer abschließenden Gefriertrocknung als farblose, feste Schäume erhalten wurden.

6.4.3.1. Darstellung von 3-MePr-*cycloSal*-BVDUMP 78a



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

94 mg (282 μmol) BVDU **15**, 116 mg (423 μmol) Saligenylchlorphosphan **76a** (verunreinigtes Rohprodukt), 73 mg (564 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 52 mg (88 μmol , 31 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

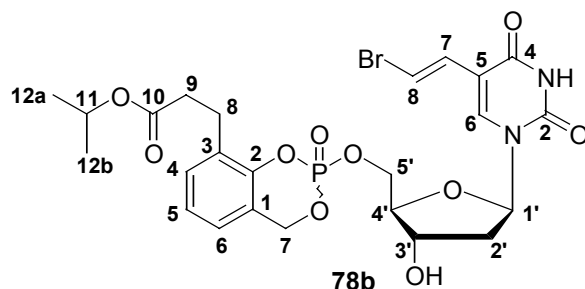
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.44

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 11.58 (s, 1H, NH); 7.78, 7.77 (2s, 1H, H6); 7.28 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.26-7.22 (m, 1H, H4-Aryl); 7.13-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.86, 6.84 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.14 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H_{2,D}, H1'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.7$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.45 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 4.6$ Hz, 1H, 3'-OH); 5.45 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 9.2$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.42 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 1.7$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.39 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 1.6$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.38 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.3$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.33 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.5$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.33 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.29 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.24-4.20 (m, 1H, H3'); 3.95-3.91 (m, 1H, H4'); 3.57, 3.56 (2s, 3H, H11); 2.89-2.78 (m, 2H, H8); 2.58 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H_{1,D}, H9); 2.56 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz, 2H_{2,D}, H9); 2.20-2.12 (m, 2H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.5 (2 \times C10); 161.7 (C4); 149.3 (C2); 147.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2-Aryl); 139.4, 139.3 (2 \times C6); 130.2 (2 \times C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.6 (2 \times C1-Aryl); 124.3 (C6-Aryl+C5-Aryl); 121.3, 121.2 (2 \times C3-Aryl); 110.3 (2 \times C5); 107.1 (2 \times C8-Vinyl); 84.8, 84.7 (2 \times C1'); 84.6, 84.5 (2 \times C4'); 69.8 (2 \times C3'); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C5'_{1,D}); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C5'_{2,D}); 68.2 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C7'_{1,D}-Benzyl); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, C7'_{2,D}-Benzyl); 51.5 (2 \times C11); 39.1, 38.9 (2 \times C2'); 33.3 (2 \times C9); 24.3 (2 \times C8)

^{31}P -NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.80, -7.84
HPLC:	t_R = 13.8 min (Methode I) t_R = 12.5 min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 586.0352 (M) gef.: 587.1 ($\text{M}+\text{H}^+$, Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.2. Darstellung von 3-*i*-PrPr-*cyclo*Sal-BVDUMP 78b



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

100 mg (300 μmol) BVDU **15**, 136 mg (450 μmol) Saligenylchlorphosphan **76c** (verunreinigtes Rohprodukt), 77 mg (600 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 100 mg (163 μmol , 54 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 0.8:1.0)

DC: R_F -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.49

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.58 (s, 1H, NH); 7.78, 7.77 (2s, 1H, H6); 7.28, 7.27 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.26-7.22 (m, 1H, H4-Aryl); 7.12-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.86, 6.83 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H $_{1,D}$, H1'); 6.14 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H $_{2,D}$, H1'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.41 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.5$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.40 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.1$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 4.85, 4.83 (2sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, 1H, H11); 4.38 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.5$ Hz,

$^1\text{H-NMR}$: 1H_{1,D}, H5'); 4.33 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.0$ Hz, 2H_{2,D}, H5'); 4.28 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.24-4.19 (m, 1H, H3'); 3.95-3.91 (m, 1H, H4'); 2.89-2.77 (m, 2H, H8); 2.54 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H_{1,D}, H9); 2.53 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H_{2,D}, H9); 2.20-2.11 (m, 2H, H2'); 1.13, 1.12, 1.11 (4d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, 6H, H12a,b)

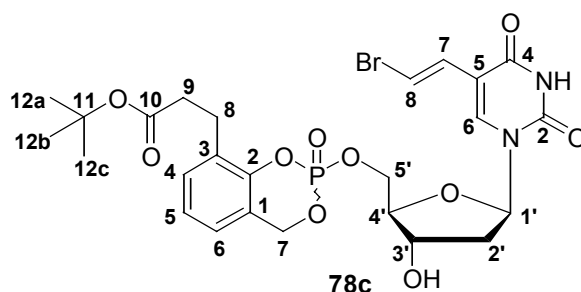
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 171.6, 171.5 (2×C10); 161.7 (C4); 149.3 (2×C2); 147.9 (C2-Aryl); 139.4, 139.3 (2×C6); 130.2 (2×C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.6 (2×C1-Aryl); 124.3 (C6-Aryl); 124.2 (2×C5-Aryl); 121.3, 121.2 (2×C3-Aryl); 110.3 (2×C5); 107.1 (2×C8-Vinyl); 84.8 (2×C1'); 84.6, 84.5 (2×C4'); 69.8 (2×C3'); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C5'_{1,D}); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C5'_{2,D}); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, C7'_{1,D}-Benzyl); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C7'_{2,D}-Benzyl); 67.4 (2×C11); 38.9 (C2'); 33.7 (2×C9); 24.3 (2×C8); 21.7 (C12a,b)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆): -7.81, -7.83

HPLC: $t_{\text{R}} = 15.4$ min (Methode I)
 $t_{\text{R}} = 14.1$ min (Methode II)

MS (FAB, *m/z*): ber.: 614.07 (M)
 gef.: 615.1 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.3. Darstellung von 3-*t*-BuPr-cycloSal-BVDUMP 78c



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

94 mg (282 μmol) BVDU **15**, 134 mg (423 μmol) Saligenylchlorphosphan **76d** (verunreinigtes Rohprodukt), 73 mg (564 μmol) DIPEA, 214 μl (1.18 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 90 mg (143 μmol , 51 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren

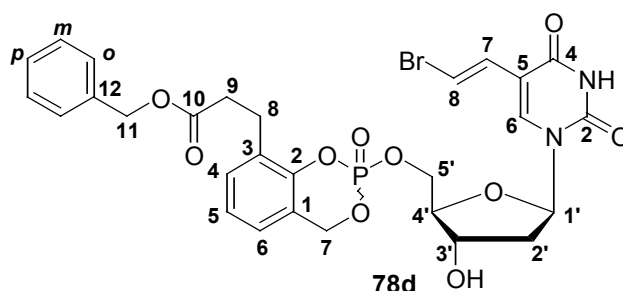
DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.56

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.58 (s, 1H, NH); 7.77 (2s, 1H, H6); 7.28, 7.27 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.26-7.22 (m, 1H, H4-Aryl); 7.12-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.86, 6.83 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.14 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H_{2,D}, H1'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.0$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.45 (d, $^3J_{\text{H-P}} = 4.6$ Hz, 1H, 3'-OH); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.40 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.3$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.40 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.2$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.38 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.5$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.33 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.1$ Hz, 2H_{2,D}, H5'); 4.28 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.24-4.20 (m, 1H, H3'); 3.95-3.91 (m, 1H, H4'); 2.86-2.73 (m, 2H, H8); 2.49-2.44 (m, 2H, H9); 2.19-2.13 (m, 2H, H2'); 1.34, 1.33 (2s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.4, 171.3 (2 \times C10); 161.8 (C4); 149.3 (C2); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C2_{1,D}-Aryl); 147.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C2_{2,D}-Aryl); 139.4, 139.3 (2 \times C6); 130.2 (2 \times C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.7 (2 \times C1-Aryl); 124.3 (C6-Aryl); 124.2 (2 \times C5-Aryl); 121.3, 121.2 (2 \times C3-Aryl); 110.3 (2 \times C5); 107.1 (2 \times C8-Vinyl); 84.8 (2 \times C1'); 84.7, 84.6 (2 \times C4'); 80.0 (C11); 69.9, 69.8 (2 \times C3'); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C5'_{1,D}); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C5'_{2,D}); 68.1 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C7_{1,D}-Benzyl); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C7_{2,D}-Benzyl); 38.9 (2 \times C2'); 34.6 (2 \times C9); 27.9 (C12a-c); 24.4 (2 \times C8)

^{31}P -NMR:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.80 (nur 1 Peak)
HPLC:	t_R = 16.4 min (Methode I) t_R = 14.9 min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 628.0821 (M) gef.: 629.2 (M+H $^+$, Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.4. Darstellung von 3-BnPr-cycloSal-BVDUMP 78d



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

95 mg (285 μmol) BVDU **15**, 150 mg (428 μmol) Saligenylchlorphosphan **76e** (verunreinigtes Rohprodukt), 74 mg (570 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 67 mg (101 μmol , 35 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.58 (2s, 1H, NH); 7.77, 7.76 (2s, 1H, H6); 7.36-7.28 (m, 5H, Ph); 7.28, 7.27 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.24-7.20 (m, 1H, H4-Aryl); 7.13-7.08 (m, 2H, H5-Aryl); 7.08 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 1H $_{1,D}$, H6-Aryl); 7.07 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 1H $_{2,D}$, H6-Aryl); 6.86, 6.84 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.14 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H, H1'); 5.47 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.7$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.40 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.5$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.40 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.2$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.06, 5.05 (2s, 2H, H11); 4.37 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} =$

11.5 Hz, $^3J_{H-P}$ = 8.0 Hz, $^3J_{H-H}$ = 3.5 Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.32 (dd, $^3J_{H-P}$ = 7.7 Hz, $^3J_{H-H}$ = 5.0 Hz, 2H_{2,D}, H5'); 4.28 (ddd, $^2J_{H-H}$ = 11.4 Hz, $^3J_{H-P}$ = 8.3 Hz, $^3J_{H-H}$ = 6.2 Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 2.92-2.80 (m, 2H, H8); 2.65 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 8.3 Hz, 2H_{1,D}, H9); 2.64 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 7.7 Hz, 2H_{2,D}, H9); 2.15 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 6.5 Hz, 2H_{1,D}, H2'); 2.14 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 6.1 Hz, 2H_{2,D}, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 172.0, 171.9 (2×C10); 161.8 (C4); 149.3 (C2); 147.8 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, C2-Aryl); 139.4, 139.3 (2×C6); 136.2 (C12); 130.2 (2×C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.6, 129.5 (2×C1-Aryl); 128.5 (2×C_m-Ph); 128.1 (C_p-Ph); 128.1 (2×C_o-Ph); 124.4 (C6-Aryl); 124.3 (2×C5-Aryl); 121.3, 121.2 (2×C3-Aryl); 110.3 (2×C5); 107.1 (2×C8-Vinyl); 84.8 (2×C1'); 84.6, 84.5 (2×C4'); 69.8, 69.7 (2×C3'); 68.8 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, C5'_{1,D}); 68.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, C5'_{2,D}); 68.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, C7'_{1,D}-Benzyl); 68.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.1 Hz, C7'_{2,D}-Benzyl); 65.7 (C11); 39.1, 38.9 (2×C2'); 33.4 (2×C9); 24.3, 24.2 (2×C8)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.84 (nur 1 Peak)

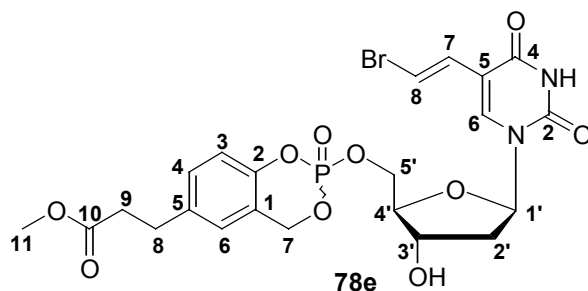
HPLC: t_R = 16.6 min (Methode I)

t_R = 15.1 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 662.0665 (M)

gef.: 663.2 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.5. Darstellung von 5-MePr-cycloSal-BVDUMP 78e



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

94 mg (282 μmol) BVDU **15**, 116 mg (423 μmol) Saligenylchlorphosphan **76f** (verunreinigtes Rohprodukt), 73 mg (564 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 55 mg (94 μmol , 33 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.43

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 11.59, 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.75 (2s, 1H, H6); 7.29, 7.27 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.24-7.18 (m, 1H, H4-Aryl); 7.10 (2d, $^4J_{\text{H-H}} = 2.6$ Hz, 1H, H6-Aryl); 7.02 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, 1H_{1,D}, H3-Aryl); 7.01 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.4$ Hz, 1H_{2,D}, H3-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.14 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.13 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H_{2,D}, H1'); 5.45 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 9.5$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.42 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.38 (2dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 9.4$ Hz, 2H_{1,D+2,D}, H7-Benzyl); 4.36 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.7$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.31 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 4.3$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.26 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 3.57 (s, 3H, H11); 2.80 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.60 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H9); 2.20-2.10 (m, 2H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.7 (C10); 161.8, 161.7 (2 \times C4); 149.3 (2 \times C2); 148.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2_{1,D}-Aryl); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C2_{2,D}-Aryl); 139.5, 139.4 (2 \times C6); 137.0 (C5-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.7 (2 \times C4-Aryl); 125.8 (2 \times C6-Aryl); 120.9, 120.8 (2 \times C1-Aryl); 118.2, 118.1 (2 \times C3-Aryl); 110.3, 110.2 (2 \times C5); 107.1 (2 \times C8-Vinyl); 84.8 (C1'); 84.6 (2 \times C4'); 69.9, 69.8 (2 \times C3'); 68.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C5'_{1,D}); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz,

C5'_{2,D}); 67.8 (2d, ²J_{C-P}= 5.1 Hz, C7-Benzyl); 51.5 (C11); 39.0, 38.8 (2×C2'); 34.8 (C9); 29.5 (C8)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -8.26, -8.34

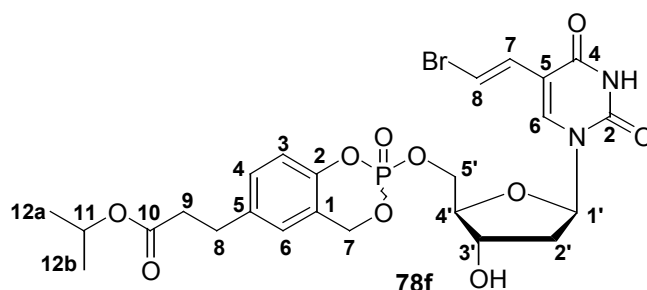
HPLC: t_R = 13.7 min (Methode I)

t_R = 12.4 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 586.0352 (M)

gef.: 589.5 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.6. Darstellung von 5-*i*-PrPr-*cyclo*Sal-BVDUMP 78f



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

81 mg (243 μmol) BVDU **15**, 110 mg (365 μmol) Saligenylchlorphosphan **76g** (verunreinigtes Rohprodukt), 63 mg (486 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 62 mg (101 μmol, 41 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.59, 11.58 (2s, 1H, NH); 7.77, 7.75 (2s, 1H, H6); 7.29, 7.28 (2d, ³J_{H-H}= 13.6 Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.22-7.17 (m, 1H, H4-Aryl); 7.10, 7.09 (2d, ⁴J_{H-H}= 2.2 Hz, 1H, H6-Aryl); 7.02, 7.01 (2d, ³J_{H-H}= 8.4 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, ³J_{H-H}= 13.6 Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.14, 6.13 (2dd, 2×³J_{H-H}= 6.9 Hz, 1H, H1'); 5.44 (dd, ²J_{H-H}= 14.5 Hz, ³J_{H-P}= 10.1 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.41 (dd, ²J_{H-H}= 14.5 Hz, ³J_{H-P}= 9.3 Hz, 1H_{2,D}, H7-

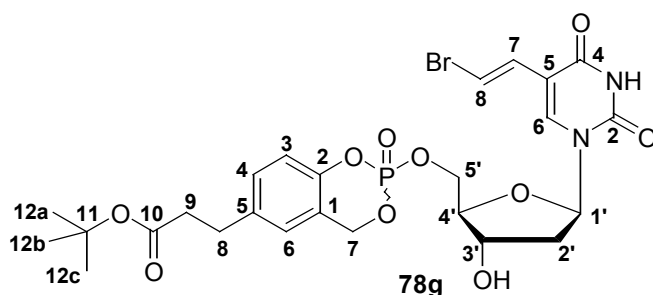
Benzyl); 5.38 (2dd, $^2J_{H-H} = 14.3$ Hz, $^3J_{H-P} = 9.4$ Hz, $2H_{1.D+2.D}$, H7-Benzyl); 4.85, 4.83 (2sept, $^3J_{H-H} = 6.3$ Hz, 1H, H11); 4.36 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.1$ Hz, $^3J_{H-P} = 7.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 3.7$ Hz, $1H_{1.D}$, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{H-P} = 7.4$ Hz, $^3J_{H-H} = 4.6$ Hz, $1H_{2.D}$, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{H-P} = 7.6$ Hz, $^3J_{H-H} = 5.8$ Hz, $1H_{2.D}$, H5'); 4.25 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.5$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.1$ Hz, $1H_{1.D}$, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 2.79 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.54 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.5$ Hz, 2H, H9); 2.20-2.10 (m, 2H, H2'); 1.12 (2d, $^3J_{H-H} = 6.3$ Hz, 6H, H12a,b)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.7 (C10); 161.8, 161.7 ($2 \times$ C4); 149.3 (C2); 148.0 (d, $^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, $C2_{1.D}$ -Aryl); 147.9 (d, $^2J_{C-P} = 6.6$ Hz, $C2_{2.D}$ -Aryl); 139.5, 139.4 ($2 \times$ C6); 137.0 (C5-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.8, 129.7 ($2 \times$ C4-Aryl); 125.9, 125.8 ($2 \times$ C6-Aryl); 120.8 ($2 \times$ C1-Aryl); 118.2, 118.1 ($2 \times$ C3-Aryl); 110.3, 110.2 ($2 \times$ C5); 107.1 ($2 \times$ C8-Vinyl); 84.8 ($2 \times$ C1'); 84.6 (d, $^3J_{C-P} = 6.6$ Hz, $C4'_{1.D}$); 84.6 (d, $^3J_{C-P} = 7.2$ Hz, $C4'_{2.D}$); 69.9, 69.8 ($2 \times$ C3'); 68.7 (d, $^2J_{C-P} = 8.1$ Hz, $C5'_{1.D}$); 68.6 (d, $^2J_{C-P} = 5.6$ Hz, $C5'_{2.D}$); 67.9 (d, $^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, $C7_{1.D}$ -Benzyl); 67.8 (d, $^2J_{C-P} = 6.6$ Hz, $C7_{2.D}$ -Benzyl); 67.3 (C11); 39.0, 38.8 ($2 \times$ C2'); 35.3 ($2 \times$ C9); 29.7 (C8); 21.7 (C12a,b)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.27, -8.34

HPLC: $t_R = 15.5$ min (Methode I)
 $t_R = 14.4$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 614.0665 (M)
gef.: 615.2 ($M+H^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.7. Darstellung von 5-*t*-BuPr-cycloSal-BVDUMP 78g

Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

98 mg (294 μmol) BVDU **15**, 139 mg (441 μmol) Saligenylchlorphosphan **76h** (verunreinigtes Rohprodukt), 76 mg (588 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 58 mg (92 μmol , 31 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.43

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.59, 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.75 (2s, 1H, H6); 7.29, 7.28 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.22-7.17 (m, 1H, H4-Aryl); 7.10, 7.08 (m, 1H, H6-Aryl); 7.02, 7.01 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.4$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.14, 6.13 (2dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 1H, H1'); 5.47-5.35 (m, 2H, H7-Benzyl); 5.45, 5.44 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 4.4$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.36 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.8$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 4.7$ Hz, 1H $_{2,D}$, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz, 1H $_{2,D}$, H5'); 4.25 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.93-3.89 (m, 1H, H4'); 2.76 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.48 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9); 2.20-2.11 (m, 2H, H2'); 1.34 (2s, 9H, H12a-c)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.5 (2 \times C10); 161.8, 161.7 (2 \times C4); 149.3 (2 \times C2); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2 $_{1,D}$ -Aryl); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, C2 $_{2,D}$ -Aryl); 139.5, 139.4 (2 \times C6); 137.1 (C5-

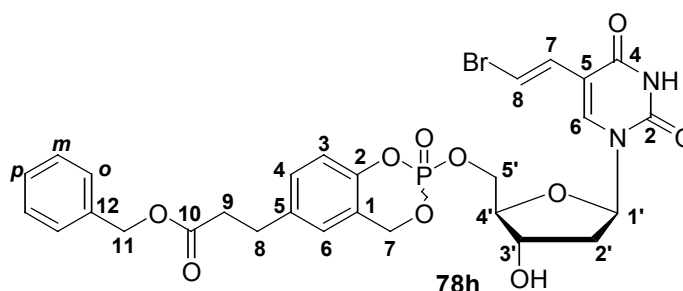
Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.7 (2×C4-Aryl); 125.8 (2×C6-Aryl); 120.8, 120.7 (2×C1-Aryl); 118.1 (2×C3-Aryl); 110.3, 110.2 (2×C5); 107.1 (2×C8-Vinyl); 84.8 (2×C1'); 84.6 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.1 Hz, C4'_{1,D}); 84.6 (d, $^3J_{C-P}$ = 8.1 Hz, C4'_{2,D}); 79.9 (C11); 69.9, 69.8 (2×C3'); 68.7, 68.6 (2d, $^2J_{C-P}$ = 7.6 Hz, C5'); 67.8 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.1 Hz, C7'_{1,D}-Benzyl); 67.8 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, C7'_{2,D}-Benzyl); 39.0, 38.8 (2×C2'); 36.2 (2×C9); 29.8 (C8); 27.9 (C12a-c)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.29, -8.34

HPLC: t_R = 16.5 min (Methode I)
 t_R = 15.3 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 628.0821 (M)
 gef.: 629.2 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.8. Darstellung von 5-BnPr-cycloSal-BVDUMP 78h



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

95 mg (285 μmol) BVDU **15**, 150 mg (428 μmol) Saligenylchlorphosphan **76i** (verunreinigtes Rohprodukt), 55 mg (428 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 84 mg (127 μmol , 44 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.51

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.75 (2s, 1H, H6); 7.36-7.26 (m, 5H, Ph); 7.29, 7.27 (2d, $^3J_{H-H}$ = 13.6

Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.22-7.17 (m, 1H, H4-Aryl); 7.09, 7.07 (m, 1H, H6-Aryl); 7.00 (d, $^3J_{H-H} = 8.2$ Hz, 1H_{1,D}, H3-Aryl); 6.99 (d, $^3J_{H-H} = 8.5$ Hz, 1H_{2,D}, H3-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, $^3J_{H-H} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15, 6.13 (2dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 6.8$ Hz, 1H, H1'); 5.48-5.33 (m, 3H, H7-Benzyl+3'-OH); 5.06 (s, 2H, H11); 4.37 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H-P} = 7.4$ Hz, $^3J_{H-H} = 3.6$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.31 (dd, $^3J_{H-P} = 6.9$ Hz, $^3J_{H-H} = 4.7$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.31 (dd, $^3J_{H-P} = 6.8$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.8$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.26 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.3$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 2.83 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.67 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.6$ Hz, 2H, H9); 2.20-2.10 (m, 2H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 172.1 (C10); 161.8 (2×C4); 149.4, 149.3 (2×C2); 148.2 (d, $^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, C2-Aryl); 139.5 (2×C6); 136.9 (C5-Aryl); 136.3 (C12); 130.0 (C7-Vinyl); 129.8, 129.7 (2×C4-Aryl); 128.6 (2×C m -Ph); 128.1 (C p -Ph); 128.1 (2×C o -Ph); 125.9, 125.8 (2×C6-Aryl); 120.8, 120.7 (2×C1-Aryl); 118.2, 118.1 (2×C3-Aryl); 110.3, 110.2 (2×C5); 107.1 (2×C8-Vinyl); 84.8 (2×C1'); 84.7 (d, $^3J_{C-P} = 7.1$ Hz, C4'_{1,D}); 84.6 (d, $^3J_{C-P} = 6.6$ Hz, C4'_{2,D}); 69.9, 69.8 (2×C3'); 68.7, 68.6 (2d, $^2J_{C-P} = 7.6$ Hz, C5'); 67.9, 67.8 (2×C7-Benzyl); 65.6 (C11); 39.0, 38.9 (2×C2'); 35.0, 34.9 (2×C9); 29.6 (C8)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.25, -8.32

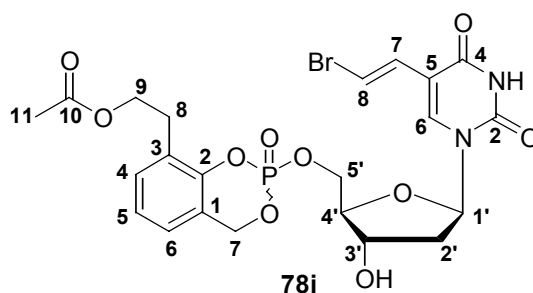
HPLC: $t_R = 16.6$ min (Methode I)

$t_R = 15.2$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 662.0665 (M)

gef.: 663.1 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.9. Darstellung von 3-AcEt-cycloSal-BVDUMP 78i



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

95 mg (285 μ mol) BVDU **15**, 117 mg (428 μ mol) Saligenylchlorphosphan **76j** (verunreinigtes Rohprodukt), 74 mg (570 μ mol) DIPEA, 260 μ l (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 70 mg (119 μ mol, 42 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.8)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.56

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.59, 11.58 (s, 1H, NH); 7.77 (2s, 1H, H6); 7.28 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.29-7.26 (m, 1H, H4-Aryl); 7.15-7.10 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.86, 6.84 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15, 6.14 (2dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H, H1'); 5.49 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 9.0$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.45 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.7$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.8$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.41 (2dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.2$ Hz, 2H_{1,D+2,D}, H7-Benzyl); 4.38 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.3$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.33 (2dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.0$ Hz, 2H_{2,D}, H5'); 4.29 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.5$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.24-4.10 (m, 3H, H3'+H9); 3.95-3.90 (m, 1H, H4'); 2.95-2.80 (m, 2H, H8); 2.17-2.14 (m, 2H, H2'); 1.95, 1.94 (2s, 3H, H11)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.2, 173.1 (2 \times C10); 161.8 (C4); 149.3 (C2); 148.1 (C2-Aryl); 139.4 (2 \times C6); 131.0 (C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.4 (C1-Aryl); 127.3 (C3-Aryl); 124.7 (C6-Aryl);

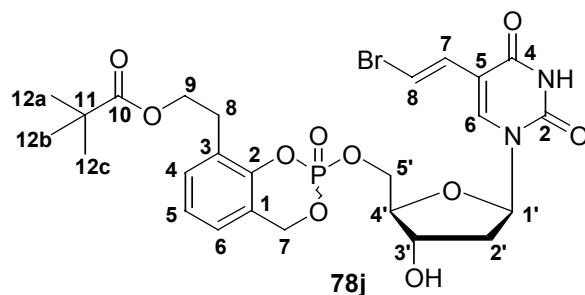
124.3 (C5-Aryl); 110.3 (C5); 107.1 (C8-Vinyl); 84.8 (2×C1'); 84.6 (C4'); 69.8 (2×C3'); 68.6 (2×C5'); 68.2, 68.1 (2×C7-Benzyl); 63.0, 62.9 (2×C9); 39.1, 38.9 (2×C2'); 28.3 (C8); 20.8 (2×C11)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.82, -7.85

HPLC: t_R = 13.6 min (Methode I)
t_R = 12.4 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 586.0352 (M)
gef.: 587.3 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.10. Darstellung von 3-PivEt-cycloSal-BVDUMP 78j



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

100 mg (300 μmol) BVDU **15**, 142 mg (450 μmol) Saligenylchlorphosphan **76I** (verunreinigtes Rohprodukt), 58 mg (450 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 77 mg (122 μmol, 41 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.7)

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.55

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 11.58 (s, 1H, NH); 7.78, 7.77 (2s, 1H, H6); 7.28 (2d, ³J_{H-H} = 13.6 Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.28-7.24 (m, 1H, H4-Aryl); 7.15-7.10 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.86, 6.84 (2d, ³J_{H-H} = 13.6 Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.14 (2dd, 2×³J_{H-H} = 6.8 Hz, 1H, H1'); 5.48 (dd, ²J_{H-H} = 14.4 Hz, ³J_{H-P} = 8.0 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.45 (dd, ²J_{H-H} = 14.2 Hz, ³J_{H-P} = 8.0 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.41

(dd, $^2J_{H-H} = 14.3$ Hz, $^3J_{H-P} = 10.5$ Hz, $1H_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.41 (dd, $^2J_{H-H} = 14.7$ Hz, $^3J_{H-P} = 9.9$ Hz, $1H_{1,D}$, H7-Benzyl); 4.39 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H-P} = 7.8$ Hz, $^3J_{H-H} = 3.4$ Hz, $1H_{1,D}$, H5'); 4.33 (2dd, $^3J_{H-P} = 7.8$ Hz, $^3J_{H-H} = 5.1$ Hz, $2H_{2,D}$, H5'); 4.28 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.5$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.4$ Hz, $1H_{1,D}$, H5'); 4.23-4.15 (m, 3H, H3'+H9); 3.95-3.91 (m, 1H, H4'); 2.98-2.81 (m, 2H, H8); 2.17-2.13 (m, 2H, H2'); 1.05, 1.04 (2s, 9H, H12a-c)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.1, 173.0 ($2 \times C_{10}$); 161.8 (C4); 149.3 (C2); 148.2 (C2-Aryl); 139.4 ($2 \times C_6$); 131.1 ($2 \times C_4$ -Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.8 (C1-Aryl); 127.3 ($2 \times C_3$ -Aryl); 124.7 ($2 \times C_6$ -Aryl); 124.1 (C5-Aryl); 110.3 (C5); 107.1 (C8-Vinyl); 84.8 ($2 \times C_{1'}$); 84.6 ($2 \times C_{4'}$); 69.8 ($2 \times C_{3'}$); 68.6 (d, $^2J_{C-P} = 8.6$ Hz, $C_{5'_{1,D}}$); 68.6 (d, $^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, $C_{5'_{2,D}}$); 68.3 ($2 \times C_7$ -Benzyl); 62.9 ($2 \times C_9$); 39.8, 38.6 ($2 \times C_{2'}$); 34.8 (C11); 28.3 (C8); 27.0 (C12a-c)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.81, -7.84

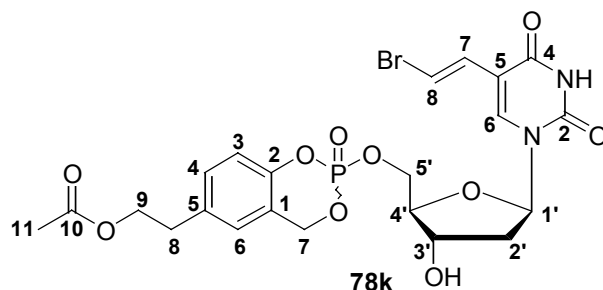
HPLC: $t_R = 16.5$ min (Methode I)

$t_R = 15.1$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 628.0821 (M)

gef.: 629.4 ($M+H^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.11. Darstellung von 5-AcEt-cycloSal-BVDUMP 78k



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

93 mg (279 μmol) BVDU **15**, 115 mg (419 μmol) Saligenylchlorphosphan **76m** (verunreinigtes Rohprodukt), 72 mg (558 μmol) DIPEA, 260 μl (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 65 mg (111 μmol , 40 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.52

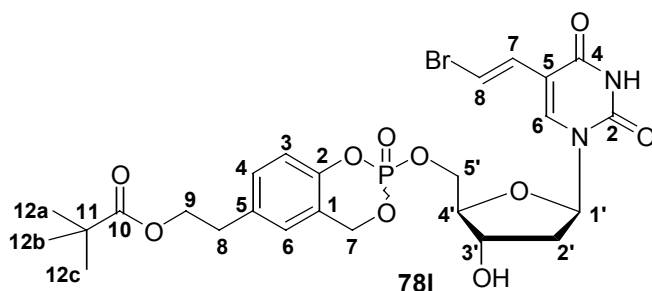
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.75 (2s, 1H, H6); 7.29, 7.28 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.25-7.20 (m, 1H, H4-Aryl); 7.14-7.12 (m, 1H, H6-Aryl); 7.04, 7.03 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.4$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H $_{1,D}$, H1'); 6.13 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 1H $_{2,D}$, H1'); 5.47 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 10.0$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 9.5$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.40 (2dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 9.2$ Hz, 2H $_{1,D+2,D}$, H7-Benzyl); 4.37 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.7$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.31 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 4.4$ Hz, 1H $_{2,D}$, H5'); 4.31 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.5$ Hz, 1H $_{2,D}$, H5'); 4.26 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.23-4.20 (m, 1H, H3'); 4.17 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H9); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 2.84 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 2H, H8); 2.20-2.10 (m, 2H, H2'); 1.97, 1.96 (2s, 3H, H11)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 170.4 (C10); 161.8, 161.7 (2 \times C4); 149.3 (2 \times C2); 147.3 (C2-Aryl); 139.5, 139.4 (2 \times C6); 134.5 (C5-Aryl); 130.3, 130.2 (2 \times C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 126.4, 126.3 (2 \times C6-Aryl); 120.9 (2 \times C1-Aryl); 118.2 (2 \times C3-Aryl); 110.3, 110.2 (2 \times C5); 107.1 (2 \times C8-Vinyl); 84.8 (2 \times C1'); 84.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C4' $_{1,D}$); 84.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, C4' $_{2,D}$); 69.9, 69.8 (2 \times C3'); 68.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C5'); 67.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C7-Benzyl); 64.2 (C9); 39.0, 38.8 (2 \times C2'); 33.6 (2 \times C8); 20.8 (C11)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.27, -8.34

HPLC:	$t_R = 13.5$ min (Methode I)
	$t_R = 12.2$ min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 586.0352 (M)
	gef.: 589.5 (M+H ⁺ , Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.3.12. Darstellung von 5-PivEt-cycloSal-BVDUMP 78I



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-7** (siehe Abschnitt 6.4.3.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

98 mg (294 μ mol) BVDU **15**, 139 mg (441 μ mol) Saligenylchlorphosphan **76n** (verunreinigtes Rohprodukt), 76 mg (588 μ mol) DIPEA, 214 μ l (1.18 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 51 mg (81 μ mol, 27 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.48

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11.59, 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.75 (2s, 1H, H₆); 7.29, 7.28 (2d, ³J_{H-H} = 13.6 Hz, 1H, H₈-Vinyl); 7.25-7.20 (m, 1H, H₄-Aryl); 7.13-7.11 (m, 1H, H₆-Aryl); 7.05 (d, ³J_{H-H} = 8.5 Hz, 1H_{1,D}, H₃-Aryl); 7.04 (d, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H_{2,D}, H₃-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, ³J_{H-H} = 13.6 Hz, 1H, H₇-Vinyl); 6.15 (dd, 2 \times ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 1H_{1,D}, H_{1'}); 6.13 (dd, 2 \times ³J_{H-H} = 7.1 Hz, 1H_{2,D}, H_{1'}); 5.48-5.36 (m, 2H, H₇-Benzyl); 5.45, 5.44 (2d, ³J_{H-H} = 4.4 Hz, 1H, 3'-OH); 4.37 (ddd, ²J_{H-H} = 11.2 Hz, ³J_{H-P} = 7.3 Hz, ³J_{H-H} = 3.7 Hz, 1H_{1,D}, H_{5'}); 4.31 (dd, ³J_{H-P} = 7.4 Hz, ³J_{H-H} = 5.2 Hz, 2H_{2,D}, H_{5'}); 4.25 (ddd, ²J_{H-H} = 11.2 Hz, ³J_{H-P} = 8.2 Hz, ³J_{H-H} = 6.1 Hz, 1H_{1,D}, H_{5'}); 4.22-4.19 (m, 1H, H_{3'}); 4.17 (dd, 2 \times ³J_{H-H} = 6.6 Hz,

2H, H9); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 2.85 (dd, $2 \times {}^3J_{H-H} = 6.6$ Hz, 2H, H8); 2.20-2.12 (m, 2H, H2'); 1.06 (2s, 9H, H12a-c)

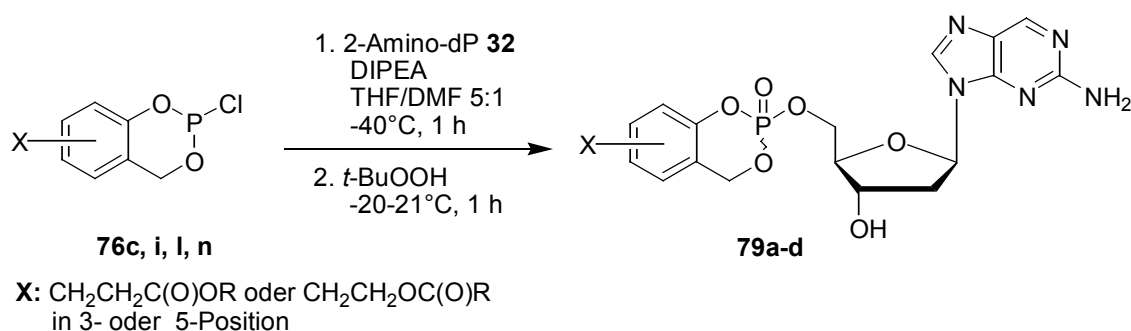
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.5 (C10); 161.8, 161.7 ($2 \times$ C4); 149.3 ($2 \times$ C2); 148.0 (d, ${}^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, C2_{1.D}-Aryl); 148.0 (d, ${}^2J_{C-P} = 8.1$ Hz, C2_{2.D}-Aryl); 139.5, 139.4 ($2 \times$ C6); 134.6, 134.4 (C5-Aryl); 130.4, 130.3 ($2 \times$ C4-Aryl); 129.9 ($2 \times$ C7-Vinyl); 126.5, 126.4 ($2 \times$ C6-Aryl); 120.9, 120.8 ($2 \times$ C1-Aryl); 118.2, 118.1 ($2 \times$ C3-Aryl); 110.3, 110.2 ($2 \times$ C5); 107.1 ($2 \times$ C8-Vinyl); 84.8 ($2 \times$ C1'); 84.7, 84.6 ($2 \times$ C4'); 69.9, 69.8 ($2 \times$ C3'); 68.7 (d, ${}^2J_{C-P} = 7.6$ Hz, C5'_{1.D}); 68.5 (d, ${}^2J_{C-P} = 6.6$ Hz, C5'_{2.D}); 67.9 (d, ${}^2J_{C-P} = 9.7$ Hz, C7_{1.D}-Benzyl); 67.8 (d, ${}^2J_{C-P} = 6.6$ Hz, C7_{2.D}-Benzyl); 64.3 (C9); 39.0, 38.8 ($2 \times$ C2'); 38.3 (C11); 33.6 (C8); 30.8 (C12a-c)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.32, -8.37

HPLC: $t_R = 16.5$ min (Methode I)
 $t_R = 14.9$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 628.0821 (M)
 gef.: 629.2 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.4. Synthesen der *cycloSal*-2-Amino-dPMPs 79a-d nach AAV-8



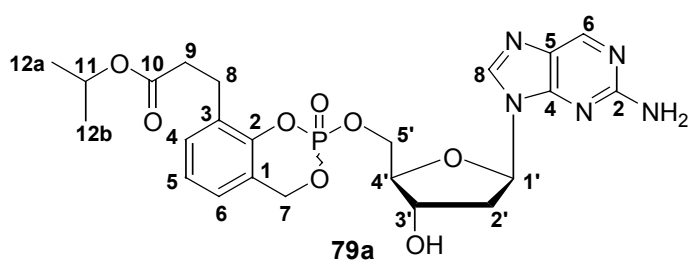
Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-8:

Alle Synthesen mußten unter Argon als Inertgas durchgeführt werden, um Sauerstoff und Feuchtigkeit ausschließen zu können. Deshalb wurde auch zu Beginn jeder Umsetzung zuerst 2-Amino-dP **32** mittels Pyridin koevaporiert.

Die gewünschte Menge 2-Amino-dP **32** (1 Äquivalent) wurde in einem Gemisch aus 10 ml THF und 2 ml DMF gelöst und mit 2 Äquivalenten DIPEA versetzt. Dieses Gemisch wurde dann auf -40°C abgekühlt (Ethanol-Kältebad mit flüssigem Stickstoff). Die benötigten 1.5 Äquivalente Saligenylchlorphosphan **76c,i,l,n** konnten mit Hilfe einer Spritze eingewogen werden und anschließend wurde sofort mit dem Zutropfen begonnen. Die Zugabe der Saligenylchlorphosphane war in der Regel nach ca. 30 min abgeschlossen. Um die Reaktionslösung innerhalb von 45 min auf 0°C erwärmen zu lassen, wurde danach das Kältebad entfernt. Die erfolgreiche Bildung des *cycloSal*-Monophosphit-Zwischenproduktes wurde mit Hilfe einer DC-Kontrolle (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) überprüft. Waren noch größere Mengen an 2-Amino-dP **32** vorhanden, wurden noch weitere 20 min bei 0°C gerührt. Danach mußte das Reaktionsgemisch wieder auf -20°C abgekühlt werden, um das *cycloSal*-Monophosphit direkt durch die Zugabe von 3-4 Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan) oxidieren zu können. Um eine möglichst quantitative Oxidation zu erreichen, ließ man das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmen. Dieser Reaktionsschritt wurde ebenfalls durch DC-Kontrolle überprüft. Nun konnte das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur abkondensiert werden. Als Rohprodukt wurde ein gelbes Harz erhalten.

Die chromatographische Aufreinigung der Rohprodukte konnte durch zwei bis drei Trennungen am Chromatotron erreicht werden. Die erste Trennung diente dabei ausschließlich der Entfernung der entstandenen Salze und wurde mit Essigester als mobile Phase und einem Methanol-Gradienten (0-20 %) durchgeführt. Die zweite und eventuell auch dritte Trennung wurde mit Dichlormethan und einem angesäuerten (0.10 % Essigsäure) Methanol-Gradienten von 0-30 % durchgeführt. Danach fielen alle Produkte als farblose Feststoffe an, die nach einer abschließenden Gefriertrocknung in farblose feste Schäume überführt wurden.

6.4.4.1. Darstellung von 3-*i*-PrPr-*cycloSal*-2-Amino-dPMP **79a**



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-8** (siehe Abschnitt 6.4.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

85 mg (338 μmol) 2-Amino-dP **32**, 153 mg (507 μmol) Saligenylchlorphosphan **76c** (verunreinigtes Rohprodukt), 87 mg (676 μmol) DIPEA, 296 μl (1.63 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 57 mg (107 μmol , 32 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.24

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 8.56 (2s, 1H, H6); 8.15, 8.13 (2s, 1H, H8); 7.24-7.20 (m, 1H, H4-Aryl); 7.09-7.03 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.52 (s(br), 2H, NH_2); 6.26 (dd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 1H, H1'); 5.48 (d, ${}^3J_{\text{H-H}} = 3.5$ Hz, 1H, 3'-OH); 5.46-5.29 (m, 2H, H7-Benzyl); 4.83 (sept, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 1H, H11); 4.43-4.39 (m, 1H, H3'); 4.40 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.1$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.36 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 7.0$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.2$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.28 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H $_{2,D}$, H5'); 4.24 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H $_{2,D}$, H5'); 4.02-3.98 (m, 1H, H4'); 2.88-2.72 (m, 2H, H8); 2.73-2.62 (m, 1H, H2'); 2.53 (dd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H $_{1,D}$, H9); 2.52 (dd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H $_{2,D}$, H9); 2.28 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 6.3$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 3.9$ Hz, 1H, H2'); 1.12, 1.11 (2d, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, 6H $_{1,D}$, H12a,b); 1.10, 1.09 (2d, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 6H $_{2,D}$, H12a,b)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 171.5 (C10); 160.6 (2 \times C4); 152.7 (C2); 149.5 (2 \times C8); 147.8 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2 $_{1,D}$ -Aryl); 147.8 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, C2 $_{2,D}$ -Aryl); 140.7, 140.6 (2 \times C6); 130.2, 130.1 (2 \times C4-Aryl); 129.7, 129.6 (2 \times C1-Aryl); 127.3 (2 \times C5); 124.3 (2 \times C6-Aryl); 124.2 (2 \times C5-Aryl); 121.3, 121.2 (2 \times C3-Aryl); 84.8, 84.7 (2 \times C1'); 82.8, 82.7 (2 \times C4'); 70.4 (2 \times C3'); 68.5 (2d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C5'); 68.1 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, C7 $_{1,D}$ -Benzyl); 68.1 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} =$

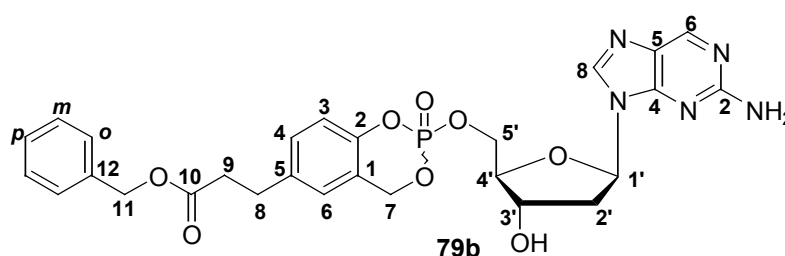
8.6 Hz, C7_{2.D}-Benzyl); 67.4 (2×C11); 38.7, 38.5 (2×C2'); 33.7, 33.6 (2×C9); 24.3, 24.2 (2×C8); 21.7 (2×C12a,b)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d₆): -7.89, -8.02

HPLC: t_R = 13.3 min (Methode I)

MS (FAB, m/z): ber.: 533.1676 (M)
gef.: 534.1 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.4.2. Darstellung von 5-BnPr-cycloSal-2-Amino-dPMP 79b



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-8** (siehe Abschnitt 6.4.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

85 mg (338 μmol) 2-Amino-dP **32**, 177 mg (507 μmol) Saligenylchlorphosphan **76i** (verunreinigtes Rohprodukt), 87 mg (676 μmol) DIPEA, 296 μl (1.63 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 45 mg (77 μmol, 23 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.8)

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.26

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d₆): 8.57, 8.56 (2s, 1H, H6); 8.16, 8.12 (2s, 1H, H8); 7.36-7.26 (m, 5H, Ph); 7.18, 7.14 (2d(br), ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H, H4-Aryl); 7.06, 7.02 (d, ⁴J_{H-H} = 2.0 Hz, 1H, H6-Aryl); 6.99, 6.91 (2d, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.53 (s(br), 2H, NH₂); 6.26 (dd, 2×³J_{H-H} = 6.9 Hz, 1H_{1.D}, H1'); 6.25 (dd, 2×³J_{H-H} = 6.8 Hz, 1H_{2.D}, H1'); 5.48, 5.47 (2d, ³J_{H-H} = 3.7 Hz, 1H, 3'-OH); 5.40-5.27 (m, 2H, H7-Benzyl); 5.06 (s, 2H, H11); 4.42-4.38 (m, 1H, H3'); 4.38 (ddd, ²J_{H-H} = 11.1 Hz, ³J_{H-P} = 7.1 Hz, ³J_{H-H} = 4.1 Hz, 1H_{1.D}, H5'); 4.35 (ddd, ²J_{H-H} = 11.2 Hz, ³J_{H-P} = 7.0 Hz, ³J_{H-H} = 4.2 Hz,

$^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H}_{1,D}$, $\text{H}5'$); 4.26 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $^1\text{H}_{2,D}$, $\text{H}5'$); 4.22 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.5$ Hz, $^1\text{H}_{2,D}$, $\text{H}5'$); 4.01-3.97 (m, 1H, $\text{H}4'$); 2.82 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, $\text{H}8$); 2.73-2.60 (m, 1H, $\text{H}2'$); 2.66 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, 2H, $\text{H}9$); 2.27 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.8$ Hz, 1H, $\text{H}2'$)

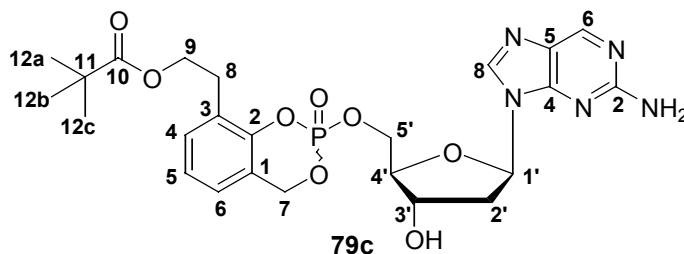
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.1 ($\text{C}10$); 160.6 ($\text{C}4$); 152.7 ($\text{C}2$); 149.5 ($2 \times \text{C}8$); 148.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, $\text{C}2_{1,D}$ -Aryl); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, $\text{C}2_{2,D}$ -Aryl); 140.8, 140.7 ($2 \times \text{C}6$); 136.8 ($2 \times \text{C}5$ -Aryl); 136.3 ($\text{C}12$); 129.7 ($2 \times \text{C}4$ -Aryl); 128.5 ($2 \times \text{Cm-Ph}$); 128.1 (Cp-Ph); 128.1 ($2 \times \text{Co-Ph}$); 127.3 ($2 \times \text{C}5$); 125.8 ($\text{C}6$ -Aryl); 120.8, 120.7 ($2 \times \text{C}1$ -Aryl); 118.2, 118.1 ($2 \times \text{C}3$ -Aryl); 84.8, 84.7 ($2 \times \text{C}1'$); 82.8 ($2 \times \text{C}4'$); 70.4 ($\text{C}3'$); 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, $\text{C}5'_{1,D}$); 68.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, $\text{C}5'_{2,D}$); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, $\text{C}7$ -Benzyl); 65.6 ($\text{C}11$); 38.5, 38.4 ($2 \times \text{C}2'$); 34.9 ($\text{C}9$); 29.6 ($\text{C}8$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_6): -8.43, -8.45

HPLC: $t_R = 16.3$ min (Methode I)

MS (FAB, m/z):
ber.: 581.1676 (M)
gef.: 582.5 ($\text{M}+\text{H}^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.4.3. Darstellung von 3-PivEt-cycloSal-2-Amino-dPMP 79c



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-8** (siehe Abschnitt 6.4.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

80 mg (318 μmol) 2-Amino-dP **32**, 201 mg (636 μmol) Saligenylchlorphosphan **76I** (verunreinigtes Rohprodukt), 41 mg (318 μmol) DIPEA, 218 μl (995 μmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 42 mg (77 μmol , 24 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.28

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d_6): 8.56 (2s, 1H, H6); 8.15, 8.13 (2s, 1H, H8); 7.26-7.21 (m, 1H, H4-Aryl); 7.12-7.06 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.53 (s(br), 2H, NH_2); 6.26 (dd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 1H, H1'); 5.47 (d, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.3$ Hz, 1H_{1.D}, 3'-OH); 5.47 (d, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.6$ Hz, 1H_{2.D}, 3'-OH); 5.44-5.30 (m, 2H, H7-Benzyl); 4.43-4.39 (m, 1H, H3'); 4.40 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.0$ Hz, 1H_{1.D}, H5'); 4.35 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 7.1$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.2$ Hz, 1H_{1.D}, H5'); 4.28 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 7.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H_{2.D}, H5'); 4.24 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 8.6$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H_{2.D}, H5'); 4.21-4.16 (m, 2H_{1.D}, H9); 4.13 (dd, $2 \times {}^3J_{\text{H-H}} = 6.6$ Hz, 2H_{2.D}, H9); 4.01-3.97 (m, 1H, H4'); 2.97-2.81 (m, 2H, H8); 2.79-2.63 (m, 1H, H2'); 2.27 (ddd, ${}^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H-P}} = 6.5$ Hz, ${}^3J_{\text{H-H}} = 3.9$ Hz, 1H, H2'); 1.04, 1.02 (2s, 9H, H12a-c)

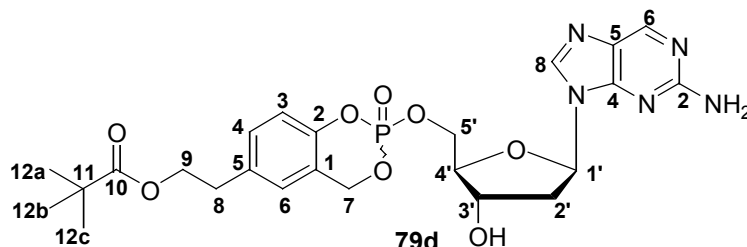
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 175.1 (2 \times C10); 160.7, 160.6 (2 \times C4); 152.7 (2 \times C2); 149.5 (C8); 147.9 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, C2-Aryl); 140.8, 140.7 (2 \times C6); 131.0 (2 \times C4-Aryl); 128.6 (C1-Aryl); 127.3, 127.2 (2 \times C5); 124.6 (2 \times C6-Aryl); 124.1 (2 \times C5-Aryl); 121.2, 121.1 (2 \times C3-Aryl); 84.8, 84.7 (2 \times C1'); 82.8, 82.7 (2 \times C4'); 70.4 (C3'); 68.5 (2d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C5'); 68.1 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C7-Benzyl); 62.9 (2 \times C9); 38.7, 38.5 (2 \times C2'); 32.5 (C11); 28.2 (2 \times C8); 26.9 (2 \times C12a-c)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_6): -7.90, -8.03

HPLC: $t_R = 14.5$ min (Methode I)

MS (FAB, m/z): ber.: 547.18 (M)
 gef.: 548.3 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)
 548.1910 (M+H⁺, Hochoflösung)

6.4.4.4. Darstellung von 5-PivEt-cycloSal-2-Amino-dPMP 79d



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-8** (siehe Abschnitt 6.4.4.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

100 mg (400 μ mol) 2-Amino-dP **32**, 189 mg (600 μ mol) Saligenylchlorphosphan **76n** (verunreinigtes Rohprodukt), 76 mg (600 μ mol) DIPEA, 260 μ l (1.43 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid;

Ausbeute: 16 mg (29 μ mol, 7 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_F-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.25

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.58, 8.57 (2s, 1H, H6); 8.17, 8.13 (2s, 1H, H8); 7.21, 7.16 (2d(br), ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H, H4-Aryl); 7.09, 7.05 (d, ⁴J_{H-H} = 2.2 Hz, 1H, H6-Aryl); 7.03, 6.95 (2d, ³J_{H-H} = 8.4 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.54 (s(br), 2H, NH₂); 6.26 (dd, 2 \times ³J_{H-H} = 6.8 Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.25 (dd, 2 \times ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 1H_{2,D}, H1'); 5.51-5.46 (m, 1H, 3'-OH); 5.45-5.28 (m, 2H, H7-Benzyl); 4.42-4.38 (m, 1H, H3'); 4.38 (ddd, ²J_{H-H} = 11.1 Hz, ³J_{H-P} = 7.0 Hz, ³J_{H-H} = 4.1 Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.34 (ddd, ²J_{H-H} = 11.1 Hz, ³J_{H-P} = 7.0 Hz, ³J_{H-H} = 4.2 Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.26 (ddd, ²J_{H-H} = 11.0 Hz, ³J_{H-P} = 7.5 Hz, ³J_{H-H} = 6.7 Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.22 (ddd, ²J_{H-H} = 11.2 Hz, ³J_{H-P} = 8.6 Hz, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.16 (2dd, 2 \times ³J_{H-H} = 6.6 Hz, 2H, H9); 4.01-3.96 (m, 1H, H4'); 2.83 (dd, 2 \times ³J_{H-H} = 6.5 Hz, 2H, H8); 2.68 (dddd, ²J_{H-H} = 13.5 Hz, ³J_{H-P} = 9.1 Hz, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, ⁴J_{H-H} = 6.4 Hz,

$^1\text{H}_{2,\text{D}}$, $\text{H}2'$); 2.27 (2ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.8$ Hz, $^1\text{H}_{2,\text{D}}$, $\text{H}2'$); 1.04 (2s, 9H, H12a-c)

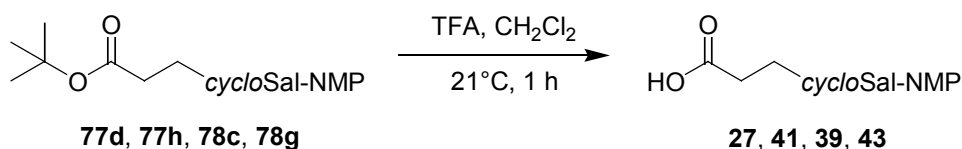
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 177.4 (C10); 160.6 (C4); 152.7 (C2); 149.5, 149.4 (2 \times C8); 148.1 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2-Aryl); 140.8 (2 \times C6); 134.6, 134.5 (2 \times C5-Aryl); 130.3 (2 \times C4-Aryl); 127.3 (C5); 126.4 (C6-Aryl); 120.8, 120.7 (2 \times C1-Aryl); 118.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.2$ Hz, C3 $_{1,\text{D}}$ -Aryl); 118.1 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.6$ Hz, C3 $_{2,\text{D}}$ -Aryl); 84.8, 84.7 (2 \times C1'); 82.9, 82.8 (2 \times C4'); 70.4 (C3'); 68.6, 68.5 (2d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C5'); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C7 $_{1,\text{D}}$ -Benzyl); 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, C7 $_{2,\text{D}}$ -Benzyl); 64.3 (C9); 38.6, 38.5 (2 \times C2'); 38.3 (C11); 33.6 (C8); 27.0 (2 \times C12a-c)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.40, -8.45

HPLC: $t_{\text{R}} = 14.9$ min (Methode I)

MS (FAB, m/z): ber.: 547.1832 (M)
gef.: 548.6 ($\text{M}+\text{H}^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.5. Hydrolyse der *tert*-Butylester 77d,h und 78c,g nach AAV-9

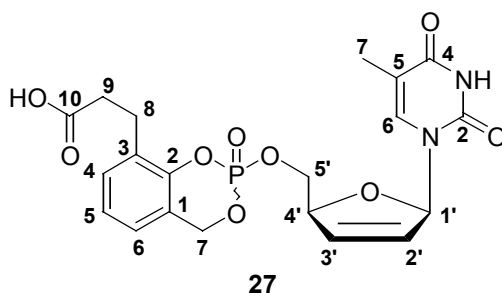


Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV)-9:

Der entsprechende *tert*-Butylester (1 Äquivalent) wurde in Dichlormethan gelöst (10 μmol Substanz in 5 ml Lösungsmittel). Bei Raumtemperatur wurde dann unter Rühren soviel Trifluoressigsäure zügig zu getropft, daß eine 15 %-ige Lösung vorlag. Zur Reaktionskontrolle wurden in Abständen von ca. 20 min Dünnschichtchromatogramme angefertigt, um die Hydrolysedauer des *tert*-Butylesters nicht unnötig zu verlängern, was sonst zu Ausbeuteverlusten durch die mögliche Triesterhydrolyse geführt hätte. Nach spätestens 60 Minuten war jedes der eingesetzten Edukte vollständig umgesetzt und das Lösungsmittel wurde zusammen mit der TFA am Rotationsverdampfer entfernt.

Das als Feststoff anfallende Rohprodukt wurde mit Hilfe des Chromatotrons aufgereinigt (Dichlormethan mit angesäuertem (0.10 % Essigsäure) Methanol-Gradienten von 10-40 %). Danach wurden die Produkte als farblose Feststoffe isoliert, die durch die abschließende Gefriertrocknung in farblose, feste Schäume überführt werden konnten.

6.4.5.1. Darstellung von 3-(2'-Carboxyethyl)-cycloSal-d4TMP 27



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-9** (siehe Abschnitt 6.4.5.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

15 mg (29 μ mol) 3-*t*-BuPr-cycloSal-d4TMP **77d**, 2.4 ml (32 mmol) Trifluoressigsäure;

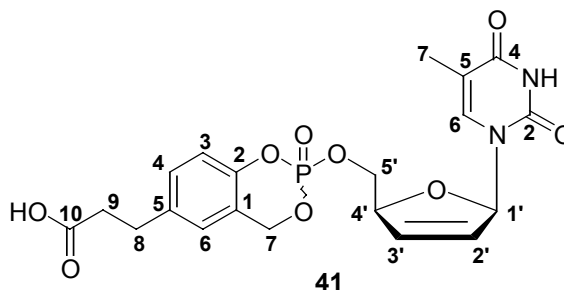
Ausbeute: 12 mg (21 μ mol, 71 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.16

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 12.17 (s(br), 1H, COOH); 11.31 (2s, 1H, NH); 7.27-7.25 (m, 1H, H4-Aryl); 7.19 (2q, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 1H, H6); 7.14-7.09 (m, 2H, H5-Aryl+H6-Aryl); 6.80-6.78 (m, 1H, H1'); 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,D}, H3'); 6.35 (ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, 1H_{2,D}, H3'); 6.02, 6.00 (2ddd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.6$ Hz, 1H, H2'); 5.47 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 6.5$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 5.8$ Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.37 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 4.0$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.34 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 4.1$ Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.96-4.92 (m, 1H, H4'); 4.34-4.24 (m, 2H, H5'); 2.85-2.75 (m, 2H, H8); 2.51, 2.50 (2dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, H9); 1.65, 1.58 (2d, $^4J_{\text{H-H}} = 1.2$ Hz, 3H, H7)

$^{13}\text{C-NMR}$:	δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.6 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.9, 150.8 (2 \times C2); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.12$ Hz, C2-Aryl); 147.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.63$ Hz, C2-Aryl); 135.8, 135.7 (2 \times C6); 133.0 132.9 (2 \times C3'); 130.2 (2 \times C4-Aryl); 130.0, 129.9 (2 \times C1-Aryl); 127.5 (2 \times C2'); 124.4 (2 \times C6-Aryl); 124.3 (C5-Aryl); 121.7, 121.6 (C3-Aryl); 109.9, 109.8 (2 \times C5); 89.4, 89.3 (2 \times C1'); 84.3 (2 \times C4'); 68.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.10$ Hz, C5'); 68.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.59$ Hz, C5'); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.12$ Hz, C7-Benzyl); 68.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.61$ Hz, C7-Benzyl); 33.5 (2 \times C9); 24.2 (2 \times C8); 12.0, 11.9 (2 \times C7)
$^{31}\text{P-NMR}$:	δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.51, -7.56
HPLC:	$t_{\text{R}} = 9.2, 9.5$ min (Methode I) $t_{\text{R}} = 9.7$ min (Methode II)
MS (FAB, m/z):	ber.: 464.0985 (M) gef.: 464.2 (M+H $^+$, Matrix <i>m</i> -Nitrobenzylalkohol)

6.4.5.2. Darstellung von 5-(2'-Carboxyethyl)-cycloSal-d4TMP 41



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-9** (siehe Abschnitt 6.4.5.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

14 mg (28 μmol) 5-*t*-BuPr-*cycloSal*-d4TMP **77h**, 2.2 ml (29 mmol) Trifluoressigsäure;

Ausbeute: 13 mg (26 μmol , 93 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_{F} -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.16

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 12.08 (s(br), 1H, COOH); 11.33, 11.32 (2s, 1H, NH); 7.24-7.19 (m, 1H, H4-Aryl); 7.18, 7.15 (2q,

$^4J_{H-H}$ = 1.1 Hz, 1H, H6); 7.13-7.11 (m, 2H, H6-Aryl); 7.03 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.5 Hz, 1H_{1,D}, H3-Aryl); 7.01 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.4 Hz, 1H_{2,D}, H3-Aryl); 6.79, 6.77 (2ddd, $^3J_{H-H}$ = 3.6 Hz, $2 \times ^4J_{H-H}$ = 1.8 Hz, 1H, H1'); 6.40, 6.33 (2ddd, $^3J_{H-H}$ = 6.0 Hz, $^3J_{H-H}$ = 1.7 Hz, $^4J_{H-H}$ = 1.7 Hz, 1H, H3'); 6.01 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 6.0 Hz, $^3J_{H-H}$ = 2.3 Hz, $^4J_{H-H}$ = 1.5 Hz, 1H_{1,D}, H2'); 5.99 (ddd, $^3J_{H-H}$ = 6.1 Hz, $^3J_{H-H}$ = 2.2 Hz, $^4J_{H-H}$ = 1.6 Hz, 1H_{2,D}, H2'); 5.45 (dd, $^2J_{H-H}$ = 14.3 Hz, $^3J_{H-P}$ = 7.4 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.41 (dd, $^2J_{H-H}$ = 14.4 Hz, $^3J_{H-P}$ = 7.3 Hz, 1H_{1,D}, H7-Benzyl); 5.36 (d(br), $^2J_{H-H}$ = 14.3 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 5.33 (dd, $^2J_{H-H}$ = 14.1 Hz, $^3J_{H-P}$ = 1.2 Hz, 1H_{2,D}, H7-Benzyl); 4.96-4.92 (m, 1H, H4'); 4.33-4.22 (m, 2H, H5'); 2.78 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 7.6 Hz, 2H, H8); 2.51 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 7.8 Hz, 2H, H9); 1.67, 1.61 (2d, $^4J_{H-H}$ = 1.1 Hz, 3H, H7)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.7 (2 \times C10); 163.9 (C4); 150.9, 150.8 (2 \times C2); 146.5, 146.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.6 Hz, C2-Aryl); 137.4 (C5-Aryl); 135.8 (2 \times C6); 133.0 132.9 (2 \times C3'); 129.8, 129.7 (2 \times C4-Aryl); 128.7 (C1-Aryl); 127.5, 127.4 (2 \times C2'); 125.9, 125.8 (2 \times C6-Aryl); 118.1 (2 \times C3-Aryl); 109.8 (2 \times C5); 89.3 (C1'); 84.3, 84.2 (2 \times C4'); 68.5 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, C5'); 68.5 (d, $^2J_{C-P}$ = 5.1 Hz, C5'); 68.4 (2d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, C7-Benzyl); 35.1 (C9); 29.6 (C8); 12.1, 12.0 (2 \times C7)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.01, -8.06

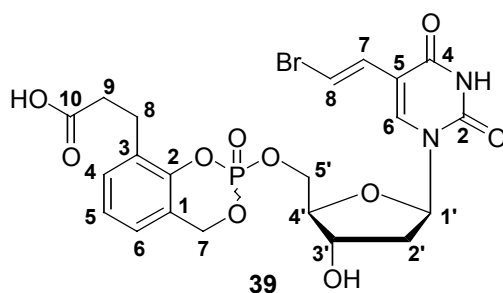
HPLC: t_R = 9.5 min (Methode I)

t_R = 9.6 min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 464.0985 (M)

gef.: 464.3 (M+H⁺, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.5.3. Darstellung von 3-(2'-Carboxyethyl)-cycloSal-BVDUMP 39



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-9** (siehe Abschnitt 6.4.5.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

15 mg (24 μ mol) 3-*t*-BuPr-cycloSal-BVDUMP **78c**, 2 ml (26 mmol) Trifluoressigsäure;

Ausbeute: 12 mg (21 μ mol, 88 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.17

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 12.17 (s(br), 1H, COOH); 11.57 (s, 1H, NH); 7.77 (s, 1H, H6); 7.28, 7.27 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.27-7.23 (m, 1H, H4-Aryl); 7.12-7.08 (m, 2H, H6-Aryl+H5-Aryl); 6.86, 6.84 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 6.5$ Hz, 1H $_{1,D}$, H1'); 6.14 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 6.6$ Hz, 1H $_{2,D}$, H1'); 5.48 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.9$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.45 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 3.9$ Hz, 1H $_{1,D}$, 3'-OH); 5.44 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 4.6$ Hz, 1H $_{2,D}$, 3'-OH); 5.44 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.9$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 5.41 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 2.0$ Hz, 1H $_{1,D}$, H7-Benzyl); 5.39 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 14.2$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 1.7$ Hz, 1H $_{2,D}$, H7-Benzyl); 4.39 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.33 (dd, $^3J_{\text{H-P}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 5.4$ Hz, 2H $_{2,D}$, H5'); 4.27 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.1$ Hz, 1H $_{1,D}$, H5'); 4.24-4.19 (m, 1H, H3'); 3.95-3.91 (m, 1H, H4'); 2.88-2.77 (m, 2H, H8); 2.58 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz, 2H $_{1,D}$, H9); 2.56 (dd, $2 \times ^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 2H $_{2,D}$, H9); 2.20-2.13 (m, 2H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.6 (2 \times C10); 161.7 (C4); 149.3 (2 \times C2); 147.8 (C2-Aryl); 139.4, 139.3 (2 \times C6); 130.1, 130.0

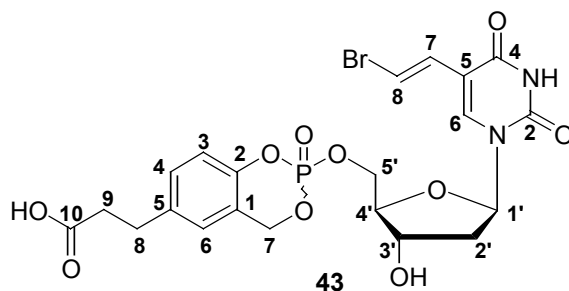
(2×C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.8 (2×C1-Aryl); 124.3 (C6-Aryl); 124.2 (C5-Aryl); 121.3, 121.2 (2×C3-Aryl); 110.3 (2×C5); 107.1 (2×C8-Vinyl); 84.8 (2×C1'); 84.6, 84.5 (2×C4'); 69.8 (C3'); 68.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 5.6 Hz, C5'_{1,D}); 68.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, C5'_{2,D}); 68.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 5.1 Hz, C7'_{1,D}-Benzyl); 68.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.1 Hz, C7'_{2,D}-Benzyl); 39.1, 38.9 (2×C2'); 33.5 (2×C9); 24.3 (C8)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -7.81 (nur ein Peak)

HPLC: t_R = 11.0 min (Methode I)

t_R = 11.2 min (Methode II)

6.4.5.4. Darstellung von 5-(2'-Carboxyethyl)-cycloSal-BVDUMP 43



Die Reaktion wurde gemäß der **AAV-9** (siehe Abschnitt 6.4.5.) mit folgenden Mengen durchgeführt:

13 mg (20 μmol) 5-*t*-BuPr-cycloSal-BVDUMP **78g**, 2 ml (26 mmol) Trifluoressigsäure;

Ausbeute: 11 mg (19 μmol , 97 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:1.0)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.17

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 12.11 (s(br), 1H, COOH); 11.59, 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.75 (2s, 1H, H6); 7.29, 7.28 (2d, $^3J_{H-H}$ = 13.6 Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.23-7.18 (m, 1H, H4-Aryl); 7.11 (d, $^4J_{H-H}$ = 2.5 Hz, 1H_{1,D}, H6-Aryl); 7.10 (d, $^4J_{H-H}$ = 2.8 Hz, 1H_{2,D}, H6-Aryl); 7.02, 7.01 (2d, $^3J_{H-H}$ = 8.4 Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88, 6.85 (2d, $^3J_{H-H}$ = 13.2 Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 6.9 Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.13 (dd, $2 \times ^3J_{H-H}$ = 6.8 Hz, 1H_{2,D}, H1'); 5.45 (dd, $^2J_{H-H}$ = 14.6 Hz, $^3J_{H-P}$ = 9.5 Hz, 1H_{1,D+2,D}, H7-Benzyl); 5.45, 5.44 (2d, $^3J_{H-H}$ =

4.4 Hz, 1H, 3'-OH); 5.39 (dd, $^2J_{H-H} = 14.7$ Hz, $2H_{1.D+2.D}$, H7-Benzyl); 4.36 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H-P} = 7.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 3.7$ Hz, $1H_{1.D}$, H5'); 4.31 (dd, $^3J_{H-P} = 7.4$ Hz, $^3J_{H-H} = 4.6$ Hz, $1H_{2.D}$, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{H-P} = 6.9$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.8$ Hz, $1H_{2.D}$, H5'); 4.26 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.3$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.2$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, $1H_{1.D}$, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 2.77 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.6$ Hz, 2H, H8); 2.50 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.6$ Hz, 2H, H9); 2.20-2.11 (m, 2H, H2')

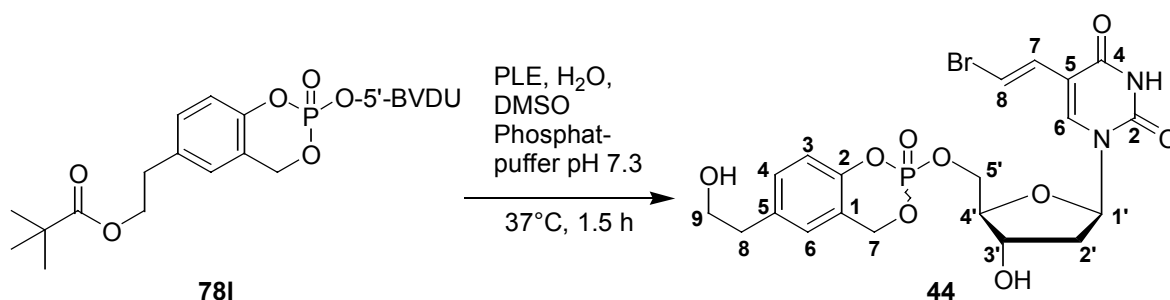
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 173.7 (C10); 161.8, 161.7 ($2 \times \text{C4}$); 149.3 ($2 \times \text{C2}$); 148.1 (d, $^2J_{C-P} = 5.6$ Hz, $\text{C2}_{1.D}$ -Aryl); 147.9 (d, $^2J_{C-P} = 6.6$ Hz, $\text{C2}_{2.D}$ -Aryl); 139.5, 139.4 ($2 \times \text{C6}$); 137.4, 137.3 ($2 \times \text{C5}$ -Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 129.7 ($2 \times \text{C4}$ -Aryl); 125.8, 125.7 ($2 \times \text{C6}$ -Aryl); 120.7, 120.6 ($2 \times \text{C1}$ -Aryl); 118.2, 118.1 ($2 \times \text{C3}$ -Aryl); 110.3, 110.2 ($2 \times \text{C5}$); 107.1 ($2 \times \text{C8}$ -Vinyl); 84.8 (C1'); 84.6, 84.5 (2d, $^3J_{C-P} = 6.6$ Hz, C4'); 69.8 ($2 \times \text{C3}'$); 68.7 (d, $^2J_{C-P} = 6.6$ Hz, $\text{C5}'_{1.D}$); 68.6 (d, $^2J_{C-P} = 7.6$ Hz, $\text{C5}'_{2.D}$); 67.8 (2d, $^2J_{C-P} = 6.1$ Hz, $\text{C7}_{1.D}$ -Benzyl); 67.8 (2d, $^2J_{C-P} = 5.6$ Hz, $\text{C7}_{2.D}$ -Benzyl); 39.0, 38.8 ($2 \times \text{C2}'$); 35.1 ($2 \times \text{C9}$); 29.6 (C8)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.25, -8.32

HPLC: $t_R = 10.7$ min (Methode I)
 $t_R = 10.8$ min (Methode II)

MS (FAB, m/z): ber.: 572.0195 (M)
gef.: 573.0 ($\text{M}+\text{H}^+$, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol)

6.4.6. Darstellung von 5-(2'-Hydroxyethyl)-cycloSal-BVDUMP 44



Es wurden 30 mg (450 Units) PLE (EC 3.1.1.1) in einem Gemisch aus 1.8 ml DMSO, 4.0 ml Wasser und 6.0 ml einem 50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7.3) aufgenommen. Zu dieser PLE-Suspension wurden dann 13.1 mg (23.8 μmol) von 5-PivEt-cycloSal-BVDUMP **78I** gegeben und das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 37°C erwärmt. Jeweils nach 30 Minuten wurden 100 μl Aliquot entnommen und dieses mit Hilfe der HPLC (Methode II) vermessen. Nach der dritten Messung konnte neben einer geringen Menge an Edukt **78I** nur ein noch ein Produkt-Peak identifiziert werden. Zur Beendigung der enzymkatalysierten Esterhydrolyse sollte das Reaktionsgemisch nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 40 ml Dichlormethan extrahiert werden. Dabei bereitete das Ausbleiben einer deutlichen Phasentrennung große Probleme. Auch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung brachte keine Verbesserung. Durch mehrfaches Abtrennen kleinerer Mengen der organischen Phase und der nachfolgenden Zugabe von Dichlormethan (20 ml) konnte dennoch eine Isolierung erreicht werden. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat konnte das Lösungsmittel entfernt werden. Das als farbloses Öl anfallende Rohprodukt wurde mit Hilfe des Chromatotrons aufgereinigt (Dichlormethan mit angesäuertem (0.10 % Essigsäure) Methanol-Gradienten von 10-40 %). Danach konnte das Produkt durch eine abschließende Gefriertrocknung als farbloser, fester Schaum erhalten werden.

Ausbeute: 9.3 mg (17 μmol , 52 %) eines farblosen, festen Schaums als Gemisch von 2 Diastereomeren (Verhältnis 1.0:0.9)

DC: R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v): 0.37

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, DMSO- d_6): 11.59, 11.58 (2s, 1H, NH); 7.78, 7.76 (2s, 1H, H6); 7.29, 7.28 (2d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.7$ Hz, 1H, H8-Vinyl); 7.21-7.16 (m, 1H, H4-Aryl); 7.09-7.07 (m, 1H, H6-Aryl); 7.01,

7.00 (2d, $^3J_{H-H} = 8.4$ Hz, 1H, H3-Aryl); 6.88, 6.86 (2d, $^3J_{H-H} = 13.6$ Hz, 1H, H7-Vinyl); 6.15 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.0$ Hz, 1H_{1,D}, H1'); 6.13 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, 1H_{2,D}, H1'); 5.49-5.36 (m, 2H, H7-Benzyl); 5.45 (2d, $^3J_{H-H} = 4.4$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.62 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 5.2$ Hz, 1H, 9-OH); 4.36 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.1$ Hz, $^3J_{H-P} = 7.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 3.6$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{H-P} = 7.3$ Hz, $^3J_{H-H} = 4.6$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.30 (dd, $^3J_{H-P} = 7.5$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.2$ Hz, 1H_{2,D}, H5'); 4.25 (ddd, $^2J_{H-H} = 11.3$ Hz, $^3J_{H-P} = 8.0$ Hz, $^3J_{H-H} = 6.1$ Hz, 1H_{1,D}, H5'); 4.23-4.19 (m, 1H, H3'); 3.94-3.90 (m, 1H, H4'); 3.56 (ddd, $2 \times ^3J_{H-H} = 6.8$ Hz, $^3J_{H-H} = 5.2$ Hz, 2H, H9); 2.67 (dd, $2 \times ^3J_{H-H} = 6.8$ Hz, 2H, H8); 2.20-2.10 (m, 2H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 161.7, 161.5 (2 \times C4); 149.3 (C2); 148.0 (2 \times C2-Aryl); 139.5, 139.4 (2 \times C6); 136.2 (2 \times C5-Aryl); 130.3 (C4-Aryl); 129.9 (C7-Vinyl); 126.3 (C6-Aryl); 120.7, 120.6 (2 \times C1-Aryl); 118.0, 117.9 (2 \times C3-Aryl); 110.3 (2 \times C5); 107.1 (C8-Vinyl); 84.8 (C1'); 84.6 (C4'); 69.9, 69.8 (2 \times C3'); 68.8, 68.6 (2 \times C5'); 67.8 (2 \times C7-Benzyl); 62.0, 61.9 (2 \times C9); 39.0, 38.8 (2 \times C2'); 33.6 (C8)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO- d_6): -8.21, -8.27

HPLC: $t_R = 10.2$ min (Methode II)

6.5. Hydrolyseexperimente

6.5.1. Verwendete Puffer und Lösungen

50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7.3):

Es wurden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat mit Wasser auf 100 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit Phosphorsäure eingestellt.

50 mM Phosphatpuffer (PBS, pH 6.8):

Es wurden 800 mg Natriumchlorid, 20 mg Kaliumchlorid, 720 mg Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) und 140 mg Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) mit Wasser auf 100 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert von 6.8 wurde, falls nötig, mit verdünnter Salzsäure oder verdünnter Natronlauge eingestellt.

Interner Standard (AZT-Lösung):

Es wurden 5 mg AZT in 500 μl Wasser gelöst.

50 mM DMSO-Stammlösung:

Es wurden 3-6 mg des *cycloSal*-Nukleotides in der entsprechenden Menge (150-250 μl) DMSO aufgenommen.

3.0 mM DMSO-Stammlösung:

Es wurden 24 μl der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 376 μl DMSO versetzt.

6.5.2. Bestimmung der chemischen Hydrolysehalbwertszeiten

Die chemischen Hydrolysehalbwertszeiten wurden in einer 1.9 mM isotonischen Phosphatpuffer-Lösung bei pH 7.3 und mit einigen ausgewählten Verbindungen zusätzlich auch bei pH 6.8 ermittelt. Dazu wurden 188.6 μl DMSO, 100 μl Wasser, 5 μl der AZT-Lösung (interner Standard) und 300 μl des 50 mM Phosphatpuffers (pH 7.3 oder pH 6.8) in einem Eppendorf-Cap vorgelegt und mit Hilfe des Thermomixers auf 37°C temperiert. Durch Hinzupipettieren von 11.4 μl der 50 mM DMSO-Stammlösung (dadurch wurde die Pufferkonzentration auf 24.8 mM und die des *cy-*

cloSal-Nukleotides auf 0.94 mM verdünnt) und kurzes Durchmischen (Vortex) wurde die Hydrolyse gestartet. Das erste Aliquot (t_0) wurde sofort danach entnommen (100 μ l) und weitere sieben Aliquote in zunehmend größer werdenden Zeitabständen. Zum Stoppen der Hydrolyse wurden die Aliquote in ein Eppendorf-Cap zu einigen Tropfen (2-3) konzentrierte Essigsäure gegeben. Danach erfolgte die HPLC-analytische Auswertung der Proben nach der Methode I.

6.5.3. Carboxyesterase-Assay mittels PLE (EC 3.1.1.1)

Der Carboxyesterase-Assay wurde analog der Angaben unter 6.5.2. durchgeführt, wobei jedoch folgende Änderungen vorgenommen wurden:

Zu Beginn wurde die entsprechende Menge an PLE (Sigma, EC 3.1.1.1) in ein Eppendorf-Cap eingewogen. Durch die Zugabe von 300 μ l 50 mM PBS und 100 μ l Wasser wurde zunächst eine homogene Suspension hergestellt. Erst dann wurden die 5 μ l des internen Standards und die 188.6 μ l DMSO zugegeben. Danach konnte die Kinetik, wie zuvor bei der chemischen Hydrolyse, gestartet werden. Zum Stoppen der Aliquot-Hydrolyse wurde diesmal neben einigen Tropfen Essigsäure zusätzlich noch 40 μ l Acetonitril verwendet.

Die HPLC-analytische Vermessung der Aliquote erfolgte diesmal nach der Methode II.

6.5.4. Hydrolysekinetiken in humanen Zellextrakten

Ein Milliliter des entsprechenden Zellextraktes (*cycloSal*-d4TMPs: CEM/0; *cycloSal*-BVDUMPs: P3HR-1) wurde gleichmäßig auf zehn Eppendorf-Caps verteilt und jeweils mit 20 μ l der 70 mM Magnesiumchlorid-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde nun in jedem einzelnen Cap durch die Zugabe von 20 μ l der 3.0 mM DMSO-Stammlösung des entsprechenden Triesters gestartet und in einem Thermomixer bei konstant 37°C gehalten. Im Gegensatz zu den bisherigen Kinetiken wurden die benötigten Proben hierbei nicht durch die Entnahme von Aliquoten gewonnen, sondern durch das sukzessive Stoppen der zehn Einzelhydrolysen. Der zeitliche Rahmen der ZE-Kinetiken wurde dabei auf maximal 12 Stunden beschränkt. Zum Abbruch der Hydrolyse wurden 300 μ l von essigsauerm Methanol hinzugegeben. Um die ausgefallenen Bestandteile abzutrennen, wurde die Probe etwa 10 Minuten auf 0°C abge-

kühlt und anschließend zentrifugiert (10 min mit 13000 U/min). Der Überstand wurde in eine Spritze (1 ml) aufgenommen und nochmals filtriert. Die so erhaltenen klaren Lösungen wurden nun unter Verwendung der Methode II HPLC-analytisch ausgewertet.

6.5.5. ³¹P-NMR-Hydrolysestudien

Diese Hydrolyseuntersuchung wurde durchgeführt, indem man zu einer Lösung von ca. 5 mg des entsprechenden Triesters in 300 µl DMSO-d₆ 700 µl einer isotonischen Imidazol/HCl-Pufferlösung gab (50 mM, entspricht 35 µmol Puffersubstanz; pH 7.3) und den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse bei Raumtemperatur ³¹P-NMR-spektroskopisch verfolgt (¹H-entkoppelt, 202 MHz, 256 Scans).

6.6. Gefahrstoffe

Verbindung	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	11-23/24/25	16-27-45
Benzylalkohol	20/22	26
Benzylbromid	36/37/38	39
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37
Chlorwasserstoff	23-35	9-26-36/37/39-45
Dichlormethan	40	23.2-24/25-36/37
Dicyclohexylcarbodiimid	22-24-41-43	24-26-37/39-45
Diethylether	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dihydrocumarin	22-43	24/25-37
Di- <i>iso</i> -propylethylamin	11-22-34-52/53	16-26-36
4-Dimethylaminopyridin	25-36/38	37-45
Dimethylformamid	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	36/38	26
Essigsäure	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Ethanol	11	7-16
Ethylacetat	11-36-66-67	16-26-33
Methanol	23/24/25-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Natronlauge	34	26-36/37/39-45
Paraformaldehyd	20/22-36/37/38-40-43	22-26-36/37
Phenylboronsäure	22	22-24/25
Phosphorsäure 85 %	11-36/38-67	7-16-23.3-24-26-51
Phosphortrichlorid	14-26/28-35-48/20	7/8-26-36/37/39-45
Pivaloylchlorid	11-34-36/37	16-26-36/37/39-45
2-Propanol	11	7-16
Propionsäure	34	23-36-45
Pyridin	25-26-36/37/38-50/53	26-28.1-36/37-45-61
<i>tert</i> -Butanol	11-20	9-16
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	7-21/22-23-34-44-52/53	3/7-26-36/37/39-45
Tetrabutylammoniumhydroxid	34	26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33

Verbindung	R-Sätze	S-Sätze
2-Thiazolin-2-thiol	22	
Thioessigsäure	11-34	16-26-36/37/39-45
Toluol	22-43-50/53	24-37-60-61
Triethylamin	11-22/21/22-35	3-16-26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Wasserstoffperoxid	34	3-28-36/39-45

7. Literaturverzeichnis

- ¹ H. Feldmeier; Auf der Suche nach einem Aids-Impfstoff, *Neue Zürcher Zeitung* **2000**, Nr. 273, 75.
- ² S. Modrow, D. Falke; Molekulare Virologie, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* **1998**, 613.
- ³ C. Cohen, J. Eron, M. Kilby, E. Nelson, P. Sista, J. Lalezar; Forty-eight week analysis of patients receiving T-20 as a component of multi-drug salvage therapy, *7th WAC, Durban* **2000**, [LbPp116].
- ⁴ H. Mitsuya, K.J. Weinhold, P.A. Furmann, M.H. St. Clair, S. Nusinoff-Lehrmann, R.C. Gallo, D.P. Bolognesi, D.W. Barry, S. Broder; 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An Antiviral Agent that Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7096-7100.
- ⁵ L. Stryer; *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1999**
- ⁶ J.M. Whitcomb, S.H. Hughes; Retroviral Reverse Transcription and Integration: Progress and Problems, *Ann. Rev. Cell Biol.* **1992**, *8*, 275-306.
- ⁷ G.L. Kenyon, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 595-598.
- ⁸ D. Motakis, M.A. Parniak; A Tight-Binding Mode of Inhibition Is Essential for Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virucidal Activity of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, *Antimicrob. Agents and Chemother.* **2002**, Vol. 46 (6), 1851-1856.
- ⁹ R.W. King, R.M. Klabe, C.D. Reid, S.K. Erickson-Viitanen; Potency of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) Used in Combination with Other Human Immunodeficiency Virus NNRTIs, NRTIs, or Protease Inhibitors, *Antimicrob. Agents and Chemother.* **2002**, Vol. 46 (6), 1640-1646.
- ¹⁰ M. Hurst, D. Faulds; Lopinavir, *Drugs* **2000**, *60(6)*, 1371-1379.
- ¹¹ A.S. Fauci; Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease, *Nature* **1996**, *384*, 529-534.
- ¹² D. Roth; Therapeutische Strategien gegen HIV- und HSV-Infektionen, *Deutsche Apotheker Zeitung* **1997**, *137*, 92-93.

- ¹³ R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq; Current Pharmacological Approaches to the Therapy of Varicella Zoster Virus Infections; *Drugs* **1999**, *57*, 187-206
- ¹⁴ D.O. White, F.J. Fenner; Medical Virology, 4th Edition, *Academic Press*, San Diego/London **1994**, 320-323.
- ¹⁵ S. Modrow, D. Falke; Molekulare Virologie, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg/Berlin/Oxford **1997**, 442-443.
- ¹⁶ M.R. Hamden, R.L. Jarvest, M.R. Boyd, D. Sutton, R.A. Vere Hodge; Prodrugs of the Selective Antivirus Agent 9-[4-(Hydroxymethyl)but-1-yl]guanine (BRL 39123) with Improved Gastrointestinal Absorption Properties, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1738-1743.
- ¹⁷ R.A. Vere Hodge; Famciclovir and Penciclovir. The Mode of Action of Famciclovir Including Its Conversion to Penciclovir, *Antiviral Chem. & Chemother.* **1993**, *4*, 67-84.
- ¹⁸ R.C. Blackley, A.S. Jones, R.T. Walker; Incorporation of 5-Substituted Uracils Derivatives into Nucleic Acids. III. Synthesis of 5-Substituted Uracils Derived from 5-Acetyluracil, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2795-2797.
- ¹⁹ R.T. Walker, P.J. Barr, E. De Clercq, J. Descamps, A.S. Jones, P. Serafinowski; The Synthesis and Properties of Some Antiviral Nucleosides, *Nucleic Acids Res. Publ.* **1978**, *4*, 103-105.
- ²⁰ J.D. Fissekis, F. Sweet; The Chemistry of Some 5-(2-Hydroxyalkyl)uracil Derivatives and a Synthesis of 5-Vinyluracil, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1963-1970.
- ²¹ E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer, P.J. Barr, A.S. Jones, R.T. Walker; (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a Potent and Selective Anti-Herpes Agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 2947-2951.
- ²² E. De Clercq, J. Descamps, G. Verhelst, R.T. Walker, A.S. Jones, P.F. Torrence, D. Shugar; Comparative Efficacy of Antiherpes Drugs Against Different Strains of Herpes Simplex Virus, *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563-574.
- ²³ S. Shigeta, T. Yokota, T. Iwabuchi, M. Baba, K. Konno, M. Ogata, E. De Clercq; Comparative Efficacy of Antiherpes Drugs Against Various Strains of Varicella-Zoster Virus, *J. Infect. Dis.* **1983**, *147*, 576-584.
- ²⁴ E. De Clercq; Potential of Bromovinyldeoxyuridine in Anticancer Chemotherapy, *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 549-556.

-
- 25 Einmal täglich: das reicht für effektive Zoster-Therapie; *Ärzte Zeitung online*
2000
- 26 J. Balzarini; Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and
pyrimidine derivatives, *Pharmacy World Sci* **1993**, 16, 113-126.
- 27 G. Antonelli, O. Turriziani, A. Verri, P. Narciso, F. Ferri, G. D'Offizi, F. Dianzini;
Long-term exposure to zidovudine affects in vitro and in vivo the efficiency of
thymidine kinase, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1996**, 12, 223-228.
- 28 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 Com-
pounds, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 6127-6133.
- 29 Z. Hao, D. Farquhar, A.L. DeVico, M.G. Samgadharan, D.A. Cooney, D.G.
Johns, 2',3'-Dideoxyuridine triphosphat: a potent inhibitor of HIV reverse tran-
scriptase, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1988**, 29, 348.
- 30 G.B. Elion; The biochemistry and mechanism of action of acyclovir, *J. Antimi-
crob. Chemother.* **1983**, 12, 9-17.
- 31 J.A. Montgomery, H.J. Thomas, H.J. Schaeffer; Synthesis of potential anti-
cancer agents. XXVIII. Simple esters of 6-mercaptapurine ribonucleotide, *J.
Org. Chem.* **1961**, 26, 1929-1933.
- 32 G. Gosselin, J.L. Girardet, C. Periguad, S. Benzaria, I. Lefebvre, N. Schlien-
ger, A. Pompon, J.-L. Imbach; New insights regarding the potential of the pro-
nucleotide approach in antiviral chemotherapy, *Acta Biochim. Pol.* **1996**, 43,
195-208.
- 33 C. Meier; Pro-Nucleotides – Recent Advances in the Design of Efficient Tools
for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates, *Synlett*
1997, 1, 233-242.
- 34 C. McGuigan, S.M. Tollerfield, P.A. Riley; Synthesis and biological evaluation
of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug AraA, *Nucleic Ac-
ids Res.* **1989**, 17, 6065-6075.
- 35 a) D. Farquhar, D.N. Srivastava, N.J. Kattesch, P.P. Saunders; Biologically
Reversible Phosphate-Protective Groups, *J. Pharm. Sci* **1983**, 72, 324-325.

b) R.V. Srinivas, B.L. Robbins, M.C. Connelly, Y.-F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland; Pivaloyloxymethyl Esters of Acyclic Nucleoside Phosphonates, *Int. Antiviral News* **1994**, *2*, 53-55.

c) J.K. Sastry, P.N. Nehete, S. Khan, B.J. Nowak, W. Plunkett, R.B. Arlinghaus, D. Farquhar; Membrane-Permeable Dideoxyuridine 5'-Monophosphate Analogue Inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection, *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 441-445.

d) A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Khan, D. Farquhar; Decomposition Pathways of the Mono-(Pivaloyloxymethyl) and Bis-(Pivaloyloxymethyl) Esters of Azidothymidine-5'-Monophosphate in Cell Extract and in Tissue-Culture Medium – An Application of the Online Isrp-Cleaning HPLC Technique, *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 91-98.

e) D. Farquhar, R. Chen, S. Khan; 5'-[4-(Pivaloyloxy)-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl]-2'-deoxy-5-fluorouridine: A Membrane-Permeating Prodrug of 5-Fluoro-2'-deoxyuridic Acid (FdUMP), *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 488-495.

36 M.N. Arimilli, J. Dougherty, K.C. Cundy, N. Bischofberger; *Advances in Antiviral Drug Design* **1999**, *Vol. 3*, 69.

37 C. Pergaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Minireview: From the Pronucleotid Concept to the SATE Phosphate Protecting Groups, *Curr. Topics in Med. Chem.* **1997**, *2*, 15-29.

38 a) I. Lefebvre, C. Perigaud, A. Pompon, A.-M. Aubertin, J.-L. Girardet, A. Kim, G. Gosselin, J.-L. Imbach; Mononucleosides Phosphotriester Derivatives with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-Protecting Groups: Intracellular Delivery of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3941-3950.

b) J.-L. Girardet, C. Perigaud, A.-M. Aubertin, G. Gosselin, A. Kim, J.-L. Imbach; Increase of the anti-HIV Activity of d4T in Human T-Cell Culture by the use of the SATE Pronucleotide Approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2981-2984.

c) C. Perigaud, A.-M. Aubertin, S. Benzaria, H. Pelicano, J.-L. Girardet, G. Maury, G. Gosselin, A. Kim, J.-L. Imbach; Equal Inhibition of the Replication of Human Immunodeficiency Virus in Human T-Cell Culture by ddA

- Bis(SATE)Phosphotriesters and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 11-14.
- 39 J. Zemlicka; Lipophilic phosphoramidates as antiviral pronucleotides, *Biochim. et Biophys. Acta* **2002**, *1587*, 276-286.
- 40 C. Meier; Rational for Design of Biologically Reversible Drug Derivatives: Prodrugs, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 77-79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70-72.
- 41 C. Meier; *cycloSal*-Pronucleotides – Design of Chemical Trojan Horses, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2002**, *2*, 219-234.
- 42 C. Meier, L.W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq; 5',5'-Di-O-nucleosyl-O'-benzylphosphotriesters as Potential Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate, *Liebigs Ann.* **1995**, 2203-2208.
- 43 S.N. Farrow, A.S. Jones, A. Kumar, R.T. Walker, J. Balzarini, E. De Clercq; Synthesis and Biological Properties of Novel Phosphotriesters: A New Approach to the Introduction of Biologically Active Nucleotides into Cells, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1400-1406.
- 44 J.T. Renze; Untersuchungen und mechanistische Interpretation zum Hydrolyseverhalten Benzyl-funktionalisierter *cycloSal*-Nucleotide, *Dissertation* **2002**, Universität Hamburg.
- 45 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.
- 46 C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; ADA-Bypass by lipophilic *cycloSal*-ddAMP Pro-Nucleotides – A second Example of the Efficiency of the *cycloSal*-Concept, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1577-1582.
- 47 C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; *CycloSal*-Pronucleotides of 2',3'-dideoxyadenosine and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydroadenosine: Synthesis and Antiviral Evaluation of a Highly Efficient Nucleotide Delivery System, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1604-1614.
- 48 C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini; Nucleotide Delivery from *cycloSal*igenyl-3'-azido-3'-dideoxythymidine Monophosphates (*cycloSal*-AZTMP), *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *16*, 793-796.

- 49 B. Gröschel, C. Meier, R. Zehner, J. Cinatl, H.W. Doerr, J. Cinatl Jr.; Effects of *cycloSal*-d4TMP Derivatives in H9 Cells with Induced AZT Resistance Phenotype, *Nucl. & Nucl.* **1999**, *18*, 933-936.
- 50 A. Lomp; Design, Synthese und Eigenschaften neuer antiviral aktiver Nucleotid Prodrugs, *Dissertation* **2002**, Universität Hamburg.
- 51 C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler; *cycloSal*-BVDUMP Pronucleotides – from an Antivirally Inactive Nucleoside Analogue to a Potential anti-EBV Active Drug, *Chem. Bio. Chem.* **2001**, *2*, 283-285.
- 52 M. Ruppel; Arbeiten zum „lock-in“-Mechanismus von *cycloSal*-Pronukleotiden, *Diplomarbeit* **1998**, Universität Würzburg.
- 53 J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier, *CycloSaligenyl*-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate: Efficient Intracellular Delivery of d4TMP, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 928-935.
- 54 M.E. Hawkins, W. Pfeleiderer, F.M. Balis, D. Porter, J.R. Knutson; Fluorescent Properties of Pteridine Nucleoside Analogs in Monomers and Incorporation into Oligonucleotides, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 68-95.
- 55 R. Keller, J.M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer; Analytical Chemistry, *Wiley VCH Weinheim* **1998**, 421.
- 56 A. Holmen, B.N. Bo Albinsson; Electronic Transition Dipole Moments of the 1,N⁶-Ethenoadenine Chromophore, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 13460-13469.
- 57 G.A. Bhat, L.B. Townsend; Synthesis of Certain Fluorescent Tricyclic Nucleosides Derived from Pyrazolo[3,4-*d*]Pyrimidine Nucleosides, *J. C. S. Perkin I* **1981**, 2389.
- 58 L.M. Wilhelmsson, A. Holmen, P. Lincoln, P.E. Nielsen, B. Norden; A Highly Fluorescent DNA Base Analogue that Forms Watson-Crick Base Pairs with Guanine, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2434-2435.
- 59 T.M. Nordlund, S. Nielsson, R. Rigler; Structure and Dynamic of a Fluorescent Oligomer Containing the Eco RI Recognition Sequence: Fluorescence, Molecular Dynamics, and NMR Studies, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9095-9103.
- 60 K.-Y. Lin, R.J. Jones, M. Matteucci; Tricyclic 2'-Deoxycytidine Analogues: Synthesis and Incorporation into Oligodeoxynucleosides Which Have Enhan-

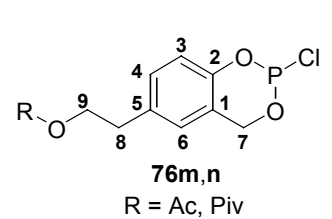
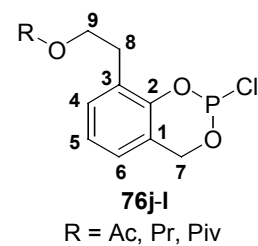
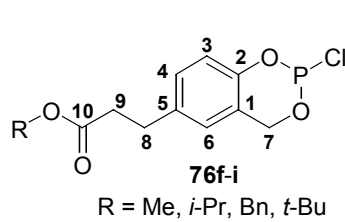
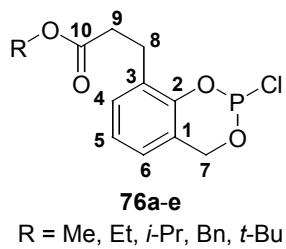
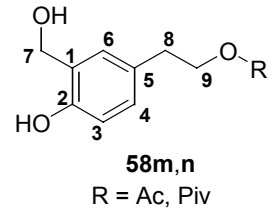
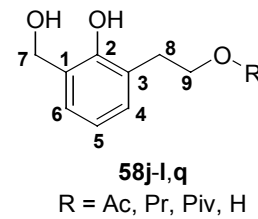
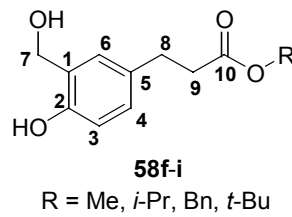
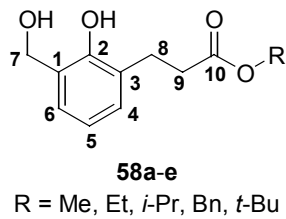
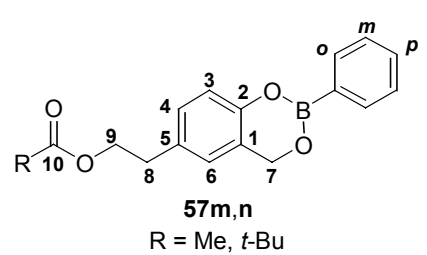
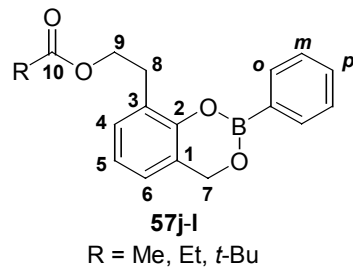
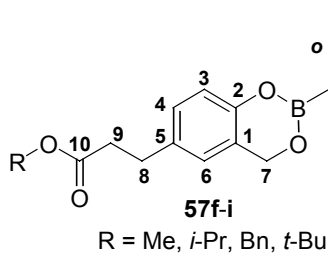
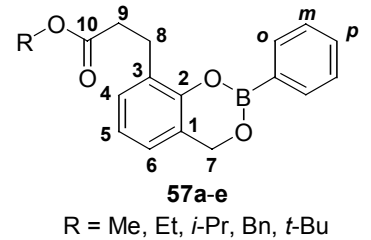
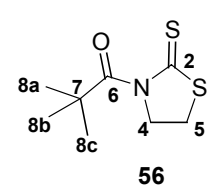
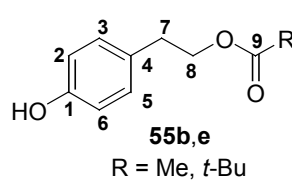
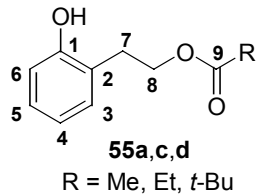
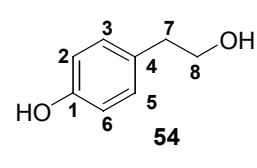
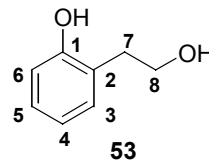
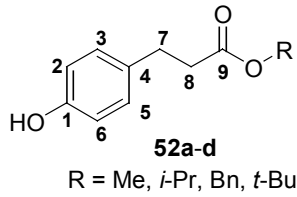
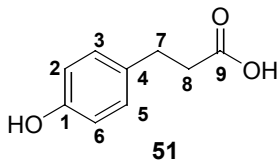
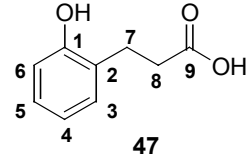
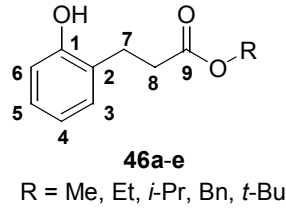
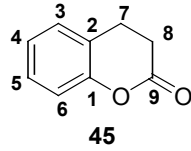
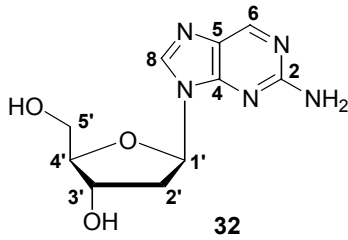
- ced Binding to Complementary RNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874.
- 61 F. Seela, Y. Chen, U. Binding, Z. Kazimierczuk; Synthesis of 2'-Deoxyisoinosine and Related 2'-Deoxyribonucleosides, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 194.
- 62 A. Holmen, B. Norden, B. Albinsson; Electronic Transition Moments of 2-Aminopurine, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3114-3121.
- 63 D.C. Ward, E. Reich, L. Stryer; Fluorescence Studies of Nucleotides and Polynucleotides, *J. Biol. Chem.* **1969**, *224*, 1228-1237.
- 64 M. Lorey; *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphat, ein neues Pro-Nucleotid-Konzept für antiviral und antitumor aktive Nucleosidanaloga, *Dissertation* **1999**, Universität Würzburg.
- 65 C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; *Cyclo*Sal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cyclo*Sal-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- 66 A. Blade-Font, T. de Mas Rocabayera; Synthesis of Dihydrobenzofurans from Phenolic Mannich Bases and Their Quarternized Derivatives, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1982**, 841-848.
- 67 L. Chung-hsi, Y. Yuen-hwa, L. Yao, L. Yong-jun, C. Ai-hsueh, H. Chi-yi; 3-Aminoacyl-Tetrahydrothiazole-2-Thione as an Active Amide for Peptide Synthesis (I), *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3467-3470.
- 68 S. Carrington, A.H. Fairlamb, I.S. Blagbrough; Macrocyclic polyamine lactam synthesis by diphenyl ether closure of 23-,24- and 28-membered rings, *Chem. Commun.* **1998**, 2335-2336.
- 69 D.G. Doherty; The Hydrolysis of Carbon-Carbon Bonds by α -Chymotrypsin, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4887-4891.
- 70 A.J. Pearson, P. Zhang, K. Lee; Application of Arene-Ruthenium Chemistry to a Formal Total Synthesis of OF 4949 III, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6581-6586.
- 71 H. Brechbühler H. Büchi, E. Hatz, J. Schreiber, A. Eschenmoser; Die Reaktion von Carbonsäuren mit Acetalen des *N,N*-Dimethylformamids: eine Veresterungsmethode, *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1746-1771.

- ⁷² I. Wengatz, D.W. Stoutamire, S.J. Gee, B.D. Hammock; Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Pyrethroid Insecticide Fenprothrin, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2211-2221.
- ⁷³ S.B. Garber, J.S. Kingsbury, B.L. Gray, A.H. Hoveyda; Efficient and Recyclable Monomeric and Dendritic Ru-Based Metathesis Catalysts, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179.
- ⁷⁴ G.W. Breton; Selective Monoacetylation of Unsymmetrical Diols Catalysed by Silica Gel-Supported Sodium Hydrogen Sulfate, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8952-8954.
- ⁷⁵ S. Yamada, T. Sugaki, K. Matsuzaki; Twisted Amides as Selective Acylating Agents for Hydroxyl Groups under Neutral Conditions: Models for Activated Peptides during Enzymatic Acyl Transfer Reaction, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5932-5938.
- ⁷⁶ A. Vilsmeier, A. Haack; Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylamino-benzaldehyde, *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 119-122.
- ⁷⁷ H. Gross, A. Rieche, G. Matthey; Neue Verfahren zur Darstellung von Phenolaldehyden, *Chem. Ber.* **1962**, *96*, 308-313.
- ⁷⁸ G. Casiraghi, G. Casnati, G. Paglia, G. Sartori, G. Terenghi; Selective Reactions between Phenols and Formaldehyd. A Novel Route to Salicylaldehyds, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1980**, 1862-1865.
- ⁷⁹ W. Nagata, K. Okada, T. Aoki; *ortho*-Specific α -Hydroxyalkylation of Phenols with Aldehyds. An Efficient Synthesis of Saligenol Derivatives, *Synthesis* **1979**, 365-368.
- ⁸⁰ C.I. Hong, A.J. Kirisits, A. Nechaev, D.J. Buchheit, C.R. West; Nucleoside Conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(beta-D arabinofuranosyl) cytosine conjugates of corticosteroides, *J. Chem. Med.* **1980**, *23*, 1343-1347.
- ⁸¹ C. Ducho; Aryl-substituierte und Benzo-anellierte *cycloSal*-Nucleotide, *Diplomarbeit* **2001**, Universität Hamburg.
- ⁸² K. Murakami, T. Shirasaka, H. Yoshioka, E. Kojima, S. Aoki, H. Ford, J.S. Driscoll, J.A. Kelley, H. Mitsuya; *Escherichia coli* Mediated Biosynthesis and in

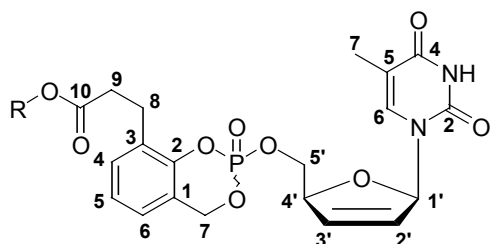
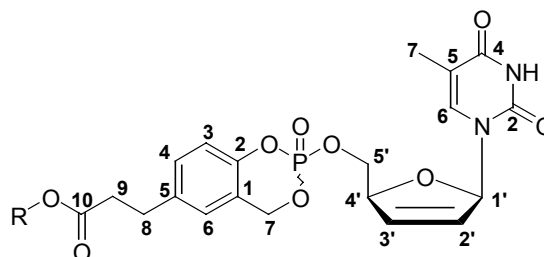
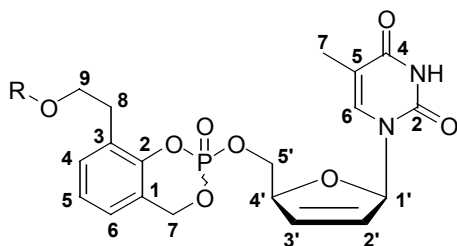
- Vitro Anti-HIV Activity of Lipophilic 6-Halo-2',3'-dideoxypurine Nucleosides, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1606-1612.
- 83 B.A. Watkins, H.A. Dorn, W.B. Kelly, R.C. Armstrong, B.J. Potts, F. Michaels, C.V. Kuffa, M. Dubois-Dalco; Specific Tropism of HIV-1 for Microglial Cells in Primary Human Brain Cultures, *Science* **1990**, *249*, 549.
- 84 P.-P. Kung, R.A. Jones; One-Flask Synthesis of 6-Thioguanosine and 2'-Deoxy-6-Thioguanosine, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3919-3922.
- 85 Y.-Z. Xu, Q. Zheng, P.F. Swann; Simple Synthesis of 4-Thiothymidine, 4-Thiouridine and 6-Thio-2'-deoxyguanosine, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2817-2820.
- 86 B. L. Gaffney, L.A. Marky, R.A. Jones; The Influence of the Purine 2-Amino Group on DNA Conformation and Stability-II, *Tetrahedron* **1984**; *40*, 3-13.
- 87 W.A. Denny, W. Leupin, D.R. Kearns; Simplified Liquid-Phase Preparation of Four Decadeoxyribonucleotides and their Preliminary Spectroscopic Characterization, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2372-2393.
- 88 J.J. Fox, I. Wempen, A. Hampton, I.L. Doerr; Thiation of Nucleosides. I. Synthesis of 2-Amino-6-mercapto-9- β -D-ribofuranosylpurine („Thioguanosine“) and Related Purine Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1669-1675.
- 89 E.J. Prisbe, J.C. Martin; A Novel and Efficient Preparation of 2',3'-Dideoxynucleosides, *Synth. Comm.* **1985**, *15*, 401-409.
- 90 D.H.R. Barton, S.W. McCombie;, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1975**, 1574.
- 91 A. Liguori, E. Perri, G. Sindona, N. Uccella; Chemo- and Regioselective Acylation of Deoxyribonucleosides by Means of *N,N*-Bis-(2-oxo-oxazolidin-3-yl) Phosphorodiammidic Chlorid (BOPDC), *Tetrahedron* **1988**, *44*, 229-234.
- 92 T. Knispel; *CycloSaligenyl*-(2'-fluor-*ara*)-2',3'-didesoxyadenosinmonophosphat (*cycloSal*-(F)ddAMP) – effiziente Pro-Nucleotide zum ADA-Bypass, *Diplomarbeit* **1997**, Universität Frankfurt/Main.
- 93 G.J. Friis, H. Bungaard; Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic α -acyloxyalkyl ester derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1996**, *4*, 49-59.
- 94 W. Junge, E. Heymann, K. Kritsch, H. Hollandt; Human Liver Carboxyesterase, *J. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 749-763.

- ⁹⁵ E.J. Toone, M.J. Werth, J.B. Jones; Active-Site Model for Interpreting and Predicting the Specificity of Pig Liver Esterase, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4946-4952.
- ⁹⁶ L. Provencher, H. Wynn, J.B. Jones, A.R. Krawczyk; Enzymes in Organic Synthesis 51. Probing the Dimensions of the Large Hydrophobic Pocket of the Active Site of Pig Liver Esterase, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, Vol. 4, 9, 2025-2040.
- ⁹⁷ P. Mohr, N. Waespe-Šarcevic, C. Tamm; A Study of Stereoselective Hydrolysis of Symmetrical Diesters with Pig Liver Esterase, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *249*, 2501-2511.
- ⁹⁸ L.K.P. Lam, J.B. Jones; Enzymes in Organic Synthesis. 43. Investigation of the Preferred Orientations of Ester Groups in Pig Liver Esterase Catalyzed Hydrolyses Using Conformationally Rigid Substrates, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2637-2639.
- ⁹⁹ A.Q. Siddiqui, C. Ballatore, C. McGuigan, E. De Clercq, J. Balzarini; The Presence of Substituents on the Aryl Moiety of the Aryl Phosphoramidate Derivative of d4T Enhances Anti-HIV Efficacy in Cell Culture: A Structure-Activity Relationship, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 393-399.
- ¹⁰⁰ C. McGuigan, H-W. Tsang, P.W. Sutton, E. De Clercq, J. Balzarini; Synthesis and anti-HIV activity of some novel chain-extended phosphoamidate derivatives of d4T (stavudine): esterase hydrolysis as a rapid predictive test for antiviral potency, *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 109-115.
- ¹⁰¹ W.R. Chappell, J. Mordenti; Extrapolation of toxicological and pharmacological data from animals to humans, *Adv. Drug Res.* **1991**, *20*, 1-116.
- ¹⁰² D.B. Campbell; Extrapolation from animals to man. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1996**, *801*, 116-135.
- ¹⁰³ Q. Zhou, K.D. Turnbull; Quinone Methide Phosphodiester Alkylations under Aqueous Conditions, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7072-7077.
- ¹⁰⁴ P.D. Senter, K.S. Beam, B. Mixan, A.F. Wahl; Identification and Activities of Human Carboxylesterases for the Activation of CPT-11, a Clinically Approved Anticancer Drug, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 1074-1080.

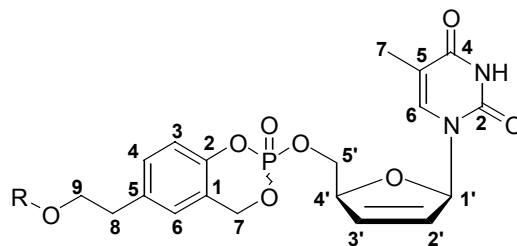
Ausklapptafel 1



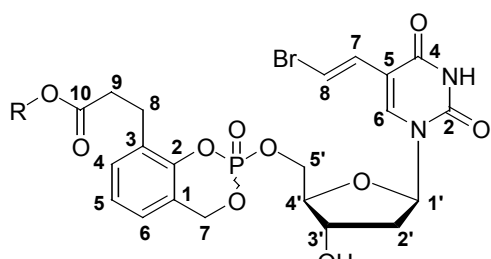
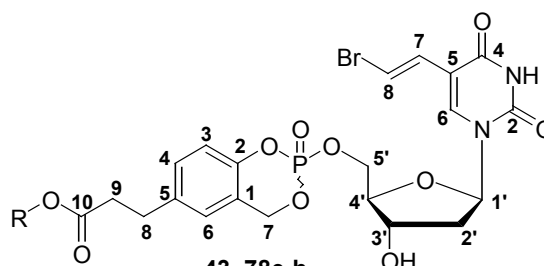
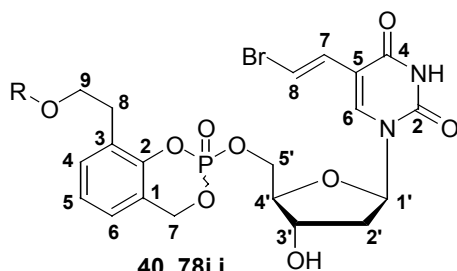
Ausklapptafel 2

**27, 77a-e**R = H, Me, Et, *i*-Pr, Bn, *t*-Bu**41, 77f-i**R = H, Me, *i*-Pr, Bn, *t*-Bu**38, 77j-l**

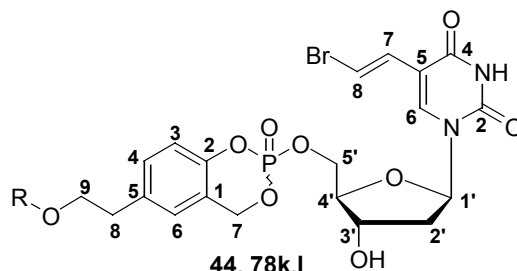
R = H, Ac, Pr, Piv

**42, 77m,n**

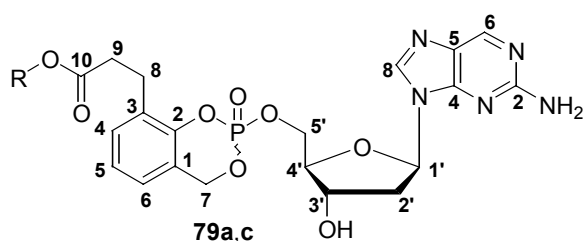
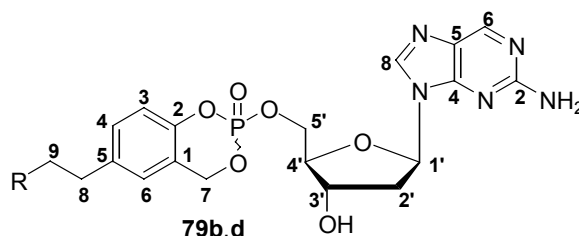
R = H, Ac, Piv

**39, 78a-d**R = H, Me, *i*-Pr, Bn, *t*-Bu**43, 78e-h**R = H, Me, *i*-Pr, Bn, *t*-Bu**40, 78i,j**

R = H, Ac, Piv

**44, 78k,l**

R = H, Ac, Piv

**79a,c**R = *i*-Pr, *t*-Bu**79b,d**

R = BnO(CO), PivO

Lebenslauf

Persönliche Daten

Manuel Ruppel

20.11.1969 Geburtsdatum

Bensheim Geburtsort

Schulbildung

1977 – 1981 Nikolaus-Fey-Verbandsschule Wiesentheid

1981 – 1990 Landschulheim Wiesentheid

Juni 1990 Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst

Juli 1990 – Juni 1991 3. Feldartilleriebatallion Schwalmstadt

Hochschulausbildung

Nov. 1991 – Juni 1998 Studium der Chemie an der Universität Würzburg

März 1994 Vordiplom mit der Gesamtnote gut

Sept. 1997 – Juni 1998 Diplomarbeit: „Arbeiten zum „lock-in“-Mechanismus von *cycloSal*-Pronucleotiden“

Juni 1998 Abschluß der Diplomprüfung mit der Gesamtnote gut

Sept. 1998 Beginn der Promotion bei Prof. C. Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg

März 1999 Wechsel mit Prof. C. Meier an das Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg

Berufstätigkeit

Aug. 1994 – Okt. 1994 Aushilfsarbeit im Versand der Firma Paulig
Teppichweberei GmbH in Kitzingen

März 1999 – Mai 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg
Die Tätigkeit umfaßte u. a. die theoretische und praktische Ausbildung von Biologie-Studenten in organischer Chemie

Soziales Engagement

Seit 1989 parteipolitische Aktivität
1993 – 1994 Mitglied im Vorstand des Kinderdorf Geesdorf e. V.
1993 – 1999 Betreuung eines autistischen Pflegebruders im Rahmen einer Wohngemeinschaft

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertationsarbeit „Synthese und Hydrolyseverhalten von „lock-in“-modifizierten *cyclo*Sal-Pronukleotiden“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, den